



Fakultät für Chemie

AMPylierungen im Kontext bakterieller Infektionen
am Beispiel des FIC-Proteins 2 aus *Coxiella burnetii*

Dorothea Maria Höpfner

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): Prof. Dr. Franz Hagn

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Aymelt Itzen
2. Prof. Dr. Matthias Feige
3. Prof. Dr. Hubert Hilbi

Die Dissertation wurde am 03.03.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.08.2021 angenommen.

Im März 2021 vorgelegt von
Dorothea Maria Höpfner
aus Wiesbaden
geboren am 11.07.1992

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2017 bis September 2018 an der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München sowie im Zeitraum von Oktober 2018 bis Dezember 2020 am Institut für Biochemie und Signaltransduktion des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Anleitung von Univ.-Prof. Dr. Aymelt Itzen durchgeführt. Sie wurde ab Februar 2018 durch ein Stipendium der Konrad-Adenauer-Stiftung unterstützt.

Im Rahmen dieser Arbeit ist folgende Veröffentlichung erschienen:

Höpfner, D., Fauser, J., Kaspers, M.S., Pett, C., Hedberg, C., Itzen, A., 2020. Monoclonal Anti-AMP Antibodies Are Sensitive and Valuable Tools for Detecting Patterns of AMPylation. *iScience* 23, 101800.

Eine weitere Arbeit befindet sich bei Nature Communications in Revision:

Fauser, J., Gulen, B., Pogenberg, V., Pett, C., Pourjafar-Dehkordi, D., Krisp, C., Höpfner, D., König, G., Schlüter, H., Feige, M. J., Zacharias, M., Hedberg, C., Itzen, A. Specificity of AMPylation of the human chaperone BiP is mediated by TPR motifs of FICD.

Abstract

Intracellular bacterial pathogens such as *Coxiella burnetii* have developed complex strategies to evade their host's immune response and to establish a replication-friendly niche within the cell by using secreted effector proteins to modify host cell signaling pathways to their advantage. One such class of effectors is represented by FIC enzymes that modify their target proteins via AMPylation as a post-translational modification. *C. burnetii* Fic 2 (CbFic2) is a unique representative of this class, which AMPylates histone H3 at Ser10 and Ser28 in a DNA-binding-dependent manner. However, the study of AMPylation is hampered by limited detection tools, especially in the medium-to-high throughput range.

Three monoclonal anti-AMP antibodies were generated and are described here, which are capable to detect AMPylation in denatured (WB) and native (ELISA, IP) applications, independent of protein backbone. Their ability to successfully detect AMPylation with high sensitivity and specificity even in complex cell lysates makes them suitable tools for target validation and identification. Based on these antibodies, studies on CbFic2 show that the enzyme is regulated *in vitro* by a complex interplay of DNA-binding and automodification: DNA-binding stimulates AMPylation of target proteins but inhibits autoAMPylation. In the absence of DNA, CbFic2 exhibits automodification at up to 5 residues, which in turn decreases its affinity for DNA. CbFic2 is shown to bind a minimal DNA fragment of 18 bp with nanomolar affinity regardless of GC content. This binding is - in addition to the C-terminal HTH domain - mediated in part by the N-terminus, the deletion of which completely inhibits CbFic2-induced AMPylation *in cellulo*. CbFic2 is also shown to have an ATP- and DNA-independent deAMPylation activity. Expression of an active CbFic2 mutant in HEK293 cells leads to a global downregulation of cellular kinase activity; in THP-1 derived macrophages CbFic2 expression leads to an enrichment of proteins related to mitosis and mRNA splicing, to a depletion of proteins related to immune response, as well as to AMPylation of the high mobility group protein HMG-I. Taken together, evidence suggests that CbFic2 modulates the NF- κ B-mediated immune response via AMPylation of histone H3 and HMG-I. In the course of this work, however, secretion of CbFic2 during avirulent, or histone H3 AMPylation in the time course of virulent *C. burnetii* infection of murine macrophages could not be confirmed.

Zusammenfassung

Intrazelluläre bakterielle Pathogene wie *Coxiella burnetii* haben komplexe Strategien entwickelt, um die Immunantwort ihres Wirtes zu umgehen und innerhalb der Zelle eine Replikationsfreundliche Nische zu etablieren, indem sie mittels sezernierter Effektor-Proteine die Signalwege der Wirtszelle zu ihrem Vorteil verändern. Eine solche Effektor-Protein Klasse wird durch FIC-Enzyme repräsentiert, welche ihre Zielproteine durch AMPylierung posttranslational modifizieren. Das *C. burnetii* Fic Protein 2 (CbFic2) ist ein spezieller Vertreter dieser Klasse, der in Abhängigkeit von DNA-Bindung Histon H3 an Ser10 und Ser28 AMPyliert. Die Studie der AMPylierung ist allerdings durch limitierte Detektionswerkzeuge, vor allem im mittleren bis hohen Durchsatzbereich, erschwert.

In dieser Arbeit wurden daher drei monoklonale anti-AMP-Antikörper generiert, welche in denaturierten (WB) sowie nativen (ELISA, IP) Anwendungen AMPylierung unabhängig vom Proteinrückgrat mit hoher Sensitivität und Spezifität selbst in komplexen Zelllysaten detektieren, und sich somit als Werkzeuge zur Target-Validierung und -Identifizierung eignen. Mittels dieser Antikörper zeigen Untersuchungen an CbFic2, dass das Enzym *in vitro* durch ein komplexes Zusammenspiel aus DNA-Bindung und Automodifikation reguliert wird: DNA-Bindung stimuliert AMPylierung an Zielproteinen, wohingegen AutoAMPylierung inhibiert wird. In Abwesenheit von DNA zeigt CbFic2 bis zu 5 AutoAMPylierungen, was wiederum die DNA-Affinität reduziert. CbFic2 bindet ein minimales DNA-Fragment von 18 bp, unabhängig vom GC-Gehalt, mit nanomolarer Affinität. Diese Bindung wird - neben der C-terminalen HTH-Domäne - in Teilen auch durch den N-Terminus vermittelt, dessen Deletion CbFic2-induzierte AMPylierung *in cellulo* vollständig inhibiert. Für CbFic2 kann außerdem eine ATP- und DNA-unabhängige DeAMPylierungsaktivität gezeigt werden. Die Expression einer aktiven CbFic2-Mutante in HEK293 Zellen induziert eine globale Herabregulierung zellulärer Kinaseaktivität; in THP-1 basierten Makrophagen führt CbFic2-Expression zur Anreicherung von Mitose- und mRNA Splicing-bezogenen Proteinen, zur Abreicherung Immunreaktion-bezogener Proteine sowie zur AMPylierung des *High mobility group* Proteins HMG-I. Zusammengenommen spricht vieles dafür, dass CbFic2 via AMPylierung von Histon H3 und HMG-I die NF- κ B vermittelte Immunreaktion moduliert. Im Verlauf dieser Arbeit konnte eine Sekretion von CbFic2 während der avirulenten oder Histon H3 AMPylierung im zeitlichen Verlauf der virulenten *C. burnetii*-Infektion muriner Makrophagen allerdings nicht nachgewiesen werden.

Inhalt

Abstract	i
Zusammenfassung	iii
Inhalt.....	v
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Infektionsstrategien intrazellulärer Pathogene	1
1.1.1 Reaktion des innate Immunsystems auf bakterielle Pathogene	1
1.1.2 Verteidigungsstrategien intrazellulärer Pathogene	3
1.1.3 Das intrazelluläre Pathogen <i>Coxiella burnetii</i>	5
1.2 Die posttranslationale Modifikation AMPylierung	6
1.2.1 Die Klasse der FIC-Proteine	7
1.2.2 Die Rolle des <i>C. burnetii</i> Fic Protein 2 (CbFic2)	10
1.3 Nachweismethoden der AMPylierung ¹	11
1.3.1 ATP-Analoga.....	11
1.3.2 anti-AMP-Antikörper	12
2 Zielsetzung	15
3 Ergebnisse.....	17
3.1 Entwicklung und Charakterisierung muriner monoklonaler anti-AMP-Antikörper ¹	17
3.1.1 Peptiddesign und Selektionsstrategie	18
3.1.2 Generierte anti-AMP-Antikörper sind hochspezifisch für AMPylierung.....	20
3.1.3 anti-AMP-Antikörper unterscheiden zwischen AMPylierung und MARYlierung .	24
3.1.4 Generierte anti-AMP-Antikörper erkennen zelluläre AMPylierung	26
3.2 Studie der AMPylierungsaktivität und DNA-Bindung von CbFic2 im Kontext der <i>C. burnetii</i> -Infektion	31
3.2.1 AMPylierungsmuster während <i>C. burnetii</i> -Infektion.....	31
3.2.2 Zelluläre AMPylierung nach transienter CbFic2 Überexpression.....	33
3.2.3 Hochsalzpuffer erhöhen die Löslichkeit und Stabilität von CbFic2.....	37
3.2.4 Hochaffine DNA-Bindung stabilisiert CbFic2 und induziert seine Aktivität.....	40

3.2.5	DNA-Bindung verringert Automodifikation von CbFic2 <i>in vitro</i>	44
3.2.6	CbFic2 WT besitzt DeAMPylierungsaktivität	47
3.2.7	CbFic2 Aktivität bewirkt eine Herabregulation der zellulären Kinaseaktivität	50
3.2.8	CbFic2 modifiziert distinkte Targets in Makrophagen	53
3.2.9	CbFic2 AMPyliert HMG-I und unterdrückt die Immunantwort der Zelle.....	56
4	Diskussion.....	63
4.1	Nachweis der AMPylierung durch monoklonale Antikörper ¹	63
4.2	Regulation der Aktivität von CbFic2 durch Automodifikation und DNA-Bindung.....	65
4.3	Physiologische Konsequenzen der CbFic2 Aktivität.....	69
4.4	Die Rolle von CbFic2 in Mitose und mRNA Splicing	72
4.5	Modulation des NF-κB Signalwegs durch CbFic2	75
4.6	Immunmodulation im Kontext der <i>C. burnetii</i> Infektion.....	77
5	Ausblick	79
6	Material und Methoden.....	81
6.1	Molekularbiologische Methoden	81
6.1.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	81
6.1.2	T4-SLIC Klonierung.....	81
6.1.3	Ortsspezifische Mutagenese.....	82
6.1.4	Analytischer Restriktionsverdau	82
6.1.5	Transformation.....	82
6.1.6	Mini und Midi Präparation von Plasmiden	83
6.1.7	Sanger-Sequenzierung	83
6.2	Zellbiologische Methoden.....	85
6.2.1	Zellkultur.....	85
6.2.2	Transiente Transfektion von HEK293 Zellen mit Lipofectamin	85
6.2.3	Zellstress/Stimulation.....	86
6.2.4	Generierung von stabilen THP-1-Zelllinien.....	87
6.2.5	Differenzierung von THP-1-Zellen.....	88
6.2.6	Expression von CbFic2 in stabilen THP-1 Makrophagen.....	89

6.2.7	Zellyse	89
6.2.8	Acide Histonextraktion.....	89
6.2.9	Immunpräzipitation	90
6.2.10	Immunfluoreszenz	91
6.3	Proteinchemische Methoden.....	92
6.3.1	Rekombinante Expression	92
6.3.2	Bakterielle Zellyse.....	93
6.3.3	NiNTA-Affinitätschromatographie	93
6.3.4	Glutathion-Affinitätschromatographie	94
6.3.5	TEV-Protease-Spaltung.....	94
6.3.6	Präparative Größenausschlusschromatographie	95
6.4	Allgemeine analytische Methoden	95
6.4.1	Bestimmung der Protein- und DNA-Konzentration	95
6.4.2	SDS PAGE Analyse	95
6.4.3	Western Blot Analyse.....	97
6.4.4	Massenspektrometrische Analyse von gereinigten Proteinen	98
6.5	CbFic2-spezifische Methoden	98
6.5.1	Hybridisierung von Oligonukleotiden	98
6.5.2	LC-MS/MS Analyse der anti-AMP IP	99
6.5.3	<i>Kinase activity profiling</i>	99
6.5.4	CbFic2 AutoAMPylierungsassay mittels WB	99
6.5.5	CbFic2 AutoAMPylierungsassay mittels MS.....	100
6.5.6	TS-H3 1-36 aa AMPylierungsassay mittels MS.....	100
6.5.7	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i>	101
6.5.8	Fluoreszenzanisotropie	102
6.5.9	Enzymgebundener Immunsorbent Assay (ELISA)	103
6.5.10	<i>Thermal Shift Assay (TSA)</i>	103
6.6	anti-AMP-Antikörper spezifische Methoden ¹	104
6.6.1	Festphasenpeptidsynthese (SPPS)	104

6.6.2	Präparation des Immunogens (GenScript)	105
6.6.3	Phase I: Immunisierung (GenScript).....	105
6.6.4	Phase II: Zellfusion und Screening (GenScript)	106
6.6.5	Phase III: Subklonierung, Screening, Expansion (GenScript)	106
6.6.6	Sequenzierung der variablen Antikörper-Domäne (GenScript).....	107
6.6.7	anti-AMP-Antikörper-Produktion (GenScript).....	107
6.6.8	<i>In vitro</i> Modifikation rekombinanter Proteine für WB-Analysen.....	107
6.6.9	Analytische Größenausschlusschromatographie (aSEC)	108
7	Literaturverzeichnis	109
8	Anhang.....	129
8.1	Ergänzende Daten zu monoklonalen anti-AMP-Antikörpern ¹	129
8.1.1	Peptidsynthese.....	129
8.1.2	Antikörper-Generierung und –Selektion gegen native Epitope ¹	131
8.1.3	Antikörper-Sequenzen der variablen Domäne	133
8.1.4	Antikörpercharakterisierung	136
8.1.5	AMPylierungsmuster in Zelllysaten	137
8.2	Ergänzende Daten zu CbFic2.....	139
8.2.1	<i>in vitro</i> Analysen.....	139
8.2.2	<i>Kinase activity profiling</i>	143
8.2.3	stabile THP-1 Zelllinien.....	146
8.2.4	LC-MS/MS Analyse der anti-AMP-IP.....	147
8.2.5	Domänen- und Sekundärstruktur-Vorhersage von CbFic2.....	148
8.2.6	Sekretion von Coxielleneffektoren	149
	Abbildungsverzeichnis.....	151
	Tabellenverzeichnis	153
	Eidesstattliche Erklärung	155
	Danksagung.....	157

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure (engl.: <i>amino acid</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	ADP-Ribose
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAM	β -Lactamase-Translokations-Assay
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumine</i>)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHX	Cycloheximid
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (engl.: <i>collision-induced dissociation</i>)
CMP	Cytidinmonophosphat
ctrl	Kontrolle (engl.: <i>control</i>)
Da (kDa)	Dalton (kilo Dalton)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	(engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>)
DrrA	(engl.: <i>Defects in Rab1 recruitment protein A</i>)
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
DUF	(engl.: <i>domain of unknown function</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzymgebundener Immunsorbent Assay (engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMSA	(engl.: <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)
ER	endoplasmatisches Retikulum
FIC	(engl.: <i>Filamentation induced by cyclic AMP</i>)
FITC	5'-Fluorescein-Isothiocyanat
FL	Volllänge (engl.: <i>full length</i>)
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GFP	(engl.: <i>green fluorescent protein</i>)
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guaninnukleotid Triphosphatase

HC	schwere Kette (engl.: <i>heavy chain</i>)
HEK	(engl.: <i>human embryonic kidney</i>)
HEPES	(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPLC	(engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
HTH	Helix-Turn-Helix
ID	(engl.: <i>identifier</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -dithiogalactopyranosid
KLH	Schlitzschnecken-Hämocyanin (engl.: <i>keyhole limpet hemocyanin</i>)
LB	(engl.: <i>Lysogeny broth</i>)
LC	leichte Kette (engl.: <i>light chain</i>)
LC-MS	(engl.: <i>liquid chromatography mass spectrometry</i>)
LCV	große Zellvariante (engl.: <i>large cell variant</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
MBP	Maltose-bindendes Protein
MOI	Multiplizität der Infektion (engl.: <i>multiplicity of infection</i>)
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (engl.: <i>molecular weight</i>)
N6pATP	N6-Propargyl-ATP
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NEB	New England BioLabs
NMPylierung	Nukleotid-Monophosphorylierung
NTA	(engl.: <i>nitrilotriacetic acid</i>)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl.: <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PEI	Polyethylenimin
pI	isoelektrischer Punkt
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPI	Phosphataseinhibitoren
PTM	Posttranslationale Modifikation
PRR	Muster-Erkennungsrezeptor (engl.: <i>pattern-recognition receptor</i>)
Rab	(engl.: <i>Ras-related in brain</i>)
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	(engl.: <i>rounds per minute</i>)
SDS	Natrium Dodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl.: <i>size exclusion chromatography</i>)
β -Me	β -Mercaptoethanol
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEV	Tobacco Etch Virus
TG	Thapsigargin
TMP	Thymidin-5'-monophosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSA	(engl.: <i>Thermal Shift Assay</i>)
UMP	Uridinmonophosphat
WB	Western Blot
WT	Wild Typ

Proteinogene Aminosäuren wurden nach dem üblichen Dreibuchstaben- oder Einbuchstabencode angegeben. Alle Einheiten wurden, sofern möglich, im Internationalen Größen- und Einheitensystem angegeben.

1 Einleitung

1.1 Infektionsstrategien intrazellulärer Pathogene

Die Interaktion zwischen bakteriellen Pathogenen und ihren Wirtsorganismen basiert auf einem komplexen Zusammenspiel aus ausgeklügelten Infektionsstrategien einerseits und der Immunantwort andererseits, dessen Gleichgewicht ultimativ über den Erfolg des Infektionsverlaufs entscheidet. Besonders intrazelluläre Bakterien, welche sich oft in der unwirtlichen Umgebung innerhalb von Makrophagen replizieren, haben beeindruckende Mechanismen entwickelt, die Abwehrreaktion des Wirtes zu umgehen und eine intrazelluläre Nische zu erschaffen, in der sie sich geschützt replizieren können (Thi et al., 2012).

1.1.1 Reaktion des innate Immunsystems auf bakterielle Pathogene

Zellen des innate Immunsystems erkennen bakterielle Pathogene über extra- und intrazelluläre Stimuli und leiten die Immunantwort ein, welche den Organismus vor Infektionen schützt. Makrophagen sind als Phagozyten Zellen des Immunsystems, welche darauf spezialisiert sind, Pathogene zu erkennen, diese via Phagozytose als Beute aufzunehmen, zu verdauen und eine Immunantwort auszubilden (Weiss and Schaible, 2015). Sie exprimieren Muster-Erkennungsrezeptoren (PRR, engl.: *pattern-recognition receptor*), zu denen auch Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören, welche Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, engl.: *pathogen-associated molecular patterns*) spezifisch erkennen und als Reaktion eine proinflammatorische Signalkaskade auslösen (Cao, 2016). Ein solches PAMP stellt Lipopolysaccharid (LPS) dar, der essentielle Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien.

LPS wird spezifisch durch den Rezeptor TLR4 erkannt (Poltorak et al., 1998), welcher sich auf der Zelloberfläche von Immunzellen wie Makrophagen befindet. Die Bindung von LPS an TLR4 resultiert in einer Signalkaskade, die unter anderem die Aktivierung der proinflammatorischen Schlüsselsignalwege *nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells* (NF- κ B) und Mitogen-aktivierter Protein Kinasen (MAP Kinasen) über die Phosphorylierung von I κ B Kinase Komplex (IKK- $\alpha/\beta/\gamma$) und MAP Kinase Kinase 6 (MKK6) bewirkt (Akira et al., 2006). Die NF- κ B Familie besteht aus den Untereinheiten NF- κ B1(p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB und cRel, welche sich zu verschiedenen Homo- und Heterodimeren zusammenschließen, um so als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl zellulärer Prozesse zu regulieren (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). Sie liegen normalerweise durch Interaktion mit Vertretern der *inhibitor of NF- κ B* (I κ B) Familie, welche die nukleären Lokalisations-Domänen der NF- κ B Untereinheiten abschirmen, inaktiv im Cytoplasma vor. Der aktivierte I κ B Kinase Komplex phosphoryliert I κ B, welcher in der Folge proteasomal abgebaut wird. Die dadurch freigegebenen nukleären Lokalisationsdomänen des NF- κ B-Dimers bewirken anschließend die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Nukleus

und die Aktivierung NF- κ B induzierter Gene (Akira et al., 2006; Rahman and McFadden, 2011). Zusätzlich akkumuliert phosphoryliertes IKK- α im Nukleus und aktiviert dort die NF- κ B regulierte Genexpression im Zusammenspiel mit dem CREB-bindenden Protein (CBP) und der NF- κ B Untereinheit RelA durch Phosphorylierung von Histon H3 an Position Ser10 der zugehörigen Promotorregionen (Anest et al., 2003). Der Phosphorylierung folgt die Histon H3 Acetylierung an Lys14 durch CBP (Yamamoto et al., 2003), mit anschließender Induktion inflammatorischer Gene, Interferon- β (IFN- β) und IFN-induzierbarer Gene (Akira et al., 2006).

Zeitgleich induziert die LPS-Erkennung durch TLR4 eine Polymerisierung von Aktinfilamenten, sodass sich die Zellmembran des Makrophagen ausstülpt und in der sogenannten Phagozytose das bakterielle Pathogen endocytotisch umschließt und innerhalb des geschaffenen Phagosoms in die Zelle aufnimmt (Weiss and Schaible, 2015). Im Rahmen seiner Reifung fusioniert dieses Phagosom innerhalb des zunehmend aciden endocytotischen Signalwegs mit Endosomen (pH 6,5) und später mit Lysosomen (pH 5,5), um den Eindringling final im Phagolysosom (pH 4,5) chemisch und enzymatisch abzubauen (Weiss and Schaible, 2015). Orchestriert wird dieser Prozess durch eine große Anzahl von Wirtsproteinen, welche den vesikulären Transport zum Phagosom und die Vesikelfusion steuern (Weiss and Schaible, 2015). Dazu zählen die Motorproteine Dynein und Dynactin, welche die Vesikel in räumliche Nähe bringen, *N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE) Proteine, welche die Vesikelfusion steuern, und kleine *Ras-related in brain* (Rab) Guaninnukleotid Triphosphatasen (GTPasen) wie Rab5 und Rab7, welche assoziiert mit charakteristischen Reifungsstadien - die Energie zur Fusion bereitstellen (Hoffmann et al., 2014; Weiss and Schaible, 2015). Die Art des initialen Stimulus und damit der Typ des aktivierten PRRs ist dabei entscheidend für den genauen Ablauf und die Geschwindigkeit der Phagozytose (Weiss and Schaible, 2015).

Die Sekretion proinflammatorischer Cytokine durch Makrophagen nach Pathogenkontakt bewirkt die T-Zell-Aktivierung, welche wiederum über Interferon- γ (IFN- γ) Sekretion Makrophagen aktiviert und zur Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) Sekretion anregt. Diese Makrophagenaktivierung stattet die Zelle mit weiteren antibakteriellen Fähigkeiten aus, wie der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies, oder den Abbau ganzer Organellen durch Makro-Autophagie (Weiss and Schaible, 2015).

Zusätzlich zur extrazellulären LPS-Erkennung kann auch ein intrazellulärer Pathogenstimulus - wie cytosolische doppelsträngige DNA oder die bakterielle Modifikation kleiner GTPasen - durch Bindung an PRRs wie AIM2 (Lugrin and Martinon, 2018) oder Pypin (Heilig and Broz, 2018) via Aktivierung von Caspase-1 einen Immunmechanismus namens Pyroptose in Makrophagen auslösen: IL-1 β liegt in Makrophagen als inaktives pro-IL-1 β Vorläuferprotein vor (Matsushima et al., 1986; Mosley et al., 1987), bevor es von Caspase-1 (Thornberry et al., 1992) im Rahmen des Inflammosoms (Martinon et al., 2002) proteolytisch zum aktiven IL-1 β gespalten und sekretiert wird (Brough and Rothwell, 2007). IL-1 β Sekretion geht einher mit einer Caspase-1 gesteuerten

Membranpermeabilisierung (Fink and Cookson, 2006; Liu et al., 2016), die ultimativ zum Pathogen-induzierten gesteuerten inflammatorischen Zelltod, der Pyroptose, führt (Brennan and Cookson, 2000). Die Unterdrückung von IL-1 β -Translation oder -Sekretion ist demnach ein notwendiger Mechanismus zur erfolgreichen Etablierung der intrazellulären Replikation bakterieller Pathogene.

1.1.2 Verteidigungsstrategien intrazellulärer Pathogene

Die Vermeidung oder Unterdrückung der Immunantwort des Wirtes ist eine grundlegende Infektionsstrategie intrazellulärer bakterieller Pathogene. Aufgrund der zentralen Rolle, welche der NF- κ B Signalweg in der Erkennung und Abwehr von Infektionen einnimmt, ist er der wohl am häufigsten angegriffene Signalweg in dieser Immunmodulation (Finlay and McFadden, 2006).

Intrazelluläre Bakterien manipulieren den Vorgang der Phagozytose durch Injektion pathogener Faktoren in die Wirtszelle, sogenannter Effektoren oder Virulenzfaktoren, die grundlegende intrazelluläre Signalwege im Wirt zum Ziel haben und auf vielfältige Art und Weise normale zelluläre Funktionen umleiten (Urbanus et al., 2016).

Je nach Art und Effektorspektrum des intrazellulären Pathogens kann die phagozytische Reifung in unterschiedlichen Stadien unterbrochen, und das Kompartiment stattdessen zu einer Replikationsfreundlichen Vakuole umstrukturiert werden.

Effektoren sind hochspezialisierte Proteine, welche über ein Sekretionssystem des Pathogens in das Zytosol der Wirtszelle ausgeschleust werden. Gramnegative Bakterien wie *Legionella* und *Coxiella* bilden spezialisierte Typ 4B Sekretionssysteme (T4BSS), welche beide Membranen und den periplasmatischen Raum der gramnegativen Zellwand durchspannen und eine Pore in die Wirtszelle bilden (Voth et al., 2012). Die Translokation der Effektoren wird dabei durch bakterielle Chaperone gesteuert, welche ihre Proteinsubstrate anhand von noch nicht vollständig verstandenen Translokationssignalen erkennen (Voth et al., 2012). Das T4BSS wird in *Legionella* durch ein Cluster aus 27 Genen codiert, welches Dot (*Defective in organelle trafficking*) (Vogel et al., 1998) oder Icm (*Intracellular multiplication*) (Segal et al., 1998) genannt wird. Stämme mit *Loss-of-Function*-Mutationen im Dot/Icm Cluster werden häufig zum Studium Effektor-abhängiger Phänotypen herangezogen.

So sezerniert der intensiv studierte intrazelluläre Erreger der Legionärskrankheit, *Legionella pneumophila*, ein Arsenal von über 300 Effektoren (Vogel et al., 1998) in seine Wirtszelle, um zum Beispiel den vesikulären Transport durch die Regulation kleiner GTPasen zu manipulieren (Hoffmann et al., 2014; Machner and Isberg, 2007; Schoebel et al., 2011, 2009; So et al., 2016), Apoptose zu inhibieren (Banga et al., 2007; Ge et al., 2009; Laguna et al., 2006) und die Ubiquitin-Signalwege der Wirtszelle zu imitieren (Hsu et al., 2014; Kubori et al., 2008). Ein gemeinsamer Nenner bakterieller Effektoren ist die Kodierung von eukaryotischen Motiven, welche das

Aktivitätsspektrum von Wirtspoteinen durch molekularen Mimikry imitieren (Stebbins and Galaán, 2001).

Einige dieser Effektoren besitzen als Enzyme die Fähigkeit, Proteine der Wirtszelle kovalent mit posttranslationalen Modifikationen (PTMs) zu versehen, um so deren Funktion und Aktivität zu manipulieren. Dabei können sie neben den aus Metazoen bekannten chemischen Mechanismen der PTM neue chemische Strukturen einführen, welche so nicht aus Eukaryoten bekannt sind und dementsprechend von der Wirtszelle nur schwer rückgängig gemacht werden können. Diese Modifikationen - wie z. B. die Phosphoribosyl-verknüpfte Ubiquitinierung (Bhogaraju et al., 2016; Kotewicz et al., 2017), die Phosphocholinierung (Mukherjee et al., 2011) oder die Glutamin-Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosylierung (Xu et al., 2019) - werden als orthogonale PTMs bezeichnet (Chambers and Scheck, 2020).

Ein Mechanismus, bei dem die Manipulation mittels PTMs durch Pathogene von besonderer Bedeutung ist, betrifft die gezielte Chromatinmodifikation, mit der die Transkriptionsaktivität des Wirtes verändert wird (Bannister and Kouzarides, 2011; Dong and Hamon, 2020). Chromatin umfasst die enge Aufwicklung des eukaryotischen Genoms durch Nukleosomen - oktamer Komplexe, bestehend aus jeweils 2 Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 (Kornberg, 1974; Zhou et al., 2019). Dies ermöglicht nicht nur eine Verpackung des Genoms auf engstem Raum, sondern gleichzeitig auch die dynamische Regulation der Zugänglichkeit der DNA in entpacktes, transkriptionell aktives Euchromatin und kondensiertes, transkriptionell inaktives Heterochromatin.

Die streng regulierten Mechanismen zur Veränderung der Nukleosomenarchitektur repräsentieren die Epigenetik und beinhalten unter anderem die posttranslationale Modifikation der verpackenden Histone durch Histon-modifizierende Enzyme (Marmorstein and Trievel, 2009). Besonders der flexible N-terminale Schwanz des Histons H3 ist Angriffspunkt zahlreicher dynamischer, synergistischer und antagonistischer PTMs, wie Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung (Kouzarides, 2007), welche zusammengenommen den Histoncode definieren (Jenuwein and Allis, 2001) und über Rekrutierung spezifischer Faktoren die Zugänglichkeit des Chromatins steuern (Bannister and Kouzarides, 2011). Wie bereits angedeutet, führt die LPS-Stimulation zu Phosphorylierung an Ser10 in Histon H3 und in der Folge zu Acetylierung an Lys14 im Bereich inflammatorischer Gene (Anest et al., 2003; Rigillo et al., 2018; Yamamoto et al., 2003), was direkt mit einer erhöhten Rekrutierung von NF- κ B in Verbindung gebracht wird (Saccani et al., 2002). Es ist daher nicht verwunderlich, dass auch bakterielle Effektoren identifiziert wurden, die in diese Regulation entweder indirekt durch die Manipulation eukaryotischer Chromatin-modifizierender Proteine, oder direkt durch die Einführung eigener PTMs eingreifen (Dong and Hamon, 2020). So konnte für den Effektor RomA aus *L. pneumophila* gezeigt werden, dass er als Methyltransferase eine in eukaryotischen Zellen nicht beschriebene Trimethylierung an Lys14 in Histon H3 einführt,

damit die Acetylierung an gleicher Position verhindert und die Genexpression des Wirtes unterdrückt wird (Rolando et al., 2013).

1.1.3 Das intrazelluläre Pathogen *Coxiella burnetii*

Q-Fieber ist eine asymptomatisch verlaufende Krankheit, welche weltweit auftritt und durch Zoonose, der Übertragung von Tier auf Menschen, verbreitet wird. Ausgelöst wird sie durch den hochvirulenten Erreger *C. burnetii* aus der Klasse der Gammaproteobakterien, welcher erstmals 1937 in Queensland, Australien, beschrieben wurde (Derrick, 1937). Q-Fieber und sein Erreger sind mit dem bislang stärksten, dokumentierten Ausbruch im Frühling 2007 in den Niederlanden eindrücklich ins Bild der Öffentlichkeit gerückt (van der Hoek et al., 2012). Bis 2011 wurden über 4000 akute Fälle beschrieben, geschätzte Zahlen gehen von einer zehnfach höheren Zahl infizierter Personen aus (Kampschreur et al., 2012). *C. burnetii* kann mit kontaminiertem Aerosol oder Staub eingeatmet werden und veränderliche Reaktionen mit akuten (Fieber, Pneumonie, Hepatitis) oder chronischen (Endokartitis, Vaskuläre Infektion) Symptomen bewirken (Parker et al., 2006), welche selbst bei angemessener antibiotischer Behandlung in durchschnittlich einem aus drei Patienten nach 24 Monaten noch gesundheitliche Einschränkungen zur Folge haben (Van Loenhout et al., 2015). Aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität, welche mit Q-Fieber in Verbindung gebracht werden, seiner geringen infektiösen Dosis von nahezu einem Organismus (Moos and Hackstadt, 1987) und der hohen Stabilität gegenüber extremen Umwelteinflüssen wird *C. burnetii* als bioterroristische Substanz der Klasse B gelistet (Madariaga et al., 2003) und in der Sicherheitsstufe 3 eingeordnet (Hackstadt, 1996).

Phase I Coxiellen, welche direkt aus Infektionen isoliert wurden, produzieren Volllängen-LPS und sind mit einer hohen Pathogenität verbunden (Moos and Hackstadt, 1987). Serielle *in vitro* Passage von Phase I Coxiellen hat bedingt durch spontane Mutationen zur Entstehung von Phase II Coxiellen geführt, welche stark verkürztes LPS exprimieren und in der Folge weitaus weniger pathogen sind (Hoover et al., 2002; Moos and Hackstadt, 1987); diese Phase II Variante unterliegt dementsprechend nur noch der Sicherheitsstufe 2 (Hackstadt, 1996). Das Verhalten der avirulenten Phase II Variante des Nine Mile Stammes RSA 493 (NMII) ist dabei in Zellkulturexperimenten nicht zu unterscheiden von der virulenten Phase I Variante (NMI) (Howe et al., 2010), und wird deswegen bevorzugt als sichererer Organismus zur Erforschung der Infektion herangezogen.

Im Infektionsverlauf wird *C. burnetii* als obligat intrazelluläres, gramnegatives Bakterium zunächst von Makrophagen ohne Effektorbeteiligung (Beare et al., 2011a) endocytotisch in das Phagosom aufgenommen (Baca et al., 1993), welches sequentiell Rab5 (frühes Endosom) und Rab7 (spätes Endosom) rekrutiert und sich nach Verschmelzen mit dem Lysosom (Heinzen et al., 1996) zum extrem unwirtlichen Phagolysosom mit saurem pH und vielen aciden Hydrolasen entwickelt. Diese für Bakterien normalerweise schädliche Umgebung sorgt bei *C. burnetii* hingegen für eine Aktivierung seines Metabolismus und eine Umstrukturierung des Phagolysosom in ein Membran-

geschütztes Kompartiment, der sogenannten CCV (engl.: *Coxiella-containing vacuole*). *Coxiella* ist das einzige bekannte Beispiel eines bakteriellen Pathogens, welches über den gesamten Infektionsverlauf in einer vom sekundären Lysosom nicht unterscheidbaren parasitophoren Vakuole repliziert. Dies geht einher mit der Umwandlung der Umwelt-resistenten kleinen Zellvariante (SCV, engl.: *small cell variant*) in die metabolisch aktive große Zellvariante (LCV, engl.: *large cell variant*) und dem Start der Replikation (Coleman et al., 2004). Erst dann, ca. 4 h bis 8 h nach Infektionsbeginn (Carey et al., 2011; Newton et al., 2013), beginnt *C. burnetii* über sein T4BSS, welches starke Ähnlichkeit zum T4BSS von *L. pneumophila* aufweist (Zamboni et al., 2003), sein Effektorarsenal in das Zytosol der Wirtszelle einzuschleusen, um dort wirtseigene Proteine zu modifizieren und zu manipulieren (Carey et al., 2011; Newton et al., 2013). Dabei beinhalten die bisher gezeigten Angriffspunkte Prozesse wie Apoptose, transkriptionelle Modulation, proteasomalen Abbau und Unterhalt der CCV Integrität (van Schaik et al., 2013).

Bioinformatische Analysen prognostizieren ungefähr 140 *Coxiella*-Effektoren (Larson et al., 2015), deren Angriffspunkt und Funktion in weiten Teilen noch unverstanden sind, da das Studium der Coxielleninfektion, im Vergleich zu anderen intrazellulären Pathogenen, lange durch große Schwierigkeiten in der genetischen Manipulation dieses Organismus eingeschränkt war. Die Entwicklung von keimfreien Kulturbedingungen unter Verwendung von acidifiziertem Citrat-Cystein-Medium (ACCM) (Omsland et al., 2009) hat nun die Möglichkeit eröffnet, dieses normalerweise obligat intrazelluläre Bakterium außerhalb eines Wirtes zu kultivieren, und damit *C. burnetii* erfolgreich genetisch zu manipulieren (Beare et al., 2012, 2011b, 2009).

1.2 Die posttranslationale Modifikation AMPylierung¹

Posttranslationale Modifikationen sind diverse kovalente Veränderungen, die die Aktivität, Lokalisierung, Stabilität und Spezifität von Proteinen modulieren. Eine solche PTM ist die AMPylierung (auch Adenylylierung genannt), die sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten auftritt. Dabei verwenden Enzyme Adenosintriphosphat (ATP) als Donorsubstrat, um in einer stark exergonen Reaktion das Adenosinmonophosphat (AMP) auf hydroxylhaltige Aminosäureseitenketten (z. B. Tyrosin, Serin, Threonin) eines Zielproteins zu übertragen, wobei Pyrophosphat als Nebenprodukt freigesetzt wird (Hedberg and Itzen, 2015).

Bisher sind drei verschiedene Klassen von AMPylatoren oder Protein-Adenylyltransferasen bekannt: DNA- β -Polymerase-ähnliche AMPylatoren, deren prominentestes Mitglied die Glutaminsynthetase-Adenylyltransferase aus *Escherichia coli* ist (Kingdon et al., 1967); FIC-Enzyme (*Filamentation induced by cyclic AMP*), wie beispielsweise humanes FICD (Engel et al.,

¹ Ausschnitte des folgenden Kapitels sind als Veröffentlichung „Höpfner, D., Fauser, J., Kaspers, M.S., Pett, C., Hedberg, C., Itzen, A., 2020. Monoclonal Anti-AMP Antibodies Are Sensitive and Valuable Tools for Detecting Patterns of AMPylation. *iScience* 23, 101800.“ in englischer Sprache erschienen (Höpfner et al., 2020).

2012), IbpA aus *Histophilus somni* (Worby et al., 2009) oder VopS aus *Vibrio parahaemolyticus* (Yarbrough et al., 2009); und, als jüngste Entdeckung, Pseudokinasen, repräsentiert durch hochkonserviertes SelO (Sreelatha et al., 2018).

Die AMPylierung wird seit über 50 Jahren untersucht (Kingdon et al., 1967) und hat in jüngster Zeit durch die Identifizierung kleiner GTPasen als Ziel AMPylierender Enzyme im Verlauf bakterieller Infektionen an Aufmerksamkeit gewonnen (Worby et al., 2009; Yarbrough et al., 2009). Die Entdeckung von FICD als einzigem FIC-Protein aus Metazoen (Engel et al., 2012; Worby et al., 2009) und der von ihm vermittelten Modifikation des Chaperons BiP des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Ham et al., 2014; Sanyal et al., 2015) verdeutlicht eine Rolle der AMPylierung in der Proteinhomeostase (Preissler et al., 2016, 2015). Jüngste Erkenntnisse zur AMPylierung durch Pseudokinasen (Sreelatha et al., 2018) deuten auf ein breiteres Auftreten dieser Modifikation im Sinne eines allgemeinen, auch außerhalb des Kontextes bakterieller Infektionen auftretenden Mechanismus hin.

1.2.1 Die Klasse der FIC-Proteine

FIC-Proteine sind charakterisiert durch Besitz der konservierten Fic-Domäne, welche aus sechs α -Helices besteht (Garcia-Pino et al., 2008). Die Übertragungsreaktion wird in FIC-Proteinen durch ein neun Aminosäuren umfassendes konserviertes Fic-Motiv $H_{\text{kat}}\text{XFX(D/E)(A/G)N(G/K)R}$ innerhalb einer Loop-Region im aktiven Zentrum (Garcia-Pino et al., 2014; Kinch et al., 2009) der α -helikalen Fic-Domäne (Garcia-Pino et al., 2008) ermöglicht, welches allein für die Katalyse dieser Übertragungsreaktion zuständig ist. Das konservierte Histidin H_{kat} deprotoniert als Base die hydroxylhaltige, nukleophile Seitenkette des Zielproteins, und ist damit unverzichtbar für die katalytische Aktivität (Luong et al., 2010; Xiao et al., 2010). Eine Mutation dieser Position zu Alanin (HA-Mutation) führt unweigerlich zu einem konstitutiv inaktiven Enzym. Die Sequenz (A/G)N(G/K) in der aktiven Tasche der FIC-Proteine bildet ein Anionen-Loch und positioniert unter Zuhilfenahme des zweiwertigen Kations Mg^{2+} die Phosphate des ATPs, und ermöglicht so den nukleophilen Angriff auf die hydroxylhaltige Seitenkette des Zielproteins (Garcia-Pino et al., 2014; Luong et al., 2010). Dieses Fic-Motiv ermöglicht die Vorhersage von FIC-Proteinen auf Basis von Sequenzanalysen (Kinch et al., 2009). Die Spezifität der FIC-Proteine für ihre Zielproteine wird durch benachbarte Domänen bestimmt (Xiao et al., 2010).

Die Regulation der FIC-Proteine kann auf verschiedene Arten erfolgen und involviert inhibitorische Helices, Automodifikation, Dimer- oder Oligomerbildung und Proteine, welche die AMPylierung wieder entfernen können:

Viele Vertreter der FIC-Proteine werden über eine inhibitorische Helix mit konserviertem Motiv (S/T)xxxE_{inh}(G/N) reguliert, welche sich entweder intermolekular auf einem Antitoxin-Partnerprotein (Klasse I), oder intramolekular am N- (Klasse II) oder C-terminalen (Klasse III) Ende der Fic-Domäne selbst befindet und durch Kontakt zum aktiven Zentrum dessen Aktivität

unterbindet (Engel et al., 2012). Dabei ragt das konservierte Glutamat E_{inh} mit seiner negativ geladenen Seitenkette in den Phosphat-bindenden Bereich der aktiven Tasche, und verdrängt sterisch und elektrostatisch die Phosphatgruppe des ATP (Engel et al., 2012; Goepfert et al., 2013). Die Mechanismen, die notwendig sind, um diese Blockade zu lösen, sind nicht geklärt. Die Mutation des konservierten Glutamats zum ungeladenen und sterisch unanspruchsvollen Glycin (EG-Mutante) führt in den meisten FIC-Proteinen zu einem konstitutiv aktiven Enzym (Ham et al., 2014; Preissler et al., 2015; Truttmann et al., 2016; Worby et al., 2009).

Es gibt des Weiteren Hinweise darauf, dass die Aktivität durch eine Kombination aus Automodifikation und Dimer- bzw. Oligomerisierung reguliert wird:

Unterdrückung der Homodimerisierung in humanem FICD und *Caenorhabditis elegans* Fic-1 reduziert ihre Automodifikationsaktivität wie auch ihre Aktivität gegenüber Zielproteinen (Bunney et al., 2014; Truttmann et al., 2016), allerdings haben Mutationen der Automodifikationsstellen in FICD keine Auswirkungen auf die Aktivität gegenüber seinem Zielprotein (Sanyal et al., 2015). Ein gegensätzlicher Effekt wurde für das *Neisseria meningitidis* Klasse III FIC-Protein NmFic gezeigt, welches konzentrationsabhängig durch Bildung von Dimeren bzw. Tetrameren inhibiert wird, bei geringeren Konzentrationen als Monomer aber AMPylierungsaktivität zeigt (Stanger et al., 2016). Bei NmFic geht dies einher mit einer AutoAMPylierung im Monomer, welche zu einer partiellen Entfaltung der inhibitorischen α -Helix und damit einem Lösen der enzymatischen Blockade führt (Stanger et al., 2016).

Bei den meisten der bisher studierten FIC-Proteine geht eine erhöhte enzymatische Aktivität gegenüber Zielproteinen mit einer erhöhten AutoAMPylierung einher; im inaktiven Enzym blockiert die inhibitorische α -Helix die Bindung von ATP. Deswegen ist AutoAMPylierung als Kennzeichen der enzymatischen Aktivität allgemein akzeptiert (Goepfert et al., 2013). Für das Klasse II FIC-Protein CdFic aus *Clostridium difficile* (Welner et al., 2014) konnte aufgrund einer ungewöhnlichen γ -Phosphat-Orientierung des ATPs in der aktiven Tasche ein ATP-Bindungsmechanismus und damit eine AutoAMPylierung, unabhängig von der inhibitorischen α -Helix, gezeigt werden (Dedic et al., 2016). In Ermangelung eines Zielproteins wurde daraus geschlossen, dass CdFic auch gegenüber Targetproteinen eine erhöhte Aktivität aufweisen könnte (Casey and Orth, 2018; Dedic et al., 2016). Eine Punktmutation in der N-terminalen Dimerisierungsoberfläche von CdFic erhöht die AutoAMPylierung drastisch (Dedic et al., 2016), eine Beobachtung, die der reduzierten Automodifikation von FICD bei Unterdrückung der Dimerisierung entgegensteht (Bunney et al., 2014).

Zusätzlich kann die AMPylierungsaktivität von FIC-Proteinen durch Enzyme reguliert werden, welche diese posttranslationale Modifikation rückgängig machen. Anhand der Effektoren DrrA und SidD aus *L. pneumophila* konnte gezeigt werden, dass die AMPylierung - wie andere posttranslationale Modifikationen auch - ein reversibler Prozess ist (Neunuebel et al., 2011; Tan and Luo, 2011). Inzwischen konnte auch gezeigt werden, dass FIC-Proteine selbst das Potenzial

haben, ihre eigene Modifikation rückgängig zu machen: FICD kann sein Zielprotein BiP sowohl *in vitro* als auch *in vivo* über die gleiche Fic-Domäne deAMPylieren, über die auch die AMPylierung vermittelt wird (Casey et al., 2017; Preissler et al., 2016). Diese Fähigkeit geht mit der EG-Mutation der inhibitorischen Helix verloren (Casey et al., 2017; Preissler et al., 2016).

Nichtsdestotrotz bleibt das Ausmaß der FIC-Proteinregulation in weiten Teilen unbekannt.

Die bisher am besten charakterisierten FIC-Proteine stammen aus bakteriellen Pathogenen: So war der Effektor VopS aus *V. parahaemolyticus* das erste FIC-Protein, von welchem gezeigt werden konnte, dass es die AMPylierung von Rho GTPasen in seinem eukaryotischen Wirt katalysiert und damit den Zusammenbruch des Zytoskeletts bewirkt (Yarbrough et al., 2009). Kurze Zeit später konnte für IbpA aus *H. somni* der gleiche Mechanismus gezeigt werden (Worby et al., 2009). AnkX, ein Effektor aus dem intrazellulären Pathogen *L. pneumophila*, modifiziert stattdessen kleine GTPasen der Rab Familie mit einer Phosphocholingupe, um den vesikulären Transport der Wirtszelle zur Replikationsvakuole umzulenken (Mukherjee et al., 2011). Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch Phosphocholin von bestimmten FIC-Proteinen übertragen werden kann, und ihr Reaktionsspektrum somit nicht nur auf AMPylierung beschränkt ist.

Die Einführung der sterisch anspruchsvollen AMPylierung an Serin-, Threonin- oder Tyrosinseitenketten verändert die Netto-Ladung des Zielproteins um -1. Damit kann AMPylierung sowohl intrinsische Eigenschaften wie Stabilität, enzymatische Aktivität (Kingdon et al., 1967; Lu et al., 2016; Stanger et al., 2016) oder Bindung von Co-Faktoren modulieren als auch Bindung von Interaktionspartnern (Yarbrough et al., 2009) verändern (Hedberg and Itzen, 2015). Es wird außerdem spekuliert, dass AMPylierung ähnlich wie O-verbundene N-Acetylglucosaminylierung eine Funktion darin hat, Phosphorylierungsstellen zu blockieren (Hedberg and Itzen, 2015).

Die genauen physiologischen und funktionellen Konsequenzen dieser AMPylierung sind in weiten Teilen noch unverstanden; die Tatsache jedoch, dass AMPylierende Enzyme in großer Anzahl in bakteriellen Pathogenen auftreten, ist ein starker Hinweis auf ihre funktionelle Bedeutung im Kontext bakterieller Infektionen. Besonders ihr gehäuftes Vorkommen in der Klasse der Gammaproteobakterien (Khater and Mohanty, 2015), welche unter anderem die stark pathogenen Gattungen der *Legionella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Shigella* und *Coxiella* umfasst, lässt darauf schließen, dass FIC-Proteine eine entscheidende Rolle in der Pathogenität gegenüber humanen Wirtszellen spielen könnten.

Mit der vollständigen Sequenzierung des Coxiellengenoms (Seshadri et al., 2003) können fünf konservierte FIC-Proteine vorhergesagt werden (The UniProt Consortium, 2017). Damit stellen Coxiellen ein ideales Modellsystem dar, um Angriffspunkte und Auswirkungen der Aktivität von FIC-Proteinen intrazellulärer Bakterien zu untersuchen.

1.2.2 Die Rolle des *C. burnetii* Fic Protein 2 (CbFic2)

Das *C. burnetii* Fic Protein 2 (CbFic2), kodiert durch das Gen CBU_0822, wurde erstmals von Adam Cichy im Rahmen seiner Dissertation als AMP-Transferase beschrieben (Cichy, 2016).

CbFic2 ist ein 378 aa langes FIC-Protein der Klasse II, welches zusätzlich zu seiner konservierten Fic-Domäne (115-223 aa, Fic-Motiv HPFDDGNGRIGR 205-216 aa) mit N-terminaler inhibitorischer Helix (TSAIEG, 62-67 aa) eine N-terminale DUF4172-Domäne (4-85 aa) unbekannter Funktion (*domain of unknown function*) und eine C-terminale Helix-Turn-Helix (HTH)-Domäne (304-362 aa) besitzt. Zusätzlich dazu wird ein schwaches nukleäres Lokalisationssignal (NLS) mit der Sequenz TKKGRSA (357-364 aa) vorhergesagt (Letunic et al., 2021; The UniProt Consortium, 2017; Yachdav et al., 2014).

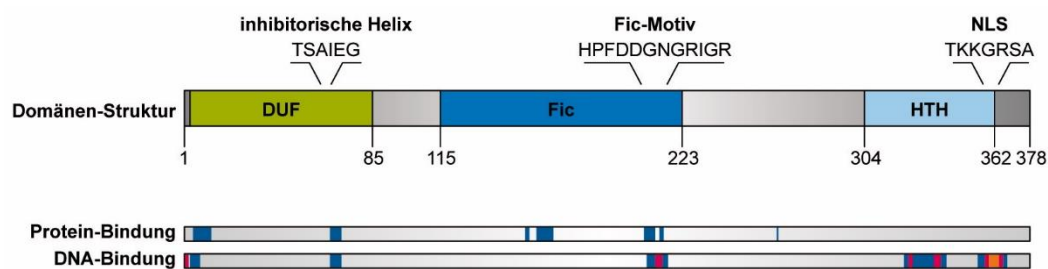


Abbildung 1: Domänenstruktur von CbFic2

CbFic2 (CBU_0822) ist ein FIC-Protein der Klasse II, bestehend aus 378 aa. Laut SMART-Analyse besitzt es eine konservierte Fic-Domäne (115-223 aa) mit dem Fic-Motiv HPFDDGNGRIGR (205-216 aa). Die inhibitorische Helix mit der Sequenz TSAIEG (62-67 aa) befindet sich N-terminal zur Fic-Domäne innerhalb der DUF4172-Domäne (4-85 aa) unbekannter Funktion. Die C-terminale Helix-Turn-Helix (HTH)-Domäne (304-362 aa) beinhaltet ein schwaches nukleäres Lokalisationssignal (NLS) mit der Sequenz TKKGRSA (357-364 aa) (Letunic et al., 2021; Schultz et al., 1998). Protein- und DNA-Bindungsgebiete sind mit PredictProtein vorhergesagt. Protein-Bindung (RI: 00-33) blau. DNA-Bindung (RI: 00-33) blau, (RI: 34-66) magenta, (RI: 67-100) gelb. RI = *reliability index*, Verlässlichkeit der positiven Vorhersage. Die Skala der positiven Vorhersage reicht von 0 bis 100. Je höher der Score, desto verlässlicher die Vorhersage (Yachdav et al., 2014).

Die HTH-Domäne ist ein gemeinsamer Bestandteil von Transkriptionsfaktoren in allen Bereichen des Lebens und besteht aus einem veränderlichen Motiv aus drei α -Helices, wovon die dritte typischerweise DNA bindet (Brennan and Matthews, 1989; Ohlendorf et al., 1983; Sauer et al., 1982). Neben DNA sind allerdings auch vielfältige andere Bindungspartner beschrieben, wie RNA oder Proteine (Aravind et al., 2005). Die HTH-Domäne tritt häufig in Kombination mit katalytischen Domänen auf, wo die HTH-Domäne zum Beispiel der Lokalisation oder Substraterkennung dient (Aravind et al., 2005).

Die stark mit CbFic2 verwandte Protein Adenylyltransferase SoFic aus *Shewanella oneidensis*, deren atomare Kristallstruktur bekannt ist, weist neben der N-terminalen DUF4172-Domäne ebenfalls eine C-terminale HTH-Domäne auf, und bildet auch in Abwesenheit von DNA über eine N-terminale Helix ein Dimer aus (Das et al., 2009). Allerdings konnte bisher DNA-Bindung für SoFic experimentell nicht bestätigt werden.

Die von Cichy durchgeführten Arbeiten waren limitiert durch die Instabilität des CbFic2-Enzyms *in vitro* (Cichy, 2016). Nichtsdestotrotz konnte er CbFic2 als DNA-bindendes Protein

identifizieren, welches nach EG-Mutation der inhibitorischen Helix in Abhängigkeit von DNA-Bindung Histon H3 an Ser10 und Ser28 AMPyliert (Cichy, 2016). Dabei gab es starke Hinweise, dass die DNA-Bindung in CbFic2 eine Dimerisierung induziert (Cichy, 2016). In Zellexperimenten konnte eine HTH-Domänen abhängige Zellkern-Lokalisation von CbFic2 gezeigt werden (Cichy, 2016). Experimente zur Identifikation physiologischer Konsequenzen der Histon H3 AMPylierung blieben jedoch leider ergebnislos (Cichy, 2016).

1.3 Nachweismethoden der AMPylierung¹

Trotz einer hohen Prävalenz postulierter FIC-Enzyme, insbesondere in pathogenen Bakterien (Khater and Mohanty, 2015), ist nur eine begrenzte Anzahl von Zielproteinen der AMPylierung bekannt (Truttmann and Ploegh, 2017). Diese Diskrepanz zwischen der Anzahl der Enzyme und identifizierter Targets illustriert die Herausforderungen im Nachweis der AMPylierung. Verfügbare Detektions-Werkzeuge und -Methoden sind sowohl limitiert als auch mit Nachteilen im Bezug auf die benötigten Ressourcen und/oder die Möglichkeit der Untersuchung in einem physiologisch relevanten Kontext verbunden (Casey and Orth, 2018; Hedberg and Itzen, 2015).

1.3.1 ATP-Analoga

Die älteste Technik der Verwendung von radioaktiv markiertem ³²P- α -AMP und der Autoradiographie ist empfindlich *in vitro* (Kingdon et al., 1967), aber durch die Kosten des Produkts, die Risiken im Umgang mit radioaktivem Material, die Notwendigkeit einer angemessenen Abfallentsorgung und vor allem die Verfügbarkeit eines Radioisotopenlabors begrenzt. Die Verwendung anderer ATP-Analoga zur Identifizierung - insbesondere die Verwendung von Azid-verknüpften Analoga, deren Einbau durch die bioorthogonale Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (Click-Chemie) basierte Markierung mit fluoreszenten Sonden nachgewiesen werden kann (Grammel et al., 2011; Lewallen et al., 2012; Yu et al., 2014) - ist durch die reduzierte intrazelluläre Aufnahme dieser Analoga (Plagemann and Wohlhueter, 1980) auf die Verwendung in Zellysaten beschränkt, bei denen die räumliche und zeitliche Regulation der Modifikation aufgehoben ist. Neben der Konkurrenz der Analoga mit hohen Mengen endogenem ATP wird die Methodik außerdem durch die Unfähigkeit vieler Enzyme erschwert, diese Analoga effizient als Substrate zu verwenden (Engel et al., 2012; Müller et al., 2012; Xiao et al., 2010). Neuere Arbeiten haben allerdings eine zellpermeable (Kielkowski et al., 2020b), nicht zytotoxische (Kielkowski et al., 2020a) Pronukleotidsonde etabliert, welche das Problem der zellulären Aufnahme überwinden und eine Analyse in lebenden Zellen ermöglichen sollte.

Beide Techniken, sowohl die Verwendung von radioaktivem ATP als auch von anderen ATP-Analoga, sind darüber hinaus nicht immun gegen falsch-positive Detektion von ADPylierung oder den Einbau der Analoga in andere Makromoleküle wie RNA (Grammel et al., 2012). Alternativ ist

die Analyse der AMPylierung durch Massenspektrometrie (MS) möglich, entweder unter Zuhilfenahme spezieller Sonden (s.o.) oder, indem nach einem spezifischen Muster der Peptidfragmentierung aufgrund der Instabilität des AMP-Anteils gesucht wird (Li et al., 2011). Dennoch ist die AMPylierung eine Modifikation, die - nach derzeitigem Stand der Forschung - im Vergleich zur Phosphorylierung mit geringer Häufigkeit auftritt. Im Gegensatz zur Phosphorylierung ist außerdem bisher keine spezifische Anreicherungsmethode für AMPylierte Peptide oder Proteine außerhalb der Click-Chemie basierten Sonden bekannt. Daher müssen die verwendeten Verfahren sehr empfindlich sein und sind dementsprechend für viele Labore nicht verfügbar. Der kürzlich veröffentlichte kovalente Capture-Ansatz ist ebenfalls auf die Inkubation von rekombinantem Enzym, modifiziert mit einem strategisch platzierten Cystein, und cysteinreaktiven ATP-Analoga in Zelllysaten beschränkt (Gulen et al., 2020). Darüber hinaus ist diese Methode meist auf die Kenntnis des relevanten AMPylators angewiesen.

Antikörper, die AMPylierung erkennen, könnten viele dieser Herausforderungen überwinden und als orthogonaler Ansatz weitere Anwendungsmöglichkeiten bieten. Idealerweise wäre ein solcher Antikörper in der Lage, AMPylierung mit hoher Sensitivität und Spezifität sowohl in nativen als auch denaturierten Proteinen zu detektieren und damit sowohl einen Nachweis mittels Western Blot (WB) als auch eine Anreicherung durch Immunpräzipitation (IP) zu ermöglichen. Bisher verfügbare polyklonale Antikörper, die mithilfe synthetischer AMPylierter Peptide generiert wurden, erfüllen diese gewünschten Eigenschaften nicht (Hao et al., 2011; Smit et al., 2011).

1.3.2 anti-AMP-Antikörper

Die Entwicklung von anti-PTM-Antikörpern - besonders von solchen, die eine PTM unabhängig von der Protein-Sequenz erkennen – steht besonderen Herausforderungen gegenüber: Die Notwendigkeit zur Erkennung sehr kleiner chemischer Gruppen, in Verbindung mit subtilen Veränderungen zwischen verwandten PTMs, wie z. B. Mono- oder Dimethylierung, erschwert die anti-PTM-Antikörper Generierung immens (Hattori and Koide, 2018).

Erste Versuche zur Herstellung von anti-AMP-Antikörpern wurden 1984 unternommen, indem AMP direkt an das Trägerprotein Rinderserumalbumin (BSA) fusioniert wurde (Chung and Rhee, 1984). Auf diese Weise wurden monoklonale Antikörper in Mäusen erzeugt, die aus Aszites isoliert und bei der Reinigung von AMPylierter Glutaminsynthetase eingesetzt wurden. Später wurden versehentlich Antikörper hergestellt, indem das eigentlich intendierte ADP-Ribose (ADPR)-Hapten zu AMP abgebaut wurde, was zu Antikörpern führte, die freies 5'-AMP erkennen (Bredehorst et al., 1978; Meyer and Hilz, 1986). Hao et al. (Hao et al., 2011) erzielten polyklonale Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen mit einem synthetischen Rac1-Peptid aus sieben Aminosäuren, das eine Threonin-AMPylierung enthält (jetzt kommerziell erhältlich als anti-pan-AMPylated Threonine Antibody 09-890, Sigma-Aldrich Merck). Nach Behandlung des Serums mit Tyrosin-AMPyliertem Protein wurde berichtet, dass das verbleibende abgereicherte Serum sowohl

in WB- als auch in IP-Experimenten spezifisch Threonin-AMPylierung, unabhängig von Proteinrückgrat und –struktur, nachweisen kann. Der jüngste Antikörper wurde mithilfe eines 13 Aminosäuren langen AMPylierten Rab1b-Peptids hergestellt, welches an Schlitzschnecken-Hämocyanin (KLH) gekoppelt wurde und nach Immunisierung von Kaninchen zu einem polyklonalen Serum führte (Smit et al., 2011). Diese Methode der Antikörperherstellung auf Basis synthetischer Peptide wurde durch die Entwicklung eines effizienten Syntheseprotokolls für AMPylierte Peptide ermöglicht (Smit et al., 2011). Beide publizierten Kaninchenantikörper sind jedoch durch geringe Sensitivität beeinträchtigt, und insbesondere hinsichtlich der Kreuzreaktivität mit anderen PTMs und der Erkennung von Proteinen außerhalb der Klasse der kleinen GTPasen oder BiPs nur unzureichend charakterisiert. Darüber hinaus sind alle verfügbaren Antikörper polyklonal, mit den damit einhergehenden Herausforderungen in Bezug auf Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge und Zuverlässigkeit der Werkzeugentwicklung auf Basis dieser Antikörper. In Anbetracht der besonderen Herausforderungen, die mit der Generierung von sequenzunabhängigen anti-PTM-Antikörpern verbunden sind (Hattori and Koide, 2018), sowie der Notwendigkeit einer umfassenden Charakterisierung, sind polyklonale Antikörper nicht die ideale Wahl. Jede neue Charge müsste vor der Anwendung auf Zelllysaten streng auf korrekte AMP-Erkennung und fehlende Kreuzreaktivität getestet werden. Bisherige Antikörper stellen daher kein allgemeines und zuverlässiges Erkennungswerkzeug der AMPylierung dar, insbesondere bei der Suche nach neuen Targets und Effekten, bei der eine Minimierung der Anzahl potenzieller falsch-negativer oder falsch-positiver Befunde von essentieller Bedeutung ist.

2 Zielsetzung

Trotz beachtlicher Fortschritte in der Erforschung intrazellulärer Pathogene und der molekularen Mechanismen, die ihrer Pathogenese zugrunde liegen, ist vieles bezüglich der Rolle der zentralen bakteriellen Effektorproteine noch unklar. In diesem Zusammenhang sind besonders die weit verbreiteten bakteriellen FIC-Proteine von Interesse, welche die Signalwege der Wirtszelle durch Einführung einer posttranslationalen Modifikation, der AMPylierung, manipulieren. Die Konsequenzen dieser Aktivität sind dabei in weiten Teilen noch unerforscht. In diesem Kontext repräsentiert das hochinfektiöse bakterielle Pathogen *C. burnetii* durch Kodierung von fünf FIC-Proteinen einen spannenden Modellorganismus, um Angriffspunkte, Regulation und Auswirkungen der FIC-Protein-induzierten AMPylierung während der Infektion durch intrazelluläre Bakterien zu untersuchen. Grundlage dieser Arbeit sind die von Adam Cichy im Rahmen seiner Dissertation durchgeführten Studien am *C. burnetii* Fic Protein 2 (CbFic2), für das er zeigen konnte, dass es in humanen Zellen zum Nukleus lokalisiert und in Abhängigkeit von DNA-Bindung *in vitro* Histon H3 an Ser10 und Ser28 AMPyliert. Die physiologischen Konsequenzen dieser Modifikation sind nach wie vor unverstanden. Die von Cichy verwendeten polyklonalen anti-AMP-Antikörper, sowie auch die kommerziell erhältlichen Alternativen, waren allerdings durch geringe Sensitivität limitiert und nicht in der Lage, native AMPylierte Proteine zu binden.

Um AMPylierung spezifisch verfolgen und AMPylierte Proteine anreichern zu können, wurde der Schwerpunkt zunächst auf die Entwicklung geeigneter Werkzeuge, d. h. monoklonaler anti-AMP-Antikörper, gelegt. Es wird die Strategie zur Entwicklung von drei neuen Antikörpern in Mäusen beschrieben; die Ergebnisse der Charakterisierung bzgl. Sensitivität, Spezifität, Protein-unabhängiger Erkennung und Kreuzreaktivität in den Anwendungen ELISA (enzymgebundener Immunsorbent Assay), WB und IP werden vorgestellt, bevor die Validierung der Antikörper als Werkzeug der Target-Identifizierung im bekannten Kontext der FICD-vermittelten BiP-AMPylierung in humanen Zellen gezeigt wird (Höpfner et al., 2020). Auf dieser Basis wird AMPylierung im Verlauf der Coxielleninfektion analysiert und mit der zellulären AMPylierung nach CbFic2 Expression verglichen. Anschließend wird die *in vitro* Regulation der CbFic2-Aktivität im Zusammenspiel von DNA-Bindung und AutoAMPylierung untersucht, bevor die physiologischen Konsequenzen der CbFic2-Aktivität mittels *Kinase activity profiling* und LC-MS/MS nach anti-AMP-IP aus CbFic2-exprimierenden THP-1 basierten Makrophagen näher betrachtet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung und Charakterisierung muriner monoklonaler anti-AMP-Antikörper¹

Die Dokumentation bisher veröffentlichter und kommerziell erhältlicher Antikörper gibt an, dass diese AMPyliertes Threonin bzw. Tyrosin unabhängig vom Peptidrückgrat und der Proteinumgebung erkennen (siehe Sigma-Aldrich 09-890 und ABS184) (Hao et al., 2011). Als Startpunkt dieser Arbeit wurde ihre Leistung im Western Blot anhand verschiedener rekombinanter Proteine mit unterschiedlich modifizierten Aminosäureseitenketten ausgewertet. Untersucht wurden die folgenden Proteine: Rho GTPase Cdc42 AMPyliert an Thr35 (durch VopS (Yarbrough et al., 2009)) bzw. Tyr32 (durch IbpA (Worby et al., 2009)), Rab GTPase Rab1b modifiziert an Tyr77 (durch DrrA aus *L. pneumophila* (Müller et al., 2010)), an Threonin modifiziertes Histon H3.1 (durch FICD (Truttmann et al., 2016)), das an Thr518 modifizierte ER-Chaperon BiP/Grp-78 (durch FICD (Preissler et al., 2015)) und das an Thr80, Thr183 und Ser79 automodifizierte FIC-Enzym FICD (Sanyal et al., 2015). Die Ergebnisse zeigen, dass nicht alle AMPylierungen erkannt werden (Abbildung 2A): Während der kommerziell erhältliche anti-Thr-AMP-Antikörper (09-890, Sigma-Aldrich) erfolgreich Cdc42-Thr-AMP und FICD-Thr-AMP erkennt, ist die Detektion von Histon H3.1-Thr-AMP und BiP-Thr-AMP weniger sensitiv und im Falle von BiP bei der im Versuch eingesetzten Proteinmenge von 50 ng sogar negativ. Der kommerziell erhältliche anti-Tyr-AMP-Antikörper (ABS184, Merck) zeigt eine unbefriedigende Leistung, indem er sowohl mit unmodifiziertem Rab1b und FICD als auch mit Histon H3.1-Thr-AMP kreuzreagiert und zudem ein generell schwaches Detektionssignal aufweist. Da beide anti-AMP-Antikörper keine universelle Erkennung der AMPylierung ermöglichen, ergab sich die Frage, ob stattdessen kommerziell verfügbare anti-ADP-Ribosylierungs-Antikörper ebenfalls in der Lage wären, AMPylierung zu detektieren, da beide Modifikationen den AMP-Anteil teilen. Ein entsprechender Test des kommerziell erhältlichen anti-pan-ADP-Ribose-Bindungsreagenz (MABE1016, Merck) auf dem gleichen WB zeigt, dass dieses zwar mono-ADP-ribosyliertes PARP3 (durch Autokatalyse (Vyas et al., 2014)) nachweisen kann, aber nicht in der Lage ist, AMPylierung mit Ausnahme von Histon H3.1-Thr-AMP zu erkennen.

Diese Experimente zeigen, dass alle kommerziell erhältlichen anti-AMP-Antikörper keine allgemeine Erkennung der AMPylierung unabhängig vom Peptidrückgrat bieten, und eine signifikante Anzahl falsch-positiver und falsch-negativer Detektionen aufweisen. Die Kombination aus eingeschränkter Leistungsfähigkeit und Kreuzreaktivität sowohl von anti-ADPR-Reagenzien als auch von anti-AMP-Antikörpern birgt die Gefahr von falsch-positiven Ergebnissen bei ADP-Ribosylierung sowie von falsch-negativen Ergebnissen bei AMPylierten Proteinen und führt zu einer Verzerrung der AMPylierungsforschung in Richtung kleiner GTPasen und Threonin-

Modifikationen (Abbildung 2A). Da vielen Forschern geeignete Positiv- und Negativkontrollen bezüglich der zu untersuchenden Proteine fehlen, werden diese Leistungsfehler möglicherweise nie entdeckt; dies begründet die Motivation zur Entwicklung monoklonaler anti-AMP-Antikörper in Mäusen.

3.1.1 Peptiddesign und Selektionsstrategie

Bisher verwendete Antikörper wurden meist gegen denaturierte Targets im WB eingesetzt und sind nur gegen kleine GTPasen (abhängig vom für die Immunisierung verwendeten Peptid) evaluiert (Hao et al., 2011; Smit et al., 2011). Im Gegensatz dazu sollte im Rahmen dieser Arbeit ein universelles Werkzeug geschaffen werden, das AMPylierung nicht nur bei der steigenden Zahl bekannter AMPylierter Proteine, sondern auch bei unbekanntem Targets unabhängig von Proteinsequenz und -umgebung erkennen kann, und zwar sowohl in denaturierter als auch in nativer Form. Nur so kann die Chance auf gezielte Anreicherung von AMPylierten Proteinen aus komplexen Proben sowie auf deren erfolgreiche Validierung und Charakterisierung erhöht werden. Anstatt ein AMPyliertes Peptid als Hapten zu verwenden, welches von einem natürlich vorkommenden Zielprotein abgeleitet ist, wurde ein reduktiver Ansatz gewählt, der darauf abzielte, den Antikörper nur gegen die AMP-gebundene Seitenkette zu entwickeln, nicht aber gegen die Peptidsequenz selbst (Abbildung 2B). Die Strategie bestand daher darin, das Peptidrückgrat (Abbildung 2C) auf eine nicht-immunogene Glycin-Alanin-Sequenz aus 8 Aminosäuren zu reduzieren, welche lang genug war, um nicht unbeabsichtigt eine Immunreaktion auf die Peptidtermini auszulösen, aber kurz genug, um die Immunreaktion auf das Peptid selbst zu vermindern. Um die Ladung an den Termini zu senken und ein natürliches Proteingerüst zu simulieren, wurde das Peptid N-terminal acetyliert und C-terminal amidiert. Das AMPylierte Threonin wurde in der Mitte des synthetisierten Peptids durch die Verwendung eines AMPylierten Bausteins eingeführt (Albers et al., 2011; Smit et al., 2011). Ein N-terminales Cystein wurde eingebaut, um die Fusion mit Trägerproteinen für die Immunisierung zu ermöglichen (Abbildung 2D; zur Synthese siehe ergänzend Abbildung S 1 und Abbildung S 2). Die Synthese des modifizierten Peptids und seines unmodifizierten Gegenstücks wurde vom Kooperationspartner Dr. Christian Pettⁱ durchgeführt.

Da diese reduktive Strategie, AMPyliertes Threonin in ein kurzes Glycin-Alanin-Rückgrat einzubauen, noch nie zuvor getestet wurde und das Risiko bestand, die Immunogenität aufzuheben, wurde ein breiter Ansatz mit zwei verschiedenen Trägerproteinen als Haptenkonjugate und zwei verschiedenen Mäuserassen für die Immunisierung gewählt. Insgesamt wurden 10 Mäuse entweder mit Rinderserumalbumin (BSA)-Konjugaten oder Schlitzschnecken-Hämocyanin (KLH)-Konjugaten von GenScript immunisiert, aufgeteilt in jeweils drei BALB/c- und zwei C57 BL/6-Mäuse.

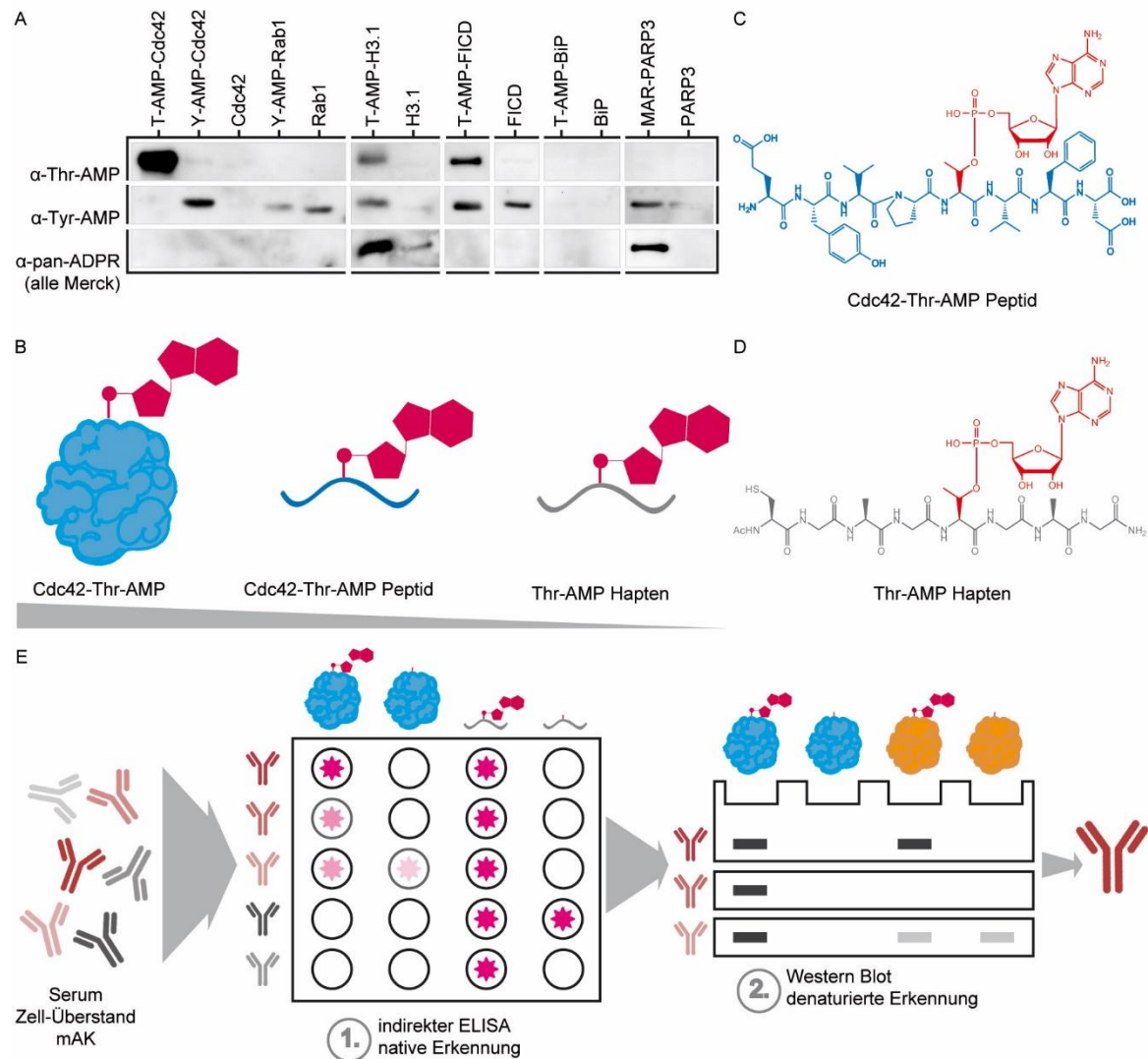


Abbildung 2: Motivation, Haptendesign und Selektionsstrategie für die Generierung von anti-AMP-Antikörpern
 (A) Leistung von kommerziell erhältlichen anti-AMP-Antikörpern auf AMPylierten Proteinen. 50 ng des angegebenen rekombinanten Proteins wurden mittels WB unter Verwendung von anti-Threonin-AMP- (Merck) und anti-Tyrosin-AMP- (Merck) Antikörpern sowie einem anti-pan-ADPR-Bindungsreagenz (Merck) wie angegeben analysiert. Jede Reihe repräsentiert einen jeweils identischen WB. (B) Reduktiver Ansatz für das Haptendesign. Anstatt intaktes AMPyliertes Protein oder AMPyliertes Peptid (blau) von einem natürlich vorkommenden Target wie Cdc42 zu verwenden, wurde die Komplexität des Peptidrückgrats reduziert (grau), um die Entwicklung von Antikörpern nur gegen den AMP-Teil (rot) sicherzustellen. (C) Darstellung des Peptids 31-38 aa im natürlich vorkommenden Cdc42-Thr-AMP mit seinen komplexen Seitenketten (blau). Das AMP-modifizierte Threonin ist in rot dargestellt. (D) Siehe auch Abbildung S 1 und Abbildung S 2. Darstellung des Thr-AMP-Hapten-Peptids mit seiner reduzierten Komplexität eines Glycin-Alanin-Rückgrats, N-terminaler Acetylierung und C-terminaler Amidierung. Ein N-terminales Cystein wurde eingefügt, um die Fusion mit dem Trägerprotein zu ermöglichen. Das AMP-modifizierte Threonin ist in rot dargestellt. (E) Siehe auch Abbildung S 3. Illustration des schrittweisen Selektionsprozesses von Mäusen (Serum), Klone (Überstand), Subklone (Überstand) und Bestätigung der gereinigten Antikörper während der Antikörpergenerierung. Die Kandidaten wurden zunächst einem ELISA gegen das AMPylierte Hapten-Peptid sowie AMPyliertes Cdc42-Thr unterzogen und negativ gegen die unmodifizierten Gegenstücke evaluiert. Positive Klone wurden hinsichtlich ihrer Leistung im WB gegen verschiedene AMPylierte Proteine und ihre unmodifizierten Gegenstücke bewertet. Die Abbildung wurde modifiziert übernommen aus (Höpfner et al., 2020) (CC BY 4.0).

Um eine Proteinrückgrat-unabhängige Erkennung der AMPylierung zu gewährleisten, wurden die Antikörperkandidaten in allen Entwicklungsstadien durch ein schrittweises Selektionsverfahren ausgewählt (Abbildung 2E). Der Selektionsprozess begann mit allen Kandidaten, die in der Lage waren, die AMPylierung am Hapten mit seiner reduzierten Rückgratkomplexität im ELISA zu

erkennen. Anschließend wurden alle Kandidaten herausgefiltert, die in der Lage waren, natives Threonin-AMPyliertes Cdc42 im ELISA zu detektieren (Abbildung 2E, 1. Schritt), bevor der Nachweis mehrerer AMP-modifizierter Proteine im denaturierten Zustand mittels WB getestet wurde (Abbildung 2E, 2. Schritt). Es wurden nur Kandidaten in Betracht gezogen und für die weitere Entwicklung verwendet, welche für all diese Kriterien und alle Zielproteine positiv, sowie negativ für die jeweiligen unmodifizierten Kontrollen waren (siehe ergänzend Abbildung S 3).

Diese Selektionsstrategie, gefolgt von einer rigorosen Charakterisierung, konnte die oben genannten Fallstricke der derzeit verfügbaren Antikörper überwinden und drei neue Antikörper gegen AMPylierung schaffen: Ein vielversprechender Klon, 17G6, mit sensitiver Erkennung aller AMPylierten Proteine im WB unabhängig von ihrer modifizierten Seitenkette, mit nativer Erkennung von Cdc42-Thr-AMP im ELISA und mit geringem Hintergrund wurde für die Subklonierung und anschließende Produktion und Präparation ausgewählt. Ein weiterer Kandidat, 7C11, wurde ausgewählt, weil er im WB eine leichte Präferenz für Threonin-modifizierte Proteine zeigte. Der dritte Klon, 1G11, wurde ausgewählt, weil er trotz Immunisierung mit einem Threonin-modifizierten Peptid eine Tyr-AMP-spezifische Erkennung aufwies. Alle monoklonalen Antikörper wurden von C57 BL/6-Mäusen abgeleitet. Das Immunogen von 17G6 war eine BSA-Fusion, während es sich bei den Immunogenen von 7C11 und 1G11 um KLH-Fusionen handelte (siehe ergänzend Abbildung S 3). Für alle drei Hybridoma-Zelllinien wurden die variablen Domänen der Antikörper von GenScript als Service sequenziert (für Sequenzierungsergebnisse siehe 8.1.3 Antikörper-Sequenzen der variablen Domäne).

3.1.2 Generierte anti-AMP-Antikörper sind hochspezifisch für AMPylierung

Die drei monoklonalen anti-AMP-Antikörper 17G6, 7C11 und 1G11 wurden anschließend per Rollflaschenzellkultur produziert, aus dem Überstand mittels Protein A-Affinitätschromatographie gereinigt und auf ihre Leistungsfähigkeit bei der Erkennung von denaturiertem AMPylierten Protein mittels WB getestet. Dabei wurden Sensitivität und Nachweisgrenzen, Spezifität gegenüber AMPylierung im Gegensatz zum Einbau anderer Nukleotide und Kreuzreaktivität mit anderen PTMs evaluiert. Zusätzlich wurde die native Bindung, wie sie zuvor mittels ELISA gezeigt wurde, durch die Bildung von Proteinkomplexen zwischen den Antikörpern und AMPylierten Antigenen mittels analytischer Größenausschlusschromatographie (engl. *size exclusion chromatography*, SEC) bestätigt. Um die Detektionsgrenzen zu bestimmen (Abbildung 3A), wurden alle drei Antikörper mittels WB gegen eine Verdünnungsreihe von rekombinantem Cdc42-Tyr-AMP, -Thr-AMP, Rab1-Tyr-AMP und BiP-Thr-AMP getestet, die enzymatisch durch IbpA, VopS, DrrA bzw. FICD in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} modifiziert wurden. Alle drei Antikörper zeigten eine ähnliche Leistung für die Zielmoleküle und modifizierten Seitenketten: Die drei Antikörper waren in der Lage, bis zu 2 ng AMPyliertes Protein zu erkennen, während sie keine Reaktion mit unmodifizierten Kontrollen (50 ng) zeigten. Antikörper 1G11 erkannte modifiziertes Cdc42 an der

Thr-Seitenkette mit geringerer Empfindlichkeit als an der Tyr-Seitenkette, und 7C11 erkannte Tyr-modifizierte GTPasen mit geringerer Empfindlichkeit als Thr-modifiziertes Protein. Antikörper 17G6 zeigte keine Präferenz für eine spezifische AMPylierte Seitenkette.

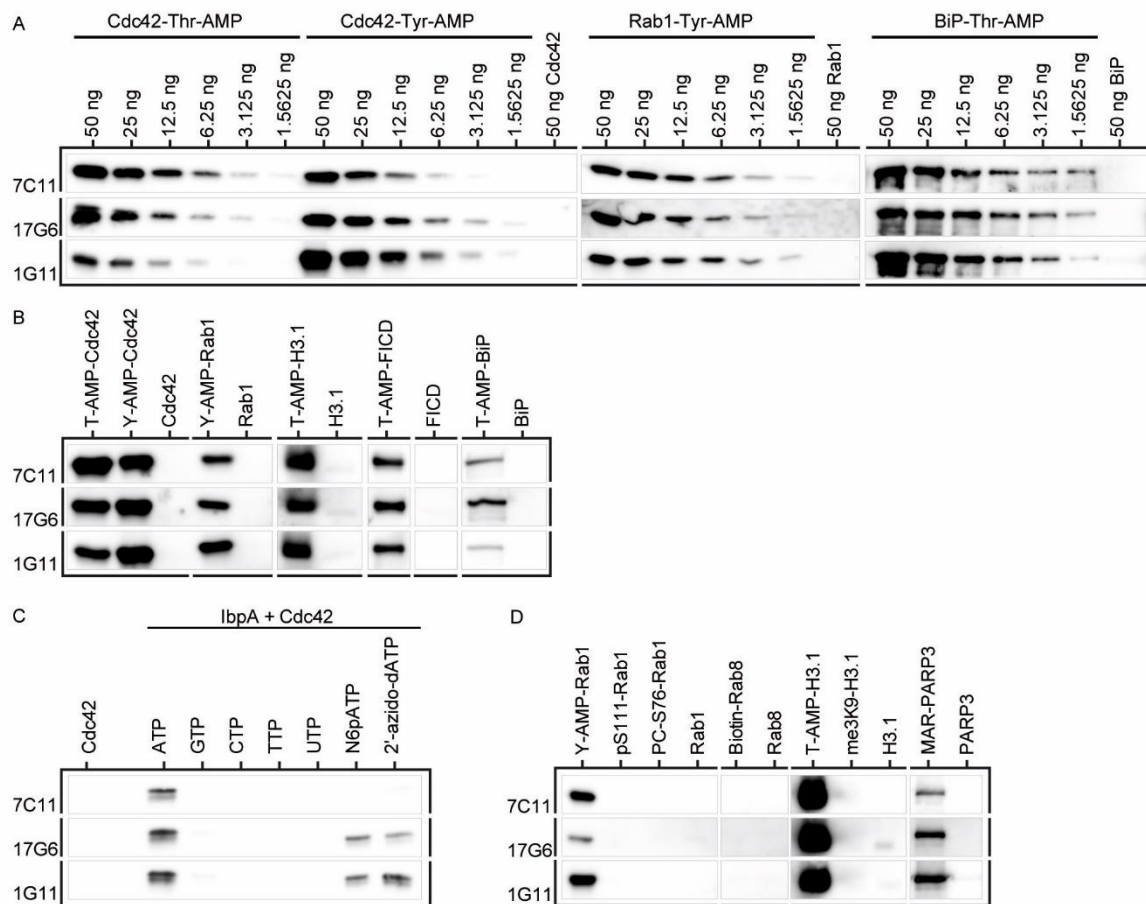


Abbildung 3: Bewertung der Spezifität und Selektivität der generierten anti-AMP-Antikörper

(A) Nachweisgrenzen von AMPyliertem rekombinatem Protein durch die monoklonalen anti-AMP-Antikörper im WB. Verdünnungsreihen ausgehend von 50 ng rekombinatem Cdc42-Thr-AMP, -Tyr-AMP, Rab1-Tyr-AMP bzw. BiP-Thr-AMP wurden im WB mit allen drei monoklonalen anti-AMP-Antikörpern wie angegeben analysiert. Unmodifizierte Kontrollen wurden mit 50 ng auf die gleichen Blots geladen wie ihre modifizierten Gegenstücke. Cdc42, Rab1 und BiP repräsentieren drei separate WBs. (B) Universelle Erkennung der AMPylierten Proteine durch die monoklonalen anti-AMP-Antikörper im WB. 50 ng rekombinantes Protein, wie angegeben, wurden im WB mit allen drei monoklonalen anti-AMP-Antikörpern, wie angegeben, analysiert. Jede Reihe repräsentiert je einen identischen WB. (C) Siehe auch Abbildung S 4. Auswertung der Spezifität gegenüber AMPylierung durch die monoklonalen anti-AMP-Antikörper im WB durch Joel Fauserⁱⁱ. Cdc42 wurde durch IbpA unter Verwendung von ATP, GTP, CTP, UTP, N6pATP und 2'-Azido-dATP NMPyliert. 50 ng rekombinantes Cdc42, unmodifiziert oder modifiziert mit Nucleotiden wie angegeben, wurden im WB mit allen drei monoklonalen anti-AMP-Antikörpern wie angegeben analysiert. Jede Reihe repräsentiert je einen identischen WB. (D) Kreuzreaktivität mit anderen PTMs durch die monoklonalen anti-AMP-Antikörper im WB. 50 ng rekombinantes Protein, wie angegeben, wurden im WB mit allen drei monoklonalen anti-AMP-Antikörpern, wie angegeben, analysiert. Jede Reihe repräsentiert je einen identischen WB. Die Abbildung wurde modifiziert übernommen aus (Höpfner et al., 2020) (CC BY 4.0).

Als nächstes sollte die Rückgrat-unabhängige Erkennung der AMPylierung bestätigt werden, indem die Antikörper auf eine breite Palette von AMPylierten Zielmolekülen angewandt wurden (Abbildung 3B). Im Ergebnis war die Erkennung der AMPylierung nicht auf kleine GTPasen beschränkt: AMPyliertes FICD, BiP und Histon H3 wurden ebenfalls erkannt, trotz der Tatsache, dass diese Moleküle sehr unterschiedliche Proteinklassen, Größen und Faltungen repräsentieren. Es

ist daher wahrscheinlich, dass auch andere AMPylierte Proteine erkannt werden können, was eine entscheidende Voraussetzung für die Target-Identifizierung ist.

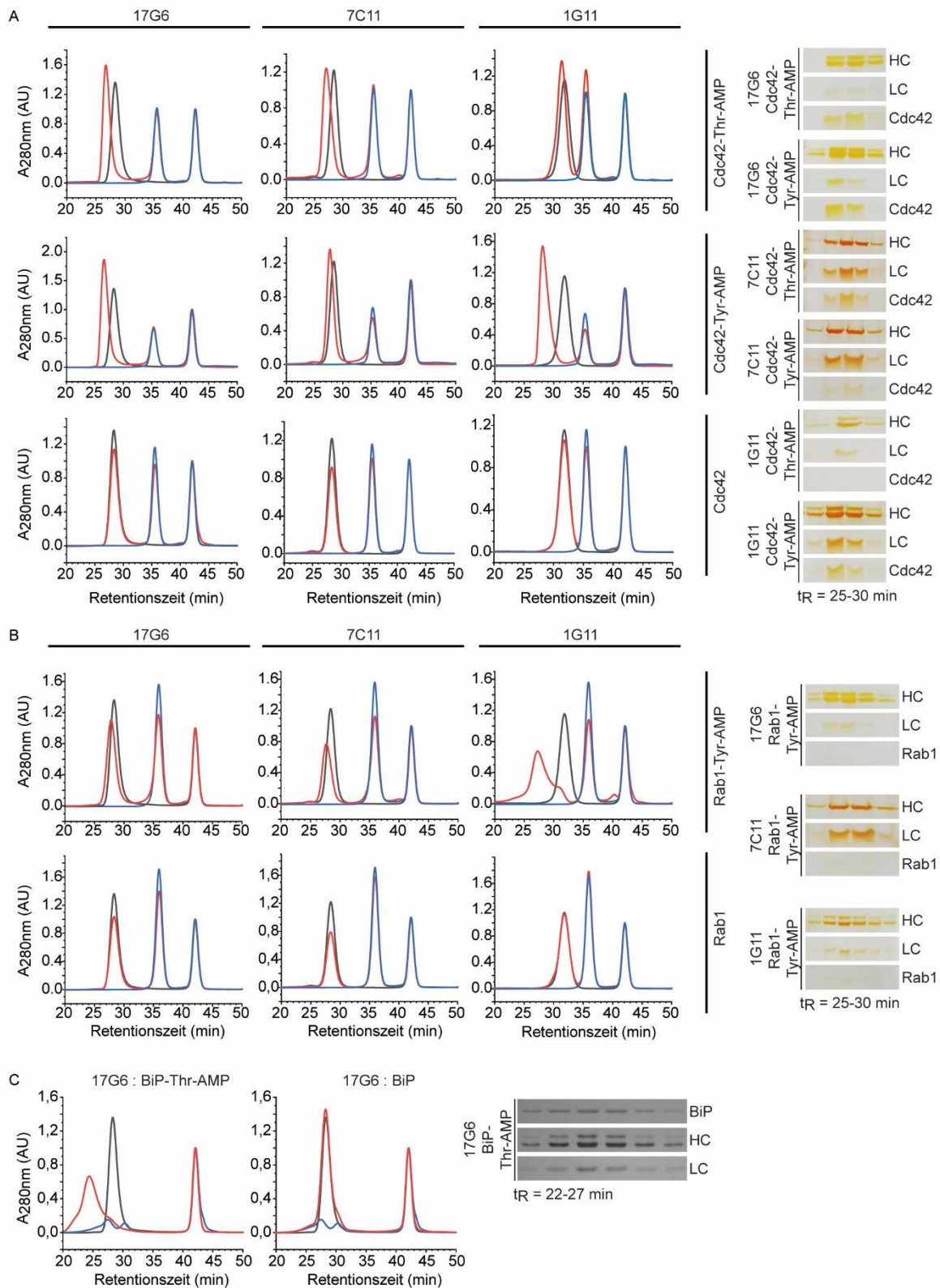


Abbildung 4: Native Bindung von AMPyliertem Antigen durch die monoklonalen anti-AMP-Antikörper
 Bindung von AMPyliertem und unmodifiziertem Cdc42 (A) und Rab1 (B) durch Antikörper 17G6, 7C11 und 1G11 sowie von BiP durch 17G6 (C), analysiert mittels analytischer SEC. 40 μ g Antigen für Cdc42 bzw. Rab1 bzw. 20 μ g BiP wurden mit 60 μ g Antikörper gemischt, darunter 50 μ M Vitamin B12 (t_R =42,5 min) als interner Standard. In schwarz Antikörper

allein wie angegeben, in blau Antigen allein wie angegeben, in rot Co-Inkubation von Antikörper und Antigen wie angegeben. Die verschobenen Antikörperpeaks (rot) wurden fraktioniert und auf Co-Elution von Antikörper (leichte Kette, LC; schwere Kette, HC) und Antigen mittels silbergefärbter SDS-PAGE analysiert (ausgeschnittene Reihen innerhalb eines Antigens entstammen einem identischen Gel). Die Abbildung wurde modifiziert übernommen aus (Höpfner et al., 2020) (CC BY 4.0).

Die native Bindung der Antikörper an ihre modifizierten Antigene wurde durch Komplexbildung mit verschiedenen AMPylierten Proteinen mittels Größenausschlusschromatographie *in vitro* untersucht (Abbildung 4). Die Verschiebung der Retentionszeit der Antikörperpeaks bei der Inkubation aller Antikörper mit AMPylierten Proteinen in Richtung eines höheren Molekulargewichts, aber keine Verschiebung bei der Inkubation mit den nicht modifizierten Proteinen, illustriert eine starke und spezifische Bindung der modifizierten Zielproteine. Die verschobenen Antikörperpeaks wurden durch Fraktionierung gesammelt und mittels silbergefärbter Natrium Dodecylsulfat (SDS) Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) auf ihre Co-Elution mit den Antigenen analysiert. Im Falle der AMPylierten Antigene co-eluierten die Antikörper mit den Antigenen. In diesem Experiment wurden die gleichen Präferenzen für Seitenketten beobachtet, wie sie bereits in WB-Studien (unter denaturierenden Bedingungen) gezeigt werden konnten: Antikörper 1G11 zeigt eine Präferenz für AMPyliertes Tyrosin, was durch eine auffällige Peakverschiebung bei der Bindung von Rab1-Tyr-AMP (Abbildung 4B), aber eine geringe Verschiebung für Cdc42-Thr-AMP verdeutlicht wird (Abbildung 4A): Antikörper 17G6 zeigt eine universale Erkennung aller modifizierten Targets (Abbildung 4A und B), einschließlich einer sehr auffälligen Peakverschiebung bei Inkubation mit AMPyliertem BiP (Abbildung 4C), während 7C11 Threonin-AMPylierung bevorzugt und keine Bindung von Rab1-Tyr-AMP zeigt (Abbildung 4A und B). Bemerkenswert ist, dass Rab1-Tyr-AMP sowohl für die native als auch für die denaturierte Erkennung durch die neuen Antikörper ein schwieriges Antigen zu sein scheint: Bereits bei der Antikörperselektion war die Rab1-Tyr-AMP-Erkennung im WB eine der Haupthürden für die meisten Kandidaten, und nur wenige Kandidaten zeigten ein starkes Signal im WB.

Um die Spezifität der Antikörper gegenüber dem übertragenen Nukleotid (z. B. AMPylierung und GMPylierung) zu testen, wurde rekombinantes IbpA verwendet, um neben AMPylierung auch UMPylierung, GMPylierung, CMPylierung und TMPylierung (NMPylierung) in Cdc42 einzuführen (Mattoo et al., 2011) (Abbildung 3C). Zusätzlich wurde die Erkennung von zwei reaktiven ATP-Analoga, die bereits im Zusammenhang mit AMPylierung beschrieben wurden, N6-Propargyl-ATP (N6pATP) (Grammel et al., 2011; Yu et al., 2014) und 2'-Azido-2'-dATP (Wang and Silverman, 2016), getestet (zur Verifizierung des Einbaus mittels MS siehe Abbildung S 4). Alle Antikörper konnten erfolgreich zwischen den Nukleotiden differenzieren und erkannten spezifisch die AMPylierung in Cdc42. Durch Verwendung von ATP-Analoga anstelle von ATP konnte bestätigt werden, dass die Antikörper auch für Basen- und Ribose-Modifikationen empfindlich sind, da nur die Antikörper 17G6 und 1G11 eine leichte Erkennung modifizierter ATP-Analoga (Abbildung 3C) zeigten. Diese Präferenz für AMPylierung lässt auf eine spezifische

Erkennung des Adeninringsystems durch die Antikörper schließen. Diese Arbeiten zur Spezifität der Antikörper gegenüber dem übertragenen Nukleotid wurden von Joel Fauserⁱⁱ durchgeführt.

Nachdem gezeigt war, dass die Antikörper empfindlich und spezifisch für die AMPylierung sind, wurden verschiedene andere gängige PTMs auf die Gefahr der Kreuzreaktion mit den Antikörpern getestet, um die Möglichkeit falsch-positiver Signale durch konkurrierende Modifikationen zu eruieren (Abbildung 3D). Im Test wurde phosphoryliertes (pS111) und phosphocholinierter (PC-S76) Rab1b im direkten Vergleich zu seiner AMPylierung, ebenso wie biotinyliertes Rab8, trimethyliertes (me3K9) Histon H3.1 im direkten Vergleich zu seiner AMPylierung und mono-ADP-ribosyliertes (MARyliertes) PARP3 eingesetzt. Wie sich zeigte (Abbildung 3D), erkannten die Antikörper keine Phosphorylierung, Phosphocholinierung, Biotinylierung oder Trimethylierung an den ausgewählten Beispielproteinen. Die Antikörper reagierten jedoch mit der MARylierung an PARP3, welche eine Adenosinmonophosphat-Einheit und damit das Erkennungsmotiv der sequenzunabhängigen anti-AMP-Antikörper beinhaltet.

3.1.3 anti-AMP-Antikörper unterscheiden zwischen AMPylierung und MARylierung

Die bisherigen Ergebnisse zeigten am Beispiel von automodifiziertem PARP3 (Abbildung 3D), dass die entwickelten anti-AMP-Antikörper auch Mono-ADP-Ribosylierung erkennen. Nachfolgend wurden daher verschiedene Zusätze zum primären Antikörper-Inkubationsschritt im WB auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Kreuzreaktivität mit ADP-Ribosylierung aufzuheben, aber die Erkennung der AMPylierung zu bewahren (Abbildung 5A). Adenin, AMP, ADP, ATP, ADP-Ribose (ADPR) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) wurden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu beiden Modifikationen und ihrer potenziellen Fähigkeit, mit der Bindung von ADP-Ribosylierung oder AMPylierung zu konkurrieren und modifizierte Proteine zu verdrängen, ausgewählt. MnCl₂ und MgCl₂ wurden als zweiwertige Kationen aufgrund ihres Potenzials ausgewählt, das negativ geladene Diphosphat der ADP-Ribosylierung, zu komplexieren und dadurch die negative Ladung abzuschirmen, die möglicherweise für die Antikörperbindung relevant sein könnte. Die Behandlung der Membran mit Hydroxylamin nach dem Blotten führt zu einer spezifischen Spaltung der ADP-Ribosylierung an Aspartat- und Glutamat-Seitenketten (Moss et al., 1983), wurde aber bisher nicht auf die Stabilität der AMPylierung hin untersucht. Keines der getesteten Additive konnte die Reaktivität der anti-AMP-Antikörper gegenüber AMPylierung oder MARylierung selektiv verändern, ohne gleichzeitig die Gesamtempfindlichkeit der Antikörper signifikant zu reduzieren. Dennoch waren AMP, ADP, ATP und NAD⁺ in der Lage, die AMPylierungssignale bis zu einem gewissen Grad zu verringern, während das MARylierungssignal weitgehend unbeeinflusst blieb. Da PARP3 bis zu 14 AutoMARylierungsstellen hat (Vyas et al., 2014), während Cdc42 nur 1-fach AMPyliert ist, könnte der beobachtete Signalverlust bei der AMPylierung gegenüber der MARylierung auf Mehrfachmodifikationen an MAR-PARP3 zurückzuführen sein und ist daher möglicherweise nicht einfach auf andere 1-fach ADP-ribosylierte

Proteine übertragbar. Wie erwartet, führte die Behandlung mit Hydroxylamin zu einem starken Verlust des MARYlierungssignals aufgrund der Abspaltung der ADP-Ribosylgruppe. Im Gegensatz dazu blieb das AMPylierungssignal völlig unbeeinflusst. Das verbleibende Signal von automodifiziertem PARP3 resultiert höchstwahrscheinlich aus den beiden berichteten Automodifikationsstellen an Lys6 und Lys37 (Vyas et al., 2014), die durch Hydroxylamin nicht gespalten werden.

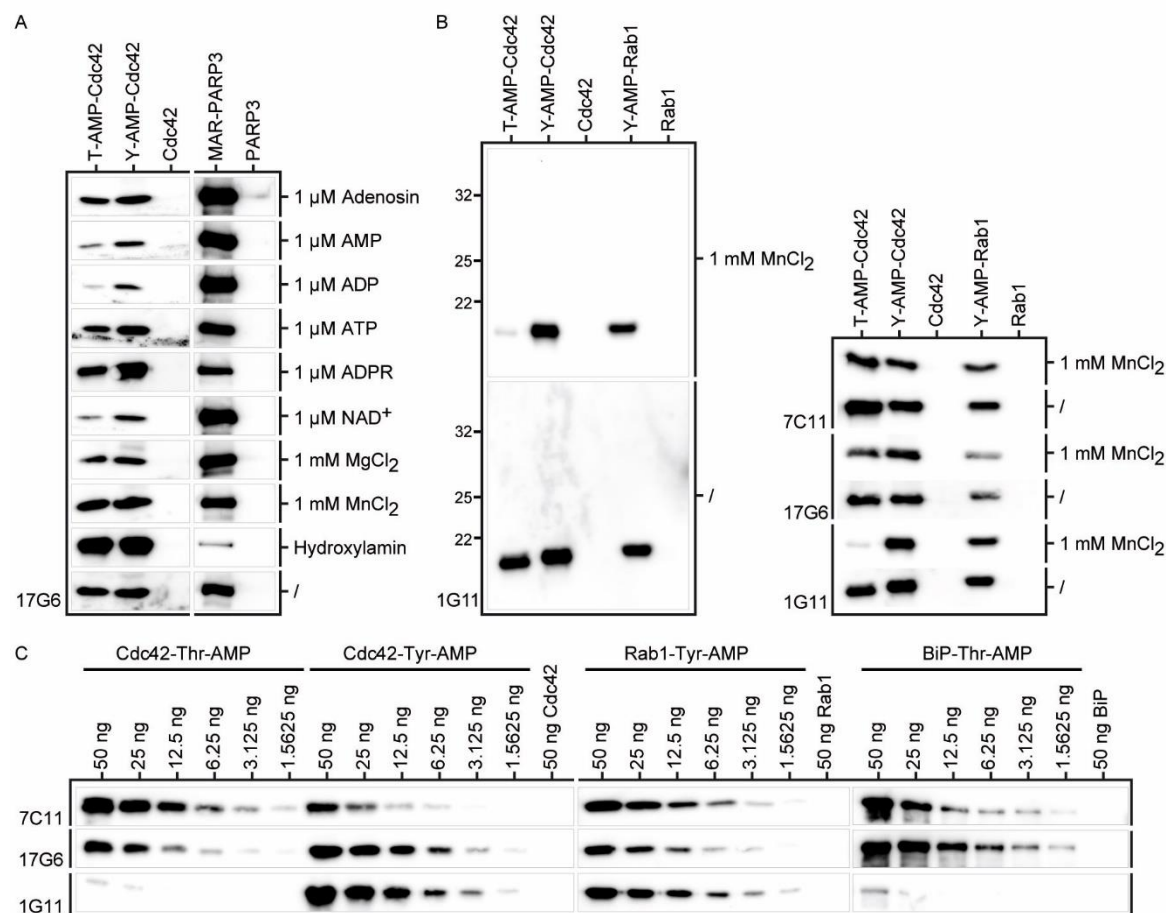


Abbildung 5: Erkennung von AMPylierung und MARYlierung in Gegenwart von Additiven

(A) Erkennung von AMPylierung vs. MARYlierung durch den Antikörper 17G6, entweder in Anwesenheit von Additiven wie angegeben während der Inkubation des primären Antikörpers oder nach Hydroxylamin-Behandlung. 50 ng rekombinantes Cdc42-Thr-AMP, -Tyr-AMP sowie mono-ADP-ribosyliertes PARP3 und ihre unmodifizierten Gegenstücke wie angegeben wurden im WB mit 17G6 analysiert. Additive wie angegeben, mit Ausnahme von Hydroxylamin, wurden während der Inkubation mit dem primären anti-AMP-Antikörper über Nacht bei 4°C zugegeben. Die Hydroxylamin-Behandlung zur Abspaltung der ADP-Ribosylierung an Asp- und Glu-Resten erfolgte für 8 h vor der Inkubation mit dem primären Antikörper. Jede Reihe entstammt je einem identischen WB. (B) Einfluss von 1 mM MnCl₂ auf Hintergrund und Seitenkettenspezifität. 50 ng rekombinantes Protein wie angegeben wurden im WB mit allen drei monoklonalen anti-AMP-Antikörpern in An- oder Abwesenheit von 1 mM MnCl₂ während der primären Antikörper-Inkubation wie angegeben analysiert. Jede Reihe entstammt je einem identischen WB. Links: Beispielhafte Volldarstellung der abgeschnittenen Reihen von 1G11 (rechts) zur Veranschaulichung der Veränderung des Hintergrunds. (C) Detektionsgrenzen unter dem Einfluss von 1 mM MnCl₂. Verdünnungsreihen ausgehend von 50 ng rekombinantes Cdc42-Thr-AMP, -Tyr-AMP, Rab1-Tyr-AMP bzw. BiP-Thr-AMP wurden im WB mit allen drei monoklonalen anti-AMP-Antikörpern wie angegeben in Gegenwart von 1 mM MnCl₂ während der primären Antikörper-Inkubation analysiert. Unmodifizierte Kontrollen wurden mit 50 ng auf die gleichen Blots geladen wie ihre modifizierten Gegenstücke. Cdc42, Rab1 und BiP repräsentieren drei separate WBs. Die Abbildung wurde unverändert übernommen aus (Höpfner et al., 2020) (CC BY 4.0).

Die Zugabe von 1 mM $MnCl_2$ während des Inkubationsschritts des primären Antikörpers beeinflusste zwar nicht die Signalintensität, führte aber zu einem deutlich reduzierten Hintergrund. Auffälligerweise führte die Zugabe von $MnCl_2$ auch zu einer stark erhöhten Tyrosinspezifität für den Antikörper 1G11 in Gegenwart von $MnCl_2$ (Abbildung 5B). Die Zugabe von $MnCl_2$ wurde daher im Hinblick auf die zuvor getesteten Nachweisgrenzen der Antikörper weiter evaluiert. Die Ergebnisse bestätigten, dass die Nachweisgrenzen der Antikörper 17G6 und 7C11 gegenüber AMPylierten Antigenen durch Zugabe von $MnCl_2$ nicht signifikant verändert wurden, während sich die Fähigkeit von 1G11, Cdc42-Thr-AMP sowie BiP-Thr-AMP zu detektieren stark verminderte (Abbildung 5C).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hier beschriebenen entwickelten Antikörper in ihrer Kombination sensitive und spezifische Werkzeuge zum Nachweis von AMPylierung und Mono-ADP-Ribosylierung sind. Durch Zugabe von $MnCl_2$ zu den primären Antikörper-Inkubationsschritten im WB kann der Hintergrund der Antikörper deutlich reduziert werden, und 1G11 zeigt eine ausgeprägte Tyrosin-Spezifität. Die Behandlung der Membranen mit Hydroxylamin nach dem Blotten führt zur Spaltung der Glutamat- und Aspartat-gebundenen ADP-Ribosylierung, während die AMPylierung unbeeinflusst bleibt. Daher ergibt die Kombination aller drei Antikörper mit Zugabe von $MnCl_2$ und Hydroxylamin-Behandlung ein Tool-Kit, das in der Lage ist, ADP-Ribosylierung und AMPylierung sensitiv zu detektieren, zwischen beiden zu differenzieren und im Falle der AMPylierung nicht nur Targets im Allgemeinen zu erkennen, sondern auch Informationen über deren modifizierte Seitenketten zu geben.

3.1.4 Generierte anti-AMP-Antikörper erkennen zelluläre AMPylierung

Nach der Charakterisierung und Evaluierung der generierten Antikörper an gereinigten und massenspektrometrisch bestätigten Antigenen wurde als nächstes die Leistung der Antikörper an Zelllysaten im bekannten Kontext der BiP-AMPylierung sowohl unter denaturierten als auch nativen Bedingungen evaluiert, da die Fähigkeit zur Reproduktion früherer Ergebnisse mit diesen neuen Werkzeugen entscheidend ist für das Vertrauen in künftige Erkenntnisse.

Die BiP-AMPylierung durch FICD geht in Zellen bei ER-Stress verloren, z. B. durch Stimulation mit Thapsigargin (TG) (Ham et al., 2014; Preissler et al., 2015). Cycloheximid (CHX) hingegen stoppt die Proteinproduktion und entlastet somit das ER, was zu einem signifikanten Anstieg der BiP-AMPylierung führt. Um diese Ergebnisse zu reproduzieren, mussten zunächst die Nachweisgrenzen von BiP-AMP in der Umgebung von Zelllysaten bestätigt werden (Abbildung 6A). Dementsprechend wurde eine Verdünnungsreihe rekombinanten AMPylierten BiPs pro Gelspur mit je 20 μ g HEK293-Lysat vermischt, welches entweder als Kontrolle (ctrl) unbehandelt war, oder für 2 h mit TG behandelt wurde, um die AMPylierung an endogenem BiP zu entfernen. Als zusätzliche Kontrollen wurden die Lysate entweder zusätzlich mit 50 ng unmodifiziertem BiP versetzt oder nicht. Bei der WB-Analyse mit dem Antikörper 17G6 in Anwesenheit von $MnCl_2$

konnten die gleichen niedrigen Nachweisgrenzen von bis zu 1,5 ng für BiP-AMP im Lysat bestätigt werden wie zuvor in Abbildung 5C am gereinigten Protein gezeigt. Um zu verifizieren, dass die zuvor bestätigte Fähigkeit der Antikörper, natives AMPyliertes Protein zu binden, sich in eine erfolgreiche IP übersetzen würde, wurde Antikörper 17G6 im Kontext der BiP-AMPylierung eingesetzt (Abbildung 6B). Die IP auf rekombinantem BiP und BiP-AMP zeigte, dass die Immunpräzipitation erstens von der Anwesenheit des Antikörpers 17G6 abhängig ist, da die Beads allein weder modifiziertes noch unmodifiziertes BiP präzipitieren, und zweitens spezifisch die AMPylierung erkennt, da das nicht modifizierte BiP nicht durch den Antikörper 17G6 präzipitiert wird.

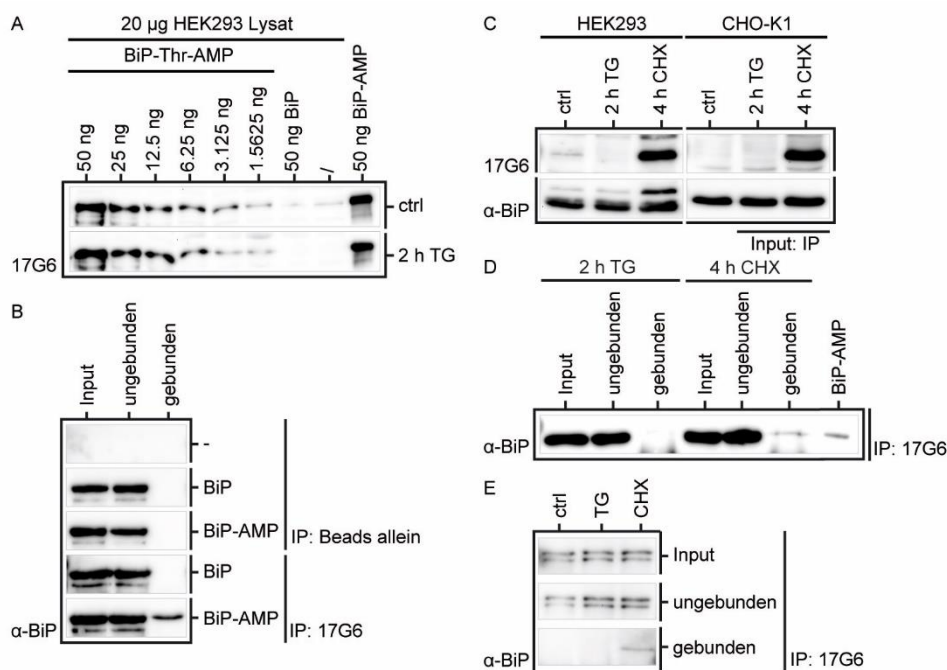


Abbildung 6: Auswertung der generierten anti-AMP-Antikörper in IP und Anwendung auf Zellysate

(A) Analyse der BiP-AMPylierungsnachweisgrenze in HEK293-Lysat, entweder unbehandelt (ctrl) oder mit TG behandelt, im WB durch Antikörper 17G6 in Gegenwart von $MnCl_2$. 20 μg HEK293-Lysat wurden wie angegeben mit einer Verdünnungsreihe von rekombinantem BiP-AMP oder 50 ng unmodifiziertem BiP versetzt. Lysat allein und 50 ng gereinigtes BiP-AMP allein dienten als Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle. Reihen stellen je einen identische WB dar. (B) IP mit Antikörper 17G6 auf rekombinantem BiP-AMP. 20 μg rekombinantes BiP oder BiP-AMP in 500 μl wurden mit 10 μg 17G6 und Protein A/G Magnetic Beads oder Beads allein präzipitiert. Gebundenes Protein wurde mit 100 μl 1x Laemmli eluiert. Die Proben mit und ohne Zugabe von 17G6 wurden identisch behandelt. Jeweils 7,5 μl der Input- und ungebundenen Probe inklusive 5x Laemmli-Puffer, bzw. 2,5 μl Elution wurden im WB mit einem anti-BiP-Antikörper analysiert. Die Reihen IP: nur Beads und IP: 17G6 stellen jeweils die gleiche WB dar. (C) Analyse der BiP-AMPylierung nach ER-Stress durch TG oder CHX im WB. 20 μg Lysat von HEK293- und CHO-K1-Zellen, unbehandelt oder entweder mit TG für 2 h oder CHX für 4 h behandelt, wurden im WB mit dem Antikörper 17G6 in Gegenwart von $MnCl_2$ analysiert, bevor der Blot gestrippt und mit einem anti-BiP-Antikörper nachbehandelt wurde. Die angegebenen CHO-K1-Proben dienten als Input für die IP in Abbildung 6D. Alle Proben repräsentieren einen WB. (D) IP von endogenem BiP-AMP mit Antikörper 17G6 aus TG- und CHX-behandelten (wie angegeben) CHO-K1-Zellysaten. 1 mg (in 500 μl) Lysat von CHO-K1-Zellen, die entweder mit TG für 2 h oder CHX für 4 h behandelt wurden, wurden mit 10 μg 17G6 und Protein A/G Magnetic Beads präzipitiert. Gebundene Proteine wurden mit 100 μl 1x Laemmli eluiert und auf 20 μl konzentriert. Je 5 μl der Input- und ungebundenen Probe inklusive 6x Laemmli-Puffer und 20 μl der konzentrierten Elution wurden im WB mit einem anti-BiP-Antikörper analysiert. 50 ng rekombinantes BiP-AMP wurden als Kontrolle geblottet. (E) IP von endogenem BiP-AMP mit Antikörper 17G6 aus unbehandelten (ctrl), TG- und CHX-behandelten (wie angegeben) CHO-K1-Zellysaten nach Methanol/Chloroform-Präzipitation. 250 μg Lysat von CHO-K1-Zellen, unbehandelt oder entweder mit TG für 2 h oder CHX für 4 h behandelt, wurden durch Methanol/Chloroform-Fällung ausgefällt. Denaturiertes Protein des resuspendierten Proteinpellets wurde mit 5 μg 17G6 in 125 μl und Protein A/G Magnetic Beads immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden mit 50 μl 1x Laemmli eluiert. Je 5 μl der Input- und ungebundenen Probe inklusive 6x

Laemmli-Puffer und 20 µl der Elution wurden in WB mit einem anti-BiP-Antikörper analysiert. Alle Zeilen repräsentieren einen identischen WB. Die Abbildung wurde modifiziert übernommen aus (Höpfner et al., 2020) (CC BY 4.0).

Nachdem so nachgewiesen war, dass Antikörper 17G6 in der Lage ist, BiP-AMP in Zelllysaten in geringen Mengen im WB zu detektieren, sowie BiP-AMP in einer IP zu binden, wurden beide Techniken auf die oben erwähnte BiP-AMPylierung im Kontext von ER-Stress angewendet. Diese Beobachtungen wurden mit Antikörper 17G6 und MnCl₂ als Additiv sowohl in HEK293- als auch in CHO-K1-Zellen (Abbildung 6C) mittels WB reproduziert und konnten die bereits publizierten Befunde bestätigen (Ham et al., 2014; Preissler et al., 2015). Während die initiale endogene Menge an AMPyliertem BiP in HEK293 etwas höher erscheint als in CHO-K1-Zellen, reagieren beide Zelllinien ähnlich auf eine TG-Behandlung für 2 h mit der vollständigen Entfernung der BiP-AMPylierung und auf eine CHX-Behandlung für 4 h mit einem starken Anstieg von AMPyliertem BiP.

Um zu verifizieren, dass sich die Fähigkeit des Antikörpers 17G6, rekombinantes BiP zu präzipitieren (Abbildung 6B) erfolgreich in eine IP in der Umgebung von Zelllysaten übersetzen lässt, wurde Antikörper 17G6 auf die oben genannten TG- sowie CHX-behandelten CHO-K1-Lysate (Abbildung 6C) angewendet (Abbildung 6D). Der Nachweis einer erfolgreichen IP aus Zelllysaten wurde durch die Nachweisgrenze des anti-BiP-Antikörpers erschwert, der BiP unter 50 ng pro Tasche nicht mehr erkannte. Unter Berücksichtigung der weitaus niedrigeren Nachweisgrenzen der anti-AMP-Antikörper deutet die Schwierigkeit, in unbehandelten CHO-K1-Zelllysaten im WB eine Bande durch den anti-AMP-Antikörper 17G6 zu detektieren (Abbildung 6C), auf sehr geringe endogene Mengen an AMPyliertem BiP hin, während der weniger empfindliche anti-BiP-Antikörper zu einem starken Signal führte. Es war demnach davon auszugehen, dass der Anteil an AMPyliertem BiP in den unbehandelten CHO-K1-Zelllysaten sehr gering ist. Daher wurde die AMPylierung durch Cycloheximid-Behandlung stimuliert, um genügend Präzipitations-Material für die anschließende Detektion mit dem anti-BiP-Antikörper im WB zu erzeugen. Obwohl zwar generell gezeigt werden konnte, dass Antikörper 17G6 in der Lage ist, AMPyliertes BiP aus CHX-behandelten Zelllysaten zu immunpräzipitieren, blieb dennoch die Detektion durch den anti-BiP-Antikörper schwach (Abbildung 6D). Dieser Effekt kann möglicherweise durch die hohen intrazellulären Konzentrationen von Nukleotiden wie AMP, ADP und ATP erklärt werden, die mit der AMPylierung bei den anti-AMP-Antikörpern um die Bindung konkurrieren. Um diese Herausforderung zu überwinden, wurde das Proteom aus unbehandelten (ctrl), sowie TG- und CHX-behandelten CHO-K1-Zelllysaten durch Methanol/Chloroform-Präzipitation extrahiert, um konkurrierende Nukleotide zu eliminieren. Denaturiertes AMPyliertes BiP wurde aus den resuspendierten Proteinpellets mit Antikörper 17G6 immunpräzipitiert (Abbildung 6E). Angereichertes BiP-AMP konnte in der gebundenen Probe aus CHX-behandelten CHO-K1-Zellen in deutlich höheren Mengen im Verhältnis zum Input nachgewiesen werden als

ohne Methanol/Chloroform-Präzipitation (Abbildung 6D). Die Ausbeute und Effizienz der IP von AMPyliertem BiP wurde dadurch stark verbessert.

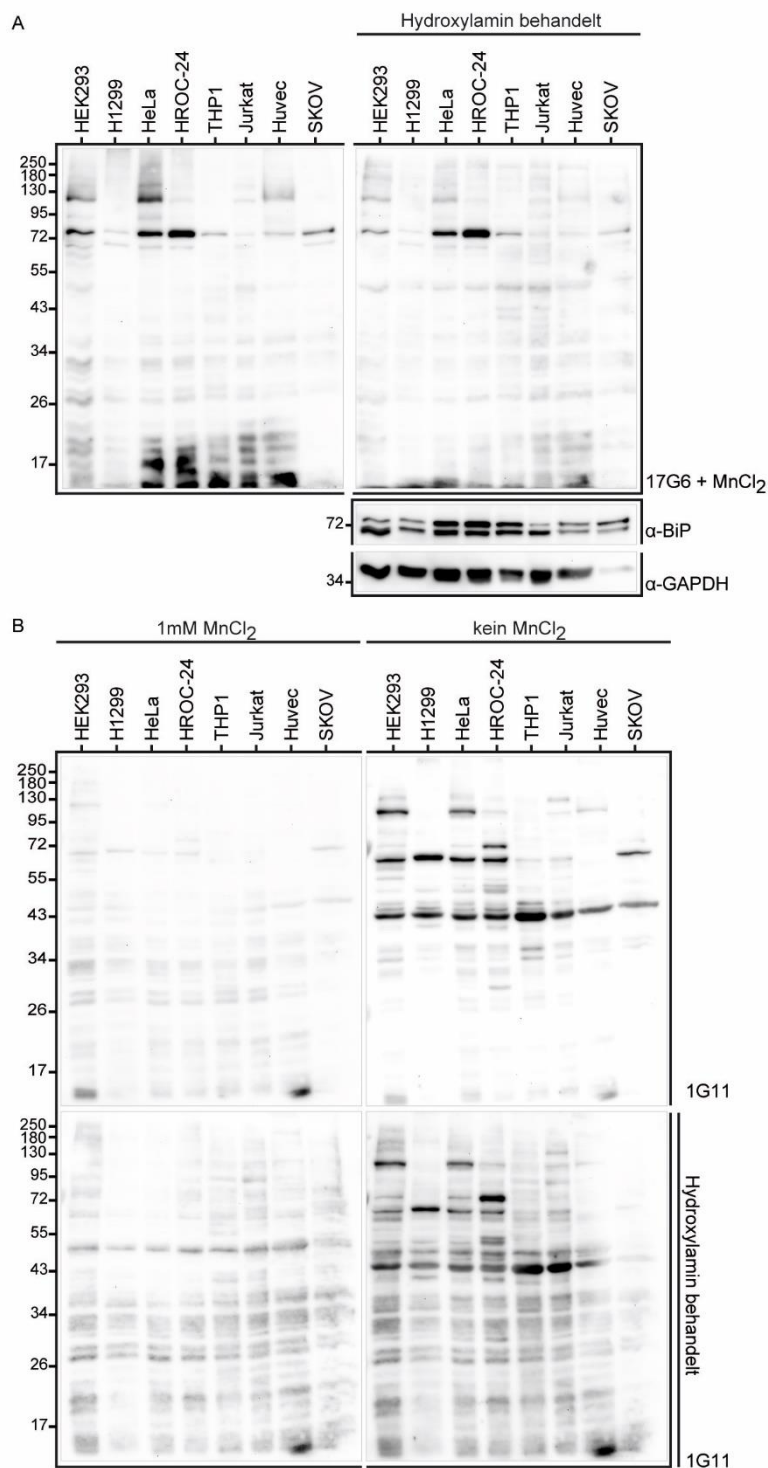


Abbildung 7: Analyse der AMPylierungsmuster in verschiedenen Krebs- und immortalisierten Zelllinien im WB
 (A) Analyse der AMPylierungsmuster in verschiedenen Zelllinien wie abgebildet im WB mit dem Antikörper 17G6 in Gegenwart von MnCl₂. 20 µg Lysat pro Tasche wurden mit Antikörper 17G6 unter Verwendung von 1 mM MnCl₂ als Zusatz während der Inkubation des primären Antikörpers sondiert. Anschließend wurde der Blot mit 1 M Hydroxylamin behandelt, um die ADP-Ribosylierung an Aspartat- und Glutamat-Resten zu spalten, und mit dem Antikörper 17G6 in Gegenwart von 1 mM MnCl₂ erneut inkubiert. Der identische Blot wurde gestrippt und mit Antikörpern gegen BiP und GAPDH als Ladekontrolle nachbehandelt. (B) Wie (A) mit dem Antikörper 1G11 in Gegenwart von MnCl₂. Zusätzlich wurde der identische Blot mit 1G11 in Abwesenheit von MnCl₂ vor und nach der Hydroxylamin-Behandlung nachbehandelt. Die Abbildung wurde modifiziert übernommen aus (Höpfner et al., 2020) (CC BY 4.0).

Es stellte sich nun die Frage, ob diese empfindlichen Werkzeuge auch in der Lage sind, neue AMPylierungsbanden in Zelllysaten zu erkennen. Um dies zu klären, wurde in Zusammenarbeit mit Marietta Kaspersⁱⁱⁱ eine Reihe von verfügbaren immortalisierten Zelllinien und Krebszelllinien mit den neu entwickelten monoklonalen Antikörpern auf das Auftreten von AMPylierungsbanden untersucht (Abbildung 7 und ergänzende Abbildung S 5). In der Tat konnten die anti-AMP-Antikörper eine Vielzahl von Banden im Bereich von 58-245 kDa und 11-22 kDa nachweisen. Auffallend ist, dass sich einige Banden zwischen den Zelllysaten unterscheiden, während andere unabhängig von der Zelllinie immer wieder auftreten. Während einige Zelllinien, wie z. B. THP-1, sehr wenig bis gar keine AMPylierungssignale zeigen, weisen andere Zelllinien, wie z. B. HeLa, HEK293 und HROC-24 Zellen, starke AMPylierungssignale auf. Die Behandlung der Membranen mit Hydroxylamin zur Abspaltung der ADP-Ribosylierung an Aspartat- und Glutamatresten entfernt zwar Banden bei 11-22 kDa, vermindert aber nicht signifikant die Banden bei 70-80 kDa. Darüber hinaus werden diese Banden nicht von dem anti-Pan-ADPR-Bindungsreagenz (Merck) (ergänzende Abbildung S 6) oder dem Tyrosin-spezifischen anti-AMP-Antikörper 1G11 (Abbildung 7B), sondern lediglich von den beiden anti-AMP-Antikörpern 7C11 (ergänzende Abbildung S 5) und 17G6 (Abbildung 7A) erkannt, was stark auf eine AMPylierung an Threonin-Resten hindeutet. Da der Antikörper 1G11 zwischen einer allgemeinen Erkennung aller AMPylierten Seitenketten (Abbildung 3A und B) und einer Tyrosin-spezifischen Erkennung in Anwesenheit von $MnCl_2$ (Abbildung 5B und C) umschaltet, die Detektion der MARYlierung aber unverändert bleibt, wurde der zuvor mit Antikörper 1G11 in Anwesenheit von $MnCl_2$ inkubierte Blot erneut mit Antikörper 1G11, diesmal ohne $MnCl_2$ -Zugabe, inkubiert (Abbildung 7B), sowohl vor als auch nach Hydroxylaminbehandlung. Sowohl vor als auch nach Hydroxylaminbehandlung ergab sich in Abwesenheit von $MnCl_2$ für 1G11 ein deutlich verstärktes Bandenmuster, was ein weiteres Indiz für eine überwiegende Threonin-AMPylierung in humanen Zellen ist. Die wiederkehrende Bande bei 70 kDa, die höchstwahrscheinlich BiP-AMP darstellt, unterscheidet sich stark in ihrer Intensität zwischen den Zelllysaten: Während H1299-, THP-1-, Jurkat- und Huvec-Zellen diese Bande überhaupt nicht zeigen, ist sie in HeLa-, HROC-24- und HEK293-Zellen deutlich vertreten. Das Sondieren der gleichen Zelllysate mit beiden kommerziellen anti-AMP-Antikörpern (Merck) ergab keine signifikanten Banden für den anti-Thr-AMP-Antikörper (ergänzende Abbildung S 6), wie aufgrund seiner Leistung bei rekombinantem AMPyliertem Protein (Abbildung 2A) erwartet. Obwohl der anti-Tyr-AMP-Antikörper sowohl in THP-1- als auch in Jurkat-Zelllysaten eine Bande bei etwa 30 kDa nachwies (ergänzende Abbildung S 6), erkannte er die Positivkontrolle von Cdc42-Tyr-AMP nicht, so dass die Bedeutung der Bande fraglich bleibt.

3.2 Studie der AMPylierungsaktivität und DNA-Bindung von CbFic2 im Kontext der *C. burnetii*-Infektion

3.2.1 AMPylierungsmuster während *C. burnetii*-Infektion

Die im Rahmen der Dissertation von Adam Cichy von N. Mohammadi unter der Leitung von Prof. Dr. C. Hedberg an der Universität von Umeå, Schweden, durchgeführte Untersuchung von AMPylierungsmustern während der Infektion durch *C. burnetii* zeigte uneindeutige und widersprüchliche Daten (Cichy, 2016). Laut Beschreibung handelt es sich um HeLa Zellen, welche mit *C. burnetii* infiziert wurden, es blieb jedoch aufgrund von Widersprüchen zwischen Abbildungsbeschriftung und Methodenteil unklar, ob es sich dabei um virulente (NMI) oder avirulente (NMII) Stämme handelte. Des Weiteren lässt sich die Repräsentativität der dort untersuchten Zeitpunkte von 0, 1, 4, 8, 24 h *post infectionem* (hpi) für den mehrtägigen Coxielleninfektionsverlauf, bei dem erst Stunden nach Infektion eine Effektorensekretion zu erwarten ist (Carey et al., 2011; Newton et al., 2013), in Frage stellen. Um diese Datenlage mit den neu entwickelten Antikörpern auszubauen, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Studien an Coxiellen-infizierten Zelllysaten in Kollaboration mit Eric Martinez^{iv}, PhD, (NMII) und Dr. Soraya Mezouar^v (NMI) durchgeführt. In beiden Fällen wurde die murine monozytische Zelllinie J774 in 6-Well-Platten in abnehmender Konzentration ausgesät, um dem langen Inkubationszeitraum von 96 h entsprechend ein Überwachsen der Platten zu verhindern. Für die 30 min bis 4 h Zeitpunkte wurden 600 000 Zellen/Well gesät, für die restlichen Zeitpunkte bis 96 h 300 000 Zellen/Well. Die Zellen wurden mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 100 mit NMI bzw. NMII durch die Kollaborationspartner infiziert, zum jeweiligen Zeitpunkt geerntet und sofort mit RIPA-Puffer lysiert. Die mit RIPA lysierten Proben wurden dann von mir mittels WB auf die AMPylierung untersucht (Abbildung 8A und B).

Die Analyse mit klassischer Tris-Glycin basierter SDS PAGE gestaltete sich dabei als schwierig, da Banden häufig schmierten und besonders im Bereich unter 25 kDa nicht reproduzierbar waren. Erst ein Wechsel auf Bis-Tris Gele, welche klassischerweise auch bei der WB-Analyse von PTMs an Histonen genutzt werden, erzeugte ein klares und reproduzierbares Bandenmuster. Allerdings blotten je nach Acrylamidanteil des Gels, stärker als bei Tris-Glycin-Gelen, bevorzugt andere Größenbereiche. Um diese Herausforderung zu verdeutlichen, sind für die Infektion mit NMI in Abbildung 8A Acrylamidanteile von 10-15 % abgebildet. Dabei zeigen sich drei sehr prägnante Bandenbereiche in den Molekulargewichtsbereichen bei 17 kDa, 70 kDa und 120 kDa. Während das Signal bei 120 kDa über den untersuchten Infektionszeitraum weitestgehend stabil bleibt, steigt das Signal bei 70 kDa nach Infektion erst an, bevor es zwischen 4 h und 24 h nach Infektion deutlich absinkt. Das Signal um 17 kDa wiederum ist schwer zu interpretieren: Während es im 15 % Gel über den zeitlichen Verlauf stark abnimmt und scheinbar mehrere Banden umfasst, ist beim Signal

im 12 % Gel kein eindeutiger Trend erkennbar (Abbildung 8A). Bei der Infektion von J774 Zellen mit dem avirulenten Stamm NMII ist das AMPylierungsmuster noch schwieriger zu interpretieren: Auch hier treten Banden um 17 kDa, bei ca. 70 kDa und eine Schmierbande bei 120 kDa auf; allerdings ist der Verlauf dieser Signale sehr unregelmäßig und deutlich schwächer ausgeprägt (Abbildung 8B). Bei all dem ist nicht auszuschließen, dass auch ADP-Ribosylierung vom anti-AMP-Antikörper 17G6 detektiert wird.

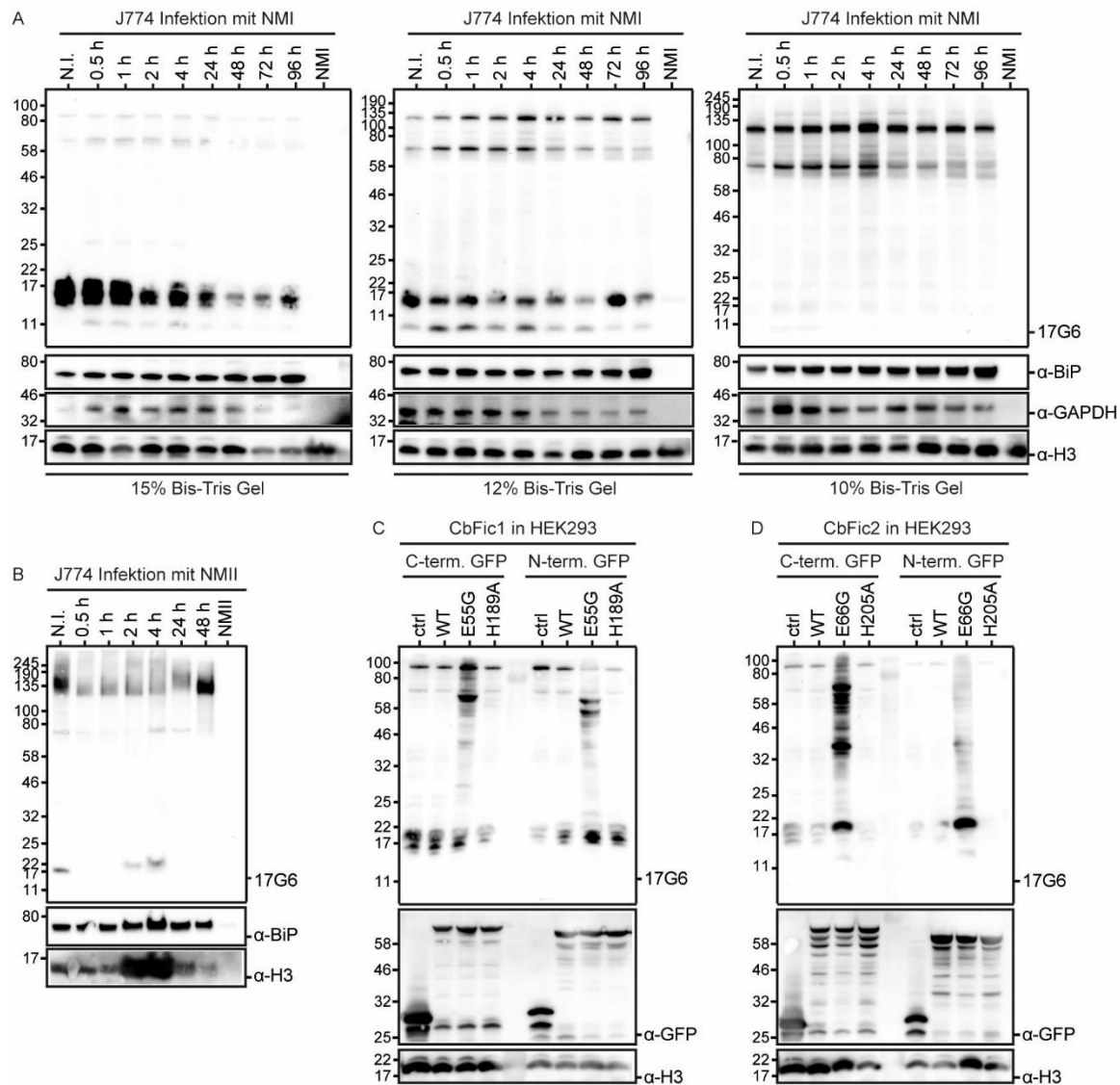


Abbildung 8: Analyse der AMPylierungsmuster im zeitlichen Verlauf der Coxielleninfektion

(A, B) Analyse der AMPylierungsmuster im zeitlichen Verlauf der Infektion von murinen J774 Makrophagen durch virulente NMI (A) oder avirulente NMII (B) *C. burnetii* mittels WB mit anti-AMP-Antikörper 17G6 in Gegenwart von 1 mM MnCl₂. J774 Zellen wurden in Kooperation mit Eric Martinez^{iv}, PhD, (NMII) und Dr. Soraya Mezouar^v (NMI) mit *C. burnetii* infiziert. 20 µg RIPA-Lysat pro Tasche wurden mit Bis-Tris Gelen geblottet. Identische Blots wurden gestrippt, in Streifen geschnitten und mit Antikörpern gegen BiP, GAPDH und Histone H3 als Ladekontrolle nachbehandelt. (C, D) Analyse der AMPylierungsmuster nach transienter Überexpression von GFP-getaggttem CbFic1 (C) oder CbFic2 (D) in HEK293 Zellen. Getaggttes Protein wurde für 48 h in HEK293 Zellen exprimiert. 20 µg RIPA-Lysat pro Tasche wurden mit Bis-Tris Gelen geblottet und mit Antikörper 17G6 in Gegenwart von 1 mM MnCl₂ sondiert. Identische Blots wurden gestrippt, in Streifen geschnitten und mit Antikörpern gegen GFP und Histone H3 als Ladekontrolle nachbehandelt.

Vergleicht man die AMPylierungsmuster während der Coxielleninfektion mit dem Muster nach transienter Überexpression von *green fluorescent protein* (GFP)-getagtem CbFic1 (Abbildung 8C) und CbFic2 (Abbildung 8D) in HEK293 Zellen, zeigt sich keine direkte Übereinstimmung von Bandenmustern. Auch die bereits von Cichy (Cichy, 2016) dokumentierte Histon H3-AMPylierung durch CbFic2 auf Höhe von 17 kDa weist keine signifikanten Ähnlichkeiten mit den Veränderung nach NMI-Infektion auf (Abbildung 8A), wo das 17 kDa Signal eher ab- als zunimmt. Aufgrund der Überlagerung vieler Signale ist in diesem Bandenbereich eine sichere Aussage aber nicht möglich. Eine Immunpräzipitation von Histon H3 aus den NMI-Infektionsproben zeigt keine detektierbare AMPylierung (Daten nicht gezeigt).

In Kooperation mit Eric Martinez^{iv}, PhD, wurden deswegen T4SS-Effektoren-Sekretionsexperimente im Bezug auf CbFic2 vorgenommen. Dabei kamen drei verschiedene Methoden zur Anwendung: Der β -Lactamase-Translokations-Assay (BLAM) (Charpentier and Oswald, 2004) beobachtet die Effektorenssekretion in lebenden Zellen und beruht auf der Fusion des Effektors mit der TEM-1 β -Lactamase (Zlokarnik et al., 1998). Nach erfolgreicher Translokation des Fusionskonstrukts aus dem Bakterium ins Zytoplasma der Wirtszelle spaltet die β -Lactamase den β -Lactam-Ring des zellgängigen, grün fluoreszenten Substrats Cumarin-Cephalosporin-Fluorescein (CCF2-AM), was einen Wechsel zur blauen Fluoreszenz der freien Cumarin-Einheit zur Folge hat. Diese Nachweismethode ist sensitiv genug, um weniger als 100 β -Lactamase-Einheiten nachzuweisen, und sollte damit auch gering translozierte Effektoren detektieren können (Zlokarnik et al., 1998). Dagegen beruht das CyA-System auf einer Fusion des Effektors mit der Calmodulin-abhängigen katalytischen Domäne des *Bordetella pertussis* Toxins CyA, welche in Gegenwart von eukaryotischem Calmodulin zelluläres ATP in quantifizierbares zyklisches AMP (cAMP) umwandelt (Sory and Cornelis, 1994). Als dritter Ansatz wurde eine Fusion des Effektors mit einem HA-Tag gewählt, um in Immunfluoreszenz (IF)-Analysen nach Fixierung und Permeabilisierung der infizierten Zellen die Translokation mit einem anti-HA-Antikörper nachzuweisen. Keine der drei Methoden konnte in der Infektion von THP-1 oder U2OS Zellen durch NMII an den gewählten Beobachtungszeitpunkten von 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi und 96 hpi eine signifikante Sekretion von CbFic2 zeigen (Daten nicht dargestellt). Damit kann auf Grundlage dieser Experimente zum jetzigen Zeitpunkt nicht bestätigt werden, dass CbFic2 eine Rolle in der Coxielleninfektion spielt, da weder seine Sekretion, noch die AMPylierung von Histon H3 nachgewiesen werden kann.

3.2.2 Zelluläre AMPylierung nach transienter CbFic2 Überexpression

Adam Cichy hatte in seiner Arbeit bereits GFP-CbFic2-Fusionskonstrukte zur Expression in Säugetierzellen kloniert, um die Lokalisation von CbFic2 zu studieren und die AMPylierungsmuster in der Zelle zu analysieren (Cichy, 2016). Diese Studien wurden hier mit den neuen, sensitiven anti-AMP-Antikörpern wiederholt: HEK293 Zellen wurden mit den von Adam

Cichy klonierten Konstrukten von Gesa König^{vi} transient transfiziert und nach 48 h Überexpression des GFP-getaggtten CbFic2 in RIPA Puffer lysiert. Die Zellysate wurden anschließend im WB mit dem anti-AMP-Antikörper 17G6 auf AMPylierungsbanden, mit einem anti-GFP-Antikörper auf CbFic2-Expression, und einem anti-H3-Antikörper zur Normierung der Lademenge untersucht. Die gleichen WBs wurden zusätzlich im Anschluss an eine acide Histonextraktion durchgeführt, um zu zeigen, wie viel der CbFic2-Aktivität im Zellkern, potenziell an Histone gebunden, stattfindet. Die Analysen mit dem neuen anti-AMP-Antikörper zeigen, dass die aktive Mutante CbFic2 E66G, nicht aber der autoinhibierte WT und die inaktive Mutante H205A, eine Bande auf Höhe von 17 kDa AMPyliert (Abbildung 8D), und diese Modifikation auch auf extrahierten Histonen nachweisbar ist (Abbildung 9A). Dabei scheint es nicht von Bedeutung zu sein, ob CbFic2 N- oder C-terminal mit GFP fusioniert exprimiert, lediglich die E66G Mutation erscheint für die AMPylierung notwendig. Die Immunpräzipitation mit einem anti-H3-Antikörper und anschließende Analyse der AMPylierung im WB bestätigen eindeutig, dass es sich bei dieser AMPylierten 17 kDa Bande um Histon H3 handelt (Abbildung 9B). Bei der anti-H3-IP zeigen sich aber noch weitere Auffälligkeiten: Der anti-AMP-WB des Inputs zeigt neben der Histon H3-Bande zwei weitere AMPylierte Banden, eine bei ca. 70 kDa, bei der es sich möglicherweise um das Automodifikationssignal von GFP-getaggttem CbFic2 handelt (potenziell im GFP-Tag und nicht CbFic2 selbst, siehe Abbildung 17B), und eine bereits von Adam Cichy berichtete Bande bei 40 kDa mit unbekannter Identität. Diese beiden Banden sind ebenfalls sichtbar in der Histonextraktion in Abbildung 9A, liegen demnach also im Zellkern vor. Interessanterweise zeigt die Analyse des ungebundenen Anteils der IP im Vergleich mit Input und gebundenem Anteil (Abbildung 9B), dass sowohl die 40 kDa Bande als auch in weiten Teilen die Bande bei ca. 70 kDa nicht mit Histon H3 co-eluiert, sondern im ungebundenen Anteil vorliegen. Des Weiteren zeigt sich auch auf Höhe von 17 kDa ein Signal im ungebundenen Anteil, welches bei genauem Hinsehen als Doppelbande erscheint, und so ein Hinweis darauf ist, dass das eindeutig bestimmbare Histon H3-AMP Signal eventuell mit einem weiteren Signal eines unbekanntes Proteins überlagert.

WB-Untersuchungen von N-terminal (Abbildung 10A) bzw. C-terminal (Abbildung 10B) mit GFP fusionierten CbFic2 Verkürzungskonstrukten in Lysaten der ganzen Zelle sowie in Extrakten der Histone zeigen weitere Hinweise auf die Funktionsweise von CbFic2: So scheint der C-Terminus mit seiner DNA-bindenden HTH-Domäne nicht entscheidend für die generelle AMPylierungsaktivität des Enzyms zu sein, auch wenn die Histon H3 Modifikation mit zunehmender Kürzung des C-Terminus in CbFic2 E66G 1-362 aa und 1-300 aa tendenziell abnimmt. Dies geht einher mit einer leicht reduzierten Menge an detektiertem Protein im anti-GFP-WB in der Histonextraktion im Vergleich zur Gesamtzellanalyse (Abbildung 10A, B) und gilt besonders für die N-terminal getaggtten CbFic2-Konstrukte (Abbildung 10A). Dabei entspricht CbFic2 E66G 1-362 aa einem Konstrukt, an dem die postulierte β -Faltblatt-Region des vorhergesagten DNA-bindenden Bereichs entfernt ist, während dem Konstrukt 1-300 aa die

gesamte HTH-Domäne inklusive der charakteristischen α -Helices fehlt (Abbildung S 19). Das Konstrukt CbFic2 E66G 1-371 aa, bei dem lediglich die letzten 7 Aminosäuren fehlen, die HTH-Domäne aber unangetastet bleibt, zeigt diese Effekte nicht (Abbildung 10A).

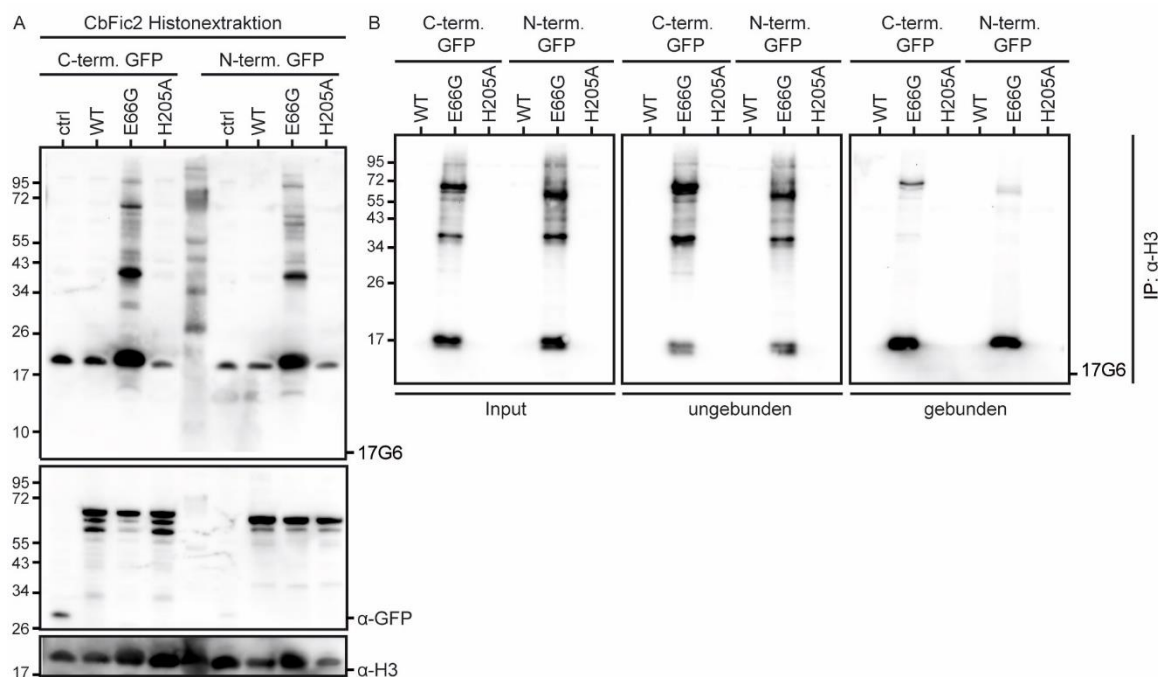


Abbildung 9: Analyse der AMPylierungsmuster nach CbFic2 Expression in HEK293 Zellen mittels WB und IP
GFP-getaggtetes CbFic2 wie angegeben wurde für 48 h in HEK293 Zellen transient exprimiert. (A) 20 μ g RIPA-Lysat pro Tasche wurden mit Bis-Tris Gelen geblotet und mit Antikörper 17G6 in Gegenwart von 1 mM $MnCl_2$ sondiert. Der identische Blot wurde gestrippt, in Streifen geschnitten und mit Antikörpern gegen GFP und Histon H3 als Ladekontrolle nachbehandelt. (B) anti-H3 IP auf den Zellysaten aus (A). 50 μ g (in 200 μ l) Lysat wurden mit 1 μ g anti-H3 Antikörper und Protein A/G Magnetic Beads präzipitiert. Gebundene Proteine wurden mit 50 μ l 1x Laemmli eluiert. Je 10 μ l der Input- und ungebundenen Probe inklusive 6x Laemmli-Puffer und 10 μ l der Elution wurden im WB mit dem Antikörper 17G6 in Gegenwart von 1 mM $MnCl_2$ analysiert.

Interessanterweise bleibt die AMPylierungsbande bei ca. 40 kDa, welche sowohl in der Gesamtzellanalyse als auch in der Histoneextraktion auftritt, in allen Fällen von der Kürzung des C-Terminus unbeeinflusst (Abbildung 10A, B). In Kombination mit einem - im Vergleich zur Gesamtzellanalyse - leichten, aber nicht signifikant reduzierten anti-GFP-Signal in der Histoneextraktion aller C-terminalen Verkürzungskonstrukte spricht dies dafür, dass auch in Abwesenheit der HTH-Domäne ein signifikanter Anteil des Enzyms in den Zellkern transloziert wird und dort das unidentifizierte Protein bei 40 kDa auch in Abwesenheit von DNA-Bindung modifiziert. Dies spricht wiederum dafür, dass die Zellkernlokalisierung nicht nur über die HTH-Domäne, sondern auch über andere Proteinbereiche bestimmt wird.

Allerdings scheint auch der N-Terminus mit seiner DUF4172-Domäne (4-85 aa) (Abbildung S 18) die Aktivität des Enzyms entscheidend mit zu beeinflussen, auch wenn die eigentliche Fic-Domäne nicht verändert wurde. Bereits das Entfernen des ersten helikalen Elements der DUF4172-Domäne (Abbildung S 19) in CbFic2 E66G 41-378 aa, welches Adam Cichy unter Vergleich mit SoFic (Das et al., 2009) als potenzielle Dimerisierungsoberfläche interpretiert, führt zu einer vollständigen enzymatischen Inaktivierung des Enzyms (Abbildung 10B). Deletion der vollständigen DUF4172-

Domäne in CbFic2 E66G 86-378 aa führt zu dem gleichen Ergebnis (Abbildung 10A, B). Eine heterologe rekombinante Expression beider Konstrukte in *E. coli* führt zu unlöslichem Protein.

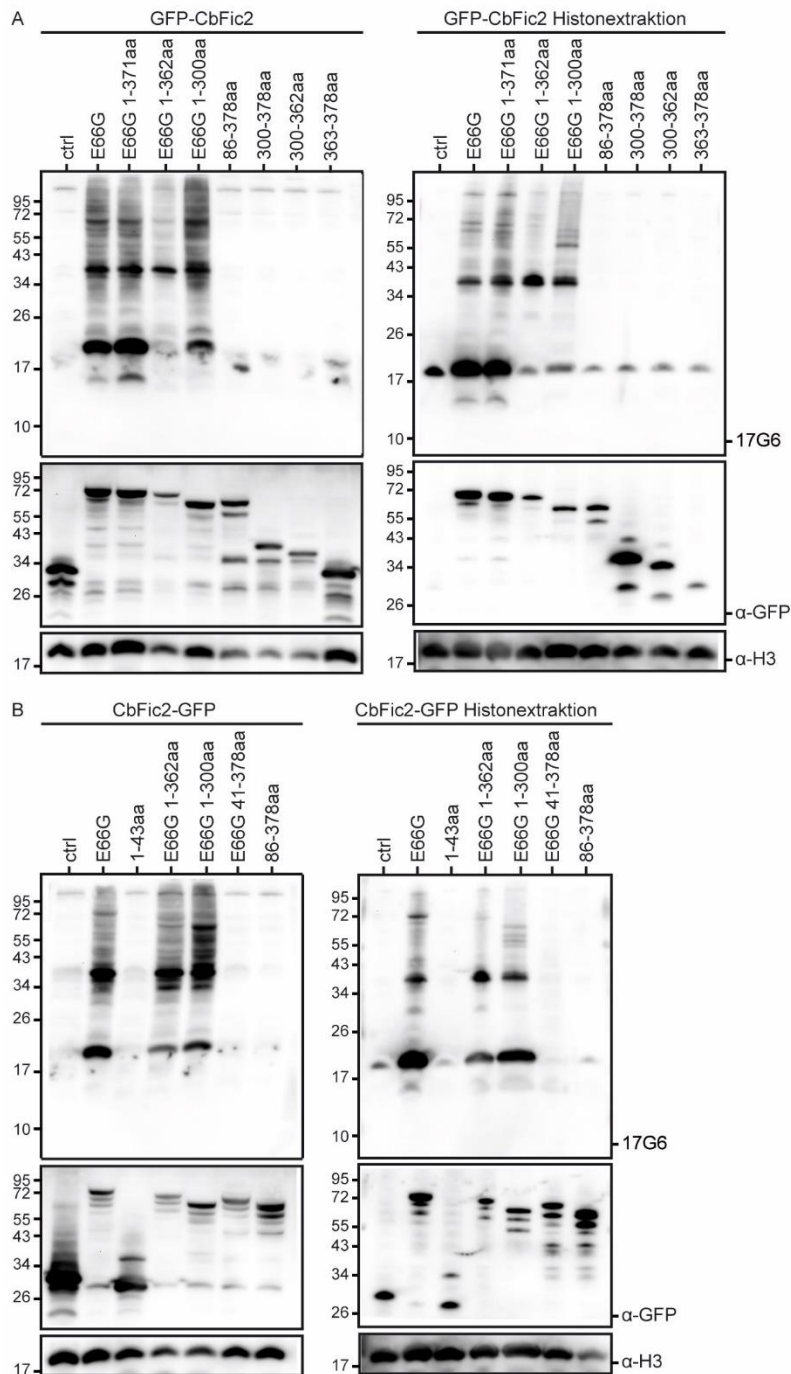


Abbildung 10: WB-Analyse der AMPylierungsmuster nach Expression verkürzter CbFic2 Versionen in HEK293
 Verkürzungskonstrukte von N-terminal (A) oder C-terminal (B) GFP-getagtem CbFic2 wie angegeben wurden für 48 h in HEK293 Zellen transient exprimiert. 20 µg RIPA-Lysat pro Tasche wurden mit Bis-Tris Gelen geblottet und mit Antikörper 17G6 in Gegenwart von 1 mM MnCl₂ sondiert. Identische Blots wurden gestrippt, in Streifen geschnitten und mit Antikörpern gegen GFP und Histon H3 als Ladekontrolle nachbehandelt.

Neben den deutlich sichtbaren und hervorgehobenen AMPylierungsbanden bei etwa 17 kDa, 40 kDa, und 70 kDa zeigen alle enzymatisch aktiven E66G Mutanten einen stark erhöhten Hintergrund in den anti-AMP-WBs, der interessanterweise mit dem Entfernen des C-Terminus

zuzunehmen scheint (Abbildung 10A, B). Die jeweilige Histonextraktion zeigt, dass dieser Hintergrund weitestgehend außerhalb der Histonfraktion auftritt. Die HTH-Domäne des Enzyms scheint daher eher Spezifität zu vermitteln, aber nicht generell entscheidend für Zellkernlokalisierung oder generelle enzymatische Aktivität von CbFic2 zu sein.

3.2.3 Hochsalzpuffer erhöhen die Löslichkeit und Stabilität von CbFic2

Vorherige Arbeiten mit CbFic2 (Cichy, 2016) haben gezeigt, dass das Protein nach heterologer Expression in *E. coli* nur als Fusionskonstrukt mit Maltose-bindendem Protein (MBP) löslich war und eine begrenzte Temperaturstabilität aufwies, sodass Aktivitätsassays meist weit unterhalb physiologischer Temperaturen durchgeführt wurden. Deshalb wurden in dieser Arbeit extensiv Konstrukt-, Expressions- und Reinigungsoptimierungen durchgeführt, durch die sich weitere Aufschlüsse über das Protein ergaben. Als ideal hat sich dabei - in Anlehnung an die von Cichy erstellten, bewährten zellulären Überexpressionskonstrukte - ein N-terminaler, durch Tobacco-Etch-Virus (TEV)-Protease spaltbarer GFP-Tag zur verbesserten Löslichkeit erwiesen (Abbildung 11A). Damit konnten die Expressionsausbeuten unter Verwendung von Lemo21 Zellen und Über-Nacht-Expression bei 21°C deutlich gesteigert werden. Nichtsdestotrotz blieb zunächst das Problem bestehen, dass das Abspalten des Tags ein Ausfallen des Proteins zur Folge hatte. Da CbFic2 von Adam Cichy als DNA-bindendes Protein beschrieben wurde (Cichy, 2016), lag der Gedanke nahe, dass ein Zusammenhang zwischen dieser Funktion und den beobachteten Löslichkeitsproblemen bestehen könnte. Für andere DNA-bindende Proteine war gezeigt worden, dass das Apoprotein ohne gebundene DNA eine verringerte Löslichkeit zeigen kann (Reed and Grindley, 1981; Rhee et al., 1998), was potenziell durch geladene Bereiche im Protein, welche ohne DNA zur Selbstassoziation neigen, erklärt werden kann. Weiterhin ist denkbar, dass eine unspezifische Bindung zellulärer DNA und RNA aus *E. coli* während der rekombinanten Expression und Reinigung zu einer aggregationsanfälligen Verbindung führt. Dafür spricht auch, dass MBP-CbFic2 nach dem initialen Reinigungsschritt hohe 260/280 nm Absorptionswerte im UV-VIS-Spektrum zeigte und DNA und RNA in einem *Gelshift-Assay* identifizierbar waren (Cichy, 2016). Da Protein-DNA-Bindungen einen starken elektrostatischen Beitrag beinhalten (Misra et al., 1998), der mit steigenden Salzkonzentrationen geschwächt wird (Record et al., 1978), war zu vermuten, dass gleichbleibend hohe Salzkonzentrationen während der Reinigung die Löslichkeit erhöhen würden. Ein gutes Indiz hierfür war, dass die nach Proteaseverdau auftretenden CbFic2-Aggregate durch Dialyse gegen hohe Salzkonzentrationen über 500 mM NaCl solubilisierbar waren. In der Folge wurden also Reinigung und Lagerung in Hochsalzpuffer bei 500 mM NaCl durchgeführt, was die Löslichkeit von CbFic2 signifikant erhöhte und ein unkritisches Abspalten des GFP-Tags ermöglichte. Dennoch blieb das Problem unspezifischer DNA- und RNA-Kontaminationen aus *E. coli* bestehen, und analytische Messungen in niedrigeren Salzkonzentrationen waren durch ein Ausfallen des Proteins erschwert.

In der Reinigung DNA-bindender Proteine ist ein häufig genutzter erster Schritt, das Protein von unspezifischen zellulären Nukleinsäuren zu trennen, um dann später zum gereinigten Protein wieder definierte Nukleinsäuren zuzugeben. Diese Trennung kann z. B. durch enzymatischen Verdau mit DNase I, aber auch durch Fällung der Nukleinsäure erreicht werden, wobei eine etablierte Methode das Ausfällen von DNA mittels Polyethylenimin (PEI) ist (Burgess, 1991). PEI ist bei physiologischem pH ein positiv geladenes Polymer, welches negativ geladene DNA und RNA bindet. Um diese Bindung allerdings selektiv für Nukleinsäuren und reproduzierbar zu machen, und nicht unabsichtlich das Zielprotein mit zu fällen, muss die genaue Menge des einzusetzenden PEI titriert werden. Dabei ist darauf zu achten, dass auch in anschließenden Reinigungen Ionenstärke und pH des Puffers sowie Konzentration des Zielproteins weitestgehend stabil sind. Die entstehenden Präzipitate können durch Zentrifugation abgetrennt werden. Da CbFic2 einen recht basischen isoelektrischen Punkt (pI) von 9,75 hat, entsteht bei dieser Methode wenig Verlust an Zielprotein, und die Verwendung von DNase, welche in späteren Experimenten die Zugabe von DNA erschweren könnte, konnte umgangen werden.

Mit dieser modifizierten Expressions- und Reinigungsstrategie konnte lösliches, bei 37°C temperaturstabiles, ungetaggtetes CbFic2 mit hoher Aktivität erzeugt werden. Die Ausbeuten betragen im Schnitt ca. 3 mg gereinigtes Protein pro Liter Expressionsmedium. In dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen gereinigten CbFic2-Konstrukten gearbeitet, einem mit N-terminalem Twinstrep-Tag zu Nachweis- und Anreicherungs Zwecken (TS-CbFic2) und einer Tag-freien Variante (CbFic2) (Abbildung 11A).

In einem *Thermal Shift Assay* (TSA) wurde an TS-CbFic2 E66G anschließend der Einfluss von 96 Pufferbedingungen und –additiven auf die Temperaturstabilität des Proteins getestet (für vollständigen Datensatz siehe Abbildung S 7). Der TSA basiert auf dem Farbstoff SYPRO Orange, welcher nach Bindung an hydrophobe Gruppen eines Proteins, die durch thermische Entfaltung des Proteins exponiert werden, stark fluoresziert und spektrophotometrisch verfolgt werden kann. Der Mittelpunkt des Entfaltungsübergangs repräsentiert dabei die Schmelztemperatur T_m . Wie nach den Erfahrungen der Reinigung zu erwarten, hatten steigende NaCl-Konzentrationen einen zunehmend stabilisierenden Effekt auf TS-CbFic2 E66G (Abbildung 11B). Interessanterweise wurde allerdings eine noch stärkere Stabilisierung durch Natriumcitrat bei einem aciden pH von 5,0-5,5 erreicht. Ein ähnlicher Effekt von Natriumcitrat konnte bereits für ein anderes Histon-modifizierendes Protein gezeigt werden (Kozak et al., 2016). Zusätzlich könnte aber auch die Fähigkeit von Zitronensäure eine Rolle spielen, durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu aciden Peptiden in Anwesenheit von divalenten Kationen wie Mg^{2+} DNA zu binden (Calzuola et al., 2000).

Allerdings scheint erhöhte Temperaturstabilität nicht zwangsweise mit einer erhöhten enzymatischen Aktivität einherzugehen: Bei enzymatischen Assays, durchgeführt von der durch mich betreuten Masterstudentin Kristina Schüller^{viii}, wurde die zeitaufgelöste AMPylierung des Histon H3 Zielpeptids TS-H3 1-36 aa durch TS-CbFic2 E66G in Anwesenheit von $MgCl_2$, ATP,

und eines Zusatzes von randomisierter, 20 Basenpaare (bp) langer, doppelsträngiger DNA (dsDNA) mittels MS verfolgt. Dort zeigt sich, dass sowohl steigende NaCl-Konzentrationen in einem HEPES-Puffer bei pH 7,5 als auch ein Natriumcitrat-Puffer bei pH 5,4 eine zunehmende Inaktivierung von CbFic2 zur Folge haben (Abbildung 11C), die in etwa vergleichbar ist mit dem DNA-freien Enzym (Abbildung 12C). Es scheint, dass Salzkonzentrationen über 150 mM NaCl sowie ein vom physiologischen Bereich abweichender pH-Wert die DNA-Bindung von CbFic2 unterdrücken und somit die Aktivität reduzieren. Damit stellt sich die Frage, welchen Einfluss die DNA-Bindung auf die Stabilität des Enzyms hat, und wie sich diese Bindung im Detail auf die enzymatische Aktivität auswirkt.

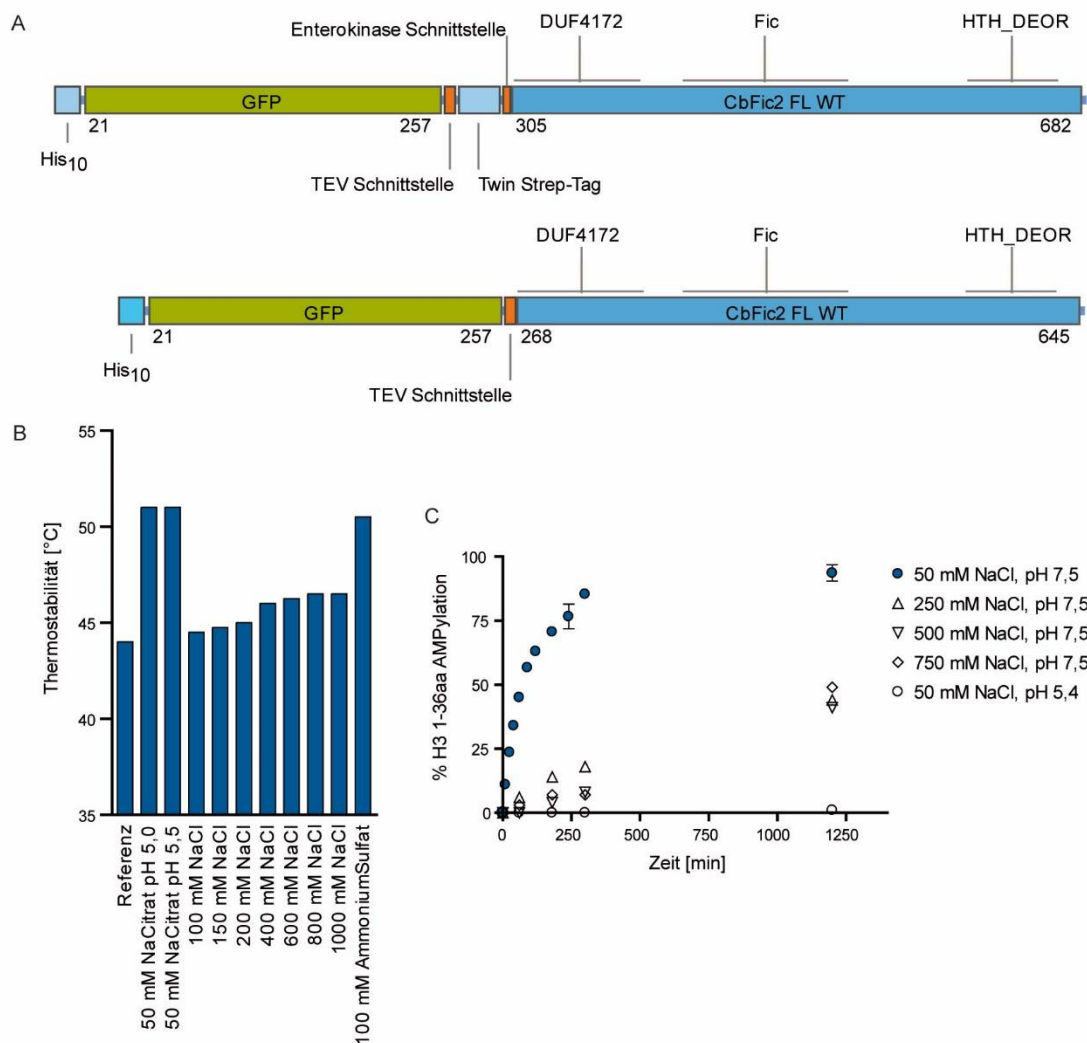


Abbildung 11: Einfluss von Salz und pH auf die Stabilität und Funktion rekombinanten CbFic2

(A) Illustration der rekombinanten Expressionskonstrukte. der His₁₀-GFP-Tag wurde während der Reinigung mit der TEV-Protease spezifisch abgespalten. DUF4172 4-85 aa, Fic 115-223 aa, HTH_DEOR 304-362 aa. (B) Einfluss verschiedener Puffersubstanzen auf die thermische Stabilität von CbFic2. Thermische Entfaltung von 4 µg TS-CbFic2 E66G in Gegenwart der angegebenen Puffersubstanzen wurde über SYPRO™ Orange Fluoreszenz im TSA verfolgt. Jeder Datenpunkt entspricht einer Einfachmessung. (C) Einfluss verschiedener Puffersubstanzen auf die AMPylierungsaktivität von CbFic2. 50 µM TS-H3 1-36 aa wurden mit 5 µM TS-CbFic2 E66G, 5 µM dsDNA und 1 mM ATP in 20 mM HEPES pH 7,5 bzw. 50 mM Natrium-Citrat pH 5,4, die indizierte Konzentration NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT bei 37 °C inkubiert. Der Grad der AMPylierung wurde über MS analysiert, Peaks wurden durch Gaußsche Integration quantifiziert.

3.2.4 Hochaffine DNA-Bindung stabilisiert CbFic2 und induziert seine Aktivität

Cichy konnte in seiner Arbeit zeigen, dass MBP-CbFic2 E66G nach der Reinigung Nukleinsäuregebunden vorliegt, und dass deren Abbau durch DNase I die AMPylierungsaktivität gegenüber Glutathion-S-Transferase (GTS)-getagtem Histon H3 Peptid GST-H3 1-20 aa drastisch reduziert. Anschließende Zugabe von randomisierter 20 bp dsDNA mit 40 % Guanin- und Cytosin (GC)-Gehalt konnte die Aktivität teilweise wiederherstellen (Cichy, 2016). Auch für die neuen Konstrukte ohne Löslichkeits-Tag konnte via MS durch den spezifischen Massezuwachs von 329 Da gezeigt werden, dass TS-CbFic2 E66G in Anwesenheit der gleichen randomisierten 20 bp dsDNA mit 40 % GC-Gehalt das Peptid TS-H3 1-36 aa *in vitro* effizient AMPyliert (Abbildung 12A). Interessanterweise treten hier, im Gegensatz zu Cichys Arbeit, drei AMPylierungsstellen auf, anstelle von dort identifizierten zwei Stellen. Die 3x-AMPylierung scheint allerdings mit weniger als 5 % Anteil nach Über-Nacht-Inkubation bei 37°C vergleichsweise eher selten zu sein. Nachfolgend wurde die AMPylierung von TS-H3 1-36 aa via MS quantifiziert, indem die Flächen unter den dekonvolvierten Peaks über Gaußsche Kurven integriert und der Prozentsatz der AMPylierung über die verbleibende Menge unAMPylierten Peptids indirekt bestimmt wurde (unter der Annahme, dass das modifizierte Peptid im gleichen Maße wie das unmodifizierte Peptid ionisierbar ist), da mehrfache AMPylierung eine direkte Quantifizierung erschwert.

Welche DNA zur Aktivierung von CbFic2 notwendig ist, mit welcher Affinität sie gebunden wird und welchen Einfluss sie auf die Struktur von CbFic2 hat, ist bislang unbekannt. Um zu verstehen, welche minimale dsDNA-Länge zur vollständigen Aktivierung von TS-CbFic2 E66G notwendig ist, wurde die AMPylierung von TS-H3 1-36 aa in Anwesenheit von MgCl₂, ATP und 5 bp, 10 bp, bzw. 20 bp dsDNA via MS zeitaufgelöst verfolgt (Abbildung 12B). Die AMPylierung wurde initial für jede zugegebene DNA-Länge mit 20 %, 40 %, bzw. 60 % GC-Gehalt (Tabelle 17) gemessen, dabei hat sich allerdings kein signifikanter Unterschied in der Aktivierung bzgl. des GC-Gehalts gezeigt. Deswegen wurden diese drei Messungen für jede DNA-Länge jeweils zu Triplikaten mit Standardabweichung zusammengefasst (Abbildung 12B). Dabei zeigt sich, dass die stärkste Aktivierung durch 20 bp dsDNA erfolgt, unabhängig vom GC-Gehalt. Da aber der Unterschied der Aktivierung zwischen 10 bp (25 % finale AMPylierung) und 20 bp dsDNA (75 % AMPylierung) groß ist, wurde in der Folge die Aktivierung von TS-CbFic2 E66G durch dsDNA zwischen 10 bp und 20 bp noch einmal in kleineren Inkrementen untersucht (Abbildung 12C). Durch Vergleich der Steilheit der linearen Regression des anfänglichen linearen Substrat-Umsatzes zeigt sich, dass ab 18 bp dsDNA das Maximum der AMPylierungsgeschwindigkeit und damit Aktivierung erreicht ist. Aufgrund der vorherigen Erkenntnis, dass stabilisierende Effekte auf CbFic2 durch hohe Salzkonzentrationen gleichzeitig seine Aktivität reduzieren, stand die Frage im Raum, welchen Einfluss das aktivierende Co-Substrat DNA auf die Stabilität von CbFic2 hat. Im TSA zeigt sich, dass interessanterweise die Bindung von DNA auch eine erhöhte Temperaturstabilität von CbFic2

um ca. 5 °C zur Folge hat (Abbildung 12D), was im bekannten Kontext der Stabilisierung durch Ligandenbindung (Huynh and Partch, 2015) offensichtlich erscheinen mag. In den bisher einzigen veröffentlichten Untersuchungen zum Einfluss der DNA-Bindung auf Proteine mittels TSA wurde allerdings sowohl ein stabilitätsmindernder (Bernhards et al., 2009), als auch ein -verstärkender Effekt gezeigt (Rupesh et al., 2015). Zugabe von 20 bp dsDNA zu einem nicht-DNA-bindenden Protein, in diesem Falle die kleine Rab GTPase Rab1b, hatte in einem Kontrollexperiment keine Auswirkungen auf die Proteinstabilität (siehe Abbildung S 8).

In einem *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA), bei dem sich in Abhängigkeit der DNA-Bindung das Laufverhalten des DNA-bindenden Proteins in PAGE Experimenten verändert, wurde versucht die Bindung von 20 bp dsDNA durch TS-CbFic2 E66G zu quantifizieren (Abbildung S 8). Da TS-CbFic2 E66G allerdings unter keinen Bedingungen, auch nicht im Komplex mit DNA, in das native Gel wandert, konnten keine sicheren Aussagen getroffen werden.

Um die Affinität zwischen CbFic2 und DNA zu bestimmen, wurden deswegen Anisotropie-Messungen durchgeführt. Fluoreszenzanisotropie bezeichnet das Phänomen, dass Anregung von Fluorophoren mit polarisiertem Licht auch eine polarisierte Emission zur Folge hat. Der Grad der Polarisation, also das Verhältnis aus vertikal und horizontal polarisiertem emittiertem Licht, gibt Aufschluss über die Rotationsgeschwindigkeit des Fluorophors: Ist das Fluorophor an ein kleines und idealerweise lineares Molekül (z. B. DNA) gebunden, und liegt frei in Lösung vor, führt seine hohe Rotationsgeschwindigkeit dazu, dass sich innerhalb der Fluoreszenzlebenszeit die Ausrichtungen der Fluorophore stochastisch verteilen und die Anisotropie somit gegen 0 geht. Bindet das Fluorophor, in diesem Falle 5'-Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gelabelte DNA, an einen deutlich größeren Bindungspartner, in diesem Fall CbFic2, reduziert sich die Rotationsgeschwindigkeit des Komplexes derart, dass die Polarisation des Anregungslichts erhalten bleibt. Damit kann durch Titration des großen Bindungspartners CbFic2 gegen eine gleichbleibend niedrige Konzentration an gelabelter DNA die Bindungsaffinität in der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_d) bestimmt werden (Anderson et al., 2008). In allen nachfolgenden Anisotropie-Messungen wurden 20 μ M oder 50 μ M CbFic2 gegen 1 nM gelabelte DNA in technischen Triplikaten titriert, die Polarisation gemessen und die Anisotropie berechnet.

Bei der Messung von je 20 μ M TS-CbFic2 WT bzw. E66G gegen 20 bp dsDNA kann der K_d mit dem „*Specific binding with Hill slope*“ Modell (3) (GraphPad Prism 4.0) auf 116 nM (WT) bzw. 65 nM (E66G) bestimmt werden (Abbildung 12E). Damit zeigt CbFic2 eine für ein unspezifisches DNA-Fragment vergleichsweise feste Bindung, wie sie im Kontext DNA-bindender Proteine mit HTH-Domäne zu erwarten ist (Schlundt et al., 2017). Der Hill-Slope in diesem Fit ist gleich 1,0, wenn ein Monomer ohne Kooperativität an eine einzige Stelle bindet. Wenn er größer als 1,0 ist, hat der Rezeptor oder Ligand mehrere Bindungsstellen mit positiver Kooperativität. Sowohl für TS-CbFic2 WT als auch für E66G kann der Hill-Slope eine Dimerbildung nicht bestätigen. Wie zu erwarten, führt das Entfernen der HTH-Domäne im Konstrukt TS-CbFic2 E66G 1-300 aa in der

Anisotropie-Messung dieses Konstrukts gegen 20 bp dsDNA zu einer signifikant reduzierten DNA-Bindungsaffinität mit einem K_d von 918 nM (Abbildung 12E).

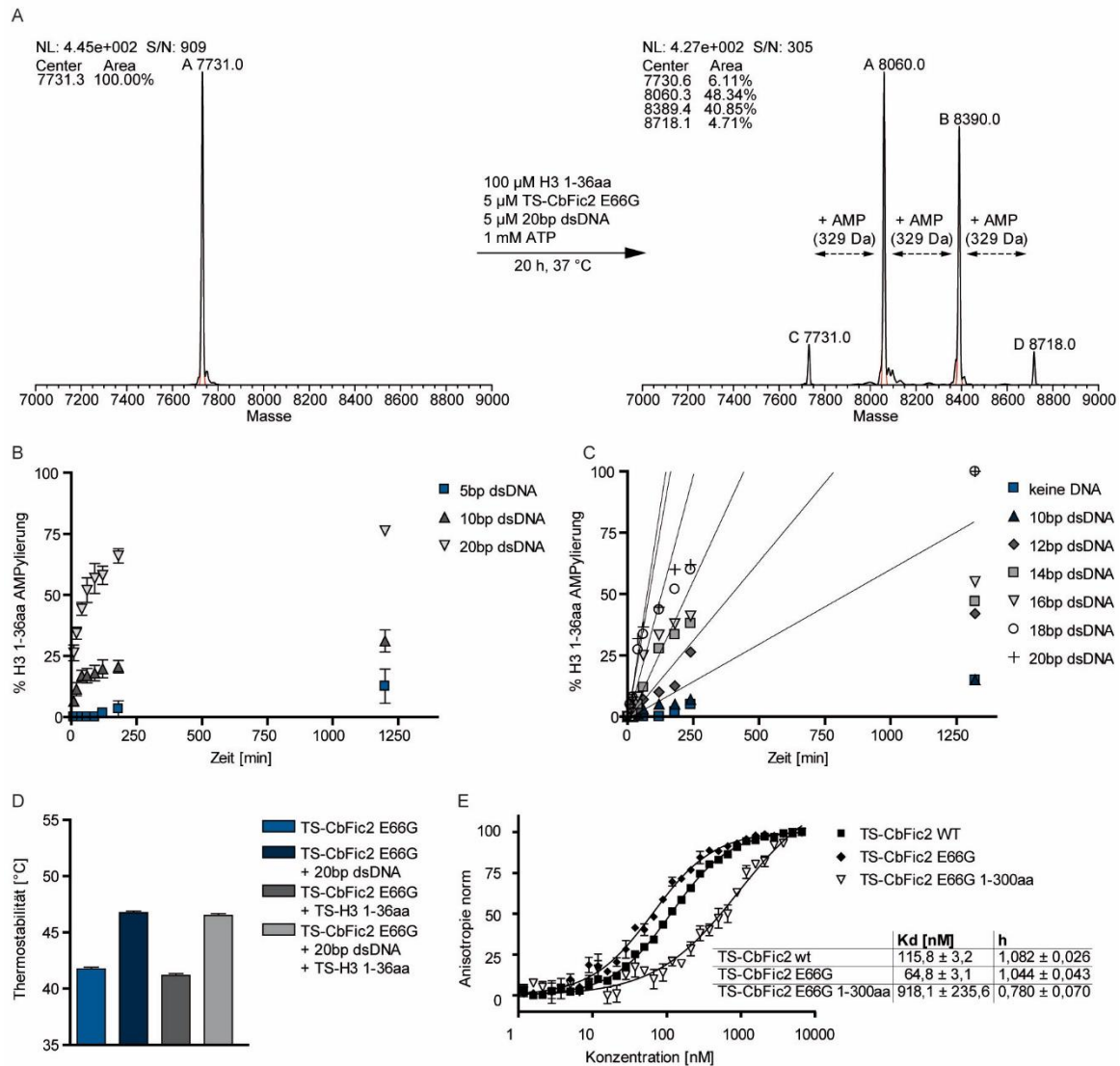


Abbildung 12: Auswirkungen der DNA-Bindung von CbFic2 auf seine Aktivität und Stabilität

(A) MS-Analyse des Histon TS-H3 1-36 aa Peptids nach Inkubation mit TS-CbFic2 E66G in Anwesenheit von DNA und ATP wie angegeben zeigt 3 Peaks mit je einem Zuwachs von 329 Da. Peaks wurden durch Gaußsche Integration quantifiziert. (B) Quantifizierung der TS-H3 1-36 aa AMPylierung durch TS-CbFic2 E66G in Gegenwart von 5 bp, 10 bp, 20 bp dsDNA mittels MS im zeitlichen Verlauf. In jedem Datenpunkt wurden 20 %, 40 % und 60 % GC-Gehalt der jeweiligen dsDNA Länge zusammengefasst. Abgebildete Werte entsprechen biologischen Triplikaten, die Fehlerbalken der Standardabweichung. (C) Quantifizierung der TS-H3 1-36 aa AMPylierung durch TS-CbFic2 E66G in Abwesenheit oder Gegenwart von 10 bp, 12 bp, 14 bp, 16 bp, 18 bp oder 20 bp dsDNA mit 40 % GC-Gehalt mittels MS im zeitlichen Verlauf. Lineare Regression des ersten linearen Substrat-Umsatz-Bereichs dient dem Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten. (D) Analyse der Thermostabilität von TS-CbFic2 E66G in An- oder Abwesenheit von 20 bp dsDNA bzw. TS-H3 1-36 aa mittels TSA. (E) Analyse der Bindungsaffinität von TS-CbFic2 WT, E66G und E66G 1-300 aa gegenüber 20 bp dsDNA mittels Anisotropie. 1 nM 5'-FITC-gelabelte 20 bp dsDNA wurde vorgelegt, und eine Verdünnungsreihe ausgehend von 20 µM bzw. 50 µM CbFic2 mithilfe eines Pipettierrobotors hinzugegeben. Werte wurden auf den kleinsten und größten Wert normiert. Fit entspricht dem „Specific binding with Hill slope“ (GraphPad Prism 4.0). Abgebildete Daten entsprechen dem Mittelwert technischer Triplikate, Fehlerbalken der Standardabweichung.

Die Situation stellt sich überraschenderweise etwas anders für CbFic2 mit freiem N-Terminus dar (Abbildung 13A): Während hier die Vollängenproteine CbFic2 WT und E66G mit ca. 200 nM einen etwa doppelt (bis dreifach) höheren K_d -Wert für 20 bp dsDNA aufweisen als ihre TS-

getaggten Gegenstücke, reduziert das Wegfallen der HTH-Domäne im CbFic2 E66G 1-300 aa Protein nicht wie erwartet die DNA-Bindung. Im Gegenteil, hier verringert sich der Kd mit ca. 100 nM im Vergleich zu den Volllängenproteinen auf die Hälfte. Damit ist die DNA-Bindung nicht allein von der Existenz der HTH-Domäne abhängig, sondern die Verfügbarkeit des N-Terminus scheint einen entscheidenden Beitrag zu leisten. Weiterhin ist CbFic2 WT in der Lage, sowohl 20 bp dsDNA als auch Einzelstrang DNA (ssDNA) zu binden, obgleich eine leichte Präferenz gegenüber dsDNA im Vergleich zu ssDNA zu bestehen scheint (Abbildung 13B). Während die funktionalen Studien ergeben haben, dass 20 bp dsDNA ausreicht, um TS-CbFic2 E66G vollständig zu aktivieren, sollte sichergestellt werden, dass diese Länge auch ausreicht, um die Bindung zu maximieren - und nicht vielleicht eine zu große Nähe des 5'-FITC-Labels zur Bindungsstelle Ergebnisse verfälscht (Anderson et al., 2008; Wang et al., 1998). Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurde 40 bp und 60 bp dsDNA im Vergleich zu 20 bp gegen CbFic2 WT gemessen (Abbildung 13C). Interessanterweise scheinen bei 40 bp und 60 bp zwei Bindungsereignisse stattzufinden, wobei sich das erste Bindungsereignis zu einer deutlich affineren Bindung bei ca. 30 nM verschiebt. Die nichtlineare Datenanpassung erfolgt in diesem Fall mit einem „*Two sites - Specific binding only*“ Modell (4) (GraphPad Prism 4.0). Wird die gleiche Untersuchung mit TS-CbFic2 E66G durchgeführt, geht dieser Umschwenkeffekt von einem Bindungsereignis bei 20 bp dsDNA zu zwei Bindungsereignissen bei 40 bp und 60 bp dsDNA verloren; Unterschiede im Kd-Wert sind statistisch nicht signifikant. Allerdings zeigt TS-CbFic2 E66G bereits für die Bindung von 20 bp eine starke Affinität von ca. 65 nM (Abbildung 13D). Der Effekt des zweiten Bindungsereignisses geht auch bei CbFic2 E66G 1-300 aa, bei dem die DNA-Bindedomäne deletiert ist, verloren. Hier erhöht sich der Kd bei längerer DNA sogar von ca. 100 nM (20 bp) auf ca. 180 nM (40 bp, 60 bp) (Abbildung 13E). Der Effekt des zweiten Bindungsereignisses bei CbFic2 WT tritt auch in Gegenwart von ssDNA auf, wenn auch die Kd-Werte insgesamt zu etwas weniger affinen Bindungen hin verschoben sind (Abbildung 13F). Diese Daten zeigen, dass der N-Terminus von CbFic2 bzw. dessen Zugänglichkeit einen starken Einfluss auf die DNA-Bindung hat, und die Bindung nicht allein abhängig von der HTH-Domäne ist. Und in der Tat, die Domänenstrukturanalyse auf potenziell DNA-bindende Bereiche von CbFic2 (Abbildung S 19) prognostiziert neben der HTH-Domäne weitere DNA-Bindungsgebiete in der Region 207-217 aa (entspricht dem Fic-Motiv) und am N-Terminus bei 1-8 aa, auch wenn für Aminosäuren 322-368 im HTH-Motiv nach wie vor ein stärkerer Effekt postuliert wird.

Interessanterweise sorgt eine Vorinkubation von CbFic2 E66G mit ATP dafür, dass die Bindungsaffinität gegenüber 20 bp dsDNA von 185 nM (ohne ATP) auf 295 nM (mit ATP) leicht reduziert ist (Abbildung 13G). Die massenspektrometrische Untersuchung der Proben zeigt, dass das Enzym nach Vorinkubation mit ATP leicht autoAMPyliert ist (Abbildung S 9). Der gleiche Trend ist bei TS-CbFic2 E66G nach Inkubation mit ATP zu beobachten, allerdings ist hier der Effekt mit einem Anstieg des Kd-Wertes von 65 nM (ohne ATP) auf 398 nM (mit ATP) deutlich

verstärkt (Abbildung 13H). Dies geht einher mit einem höheren Grad an AutoAMPylierung (Abbildung S 9). Damit stellt sich die Frage, ob die AutoAMPylierung die Affinität zu DNA reduziert und damit potenziell zu einer Inaktivierung des Enzyms im Sinne eines regulatorischen Mechanismus führt.

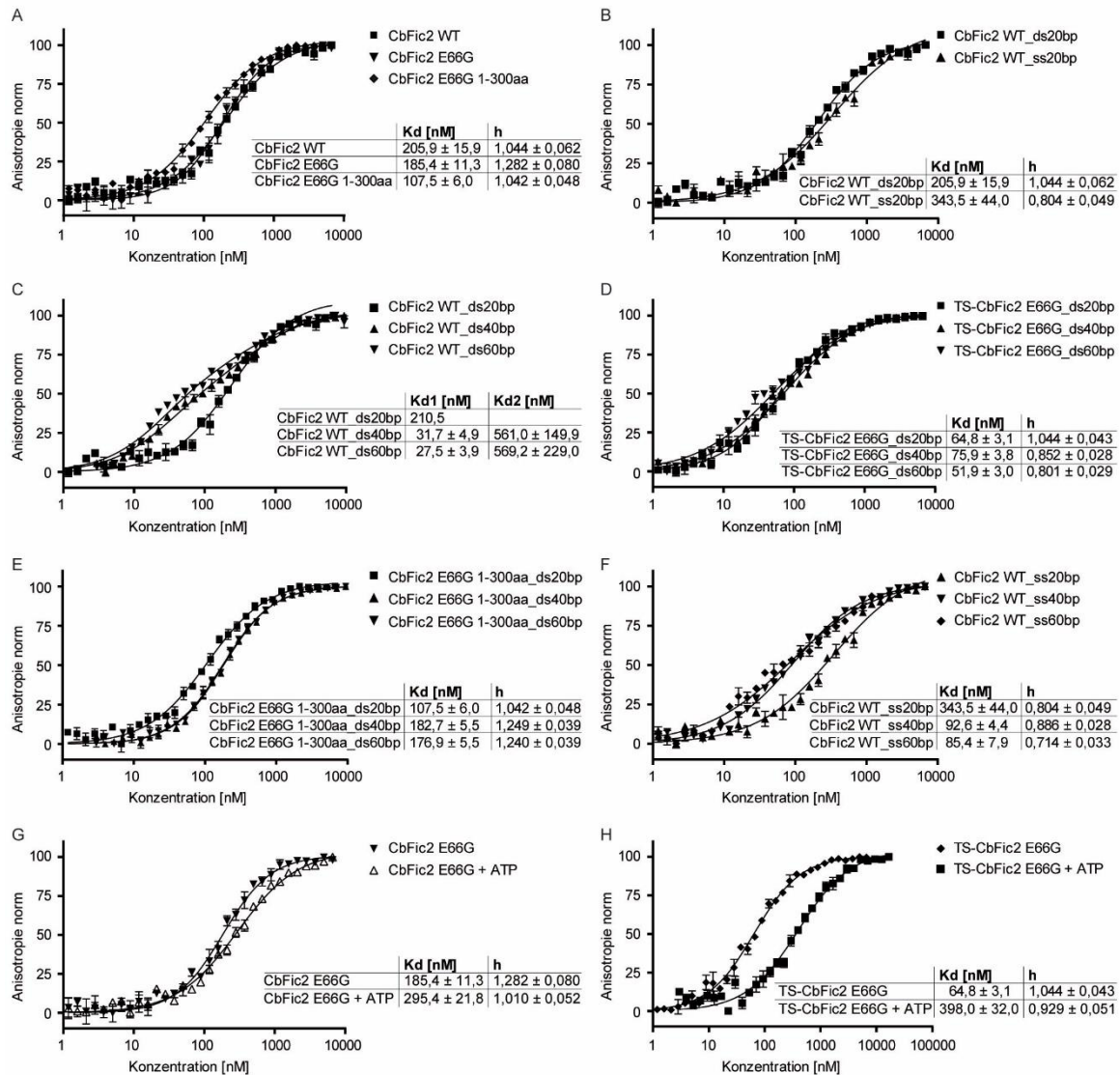


Abbildung 13: Anisotropieanalyse der Bindungsaffinitäten von CbFic2 Versionen gegenüber DNA Versionen
 Analyse der Bindungsaffinität verschiedener CbFic2 Varianten wie angegeben gegenüber DNA wie angegeben mittels Anisotropie. 1 nM 5'-FITC-gelabelte DNA wurde vorgelegt, und eine Verdünnungsreihe ausgehend von 20 µM bzw. 50 µM CbFic2 mithilfe eines Pipettierroboters hinzugegeben. Werte wurden auf den kleinsten und größten Wert normiert. Fit entspricht dem „Specific binding with Hill slope“ (3) bzw. dem “Two sites - Specific binding only” (4) (GraphPad Prism 4.0). Abgebildete Daten entsprechen dem Mittelwert technischer Triplikate, Fehlerbalken der Standardabweichung. (A) CbFic2 WT, E66G, E66G 1-300 aa gegenüber 20 bp dsDNA. (B) CbFic2 WT gegenüber 20 bp dsDNA und ssDNA. (C) CbFic2 WT gegenüber 20 bp, 40 bp, 60 bp dsDNA. (D) TS-CbFic2 E66G gegenüber 20 bp, 40 bp, 60 bp dsDNA. (E) CbFic2 E66G 1-300 aa gegenüber 20 bp, 40 bp, 60 bp dsDNA. (F) CbFic2 WT gegenüber 20 bp, 40 bp, 60 bp ssDNA. (G) CbFic2 E66G nach Inkubation in An- und Abwesenheit von ATP gegenüber 20 bp dsDNA. (H) TS-CbFic2 E66G nach Inkubation in An- und Abwesenheit von ATP gegenüber 20 bp dsDNA.

3.2.5 DNA-Bindung verringert Automodifikation von CbFic2 *in vitro*

Um den Einfluss der DNA-Bindung auf die AutoAMPylierung von CbFic2 näher zu bestimmen, wurde zunächst der Grad der Automodifikation nach Reinigung der verschiedenen CbFic2

Konstrukte via WB betrachtet: Dabei liegen TS-CbFic2 E66G und E66G 1-300 aa ohne HTH-Domäne bereits direkt nach der Aufreinigung eindeutig autoAMPyliert vor. WT und H205A hingegen sind nicht modifiziert (Abbildung 14A). Für CbFic2 ohne TS-Tag (Abbildung 14B) stellt sich die Situation anders dar: Nur CbFic2 E66G 1-300 aa liegt nach der Reinigung mit geringer Automodifikation vor, welche durch Inkubation mit ATP verstärkt wird. In ähnlicher Weise induziert Inkubation von CbFic2 E66G mit ATP die AutoAMPylierung, unabhängig von der Anwesenheit von DNA. Damit scheint die Automodifikation für CbFic2 E66G im Gegensatz zur Targetmodifikation nicht DNA-abhängig zu sein. CbFic2 WT und HA bleiben laut WB-Analyse weitestgehend unmodifiziert, ähnlich wie TS-CbFic2. Führt man allerdings die gleiche Betrachtung nach Inkubation mit 5-fach verdünntem CbFic2 WT durch und untersucht die AMPylierung zeitaufgelöst im WB, kann man sehr deutlich beobachten, dass Automodifikation auftritt, allerdings sehr spezifisch nur in Abwesenheit von DNA, während dieselbe durch Anwesenheit von DNA unterdrückt wird (Abbildung 14C).

Da eine WB-Analyse nur begrenzt quantifizierbar ist und auch keinen Aufschluss über die Anzahl der Modifizierungen gibt, wurden genauere Untersuchungen mittels zeitaufgelöster MS durchgeführt (Abbildung 14D): Die Konstrukte TS-CbFic2 WT und TS-CbFic2 E66G bzw. CbFic2 WT und CbFic2 E66G wurden je in An- und Abwesenheit von 20 bp dsDNA mit ATP bei 37 °C 8 h inkubiert, und zeitaufgelöst in Stundenintervallen mittels MS analysiert. Der Grad der Automodifikation wurde durch den spezifischen Massenzuwachs der AMPylierung von 329 Da massenspektrometrisch erfasst. Die Quantifizierung der AMPylierung erfolgte hier über den Anteil des spezifischen Signals an der Gesamtintensität aller CbFic2 Signale und nicht - wie an anderer Stelle - über die Fläche unter dem Peak. Wie bereits im WB gezeigt, liegt TS-CbFic2 E66G demnach bereits zum Zeitpunkt 0 h über 30 % 1-fach AMPyliert vor. Die Inkubation mit ATP führt dann bis zu einer 8-fachen Modifikation nach 8 h. Dahingegen zeigt TS-CbFic2 WT kaum Automodifikation. Ohne TS-Tag liegen CbFic2 WT und E66G zum Zeitpunkt 0 h weitestgehend unmodifiziert vor; Inkubation mit ATP führt dann bei beiden Konstrukten gleichermaßen zu einer 5-fachen AMPylierung. Spannenderweise führt die Anwesenheit von 20 bp dsDNA in beiden Fällen zu einer deutlichen Unterdrückung der Automodifikation, wobei der Effekt stärker bei CbFic2 WT als bei E66G auftritt. Damit bestätigt die MS-Analyse die WB-Daten (Abbildung 14C). Die Anwesenheit von Target während der ATP-Inkubation, sowohl Histon H3 FL als auch Histon H3 1-36 aa, verändert den Grad der Automodifikation für beide Konstrukte nicht signifikant (Abbildung S 10, Abbildung S 11).

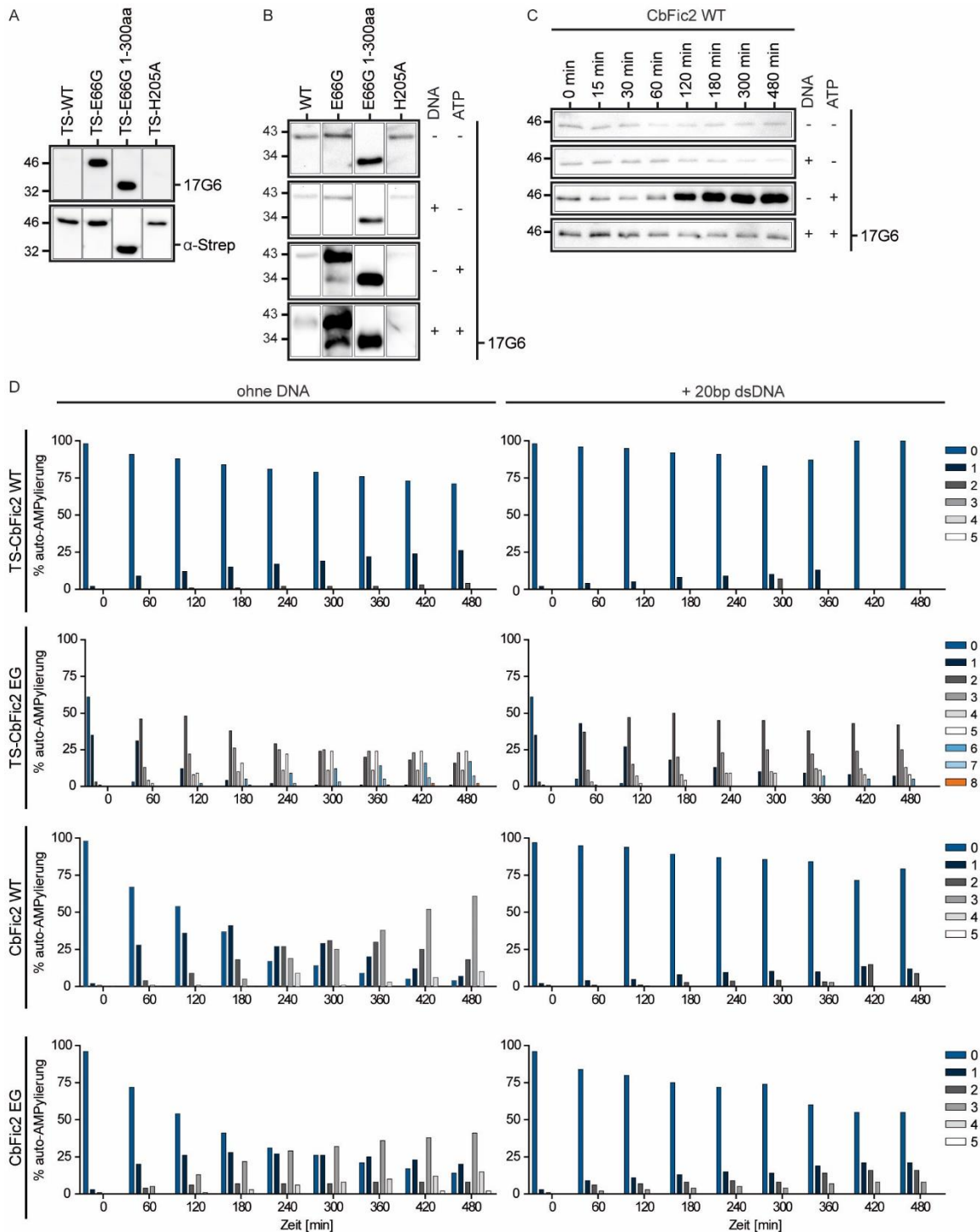


Abbildung 14: Analyse der AutoAMPylierung verschiedener CbFic2 Versionen mittels MS und WB

(A) Analyse der AutoAMPylierung von 100 ng TS-CbFic2 WT, E66G, E66G 1-300 aa, H205A nach Reinigung ohne weitere Behandlung mit ATP oder DNA mittels WB mit anti-AMP-Antikörper 17G6 in Gegenwart von 1 mM MnCl₂. Der identische Blot wurde gestrippt und mit der anti-Strep-Probe inkubiert. (B) Analyse der AutoAMPylierung von 100 ng/Spur CbFic2 WT, E66G, E66G 1-300 aa, H205A nach Inkubation mit und ohne ATP oder DNA mittels WB mit anti-AMP-Antikörper 17G6 in Gegenwart von 1 mM MnCl₂. 0,1 mg/ml je CbFic2 Version wurden in An- und Abwesenheit von 2,5 μM 20 bp dsDNA bzw. 1 mM ATP in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP bei 37 °C über Nacht inkubiert. (C) Analyse der AutoAMPylierung von 100 ng/Spur CbFic2 WT im zeitlichen Verlauf der Inkubation mit und ohne ATP oder DNA mittels WB mit anti-AMP-Antikörper 17G6 in Gegenwart von 1 mM MnCl₂. 0,02 mg/ml CbFic2 WT wurde in An- und Abwesenheit von 0,5 μM 20 bp dsDNA bzw. 1 mM ATP in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP bei 37 °C inkubiert. (D) MS-Analyse der AutoAMPylierung von TS-CbFic2 WT, TS-CbFic2 E66G, CbFic2 WT, CbFic2 E66G im zeitlichen Verlauf der Inkubation mit ATP in An- oder Abwesenheit von DNA. 0,2 mg/ml CbFic2 WT oder CbFic2 E66G oder TS-CbFic2 WT

oder TS-CbFic2 E66G wurden in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP, 1 mM ATP je in An- und Abwesenheit von 5 µM 20 bp dsDNA bei 37 °C inkubiert und stündlich mittels MS analysiert. Der Grad der Automodifikation wurde durch den spezifischen Massenzuwachs der AMPylierung von 329 Da erfasst. Die Quantifizierung der AMPylierung erfolgte über den Anteil des spezifischen Signals an der Gesamtintensität aller CbFic2 Signale.

Damit scheint auch die Automodifikation abhängig vom N-Terminus zu sein, und CbFic2 E66G ohne TS-Tag wird insgesamt geringer automodifiziert als TS-CbFic2 E66G. Besonders für CbFic2 WT tritt eine deutlich ausgeprägte AutoAMPylierung in Abhängigkeit von DNA auf, ein Effekt, der bei TS-CbFic2 WT überhaupt nicht beobachtbar ist. Für alle Konstrukte lässt sich allerdings feststellen, dass die Automodifikation in Abwesenheit von DNA deutlich stärker ausfällt. Leider blieb eine genauere Identifikation der Automodifikationsstellen via MS/MS bisher erfolglos. Die Betrachtung der Primärsequenz von CbFic2 zeigt, dass das Enzym insgesamt 20 Serine und 23 Threonine besitzt, welche für eine Modifikation in Frage kämen, sollte die Seitenkettenpräferenz der Targetmodifikation auf die Automodifikation übertragbar sein.

3.2.6 CbFic2 WT besitzt DeAMPylierungsaktivität

Nachdem die im vorigen Kapitel beschriebenen Experimente gezeigt haben, dass bei CbFic2 WT, aber nicht bei TS-CbFic2 WT, eine DNA-abhängige Automodifikation stattfindet, stellt sich die Frage, ob dieser Automodifikationseffekt intramolekular (d. h. in cis) oder intermolekular (d. h. in trans) stattfindet, womit dann eventuell auch die Aktivität anderer Proteine (in trans) beeinflusst werden könnte. Da für CbFic2 WT bislang in keinem Konstrukt eine signifikante AMPylierungsaktivität gezeigt werden konnte, käme hier allerdings auch eine DeAMPylierungsaktivität in Betracht, wie sie für andere FIC-Proteine bereits nachgewiesen wurde (Casey et al., 2017; Preissler et al., 2016).

Mittels WB wurden die AMPylierungseffekte bei Co-Inkubation verschiedener CbFic2 Konstrukte - mit und ohne TS-Tag, Volllänge (FL) vs. verkürzte (1-300 aa) Varianten, und Mutanten (WT, E66G, H205A) - in An- bzw. Abwesenheit von DNA und ATP analysiert (Abbildung 15A). Wie die vorherigen Analysen bereits gezeigt haben, liegen CbFic2 E66G und CbFic2 E66G 1-300 aa nach Inkubation mit ATP automodifiziert vor (Abbildung 14B), während TS-CbFic2 E66G und TS-CbFic2 E66G 1-300 aa bereits ohne Inkubation mit ATP automodifiziert vorliegen (Abbildung 14A).

In Abwesenheit von ATP führt allerdings Co-Inkubation von CbFic2 WT oder TS-CbFic2 WT mit TS-CbFic2 E66G als auch TS-CbFic2 E66G 1-300 aa dazu, dass sowohl TS-CbFic2 E66G als auch TS-CbFic2 E66G 1-300 aa nicht mehr AMPyliert vorliegen (Abbildung 15A, Spalten 5 und 9), während beide Konstrukte (TS-CbFic2 E66G und TS-CbFic2 E66G 1-300 aa) nach Co-Inkubation mit CbFic2 H205A oder TS-CbFic2 H205A (unter gleichen ATP-Bedingungen) ihre Automodifikation beibehalten (Abbildung 15A, Spalten 6 und 10). Damit zeigt CbFic2 WT, mit oder ohne TS-Tag, in Abwesenheit von ATP offensichtlich einen DeAMPylierungseffekt in trans.

Ein DNA-Einfluss ist hier nicht sichtbar, allerdings liegt CbFic2 WT bzw. TS-CbFic2 WT in Abwesenheit von ATP unabhängig von DNA immer weitestgehend unmodifiziert vor (Abbildung 14C und D). Damit stellt sich die Frage, ob CbFic2 WT, mit oder ohne TS-Tag, auch in Anwesenheit von ATP zur Demodifikation in der Lage ist, wenn diese mit der AMPylierungsaktivität von (TS-)CbFic2 E66G Varianten konkurriert. Abbildung 15A, Spalte 1 und 3, belegt, dass CbFic2 WT (bzw. TS-CbFic2 WT) selbst in Anwesenheit von ATP die Automodifikation von CbFic2 E66G 1-300 aa (bzw. von CbFic2 E66G) unterdrückt, unabhängig von DNA. Interessanterweise liegt aber TS-CbFic2 WT im gleichen Ansatz in Anwesenheit von DNA AMPyliert vor. Da aufgrund der vorherigen Daten (Abbildung 14D) eine Automodifikation (in cis) unwahrscheinlich ist, und auch weil die TS-CbFic2 WT AMPylierung in Anwesenheit von CbFic2 H205A (im Gegensatz zu dem in Anwesenheit von CbFic2 E66G gesehenen Effekt) nicht auftritt (Abbildung 15A, Spalten 3 und 4), ist anzunehmen, dass CbFic2 E66G TS-CbFic2 WT in trans modifiziert. Dabei sind zwei Szenarien denkbar: Entweder verstärkt DNA-Bindung die Automodifikationsaktivität von CbFic2 E66G deutlich über die – im Vergleich dann langsamere – Demodifikationsaktivität von TS-CbFic2 WT, oder die Demodifikationsfähigkeit von TS-CbFic2 WT ist - bei gleichbleibender CbFic2 E66G Aktivität - in Anwesenheit von DNA abgeschwächt. Letzteres würde allerdings voraussetzen, dass CbFic2 WT auch sich selbst demodifiziert, wozu es bisher keinerlei Datengrundlage gibt. Mit Blick auf Abbildung 15A, Spalte 8, wo CbFic2 E66G TS-CbFic2 H205A in trans modifiziert, und die bekannte Aktivierung der CbFic2 E66G Targetmodifikation durch DNA am Beispiel von Histon H3, scheint das erste Szenario wahrscheinlicher. Spalte 5 zeigt, dass in Zusammenspiel mit ATP und DNA, nicht aber mit ATP allein, CbFic2 WT in der Lage ist, die Automodifikation von TS-CbFic2 E66G zu entfernen oder zu unterdrücken. Da in Abwesenheit von DNA TS-CbFic2 E66G stärker automodifiziert ist (Abbildung 14D), passt diese Beobachtung in das Gesamtbild. Allerdings scheint die Demodifikationsaktivität von TS-CbFic2 WT in Anwesenheit von ATP nicht auszureichen, um TS-CbFic2 E66G 1-300 aa zu deAMPylieren, obwohl dies in Abwesenheit von ATP möglich ist (Abbildung 15A, Spalte 9). Ein weiterer Punkt ist auffällig im Vergleich der Spalten 5, 8 und 10: Während CbFic2 E66G in der Lage ist, in Anwesenheit von DNA TS-CbFic2 H205A zu modifizieren, und dieser Effekt durch DNA leicht verstärkt wird (Spalte 8) (dieser Trend gilt auch in abgeschwächter Form für TS-CbFic2 E66G gegenüber CbFic2 H205A in Spalte 5), kann TS-CbFic2 E66G 1-300 aa ohne HTH-Domäne TS-CbFic2 H205A unter keinen Bedingungen modifizieren (Spalte 10).

Diese WB-Beobachtungen können zwar qualitativ den allgemeinen Trend aufzeigen, dass CbFic2 WT (bzw. TS-CbFic2 WT) unabhängig von An- oder Abwesenheit von ATP oder DNA-Bindung deAMPylieren kann, und in Anwesenheit von ATP mit der Automodifikations- (ohne DNA) bzw. Targetmodifikationsaktivität (mit DNA) von TS-CbFic2 E66G bzw. CbFic2 E66G konkurriert, allerdings sind diese Effekte im WB extrem schwer zu quantifizieren.

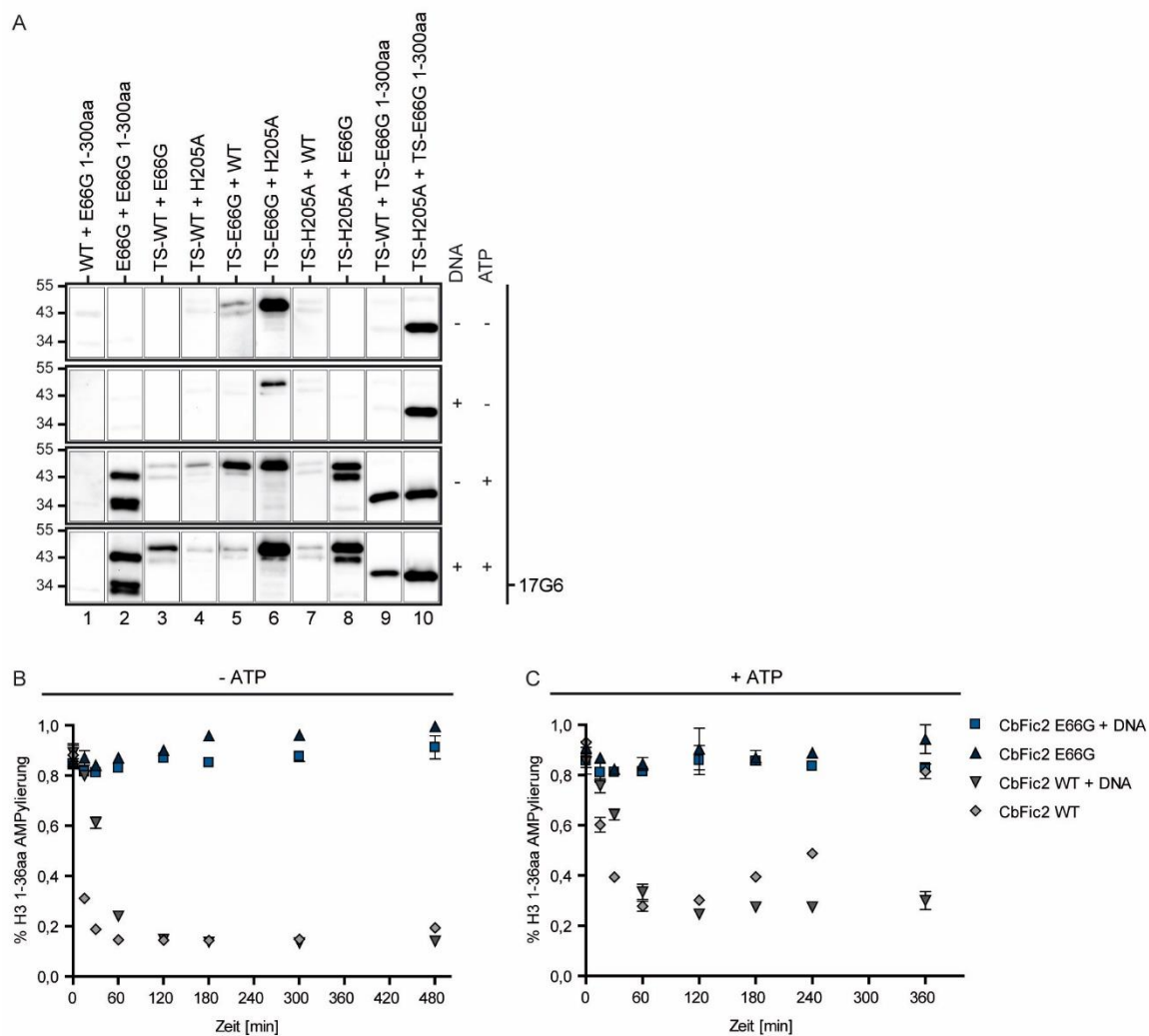


Abbildung 15: Analyse der DeAMPylierungsfähigkeit von CbFic2 WT mittels WB und ELISA

(A) WB Analyse der AutoAMPylierung nach Co-Inkubation verschiedener CbFic2-Versionen in An- und Abwesenheit von 20 bp dsDNA und ATP mittels anti-AMP-Antikörper 17G6 + MnCl₂. 0,1 mg/ml je CbFic2 Version wurden in An- und Abwesenheit von 2,5 μ M 20 bp dsDNA bzw. 1 mM ATP in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP bei 37 °C über Nacht co-inkubiert. 100 ng/Spur wurden aufgetragen. (B, C) ELISA Analyse der Demodifikation von AMPyliertem TS-H3 1-36 aa durch CbFic2 WT bzw. CbFic2 E66G mit und ohne 20 bp dsDNA in Abwesenheit (B) und Anwesenheit (C) von ATP mit anti-AMP-Antikörper 17G6. 0,5 μ M CbFic2 WT oder CbFic2 E66G in An- und Abwesenheit von 0,5 μ M 20 bp dsDNA und An- und Abwesenheit von 1 mM ATP wurden in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP bei 37 °C inkubiert. Mittelwerte der technischen Duplikate wurden auf den Wert bei 0 min (höchster Wert) normiert und mit der Standardabweichung als Fehlerbalken abgebildet.

Aus diesem Grund wurde mit ELISA eine Methode gewählt, die leichter zeitaufgelöst zu quantifizieren ist: Streptactinplatten wurden mit dem Histon H3 Peptid TS-H3 1-36 aa gecoatet, und im Überstand mit CbFic2 WT bzw. CbFic2 E66G in Anwesenheit von ATP, MgCl₂ und DNA bei 37°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde der enzymhaltige Überstand entfernt, das Well dreifach mit TBS-T gewaschen und anschließend auf 4°C bis zur Antikörperinkubation gelagert. Die Veränderung einer möglichen AMPylierung bzw. DeAMPylierung wurde mit dem anti-AMP-Antikörper 17G6 detektiert. Dabei entstand leider das Problem, dass CbFic2 E66G - und mit verzögerter Reaktion auch CbFic2 WT - die Streptactinplatten selbst AMPyliert, auch in Abwesenheit des immobilisierten Zielproteins TS-H3 1-36 aa (Daten nicht gezeigt). Sobald die

Platten allerdings mit vorher in Lösung dreifach AMPyliertem TS-H3 1-36 aa gecoatet wurden, konnte die Demodifikationsreaktion Target-spezifisch verfolgt werden. Dabei zeigte sich, dass CbFic2 WT, nicht aber CbFic2 E66G, in der Lage ist, eine DeAMPylierung von H3 1-36 aa-AMP sowohl in Ab- (Abbildung 15B), als auch in Anwesenheit von ATP (Abbildung 15C) zu bewirken, wobei Anwesenheit von DNA die Reaktion jeweils leicht zu verlangsamen scheint. In Abhängigkeit von ATP scheint dann interessanterweise lediglich CbFic2 WT ohne DNA-Bindung in der Lage zu sein, das Target H3 1-36 aa nach vollständiger Demodifikation bei 120 min wieder zu AMPylieren, während das Signal von CbFic2 WT + DNA nach DeAMPylierung niedrig bleibt (Abbildung 15C).

3.2.7 CbFic2 Aktivität bewirkt eine Herabregulation der zellulären Kinaseaktivität

Um die physiologische Auswirkungen der CbFic2 Aktivität zu studieren, wurde der Einfluss von GFP-CbFic2 E66G im Vergleich zu GFP-CbFic2 H205A Überexpression in HEK293 Zellen auf die Gesamtheit aller Serin/Threonin Kinasen mittels *Kinase activity profiling* untersucht.

Dies geschah unter Verwendung der PamStation® Technologie in Kooperation mit PD Dr. Malte Kriegs^{viii} durch Inkubation der Probenlysate mit dem PamChip®4 Microarray, auf dessen 3D-Oberfläche 144 Serin/Threonin Kinase (STK) Peptid-Substrate immobilisiert sind. In den Lysaten vorhandene Kinasen phosphorylieren die Peptidsubstrate, was durch fluoreszenzmarkierte anti-Ser/Thr-phospho-Antikörper nachgewiesen wird. Durch Analyse jeder einzelnen Peptidposition können dann Rückschlüsse auf globale oder einzelne veränderte Kinaseaktivitäten und -regulationen gezogen werden.

Initial sollten die Experimente lediglich einen Hinweis darauf geben, ob auf Basis der PamStation® Technologie in Kombination mit den generierten anti-AMP-Antikörpern ein „*AMPylator activity profiling*“-Test entwickelt werden könnte. Die Arbeitshypothese war, dass FIC-Proteine ein Targetspektrum mit Kinasen teilen und somit grundsätzlich die 13-Aminosäuren langen Peptid-Substrate erkennen und modifizieren können sollten. Zumindest die Analyse von GFP-CbFic2 E66G auf dem STK Chip, welcher unter anderem das Peptid H3.2 3-18 aa enthält, mit dem anti-AMP-Antikörper 17G6 war aufgrund sehr geringer Signalintensität nicht erfolgreich (siehe Abbildung S 12). In den Kontroll-Experimenten mit anti-phospho-Antikörpern fiel jedoch unerwarteter Weise auf, dass GFP-CbFic2 E66G HEK293 Lysat (M0907) im Vergleich zum inaktiven GFP-CbFic2 H205A Äquivalent (M0908) eine deutliche Herabregulation der Phosphorylierung zeigte (Abbildung 16).

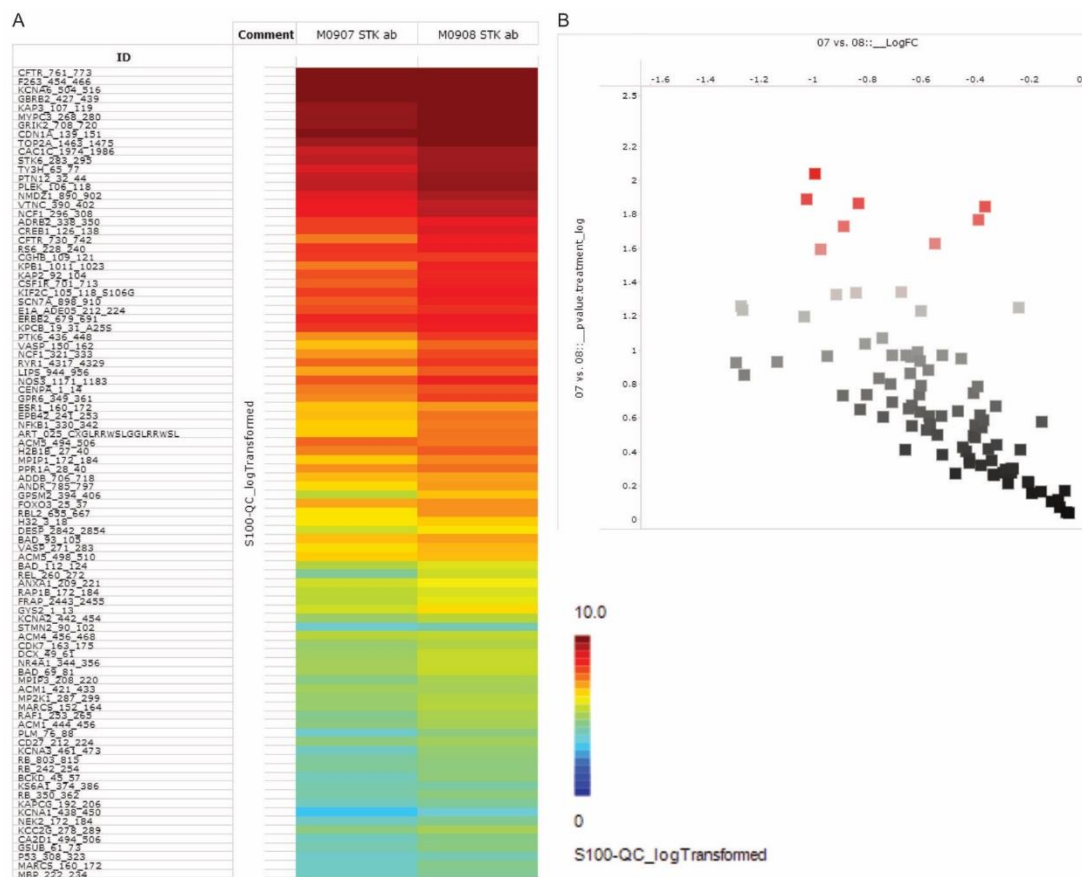


Abbildung 16: Globale Reduktion der Phosphorylierungsaktivität im Kinase activity profiling

Kinase activity profiling mit HEK293-Lysaten nach transienster Expression von GFP-CbFic2 E66G (M0907) für 48 h im Vergleich zur GFP-CbFic2 H205A (M0908) Expression. Lysate wurden in Gegenwart von 400 μ M ATP auf STK-PamChip® -Arrays inkubiert und Phosphorylierung mit der PamStation®12 mittels anti-Phospho-Ser/Thr-Antikörpern nachgewiesen. Datensatz repräsentiert eine 4-fach Bestimmung je CbFic2 Version. (A) *Heatmap* der \log_2 transformierten Signalintensitäten der globalen Phosphorylierungsaktivität auf STK-Chip. (B) *Volcano blot* aller Peptide. Signifikant veränderte Peptide sind rot markiert.

Dabei konnten 11 signifikant veränderte Peptide identifiziert werden, deren Phosphorylierung allesamt herabreguliert war (\log_2 FC $< -0,3$) (Tabelle 1). Da den Lysaten Phosphataseinhibitoren (PPI) zugesetzt waren, lag die Ursache für diese Unterschiede mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht in einer erhöhten Phosphataseaktivität. Um auszuschließen, dass anstelle einer herabregulierten Kinaseaktivität eine globale, unspezifische AMPylierung der Peptid-Substrate durch GFP-CbFic2 E66G zum Rückgang der Phosphorylierung führte, wurde Adenosin-5'-((α,β)-Imido)Triphosphat (AMPNPP) anstelle von ATP bei der *in vitro* Inkubation der Lysate auf dem Chip eingesetzt. AMPNPP kann aufgrund der nicht-hydrolysierbaren α/β -Phosphat-Bindung zwar von Kinasen (Ma et al., 1988), nicht aber von AMP-Transferasen als Substrat genutzt werden (Yang et al., 2020). Allerdings veränderte der Einsatz von AMPNPP das Bild nicht deutlich Abbildung S 13), was gegen eine globale, unspezifische AMPylierung spricht.

Tabelle 1: Liste signifikant veränderter Peptide im *Kinase activity profiling*

Liste signifikant veränderter Peptide im *Kinase activity profiling* auf STK-Chip mit HEK293-Lysaten nach transienter Überexpression von GFP-CbFic2 E66G für 48 h im Vergleich zu GFP-CbFic2 H205A Expression.

Uniprot ID	Sequenz	ID	Protein Name	Log2 FC
P13569	EPLERRLSLVPDS	CFTR_730_742	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	-0,991
Q93045	AAGERRKSQEAQV	STMN2_90_102	Stathmin-2	-1,021
Q13936	ASLGRRASFHLEC	CAC1C_1974_1986	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C	-0,829
O14965	SSRRTTLCGTLDY	STK6_283_295	Aurora kinase A	-0,362
P22612	VKGRTWTLCGTPEYL	KAPCG_192_206	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit gamma	-0,386
P13861	SRFNRRVSVCAET	KAP2_92_104	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	-0,885
P31323	NRFTRRASVCAEA	KAP3_107_119	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	-0,545
P07550	ELLCLRRSSLKAY	ADRB2_338_350	Beta-2 adrenergic receptor	-0,970
P11388	RRKRKPSTSDSDS	TOP2A_1463_1475	DNA topoisomerase 2-alpha	-0,672
Q04864	KMQLRRPSDQEVS	REL_260_272	Proto-oncogene c-Rel	-0,838
P46020	QVEFRRLSISAES	KPB1_1011_1023	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha	-0,910

In einer Upstream Kinase Analyse wurde mit hoher Spezifität und signifikanter Veränderung die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CAMKII) als übergeordnete Kinase dieser Peptide identifiziert, gefolgt von der Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 6 (MINK/ZC3), der Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 4 (MAP4K4/ZC1) und der Serine/Threonine-Protein Kinase DCLK2, ebenfalls ein Mitglied der CaMK Familie (siehe Abbildung S 14). Um eine direkte AMPylierung und damit Regulation sowohl der signifikant veränderten Peptide als auch der übergeordneten CAMKII Kinase oder ihrem Bindungspartner Calmodulin durch CbFic2 auszuschließen, wurden alle betroffenen Proteine rekombinant hergestellt und mit TS-CbFic2 E66G in Anwesenheit von ATP und 20 bp dsDNA inkubiert. In der WB-Analyse mit anti-AMP-Antikörper 17G6 konnte kein erhöhtes Signal im Vergleich zur Inkubation mit TS-CbFic2 H205A festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Damit handelt es sich bei dem hier beschriebenen Befund (Abbildung 16, Tabelle 1) allem Anschein nach entweder um eine Abwehrreaktion der Zelle auf CbFic2-Aktivität (z. B. der AMPylierung von Histon H3) oder eine direkte Auswirkung der Target-AMPylierung durch CbFic2, z. B. im Sinne einer transkriptionellen oder translationellen Regulation.

3.2.8 CbFic2 modifiziert distinkte Targets in Makrophagen

Um das volle Potenzial der Targetidentifizierung der neu entwickelten anti-AMP-Antikörper auszuschöpfen, ist das bisher genutzte System der transient GFP-CbFic2 transfizierten HEK293 Zellen ungeeignet. Zum einen haben die Studien zur DNA-Bindung und Automodifikation von CbFic2 gezeigt, dass ein N-terminaler Tag wie im Falle des GFP-Tags mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer Veränderung der Aktivität von CbFic2 führt. Des Weiteren ist die zelluläre Umgebung von HEK293 Zellen weit vom Infektionsgeschehen in Makrophagen entfernt, besonders da eine potenzielle epigenetische Veränderung stark Zelllinien-abhängig ist. Nicht zuletzt beinhaltet die transiente Transfektion eine geringere Reproduzierbarkeit durch einen nicht vollständig transfizierten Zellpool, eine kurzfristig sehr starke Überexpression und ein recht kurzes Beobachtungsfenster, bevor die Expression von CbFic2 wieder abnimmt. Aus diesen Gründen war die Etablierung einer stabilen, induzierbaren Zelllinie von ungetagtem CbFic2 in einer monozytischen Zelllinie notwendig: Mittels Lentiviren wurden humane monozytische Zellen (THP-1) mit einem G418-selektierbaren Tet-On® Plasmid transduziert, welches GFP-P2A-CbFic2 bzw. GFP-P2A-V5-CbFic2 und die jeweiligen Mutanten E66G und H205A Doxycyclin-induzierbar exprimiert. Diese stabilen monozytischen Zelllinien können dann mittels Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu einer Mischpopulation aus M1 und M2 Makrophagen differenziert werden (Lund et al., 2016), bevor die Expression induziert wird. Die der CbFic2 Sequenz vorgeschaltete GFP-P2A Sequenz dient dazu, die erfolgreiche Induktion der Expression schnell verfolgen und evtl. auch quantifizieren zu können. Die 2A Sequenz aus dem Porzinen Teschovirus 1 (P2A) führt dazu, dass Ribosomen die Synthese der Glycyl-Prolyl-Peptidbindung am C-Terminus des Peptids überspringen (Donnelly et al., 2001; Kim et al., 2011), und damit GFP und das nachgeschaltete CbFic2 getrennt voneinander in der Zelle vorliegen. CbFic2 trägt damit lediglich ein Prolin am N-Terminus. Zusätzlich dazu wurde eine Version generiert, in welcher CbFic2 nach P2A-Spaltung einen N-terminalen V5-Tag zur Verwendung in Lokalisationsanalysen, ChIP Sequenzierung oder Ähnlichem trägt (V5-CbFic2). Für beide Varianten wurden neben dem WT jeweils die Mutanten E66G und H205A generiert. Nach der Transduktion wurden alle Zelllinien für ca. zwei Wochen mit G418 bis zur Erholung der Zellvitalität selektiert, bevor die Doxycyclin-induzierte Expression von GFP vor und nach PMA-Differenzierung der THP-1 Monozyten zu Makrophagen via Fluoreszenzmikroskopie, und die Expression von CbFic2 mittels WB mit einem anti-CbFic2-Antikörper bestätigt wurden (Abbildung S 15).

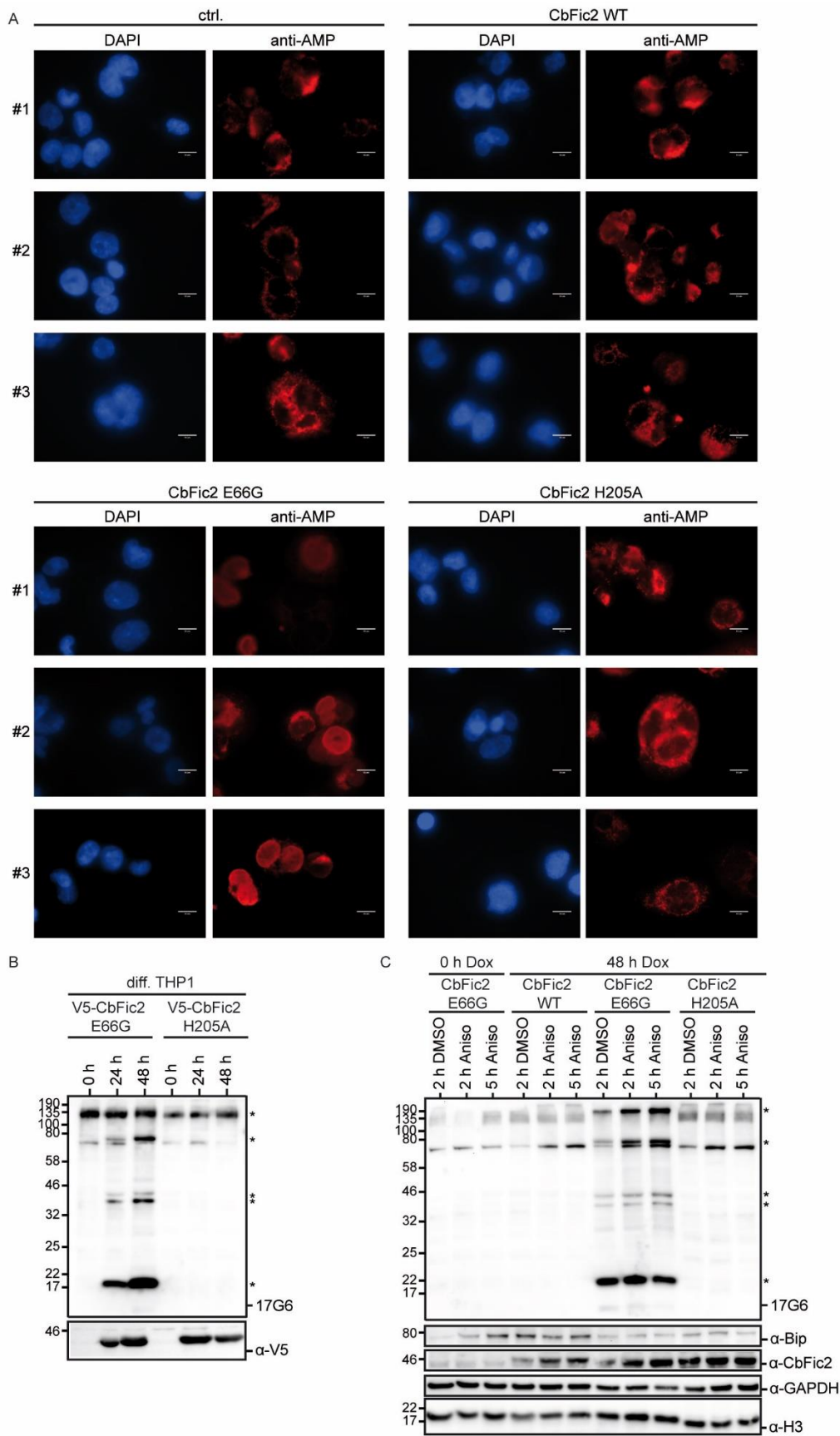


Abbildung 17: Analyse der AMPylierung in stabilen CbFic2-exprimierenden THP1 Makrophagen
 (A) Analyse der Lokalisation der AMPylierung nach 48-stündiger CbFic2-Induktion in Makrophagen mittels anti-AMP IF. Die jeweiligen stabilen THP-1 Zelllinien CbFic2 WT, CbFic2 E66G, CbFic2 H205A sowie die Kontrollzelllinie (ctrl)

wurden für 48 h mit PMA zu Makrophagen differenziert, bevor die Expression von CbFic2 für 48 h mittels Doxycyclin induziert wurde. Zellen wurden fixiert und permeabilisiert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt, die AMPylierung mit Antikörper 17G6 (rot) sichtbar gemacht. (B) Analyse des AMPylierungsmusters in THP-1 Makrophagen vor und nach Induktion der Expression von V5-CbFic2 E66G und V5-CbFic2 H205A für 24 h und 48 h mittels WB. Die jeweiligen stabilen THP-1 Zelllinien V5-CbFic2 E66G und V5-CbFic2 H205A wurden für 48 h mit PMA zu Makrophagen differenziert, bevor die Expression von CbFic2 mit Doxycyclin induziert wurde. 20 µg RIPA-Lysat pro Tasche wurden mit Bis-Tris Gelen geblottet und mit Antikörper 17G6 in Gegenwart von 1 mM MnCl₂ sondiert. Identischer Blot wurde gestrippt und mit Antikörpern gegen V5-Tag nachbehandelt. Deutlich veränderte AMPylierungsbanden sind mit einem Stern markiert. (C) Analyse des AMPylierungsmusters in THP-1 Makrophagen nach Anisomycin Stress und CbFic2 Expression mittels WB. Die jeweiligen stabilen THP-1 Zelllinien CbFic2 WT, CbFic2 E66G, CbFic2 H205A wurden für 48 h mit PMA zu Makrophagen differenziert, bevor die Expression von CbFic2 mit Doxycyclin induziert wurde. Zellen wurden für 2 h bzw. 5 h mit Anisomycin (Aniso) gestresst, DMSO dient als Lösungsmittel-Kontrolle. 20 µg RIPA-Lysat pro Tasche wurden mit Bis-Tris Gelen geblottet und mit Antikörper 17G6 in Gegenwart von 1 mM MnCl₂ sondiert. Identischer Blot wurde gestrippt, in Streifen geschnitten und mit Antikörpern gegen BiP, CbFic2, GAPDH und Histon H3 als Ladekontrolle nachbehandelt.

In IF-Analysen der differenzierten THP-1 Zelllinien nach 48 h Expression der jeweils angegebenen CbFic2 Mutante (bzw. von GFP in der Kontrollzelllinie (ctrl.)) mit dem anti-AMP-Antikörper 17G6 ist eine eindeutige Überlagerung des anti-AMP-Signals (rot) mit dem 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-gefärbten Zellkern (blau) für CbFic2 E66G erkennbar, während CbFic2 WT und H205A keine deutliche Veränderung gegenüber der Kontrolle aufweisen (Abbildung 17A). Obwohl sowohl für die Kontrolle als auch für CbFic2 WT und H205A nicht ausgeschlossen werden kann, dass das anti-AMP-Signal um den Zellkern herum auch von einer Kreuzreaktion mit ADP-Ribosylierung stammen könnte, ist die CbFic2 E66G induzierte Verlagerung des Signals in den Zellkern hinein ein eindeutiges Indiz für AMPylierung. In WB-Analysen der V5-CbFic2 E66G und H205A Zelllinien nach 0 h, 24 h und 48 h Expressions-Induktion mit dem anti-AMP-Antikörper 17G6 zeigt sich im Vergleich zur transienten Überexpression von GFP-CbFic2 in HEK293 Zellen (Abbildung 8D) ein sehr definiertes und reproduzierbares Bandenmuster mit 5 distinkten Banden (mit Sternchen markiert) bei ca. 17 kDa, 40 kDa (Doppelbande), 80 kDa (oberhalb einer CbFic2 E66G unabhängigen Bande), und über 135 kDa (überlagernd mit einer CbFic2 E66G unabhängigen Bande) (Abbildung 17B).

In einem weiteren Experiment wurden die jeweils angegebenen, differenzierten, für 48 h CbFic2-exprimierenden THP-1 Zelllinien für 2 h bzw. 5 h mit Anisomycin (Aniso) gestresst und die AMPylierungsmuster mit der jeweiligen Dimethylsulfoxid (DMSO)-Kontrolle verglichen (Abbildung 17C). Für Anisomycin konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass es in Maus-Fibroblasten über den p38 MAP Kinase Signalweg Zellstress auslösen kann, welcher in der Phosphorylierung von Histon H3 an Ser10 (Thomson et al., 1999) und Ser28 (Soloaga et al., 2003) und einer damit verbundenen transkriptionellen Aktivierung sogenannter *immediate early genes* (IE Gene) resultiert (Sawicka et al., 2014). Das Stressen der differenzierten THP-1 Zellen mit Anisomycin sollte klären, ob die CbFic2 E66G Expression die erwartete Histonphosphorylierung unterdrücken könnte, bzw. ob der Anisomycin-Stress die AMPylierungsmuster verändert. Dabei zeigte sich die Problematik, dass alle ChIP-grade anti-phospho-Serin-H3-Antikörper kreuzreaktiv mit rekombinatem, MS-verifiziertem H3-AMP waren, und damit eine Studie der H3-Phosphorylierung bei gleichzeitiger AMPylierung unmöglich war. Die Behandlung mit

Anisomycin zeigte jedoch weder bei 2 h noch bei 5 h ein signifikant verändertes AMPylierungssignal (Abbildung 17C).

3.2.9 CbFic2 AMPyliert HMG-I und unterdrückt die Immunantwort der Zelle

Um die Auswirkungen der Aktivität von CbFic2 in Makrophagen und die Zielproteine der AMPylierung zu bestimmen, wurde eine Immunpräzipitation mit anti-AMP-Antikörper 17G6 mit anschließender LC-MS/MS-Analyse durchgeführt.

Die Untersuchungen basierten auf biologischen Triplikaten der in Abbildung 17B dargestellten differenzierten THP-1 Lysate nach Doxycyclin-induzierter CbFic2 E66G bzw. CbFic2 H205A Expression für 48 h. Um die Anreicherung AMPylierter Proteine zu ermöglichen, wurden kompetitierende Nukleotide durch Proteom-Fällung entfernt und die denaturierten Proteinpellets anschließend unter polymerfreien Bedingungen in Lösung genommen. Die resuspendierten Pellets wurden dann mit kovalent an Epoxy-Beads gekoppeltem anti-AMP-Antikörper 17G6 über Nacht inkubiert. Eluierte Proteine wurden Trypsin verdaut, und in Kooperation mit Dr. Christoph Krisp^{ix} mittels LC-MS/MS und Fragmentierung durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) analysiert. Als AMPyliert wurden solche Peptide gewertet, welche Fragmente bei m/z 136 (Adenin) und 348 (AMP), im Falle von Tyrosinmodifikation zusätzlich bei 250 (Adenosin), zeigten (Li et al., 2011) (Abbildung S 16). Bedauerlicherweise fragmentieren AMPylierte Peptide erfahrungsgemäß nicht uneinheitlich, womit die Identifizierung der zugehörigen Proteine generell schwierig ist. Zusätzlich dazu bestand die Schwierigkeit einer geringen Signalstärke, sodass die Identifikation der AMPylierten Peptide kaum möglich war, da die Fragmentierung weitestgehend im Rauschen unterging.

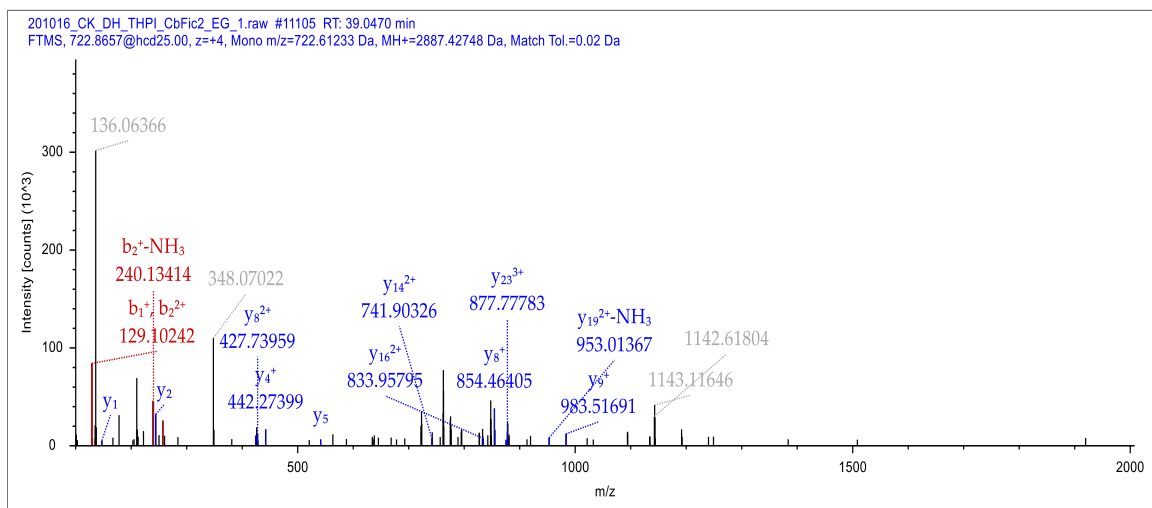


Abbildung 18: CID-Fragmentationsspektrum des AMPylierten HMG1-Peptids

LC-MS/MS-Identifikation des zum Gen HMG1A1 gehörigen Peptids „KQPPVSPGTALVGSQKEPSEVTPK“ mit eindeutigem CID-induziertem Fragmentierungsmuster der AMPylierung bei m/z 136 (Adenin) und 348 (AMP) in der anti-AMP IP Probe aus THP-1 basierten Makrophagen nach 48-stündiger CbFic2 E66G Expression. Die genaue Modifikationsstelle kann aufgrund der geringen Signalstärke nicht bestimmt werden.

Damit repräsentiert das einzige identifizierbare AMPylierte Peptid die Aminosäuren 30-54 (KQPPVSPGTALVGSQKEPSEVTPK) des ca. 12 kDa großen High mobility group protein HMG-I, codiert durch das Gen HMGA1 (Abbildung 18). HMG-I ist wie Histone ein Chromatinorganisierendes Protein, welches wichtige Rollen in Chromatindynamik und Transkription einnimmt (Mallik et al., 2018). Die genaue Modifikationsstelle der fünf verfügbaren Serin- und Threonin-Seitenketten innerhalb des identifizierten Peptids ist aufgrund der schwachen Signalstärke der Fragmentierung nicht eindeutig bestimmbar. Interessanterweise ist dieses Protein nicht signifikant angereichert, es ist aber nur in der E66G Probe AMPyliert vorhanden, während es in der H205A Probe lediglich unmodifiziert auftritt (Abbildung S 17). Neben HMG-I konnten noch weitere AMPylierte Peptide detektiert (siehe Anhang), aber unglücklicherweise nicht identifiziert werden.

Die quantitative Analyse der An- und Abreicherung identifizierter Proteine erfolgte mit Proteome Discoverer 2.4 über die Summe der integrierten Flächen unter der Kurve im Chromatogramm aller identifizierten Peptide eines Proteins. Da für jedes biologische Triplikate jeweils ein statistischer Ausreißer mit deutlich veränderten Proteinmengen auftrat, wurde die statistische Signifikanz jeweils nur aus Duplikaten berechnet. Basierend auf einem Student's t-Test (p -value $< 0,05$) wurden 236 Proteine als signifikant unterschiedlich identifiziert (Abbildung 19).

Schaut man auf die Proteine mit der deutlichsten Anreicherung in den CbFic2 E66G Proben im Vergleich zu den CbFic2 H205A Proben ($\text{LogFC} > 1,0$; Tabelle 2), können sowohl Histon H3.3 als auch Core Histone Macro-H2A.1 unter diesen Proteinen identifiziert werden. Histone H3.3 ist eine nicht-kanonische Histon H3 Variante, welche anstelle eines Alanins ein Serin an Aminosäureposition 31 (S31) trägt, und gehäuft in Euchromatin vorkommt (Ahmad and Henikoff, 2002). Macro-H2A.1 besteht aus einer H2A-ähnlichen Domäne mit über 60 % Sequenzidentität zu H2A, gefolgt von einer nicht Histon-verwandten Domäne (Chakravarthy et al., 2005) und unterdrückt die Transkription (Doyen et al., 2006). Auch Histon H2A liegt im Datensatz mit einem $\text{Log}_2 \text{FC}$ von 0,63 signifikant angereichert vor, wenn auch weniger deutlich als Macro-H2A.1 mit 1,15. Die Identifikation dieser Proteine ist wichtig, da Histon H3.3 und Histon H2A, nicht aber Histon H2B, nachweislich rekombinant von CbFic2 E66G AMPyliert werden (Cichy, 2016), und somit die Positivkontrolle darstellen, dass trotz fehlender Identifikation AMPylierter Peptide die AMP-spezifische Anreicherung durch Antikörper 17G6 erfolgreich war. Nichtsdestotrotz zeigt auch die Identifikation von Histon H4, welches nachweislich nicht von CbFic2 E66G rekombinant modifiziert wird (Cichy, 2016), dass nicht alle Proteine der Liste AMPyliert vorliegen, sondern auch durch sekundäre Effekte wie Bindung, in diesem Fall höchstwahrscheinlich innerhalb des Nukleosoms, angereichert werden können.

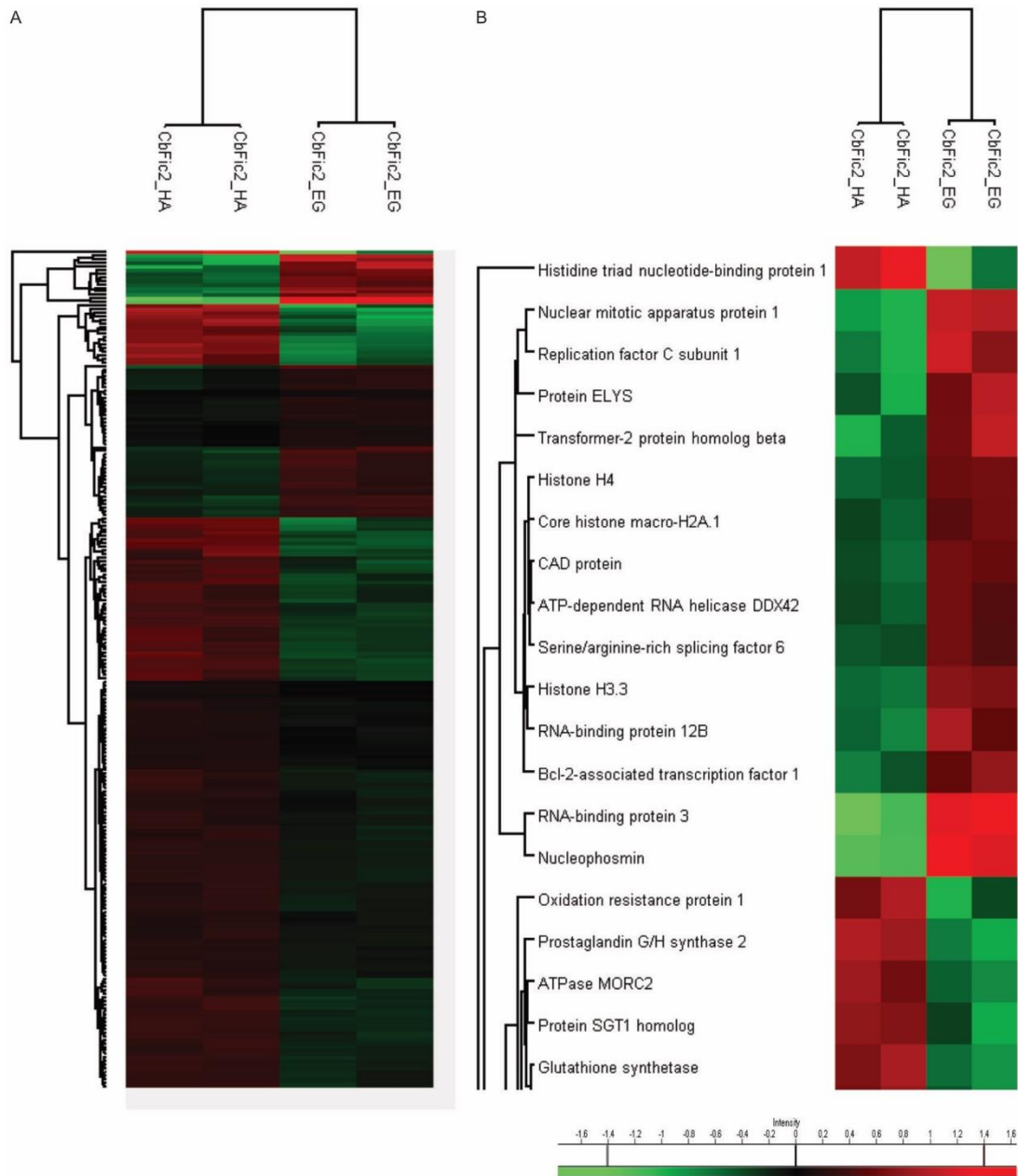


Abbildung 19 Heatmap der An- und Abreicherung von Proteinen nach anti-AMP-IP

250 µg differenzierte THP-1 Lysate nach 48 h CbFic2 E66G bzw. CbFic2 H205A Expression wurden in biologischen und technischen Triplikaten Methanol/Chloroform gefällt. Resuspendierte Pellets wurden pro Ansatz in 200 µl 25 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl mit 1 mg anti-AMP-Antikörper-gekoppelten Epoxy-Beads präzipitiert. Gebundene Proteine wurden mit 0,5 M NH₄OH, 0,5 mM EDTA eluiert, lyophilisiert und anschließend durch Dr. Christoph Krisp^{ix} Trypsin-verdaut und mittels LC-MS/MS analysiert. Proteine mit einem LogFC zwischen CbFic2 E66G und CbFic2 H205A Proben von <-0,5 und >0,5 wurden als ab- bzw. angereichert im Bezug auf CbFic2 E66G betrachtet. (A) Heatmap an- und abgereicherter Proteine nach anti-AMP-IP. Dargestellt sind alle statistisch relevanten Anreicherungen aus biologischen Duplikaten. (B) Ausschnitt aus (A) der am stärksten angereicherten Protein in der Heatmap.

Tabelle 2: Angereicherte Proteine in LC-MS/MS Analyse nach anti-AMP IP

Liste angereicherter Proteine (Log₂ FC >1,0) in LC-MS/MS der anti-AMP IP aus THP-1 basierten Makrophagen nach 48-stündiger CbFic2 E66G Expression im Vergleich zu CbFic2 H205A Expression. Proteine, die ausschließlich in der CbFic2 E66G Probe mit mindestens 2 Peptiden identifiziert wurden, wurden ebenfalls berücksichtigt (Log₂ FC n. def.).

Accession	Protein Name	Gen Name	# Peptide	Log ₂ FC	MW [kDa]
P98179	RNA-binding protein 3	RBM3	2	3,03	17,2
P06748	Nucleophosmin	NPM1	12	2,89	32,6
Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	7	2,24	238,3
P35251	Replication factor C subunit 1	RFC1	1	2,02	128,3
P62995	Transformer-2 protein homolog beta	TRA2B	3	1,83	33,7
Q8WYP5	Protein ELYS	AHCTF1	3	1,75	252,5
Q8IXT5	RNA-binding protein 12B	RBM12B	1	1,58	118,1
P84243	Histone H3.3	H3-3A	12	1,51	15,3
Q9NYF8	Bcl-2-associated transcription factor 1	BCLAF1	1	1,43	106,1
P62805	Histone H4	H4C1	10	1,30	11,4
P27708	CAD protein	CAD	4	1,27	243,0
O75367	Core histone macro-H2A.1	MACROH2A1	2	1,15	39,6
Q86XP3	ATP-dependent RNA helicase DDX42	DDX42	3	1,15	103,0
Q13247	Serine/arginine-rich splicing factor 6	SRSF6	6	1,13	39,6
O94979	Protein transport protein Sec31A	SEC31A	4	n. def.	133,0
Q13123	Protein Red	IK	2	n. def.	65,6
P61163	Alpha-centractin	ACTR1A	2	n. def.	42,6

Bei der Analyse der angereicherten Proteine mittels Reactome Knowledgebase (Jassal et al., 2020) zeigen sich drei deutlich repräsentierte Signalwege (Tabelle 3): Zum einen wird die mitotische Zellzyklus Regulation, zum anderen mRNA Splicing und die Prozessierung des mRNA 3'-Endes identifiziert.

Tabelle 3: Signalwege im Datensatz angereicherter Proteine nach anti-AMP IP

Reactome-Analyse angereicherter Proteine (Log₂ FC >0,5) in LC-MS/MS der anti-AMP IP aus THP-1 basierten Makrophagen nach 48-stündiger CbFic2 E66G Expression im Vergleich zu CbFic2 H205A Expression. Proteine, die ausschließlich in der CbFic2 E66G Probe mit mindestens 2 Peptiden identifiziert wurden, wurden ebenfalls berücksichtigt.

Signalweg	# Proteine im Signalweg	# Proteine aus Datensatz	P-value	FDR	Hit Gene
Zellzyklus, mitotisch	494	7	1,83E-05	0,001	AHCTF1, NUMA1, ACTR1A, LMNA, H4C1, H3-3A, RFC1
mRNA Splicing	191	5	2,08E-05	0,001	DDX42, TRA2B, CPSF4, RNPS1, SRSF6
mRNA 3'-Ende Prozessierung	57	3	1,54E-04	0,004	CPSF4, RNPS1, SRSF6

Der Datensatz der deutlich abgereicherten Proteine in den CbFic2 E66G Proben im Vergleich zu den CbFic2 H205A Proben (LogFC <-1,0, Tabelle 4) ist deutlich umfangreicher als der der angereicherten Proteine (Tabelle 2).

Tabelle 4: Abgereicherte Proteine in LC-MS/MS Analyse nach anti-AMP IP

Liste abgereicherter Proteine (Log2 FC <-1,0) in LC-MS/MS der anti-AMP IP aus THP-1 basierten Makrophagen nach 48-stündiger CbFic2 E66G Expression im Vergleich zu CbFic2 H205A Expression. Proteine, die ausschließlich in der CbFic2 H205A Probe mit mindestens 2 Peptiden identifiziert wurden, wurden ebenfalls berücksichtigt (Log2 FC n. def.).

Accession	Protein Name	Gen Name	# Peptide	Log2 FC	MW [kDa]
P49773	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1	3	-2,57	13,8
P35354	Prostaglandin G/H synthase 2	PTGS2	2	-1,98	69,0
P48637	Glutathione synthetase	GSS	1	-1,73	52,4
Q8N573	Oxidation resistance protein 1	OXR1	3	-1,72	98,0
Q9NRW1	Ras-related protein Rab-6B	RAB6B	1	-1,61	23,5
Q9Y2Z0	Protein SGT1 homolog	SUGT1	1	-1,60	41,0
Q9Y6X9	ATPase MORC2	MORC2	2	-1,58	117,8
Q8WXF1	Paraspeckle component 1	PSPC1	5	-1,58	58,7
Q13188	Serine/threonine-protein kinase 3	STK3	2	-1,54	56,3
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	TXNDC5	4	-1,51	47,6
Q9UL25	Ras-related protein Rab-21	RAB21	1	-1,50	24,3
P01584	Interleukin-1 beta	IL1B	13	-1,47	30,7
Q15814	Tubulin-specific chaperone C	TBCC	1	-1,44	39,2
P78556	C-C motif chemokine 20	CCL20	2	-1,33	10,8
P59190	Ras-related protein Rab-15	RAB15	1	-1,29	24,4
Q04446	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	GBE1	3	-1,29	80,5
Q9NY65	Tubulin alpha-8 chain	TUBA8	12	-1,22	50,1
P60174	Triosephosphate isomerase	TPI1	15	-1,21	26,7
P14317	Hematopoietic lineage cell-specific protein	HCLS1	4	-1,19	54,0
Q9H3K6	BolA-like protein 2	BOLA2	2	-1,19	10,1
Q96IU4	Protein ABHD14B	ABHD14B	2	-1,17	22,3
P61020	Ras-related protein Rab-5B	RAB5B	2	-1,17	23,7
P25398	40S ribosomal protein S12	RPS12	6	-1,14	14,5
P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29	5	-1,06	29,0
Q66K74	Microtubule-associated protein 1S	MAP1S	13	-1,06	112,2
P00568	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1	1	-1,01	21,6
O43172	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	PRPF4	2	-1,01	58,4
P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	HNRNPH3	3	n. def.	36,9
Q99426	Tubulin-folding cofactor B	TBCB	4	n. def.	27,3
Q01201	Transcription factor RelB	RELB	1	n. def.	62,1

Q9BWF3	RNA-binding protein 4	RBM4	2	n. def.	40,3
Q9Y4H2	Insulin receptor substrate 2	IRS2	2	n. def.	137,3
P98171	Rho GTPase-activating protein 4	ARHGAP4	2	n. def.	105,0
Q9UGN4	CMRF35-like molecule 8	CD300A	2	n. def.	33,2
P19474	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21	TRIM21	2	n. def.	54,2

Die Analyse der Signalwege im Datensatz abgereicherter Proteine fällt dementsprechend auch umfangreicher aus (Tabelle 5), allerdings ist auch hier eine deutliche Akkumulation auf einzelnen Signalwegen zu erkennen. Auffällig dabei ist, dass diese Signalwege in weiten Teilen die Stress- oder Immunantwort der Zelle betreffen.

Tabelle 5: Signalwege im Datensatz abgereicherter Proteine nach anti-AMP IP

Reactome-Analyse abgereicherter Proteine (Log₂ FC <-0,5) in LC-MS/MS der anti-AMP IP aus THP-1 basierten Makrophagen nach 48-stündiger CbFic2 E66G Expression im Vergleich zu CbFic2 H205A Expression. Proteine, die ausschließlich in der CbFic2 H205A Probe mit mindestens 2 Peptiden identifiziert wurden, wurden ebenfalls berücksichtigt.

Signalweg	# Proteine im Signalweg	# Proteine aus Datensatz	P-value	FDR	Hit Gene
Signalgebung durch Interleukine	452	13	1,44E-05	0,007	RPLP0, IRS2, HSP90AA1, IL1B, BOLA2, SQSTM1, PTGS2, HSP90B1, PSMB1, CCL20, TAB2, P4HB, PTPN7
Cytokin Signalgebung im Immunsystem	849	17	6,47E-05	0,015	RPLP0, IRS2, TRIM21, HSP90AA1, IL1B, BOLA2, TLN1, SQSTM1, PTGS2, HSP90B1, RELB, PSMB1, RAE1, CCL20, TAB2, P4HB, PTPN7
RAB Geranylgeranylierung	65	5	9,92E-05	0,015	RAB2A, RAB5B, RAB21, RAB6B, RAB15
Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies	37	4	1,42E-04	0,016	GPX1, PRDX3, PRDX5, P4HB
Axonsteuerung	536	12	3,35E-04	0,031	RPLP0, IRS2, RPL38, RPS12, HSP90AA1, NUMB, PFN1, TLN1, ITGA9, ROCK1, PSMB1, ARPC3
Zelluläre Antwort auf Stress	553	12	4,43E-04	0,034	RPLP0, RPL38, RPS12, HSP90AA1, GPX1, PRDX3, PRDX5, PSMB1, RAE1, ST13, DNAJA2, P4HB
Post-Chaperonin Tubulin Faltung Signalweg	23	3	5,93E-04	0,039	TBCC, TBCB, TUBA8

4 Diskussion

Die im ersten Teil dieser Arbeit entwickelten monoklonalen anti-AMP-Antikörper, welche die posttranslationale Modifikation AMPylierung in nativen und denaturierten Applikationen protein- und sequenzunabhängig erkennen, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit genutzt, um die Auswirkungen der AMPylierungsaktivität des Coxielleneffektors CbFic2 zu studieren. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass CbFic2 durch Automodifikation und DNA-Bindung gegensätzlich reguliert wird, und in der Zelle über die AMPylierung von Histon H3 und HMG-I die Kinaseaktivität herab reguliert, und Mitose und Immunreaktion moduliert. Dies wird im Folgenden näher erörtert.

4.1 Nachweis der AMPylierung durch monoklonale Antikörper¹

Die hier vorgelegte Arbeit beschreibt die Erzeugung, Charakterisierung und Anwendung von drei neuen monoklonalen anti-AMP-Antikörpern, die AMPylierung unabhängig vom Proteinrückgrat spezifisch erkennen. Die Reproduzierbarkeitskrise von Antikörpern in den letzten Jahren (Baker, 2015) sowie die Einschränkungen der kommerziell erhältlichen anti-AMP-Antikörper (Hao et al., 2011) (Sigma-Aldrich ABS184 und 09-890) unterstreichen die Notwendigkeit einer gründlichen Bewertung der Leistung der neuen monoklonalen Antikörper in den angestrebten Anwendungen. In Bezug auf denaturierte Erkennung wurde daher die Sensitivität, Spezifität und Kreuzreaktivität der neuen Antikörper in WBs getestet. Im Hinblick auf native Erkennung wurde die Komplexbildung der Antikörper mit verschiedenen modifizierten Targets mittels Größenausschlusschromatographie untersucht und die native Bindung in IP-Experimenten bestätigt. Im WB zeigen die Antikörper Kreuzreaktivität gegenüber MARYlierung. Hydroxylamin-Behandlung der WB-Membranen hat sich hier als hilfreich bei der Abspaltung der MARYlierung an Aspartat- und Glutamat-Resten erwiesen, kann allerdings das MARYlierungssignal nicht immer vollständig entfernen, entweder aufgrund hoher Mengen des modifizierten Proteins in der Probe, oder weil sich Modifikationsstellen an anderen Resten, z. B. an Lysin und nicht an Aspartat oder Glutamat, befinden. Daher ist eine sorgfältige Auswertung der Ergebnisse mit orthogonalen Methoden wie Massenspektrometrie etc. entscheidend. In den IP-Experimenten hat sich gezeigt, dass hohe Mengen an konkurrierenden Nukleotiden die effiziente Anreicherung AMPylierter Targets behindern können.

Die in dieser Arbeit vorgestellten drei neuen monoklonalen anti-AMP-Antikörper wurden mit Hilfe eines AMPylierten synthetischen Peptids mit reduzierter Peptidrückgrat-Komplexität generiert. Ein häufiges Problem bei der Generierung von Antikörpern auf Basis synthetischer Peptide, das z. B. für die Generierung anderer anti-PTM-Antikörper berichtet wurde (Archuleta et al., 2011), ist das Phänomen positiver Peptid-ELISAs gegen modifizierte Haptene, die sich aber nicht in positiven

WB-Ergebnissen niederschlagen. Die hierbei übliche Vorgehensweise ist, per ELISA nur gegen das modifizierte Peptid-Hapten zu selektieren. Laut Archuleta et al. werden bei dieser Methode in 25-50 % der Fälle Antikörper selektiert, deren Leistung in anderen Anwendungen versagt (Archuleta et al., 2011). In dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren wurde daher durch Einbeziehung eines nativen AMPylierten Proteins in Form von Cdc42-Thr-AMP in den ELISA-Screeningprozess (Abbildung S 3) eine effektive Vorselektion der Kandidaten betrieben und somit die Generierung von monoklonalen Antikörpern ermöglicht, die eine hohe Korrelation zwischen positiven ELISA-Tests gegen modifiziertes Protein - zusätzlich zum Peptid-ELISA durchgeführt - und guter WB-Leistung aufwiesen. Die Einbeziehung von nativem, modifiziertem Protein in den ELISA-Screeningprozess ist daher auf Basis dieser Arbeit für alle anti-PTM-Antikörper empfehlenswert. Über AMPylierung in eukaryotischen Zellen ist - außerhalb der Modifikation von BiP im Kontext von ER-Stress - wenig bekannt. In Übereinstimmung mit jüngsten Veröffentlichungen (Kielkowski et al., 2020b; Sreelatha et al., 2018) deuten die Ergebnisse der Anwendung der hier beschriebenen monoklonalen Antikörper auf Zelllysaten immortalisierter Zelllinien und Krebszelllinien auf eine stärkere Prävalenz der AMPylierung hin, als bisher wahrgenommen. Die begrenzte Anzahl von Werkzeugen, insbesondere im mittleren bis hohen Durchsatzbereich, hat bislang den zuverlässigen Nachweis von AMPylierung in zellulären Systemen erschwert. Die hier beschriebenen monoklonalen Antikörper erweitern nun die verfügbare Toolbox, indem sie eine ressourceneffiziente Möglichkeit zur empfindlichen Detektion sowie zur gezielten Anreicherung AMPylierter Targets bieten, was für die Anwendbarkeit in einem Standardlabor von entscheidender Bedeutung ist. Diese Antikörper eröffnen daher neue Möglichkeiten in einem expandierenden Forschungsfeld. Im Licht der anfänglich bereits erwähnten Antikörper-Reproduzierbarkeitskrise, insbesondere in Bezug auf anti-PTM-Antikörper (Baker, 2015; Egelhofer et al., 2011), wurde auf eine gründliche Charakterisierung der AMPylierungsspezifität und -sensitivität der hier beschriebenen neuen monoklonalen Antikörper in den Anwendungen WB, ELISA und IP Wert gelegt. Die im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die neuen Antikörper erfolgreich zur Anreicherung von AMPylierten Proteinen und Peptiden für die Massenspektrometrie eingesetzt werden können, um z. B. die Einschränkung des geringen Vorkommens von AMPylierung in Proteomstudien zu überwinden. Da alle drei monoklonalen Antikörper sequenziert sind (8.1.3 Antikörper-Sequenzen der variablen Domäne) und somit eine rekombinante Antikörperproduktion möglich ist, bilden sie eine gute Basis für eine langfristige Reproduzierbarkeit in der AMPylierungsforschung. Mit ihrer hohen Sensitivität und breiten Zielerkennung überwinden sie die Einschränkungen der bisher veröffentlichten anti-AMP-Antikörper und schaffen Möglichkeiten für die Identifizierung neuer Zielmoleküle und die Untersuchung der zellulären AMPylierung.

4.2 Regulation der Aktivität von CbFic2 durch Automodifikation und DNA-Bindung

Bereits Adam Cichy hatte gezeigt, dass CbFic2 durch randomisierte dsDNA aktiviert wird (Cichy, 2016). In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass in der Tat bereits ein randomisiertes 18 bp dsDNA Fragment zur maximalen Aktivierung des Enzyms ausreicht (Abbildung 12). Die Anisotropieanalysen zeigen, dass CbFic2 randomisierte DNA-Sequenzen mit hoher (d. h. niedriger nanomolarer) Affinität bindet und eine leichte Präferenz für dsDNA aufweist (Abbildung 13). Dabei wird die Bindung nicht allein über die HTH-Domäne vermittelt, da auch CbFic2 mit deletierter HTH-Domäne noch signifikante DNA-Bindung aufweist. Im Vergleich der CbFic2-Konstrukte mit und ohne N-terminalem TS-Tag zeigt sich, dass der TS-Tag deutliche Bindungsartefakte erzeugt, was für einen Einfluss des N-Terminus auf die Bindung spricht. Diese Beobachtung deckt sich mit Sekundärstrukturanalysen (Abbildung S 19), welche ebenfalls eine DNA-Bindung durch den N-Terminus sowie in Teilen auch durch die Fic-Domäne vorhersagen. Längere DNA-Sequenzen von 40 bp und 60 bp induzieren - im Gegensatz zu einem funktional minimal notwendigen 20 bp Fragment - ein zweites, deutlich affineres Bindungsereignis (Abbildung 13). Bei keiner der Bindungsstudien mittels Anisotropie ist eine ausgeprägte Kooperativität zu beobachten, was die von Adam Cichy vermutete Dimerbildung an der DNA nicht bestätigt (Cichy, 2016). Allerdings spricht die deutliche Erhöhung der Schmelztemperatur von CbFic2 in Anwesenheit von DNA dafür (Abbildung 12), dass CbFic2 durch DNA-Bindung eine strukturelle Stabilisierung erfährt, möglicherweise durch eine für die HTH-Domäne typische Umwandlung ungeordneter Proteinbereiche in definierte Sekundärstruktur (Andrabi et al., 2014; Eiting et al., 2005; Myrset et al., 1993).

Untersuchungen zu DNA-Bindung und Automodifikation von CbFic2 zeigen, dass die Automodifikationsreaktion in Anwesenheit von DNA unterdrückt ist (Abbildung 14), und umgekehrt die Automodifikation die Affinität für DNA zu reduzieren scheint (Abbildung 13). Im Falle von CbFic2 WT ergeben sich darüber hinaus Hinweise, dass die in Abwesenheit von DNA entstehende Automodifikation ein Trigger zum Umschalten zwischen DeAMPylierungs- und AMPylierungsaktivität sein könnte: Vergleicht man die ELISA-Experimente zur Histon H3 DeAMPylierung durch CbFic2 WT (Abbildung 15C) mit den im Versuchsaufbau identischen Experimenten zur CbFic2 WT Automodifikation (Abbildung 14C), fällt auf, dass die DNA-freie Automodifikation von CbFic2 WT zeitlich parallel mit dem Abschluss der Demodifikationsreaktion gegenüber Histon H3 bei 120 min und der dann startenden (unspezifischen) AMPylierungsaktivität auftritt (Abbildung 15C), was allerdings aufgrund der unspezifischen Modifikation der Platte zum derzeitigen Stand mit größter Vorsicht zu interpretieren ist. Auch steht diese Vermutung in Diskrepanz zu dem Befund, dass CbFic2 E66G lediglich in Anwesenheit von DNA, d. h. mit reduzierter Automodifikation (Abbildung 14D), sein Zielprotein,

sei es Histon H3 oder ein anderes CbFic2 Protein, AMPylieren kann (Abbildung 12A+C, Abbildung 15A). Die DeAMPylierungsfähigkeit von CbFic2 WT scheint hingegen DNA-unabhängig zu funktionieren (Abbildung 15).

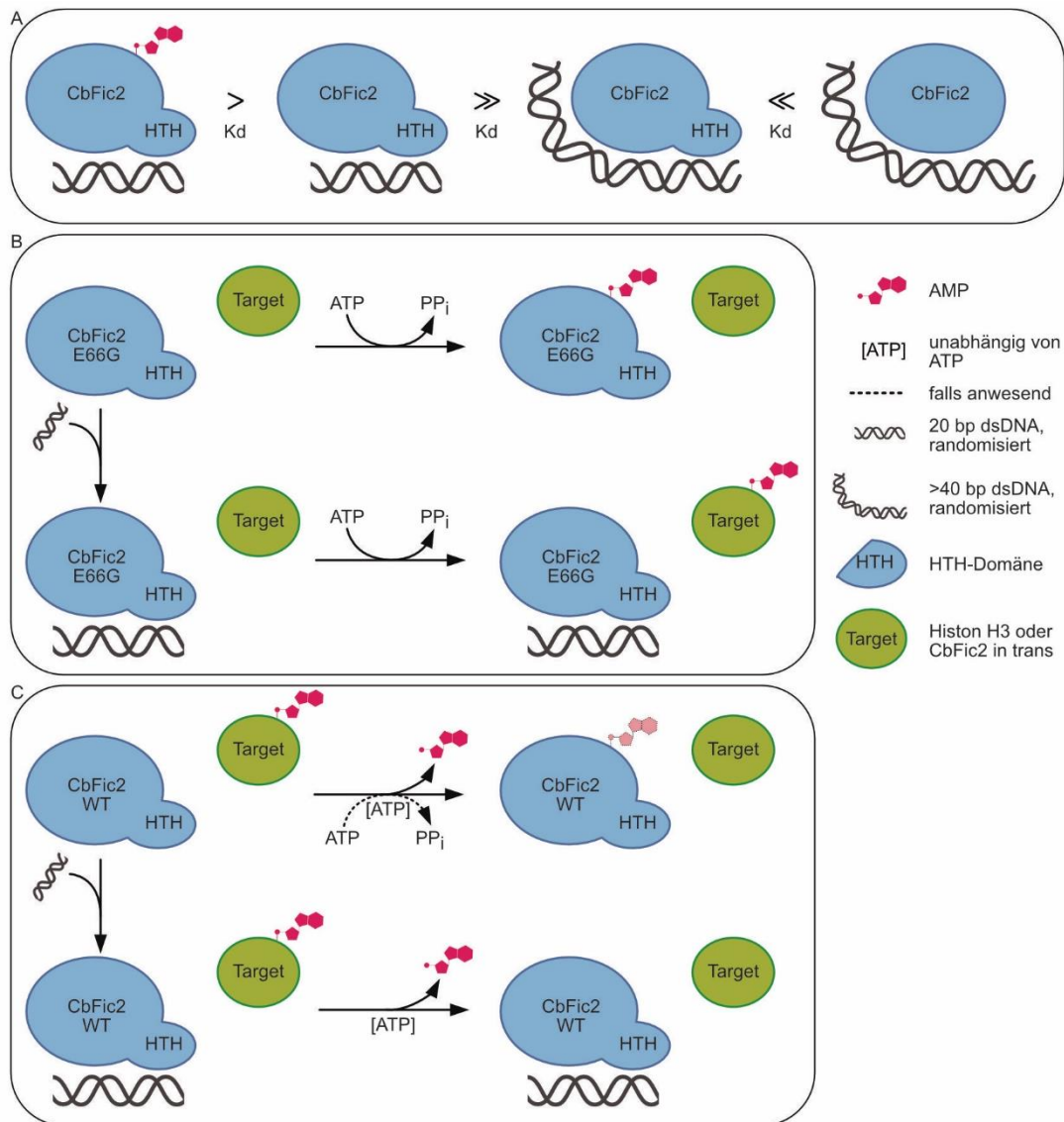


Abbildung 20: Regulation von CbFic2 durch DNA-Bindung und Automodifikation

(A) Fluoreszenzanisotropie-Experimente zwischen 5'-FITC-gelabelter DNA und CbFic2 zeigen, dass die Automodifikation von CbFic2 die Affinität für randomisierte 20 bp dsDNA reduziert. Im Vergleich zu randomisierter 20 bp dsDNA zeigt CbFic2 deutlich niedrigere K_d-Werte gegenüber 40 bp oder 60 bp dsDNA. Die Bindungsaffinität von CbFic2 zu 40 bp oder 60 bp dsDNA nimmt mit Deletion der HTH-Domäne deutlich ab. (B) CbFic2 E66G modifiziert sich in Abwesenheit von DNA und Anwesenheit von ATP selbst. Die Automodifikationsreaktion ist in Abwesenheit von randomisierter 20 bp dsDNA unterdrückt, dafür AMPyliert CbFic2 E66G sein Target (entweder Histon H3 oder andere CbFic2 Proteine). (C) CbFic2 WT deAMPyliert sein AMPyliertes Target (Histon H3 oder andere CbFic2 Proteine) unabhängig von An- oder Abwesenheit von ATP in Ab- und Anwesenheit von randomisierter 20 bp dsDNA. In Abwesenheit von DNA und Anwesenheit von ATP zeigt CbFic2 WT genauso wie CbFic2 E66G Automodifikation. Die abgebildeten Schemata sind vereinfachte Darstellungen, die keinerlei Aussagen über Monomer- oder Dimerbildung bzw. DNA-Bindungsmodus implizieren sollen.

Diese scheinbar widersprüchliche Datenlage ist zum jetzigen Zeitpunkt schwer zu interpretieren. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass CbFic2 WT und CbFic2 E66G grundsätzlich gegensätzlich reguliert werden, eine Theorie, die durch die Beobachtung gestützt wird, dass der TS-Tag am N-

Terminus bezüglich der Automodifikation des Enzyms gegensätzliche Effekte hat: CbFic2 WT verliert mit TS-Tag seine Automodifikationsfähigkeit, CbFic2 E66G steigert sie (Abbildung 14D). Zum anderen könnte es sein, dass - wie vielfach in der Literatur spekuliert – die Automodifikation von FIC-Enzymen ein *in vitro* Artefakt aufgrund eines Überschusses an ATP und fehlender zellulärer Umgebung darstellt (Roy and Cherfils, 2015). Für die letztgenannte Überlegung spricht, dass selbst für CbFic2 E66G nach Überexpression in Makrophagen keine Automodifikationsbande im WB nachweisbar ist (Abbildung 17B). Die Überexpression von GFP-CbFic2 E66G in HEK293 Zellen zeigt zwar eine Automodifikationsbande (Abbildung 8D, Abbildung 9), allerdings könnte diese Modifikation auch als Artefakt im GFP-Tag und nicht im Enzym selbst vorliegen.

Sollte die AutoAMPylierung von CbFic2 allerdings ein realer Effekt sein, dann könnte dies ein Regelmechanismus sein, um nach erfolgreicher Lokalisation an der DNA und Modifikation von Histon H3 die Bindung an die DNA durch langsame Automodifikation wieder zu lösen. Dieser Mechanismus wäre besonders dann denkbar, wenn eine DNA-Bindung eine Dimerisierung induzieren würde, wie von Adam Cichy postuliert (Cichy, 2016), und es CbFic2 ermöglichen würde, sein Gegenüber *in trans* zu modifizieren, statt rein intramolekular wie in Abwesenheit von DNA. Für die Induktion einer Dimerisierung bei DNA-Bindung spricht, dass CbFic2 E66G sein inaktives Gegenüber (H205A) in Anwesenheit von DNA nur modifizieren kann, wenn die HTH-Domäne vorhanden ist (Abbildung 15A).

Sicher ist, dass die DNA-Bindung eine allosterische Regulation von CbFic2 bewirkt, die es dem Enzym ermöglicht, sein Zielprotein zu AMPylieren. Dabei können mehrere Mechanismen eine Rolle spielen: Zum ersten könnte die DNA-Bindung eine Veränderung der aktiven Taschen dahingehend bewirken, dass CbFic2 sterisch überhaupt ATP binden kann, ähnlich wie es in nicht-DNA-bindenden FIC-Proteinen allein die Mutation des Glutamats der inhibitorischen Helix zu Glycin bewirkt (Goepfert et al., 2013). Dem würde aber entgegenstehen, dass CbFic2 WT analog zu CdFic (Dedic et al., 2016; Welner et al., 2014) trotz autoinhibitorischer Helix zur AutoAMPylierung fähig ist. Analog wäre es im Falle der CbFic2 E66G Mutante denkbar, dass ATP zwar bereits in die aktive Tasche passt, DNA-Bindung aber die Affinität zum Nukleotid signifikant erhöht. Zum zweiten könnte die DNA-Bindung eine konformationelle Veränderung des Enzyms bewirken, welche dann die Interaktion mit dem Zielprotein ermöglicht. In diversen Studien anderer DNA-bindender Enzyme konnte ein ähnlich komplexes Zusammenspiel aus DNA-Bindung und enzymatischer Aktivität beobachtet werden. So konnte für die *E. coli* Helikase PriA und ihre zwei DNA-Bindestellen und zwei Nukleotidbindestellen gezeigt werden, dass die Bindung der DNA die Affinität der Nukleotidbindung verändert und *vice versa* (Lucius et al., 2006). Bei der Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1), welche unter Verwendung von NAD⁺ ADP-Ribosyl auf ihre Zielproteine überträgt, führt die Bindung an DNA zur Entfaltung autoinhibitorischer Helices (Dawicki-McKenna et al., 2015), welche die aktive Tasche für NAD⁺ zugänglich macht (Langelier et al., 2018) und eine Stimulation der enzymatischen Aktivität um das 1000-fache bewirkt

(Langelier et al., 2010). Interessanterweise führt die NAD^+ -Bindung wiederum in einer reversen allosterischen Regulation zu einer erhöhten Affinität zu DNA (Langelier et al., 2018). Es erscheint daher vielversprechend, dieses Wechselspiel zwischen Nukleotid- und DNA-Bindung auch bei CbFic2 zu untersuchen.

In den Aktivitätsassays und DNA-Bindungsstudien von CbFic2 wurden randomisierte DNA-Sequenzen verwendet, wobei lediglich die Stranglänge und nicht der GC-Gehalt Einfluss auf Bindung und Aktivierung zu haben scheint (Abbildung 12B und C). Die hohe Affinität zu diesen zufälligen DNA-Sequenzen könnte ein Zeichen dafür sein, dass CbFic2 ein unspezifisch DNA-bindendes Protein und nicht auf eine spezifische Sequenz, beispielweise eine Promotorregion angewiesen ist. In diesem Fall könnte die DNA-Bindung lediglich dazu dienen, eine generelle Nähe zu Zielproteinen wie Histon H3 sicherzustellen, um die Verweilzeit am Zielprotein zu erhöhen. Allerdings spricht die enzymatische Aktivierung durch DNA dafür, dass eine gewisse Form von Signalerkennung bei CbFic2 vorhanden ist, die über eine generelle Lokalisation hinausgeht.

Die Bindung unspezifischer DNA bewirkt oft nur kleine oder lokale strukturelle Veränderungen, während spezifische Interaktionen häufig mit größeren Konformationsänderungen einhergehen, um einen stabilen Komplex auszubilden (Andrabi et al., 2014). Es ist dabei unklar, ob diese größeren Veränderungen Ursache oder Konsequenz der spezifischen Bindung sind. Die meisten DNA-bindenden Proteine sind in der Lage, auch außerhalb ihrer spezifischen Sequenz mit DNA zu interagieren - als Teil ihrer Strategie, einen kleinen Bereich auf einem deutlich größeren DNA-Molekül durch unspezifische Bindungsmechanismen wie Gleiten, Hüpfen oder intersegmentale Übertragung zu finden (Suter, 2020). Für die Endonukleasen BstYI und BamHI konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Protein im Komplex mit unspezifischer DNA dichter an der ungebundenen Form als am spezifischen Komplex liegt, und die Mutation einer einzigen Base im Erkennungsmotiv die DNA-Spaltung unterdrückt, die DNA-Bindung aber aufrecht erhält (Townson et al., 2007; Viadiu and Aggarwal, 2000). Des Weiteren weist der intensiv untersuchte Transkriptionsfaktor p53 eine deutliche Varianz im mittleren bis niedrigen nM Bereich hinsichtlich seiner Affinität gegenüber verschiedenen spezifischen DNA-Sequenzen auf (Weinberg et al., 2005), ohne dass dabei ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu seiner Affinität zu unspezifischen Sequenzen (Weinberg et al., 2004b) deutlich würde. Somit wäre es denkbar, dass auch CbFic2, trotz seiner hohen Affinität für unspezifische DNA, bestimmte DNA-Motive sequenzspezifisch erkennt. Interessanterweise trat bei der Anisotropiestudie von p53 gegenüber fluoreszenzmarkierter DNA (Weinberg et al., 2004b) ein vergleichbares 2-phasiges Verhalten wie bei CbFic2 WT gegenüber 40 bp und 60 bp dsDNA auf, mit einem ersten höher-affinen Bindungsereignis, gefolgt von einem zweiten mit reduzierter Affinität. Bei p53 wurde dies auf unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen mit DNA zurückgeführt, welche in der Tat durch Erhöhung der Salzkonzentration von 150 mM auf 225 mM NaCl gelöst werden konnten. Erst dann war auch eine Kooperativität der Bindung in den Anisotropiedaten sichtbar, und trat verstärkt für

spezifische DNA-Sequenzen auf (Weinberg et al., 2004b). Damit ist die fehlende Kooperativität von CbFic2 in den Anisotropiedaten noch kein Beweis für eine fehlende Dimerisierung, und das Phänomen der zwei Bindungsereignisse könnte in der Zukunft durch gesteigerte Salzkonzentrationen reduziert werden. Bei p53 wird die unspezifische DNA-Bindung durch den C-Terminus (18 aa) des Proteins vermittelt (Weinberg et al., 2004a) und durch PTMs wie Acetylierung und Phosphorylierung innerhalb des C-Terminus reguliert (Gu and Roeder, 1997; Hupp and Lane, 1994), sodass der Transkriptionsfaktor trotz fehlender Kern-DNA-Bindungsdomäne noch eine signifikante Affinität zu DNA aufweist (Weinberg et al., 2004a), welche ungefähr in der Größenordnung von CbFic2 ohne HTH-Domäne liegt. Trotz fehlender Homologie von p53 mit CbFic2 weist dieser Bindungs- und Regulationsmechanismus deutliche Ähnlichkeiten mit dem in dieser Arbeit aufgezeigten Verhalten von CbFic2 auf und könnte erklären, warum einerseits CbFic2 ohne HTH-Domäne noch DNA bindet und wie andererseits die Automodifikation die DNA-Bindung reguliert.

Wenn CbFic2 tatsächlich ein spezifisch DNA-bindendes Protein ist, sollte beachtet werden, dass trotz einer affinen Bindung unspezifischer DNA diese evtl. nicht ausreicht, um die zur maximalen enzymatischen Aktivität notwendige Strukturänderung zu induzieren. In diesem Kontext konnte z. B. für Glucocorticoid-Rezeptoren gezeigt werden, dass DNA als sequenzspezifischer allosterischer Ligand fungiert, welcher bei gleichbleibender Affinität die Konformation und damit Aktivierung seines Bindungspartner Base für Base verändern kann (Meijsing et al., 2009).

Generell besteht bei der Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen immer die Schwierigkeit physiologische Konsequenzen akkurat aus *in vitro* Daten abzuleiten, da die Chromatinumgebung und -zugänglichkeit in der Zelle durch Anwesenheit von Nukleosomen, PTMs und anderen Chromatin-interagierenden Faktoren stark verändert wird. Allosterische Effekte in der DNA können bewirken, dass die Bindung eines Proteins die Bindung eines weiteren beeinflusst, z. B. durch Deformation der doppelsträngigen Helix (S. Kim et al., 2013). Da zu vermuten steht, dass CbFic2 in der Nähe von Nukleosomen bindet um Histon H3 modifizieren zu können, spielt dieser Faktor wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle in der DNA-Erkennung, -Bindung und -Aktivierung von CbFic2.

4.3 Physiologische Konsequenzen der CbFic2 Aktivität

Trotz aller *in vitro* Erkenntnisse zur Aktivierung und Regulation von CbFic2 können die physiologischen Konsequenzen seiner Aktivität und Rolle in der Coxielleninfektion bislang nicht als völlig geklärt betrachtet werden.

Aus den Ergebnissen der *C. burnetii* Infektionsanalysen auf AMPylierungsmuster (Abbildung 8A und B) lässt sich zwar die Erkenntnis gewinnen, dass sich das AMPylierungsmuster mit Infektion durch NMI und NMII verändert, allerdings liegt im Gegensatz zu vorherigen Daten von A. Cichy

und N. Mohammadi keine klare Aktivierung der AMPylierung nach 24 hpi mit einer deutlichen – als Histon H3 interpretierten – AMPylierungsbande bei 15-20 kDa 1 hpi vor (Cichy, 2016). Im Gegenteil, besonders bei der Infektion mit NMI scheint das allgemeine AMPylierungssignal zeitlich übereinstimmend mit der erwarteten Effektorensekretion zwischen 8 hpi und 24 hpi tendenziell eher abzunehmen (Abbildung 8A). Damit drängt sich die Frage auf, ob statt einer AMPylierungsaktivität nicht eine DeAMPylierungsaktivität entscheidender ist, und ob diese Aktivität durch Effektoren aus Coxiellen vermittelt wird, oder ob die Zelle auf die Infektion mit endogener DeAMPylierung reagiert. Zum Beispiel könnte die AMPylierung im Bereich der 70 kDa Bande eine Reaktion der Zelle sein (Abbildung 8A), welche dann von Coxielleneffektoren im fortschreitenden Infektionsverlauf unterdrückt wird. Insgesamt zeigen die Proben nach NMII-Infektion (Abbildung 8B) sehr viel schwächere Signale als nach NMI-Infektion (Abbildung 8A). Damit könnte AMPylierung potenziell eine Rolle in der Virulenz von *C. burnetii* spielen. Allerdings ist hier zu beachten, dass die NMI- und NMII-Kultivierung und -Infektion in unterschiedlichen Laboren erfolgte, sodass auch Unterschiede in der Coxiellenkultivierung oder Probenaufbereitung eine Rolle spielen könnten.

Für den fehlenden Nachweis einer Histon H3 AMPylierung während der *C. burnetii* Infektion (Abbildung 8A und B) kommen verschiedene Szenarien als Erklärung in Betracht: eine Option wäre, dass eine Histon H3 AMPylierung nicht stattfindet, weil CbFic2 nicht sezerniert wird; eine andere, dass CbFic2 eine Demodifikationsaktivität ausübt, anstatt zu AMPylieren. Es könnte sich allerdings auch um ein Problem der Nachweisgrenze handeln, sollte Histon H3 nicht ubiquitär, sondern lediglich spezifisch in bestimmten Gen-Regionen modifiziert werden. Eine weitere Option wäre, dass eine AMPylierung von Histon H3 zwar auftritt, aber kurzlebig ist, und nicht im gewählten Zeitfenster der Infektionsproben liegt.

Laut S4TE 2.0, einem Suchalgorithmus zur Vorhersage von Typ IV Effektorproteinen (Noroy et al., 2019), können in *C. burnetii* RSA 493 drei FIC-Proteine, nämlich CBU_0372, CBU_2078 (CbFic1) und CBU_0822 (CbFic2), als sezerniertes Protein identifiziert werden (Abbildung S 20). Auch andere Daten sprechen dafür, dass diese FIC-Proteine eine Rolle in der Coxielleninfektion spielen: So zeigten semi-quantitative Proteom-Analysen von *C. burnetii* NMI und NMII, dass CbFic1 nach Kultur der virulenten NMI-Bakterien in L-929 Maus-Fibroblasten im Vergleich zu avirulenten NMII in erhöhten Mengen vorlag (Dresler et al., 2019). Auch in Genom-weiten Transkriptionsanalysen von *C. burnetii* in *in vivo* (Mäusemilz) und *in vitro* (Zellkultur) Modellen zeigte sich, dass die Expression von CbFic1 (CBU_2078) und CBU_0372 *in vivo* im Vergleich zur Zellkultur erhöht ist (Kuley et al., 2015). Bei Transkriptomanalysen zur Studie des Übergangs der *C. burnetii* großen Zellvariante zur kleinen Zellvariante zeigte sich zum Zeitpunkt 5 (späte LCV), 7 (Zwischenformen), 14 (frühe SCV) und 21 (späte SCV) Tage nach Infektion von epithelialen Vero-Zellen eine Herabregulation von CbFic1 (CBU_2078) an Tag 5, mit anschließendem Anstieg bis Tag 21, während CbFic2 (CBU_0822) an Tag 5 moderat hochreguliert mit einem steten Abfall

der Expression bis Tag 21 vorliegt; CBU_0372 ist über den gesamten Beobachtungszeitpunkt moderat hochreguliert (Sandoz et al., 2016). Dass die Sekretion von CbFic2 im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte, ist damit unerwartet.

Vergleicht man die Ergebnisse der AMPylierungsanalyse in Coxiellen-infizierten murinen Makrophagen (Abbildung 8A und B) mit jenen in transient transfizierten humanen HEK293 Zellen (Abbildung 8D, Abbildung 9A) sowie in stabil transduzierten humanen THP-1 Makrophagen (Abbildung 17B und C), ist auf den ersten Blick keine eindeutige Übereinstimmung ersichtlich. Im Vergleich der Auswirkungen zellulärer Expression von CbFic2 wird allerdings deutlich, dass innerhalb der Zelle lediglich die jeweiligen CbFic2 E66G Mutanten eine AMPylierung hervorrufen, während der WT sowohl in HEK293 Zellen (Abbildung 8D, Abbildung 9A) als auch in THP-1 Makrophagen (Abbildung 17C) inaktiv ist. Bei THP-1 Makrophagen zeigt sich außerdem im Vergleich zu HEK293 Zellen ein distinktes AMPylierungsmuster (Abbildung 17B und C), was für eine Zelllinien-spezifische Aktivität von CbFic2 spricht und erklären kann, warum in vorherigen SILAC (engl. *stable isotope labeling by amino acids*)-Experimenten keine Auswirkungen der CbFic2 Aktivität in HEK293 Zellen beobachtet werden konnten (Cichy, 2016).

Interessanterweise zeigte die in der Untersuchung der Anisomycinauswirkungen auf CbFic2 Aktivität als Kontrolle dienende DMSO-Behandlung (DMSO wurde in diesem Versuch als Lösungsmittel für Anisomycin benötigt) bei der CbFic2 E66G Zelllinie (Abbildung 17C) im Vergleich zu unbehandelten Proben (Abbildung 17B) eine reduzierte Bandenintensität der 80 kDa Doppelbande, und in allen anderen stabilen Zelllinien eine reduzierte 80 kDa Einzelbande. Kombiniert man diese Beobachtung mit der Erkenntnis, dass DMSO – ähnlich wie Thapsigargin – ER-Stress auslöst (Ha et al., 2019) und damit BiP-AMPylierung reduziert (Ham et al., 2014; Preissler et al., 2015), liegt der Verdacht nahe, dass es sich bei der AMPylierten 80 kDa Einzelbande um BiP-AMP handelt. Bei der durch CbFic2 E66G Expression induzierten AMPylierten 80 kDa Doppelbande könnte es sich demnach um BiP-AMP selbst oder um andere Proteine handeln, die mit Zell-Stress in Verbindung stehen. Damit drängt sich die Frage auf, ob alle identifizierten AMPylierungsbanden in differenzierten THP-1 Zellen nach CbFic2 E66G Expression tatsächlich auf direkte enzymatische Aktivität von CbFic2 zurückzuführen sind, oder aber zumindest in Teilen eine Antwort der Zelle auf die physiologischen Auswirkungen der Histon H3 AMPylierung durch CbFic2 darstellen. Um diese Frage zu beantworten, wären zwei Schlüsselexperimente spannend: Erstens eine zeitaufgelöste WB-Analyse der AMPylierung nach CbFic2 E66G Expression, um herauszufinden, ob eine zeitliche Reihenfolge modifizierter Banden im Sinne einer Zellantwort erkennbar ist - oder ob alle gleichzeitig auftreten, was dann für eine direkte AMPylierung durch CbFic2 E66G spräche. Zweitens könnte untersucht werden, ob die gleichen AMPylierungsbanden nach CbFic2 E66G Expression auch in Zellen auftreten, in denen FICD, das einzige FIC-Protein in Metazoen, ausgeschaltet wurde. Dieses Experiment ist in THP-1 Zellen schwierig umzusetzen, da die genetische Manipulation dieser Zellen ausgesprochen ineffizient ist, ließe sich aber in CHO-K1

Zellen realisieren (Preissler et al., 2015). Die in der Untersuchung der Anisomycin-Auswirkungen auf CbFic2 Aktivität entdeckte Kreuzreaktivität der Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H3 mit AMPyliertem Histon H3 (Abbildung 17C) wirft interessante Fragen bezüglich der Vermischung von Histon-Phosphorylierungs- und –AMPylierungseffekten in ChIP-Sequenzierungsexperimenten auf, sollten sich Hinweise bestätigen, dass Histon H3 AMPylierung auch ohne Infektion eine physiologische Rolle in der Zelle spielen könnte (Truttmann et al., 2016). In jedem Fall erschwert dieser Befund signifikant die eigentlich notwendige Analyse des Zusammenspiels aus Zell-induzierter Histon H3 Phosphorylierung und CbFic2-induzierter AMPylierung.

Bei der Interpretation der anti-AMP-IP-Daten aus CbFic2-exprimierenden Makrophagen (Tabelle 2, Tabelle 4) ist zu beachten, dass sich in der An- und Abreicherung der Proteine verschiedene Effekte vermischen. Einerseits zeigt der Nachweis von Histon H3.3 und Histon H2A, sowie des AMPylierten HMGA1-Peptids, dass eine Anreicherung mit dem anti-AMP-Antikörper 17G6 nach direkter AMPylierung erfolgreich war. Allerdings ist die Identifikation des jeweils modifizierten Peptids nicht immer möglich, sei es durch geringe Signalintensität oder, wie bei Histon H3, durch den vollständigen Abbau des AMPylierten Peptids im Lysin-reichen N-Terminus durch die Trypsin-Behandlung. Dadurch ist nicht eindeutig bestimmbar, welches der angereicherten Proteine auch tatsächlich modifiziert ist. Im Vergleich der Proteinlisten aus Tabelle 2 und Tabelle 4 fällt auf, dass deutlich mehr Proteine ab- als angereichert sind. Ob dies ein Resultat direkter transkriptioneller und/oder translationeller Regulation durch CbFic2 Aktivität ist oder eine eher indirekte zelluläre Reaktion auf CbFic2 Aktivität abbildet, ist nur in Kombination mit Transkriptomanalysen zu klären. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass bei der beobachteten An- oder Abreicherung von Proteinen auch ein verändertes Interaktionsmuster eine Rolle spielen kann; entweder direkt, indem AMPylierung eine neue Interaktion schafft oder eine vorherige durch sterische Hinderung auflöst, oder indirekt über den Wegfall einer anderen PTM an Stelle der AMPylierung. Beispielsweise könnte hier der Wegfall der normalerweise an Ser10 und Ser28 auftretenden Phosphorylierung des Histons H3 eine Rolle spielen. Dies ist besonders im Kontext der Befunde zur Herabregulierung zellulärer Kinaseaktivität und – damit einhergehend - herabregulierter Phosphorylierung im *Kinase activity profiling* (Tabelle 1) von Bedeutung. Insgesamt ist in der anti-AMP IP nach CbFic2 Expression eine Veränderung von Signalwegen und Proteinen zu beobachten, welche sich mit den Ergebnissen des *Kinase activity profiling* ergänzen.

4.4 Die Rolle von CbFic2 in Mitose und mRNA Splicing

Die Analyse angereicherter Proteine in der anti-AMP IP nach CbFic2 E66G Expression in THP-1 Makrophagen auf repräsentierte Signalwege zeigt eine Akkumulation von Proteinen, die in den Bereichen Mitose, mRNA Splicing und 3'-Ende Prozessierung der mRNA eine Rolle spielen (Tabelle 3).

durch CbFic2 modulierte Signalwege			
Mitose Histon H3 -AMP † Top2A -P † Aurora A -P † NPM1 † ACTR1A † NUMA1 †	mRNA Splicing TRA2B † DDX42 † SRSF6 †	Proteintransport Stathmin -P † ACTR1A † SEC31A † Tubulin † Rab GTPasen †	Immunantwort Histon H3 -AMP † HMG-I -AMP † c-Rel -P † PKA -P † Aurora A -P † Macro H2A.1 † PTGS2/COX-2 † IL-1β †

Abbildung 21: Modulierte Signalwege durch CbFic2 in menschlichen Zellen

Zusammengefasst sind Resultate aus WB-Analysen der zellulären AMPylierungsmuster, aus *Kinase activity profiling* Experimenten und aus anti-AMP-IP. (-P) entspricht Phosphorylierung, (-AMP) AMPylierung. Aufgeführt sind alle veränderten Proteine, deren Funktion im jeweiligen Signalweg in der Diskussion ausführlicher dargelegt werden.

Die Anreicherung von Mitose-regulierenden Proteinen ist im Kontext der H3-AMPylierung an Ser10 und Ser28 durch CbFic2 nicht gänzlich unerwartet. Globale Phosphorylierung an Histon H3 Ser10 und Ser28 durch die Aurora-B Kinase (Hsu et al., 2000) tritt mit Beginn der Mitose auf (Hendzel et al., 1997) und geht einher mit der Kondensation der Chromosomen (Giet and Glover, 2001). Die DNA Topoisomerase 2-alpha (Top2A), deren nicht-katalytische Phosphorylierungsstellen pS1469, pT1470, pS1471, pS1474 innerhalb der C-terminalen Domäne (Escargueil et al., 2000) im *Kinase activity profiling* nach CbFic2 E66G Expression als herabreguliert identifiziert wurden (Tabelle 1), spielt in diesem Kontext ebenfalls eine wichtige Rolle (Lee and Berger, 2019). Diese C-terminale Domäne kann nämlich den N-terminalen Arm von Histon H3 binden (Lane et al., 2013) und - in Abhängigkeit von SUMOylierung durch die Nucleoporin E3 SUMO-Protein Ligase RanBP2 - Aurora B rekrutieren (Edgerton et al., 2016; Yoshida et al., 2016). RanBP2 liegt in der anti-AMP-IP nach CbFic2 E66G Expression leicht angereichert vor. Die *Kinase activity profiling* Daten zeigen darüber hinaus, dass die Expression von CbFic2 E66G die aktivierende Phosphorylierung der Aurora Kinase A an Thr287 und Thr288 signifikant reduziert (Tabelle 1). Aurora A reguliert die Reifung der Zentrosomen und die Assemblierung des Spindelapparats und spielt damit - ebenso wie Aurora B - eine essentielle Rolle in der Mitose (Willems et al., 2018). Nucleophosmin (NPM1), welches in der anti-AMP-IP stark angereichert vorliegt (Tabelle 2), bindet Aurora A in Abhängigkeit ihrer Thr288 Phosphorylierung und stimuliert eine weitere, ebenfalls aktivierende Phosphorylierung an Ser89 (Reboutier et al., 2012).

Zwar konnte Adam Cichy in transient mit GFP-CbFic2 transfizierten HEK293-Zellen keinen direkt toxischen oder proliferationshemmenden Effekt beobachten (Cichy, 2016), allerdings würden in diesem Expressions-Modell - mit den gewählten Readout-Parametern Zellvitalität und Zelldichte - aller Wahrscheinlichkeit nach nur sehr drastische Effekte sichtbar werden, jedoch keine feinen Unterschiede in der Modulation der Mitose. Auch für die anhaltende Infektion von mit *C. burnetii* infizierten Zellen konnten keine cytopathischen Effekte beobachtet werden (Baca et al., 1985), ein

Mechanismus, der es - gekoppelt mit aktiver Unterdrückung der Apoptose (Voth et al., 2007) - dem Bakterium erlaubt, die Infektion über lange Zeiträume aufrecht zu erhalten. Allerdings hat die Phosphorylierung von Histon H3 an Ser10 und Ser28 auch außerhalb der Mitose eine entscheidende Bedeutung in der Aktivierung der *immediate early genes* (Sawicka and Seiser, 2012) und wird im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

Neben den Mitose-inhibierenden Effekten, wenn die Histon H3 Phosphorylierung durch CbFic2-induzierte AMPylierung verhindert würde, finden sich in der anti-AMP IP weitere mitotische Regulatoren wie AHCTF1, NUMA1, ACTR1A, LMNA und RFC1 stark angereichert, welche vor allem das Mikrotubulinetzwerk und damit auch den Spindelapparat betreffen:

α -Contractin (ACTR1A) ist eine Untereinheit des Dynactin-Komplexes, welcher im Zusammenspiel mit dem molekularen Motor Dynein den Vesikeltransport entlang Mikrotubuli zum Minus-Ende steuert. Während der Mitose wird Dynein als Teil der mitotischen Spindel durch das *Nuclear mitotic apparatus protein 1* (NUMA1) am Nukleus verankert (Radulescu and Cleveland, 2010; Reck-Peterson et al., 2018). Außerhalb der Mitose spielen Mikrotubuli eine entscheidende Rolle im vesikulären Transport (Nogales, 2000), in dessen Kontext vielleicht auch die erstaunliche Anzahl von nach anti-AMP-IP abgereicherten Rab Proteinen zu sehen ist (Tabelle 4, Tabelle 5) (Kjos et al., 2018). Das Transportprotein Sec31A, welches allein in der CbFic2 E66G Probe nach anti-AMP-IP identifiziert werden kann, ist Bestandteil des *Coat Protein Complex II* (COPII), welcher den vesikulären Transport vom ER steuert (Barlowe et al., 1994). Stathmin (Stmn2), welches im *Kinase activity profiling* mit reduzierter Phosphorylierung an Ser97 identifiziert wurde (Tabelle 1), verhindert durch Bindung freien Tubulins dessen Polymerisierung zu Mikrotubuli und induziert so deren Abbau; die Phosphorylierung von Stathmin wird mit seiner Inaktivierung in Verbindung gebracht (Cassimeris, 2002). Dazu passend kann eine Abreicherung einzelner Tubulin-Untereinheiten nach anti-AMP-IP beobachtet werden (Tabelle 4, Tabelle 5). Die resultierende Destabilisierung der Mikrotubuli ist ein beliebtes Motiv der Infektionsstrategie intrazellulärer Pathogene (Radhakrishnan and Splitter, 2012).

Die Akkumulation von nach anti-AMP-IP angereicherten Proteinen, die im Kontext von mRNA Splicing und 3'-Ende Prozessierung von mRNA stehen, ist auffällig (Tabelle 3). Splicing ist der hochkomplexe Prozess, bei dem in eukaryotischen Zellen die Introns vom sogenannten Spliceosom aus der transkribierten Vorläufer mRNA (prä-mRNA) geschnitten werden, um die Exons in der reifen, Protein-codierenden mRNA für die Translation zusammenzuführen (Shi, 2017). Die Prozessierung des 3'-Endes der mRNA erfolgt zeitgleich und involviert die Spaltung der prä-mRNA an der Polyadenylierungsstelle und die anschließende Addition des Polyadenosin (Poly(A))-Schwanzes, um die mRNA Stabilität zu erhöhen (Kumar et al., 2019). Pathogene machen sich diese Maschinerie zu Nutze, um über die Generierung von alternativen Splicevarianten die Immunreaktion der Zelle zu verändern (Chauhan et al., 2019). Auch für Coxiellen konnte gezeigt werden, dass nach Infektion ein sehr spezifisches Splicemuster induziert wird (Millar et al., 2015).

4.5 Modulation des NF- κ B Signalwegs durch CbFic2

Die Analyse abgereicherter Proteine in der anti-AMP IP nach CbFic2 E66G Expression in THP-1 Makrophagen auf repräsentierte Signalwege zeigt vor allem eine Akkumulation im Bereich der Interleukin- und Cytokin-vermittelten Immun- und Stressreaktion der Zelle (Tabelle 5).

Die in der hier vorgelegten Arbeit ermittelte Datenlage weist dabei darauf hin, dass CbFic2 entscheidend in die NF- κ B-vermittelte Immunregulation von Makrophagen eingreifen könnte. So ist die Phosphorylierung der NF- κ B-Untereinheit c-Rel an Position Ser267 im *Kinase activity profiling* nach CbFic2 E66G Überexpression herabreguliert (Tabelle 1). c-Rel hat wichtige Funktionen in der zellulären Differenzierung und Immunantwort von Makrophagen (Gilmore and Gerondakis, 2011), wobei Ser267 *in vitro* durch Protein Kinase A (PKA) phosphoryliert wird, in dessen Folge transkriptionelle Aktivität (Yu et al., 2004) und nukleare Lokalisation des Transkriptionsfaktors (Mosialos et al., 1991) stimuliert werden. Die Modifikationsstelle pSer267 in c-Rel ist konserviert mit pSer276 in der NF- κ B-Untereinheit p65 (RelA) (Mosialos and Gilmore, 1993), und zu den diesbezüglichen Regulationsmechanismen existiert eine ausführliche Datenlage: Demnach liegt im Zytosol ein NF- κ B-I κ B-PKA-Komplex vor, in welchem die phosphorylierte, katalytische Untereinheit von PKA in einem inaktiven Zustand gehalten wird (Zhong et al., 1997). LPS-Stimulation bewirkt den proteasomalen Abbau von I κ B (Thompson et al., 1995) und in der Folge eine cAMP-unabhängige Aktivierung von PKA. Diese phosphoryliert anschließend p65 an Ser276 und stimuliert so die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B (Zhong et al., 1997). Interessanterweise sind laut *Kinase activity profiling* nach CbFic2 E66G Expression auch die aktivierenden, autokatalysierten Phosphorylierungen der regulatorischen PKA-Untereinheiten des Typs II, KAP2 (Ser99) und KAP3 (Ser114) sowie die der katalytischen Untereinheit KAPCG im Aktivierungs-Loop an Position Thr197 (Adams et al., 1995; Steinberg et al., 1993) signifikant reduziert (Tabelle 1). Die Modulation der PKA-Aktivierung ist ein bekannter Mechanismus in der *C. burnetii* Infektion (MacDonald et al., 2012).

Wie vorher bereits erwähnt, zeigen die *Kinase activity profiling* Daten auch, dass die Expression von CbFic2 E66G die aktivierende Phosphorylierung der Aurora Kinase A an Thr287 und Thr288 signifikant reduziert (Tabelle 1). Dabei führt allem Anschein nach die Unterdrückung von Aurora A zu einer gestörten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (Briassouli et al., 2007; Sun et al., 2007). LPS-Stimulation von Makrophagen via TLR4 induziert eine erhöhte Expression von phosphorylierter und damit aktivierter Aurora-A Kinase und führt damit zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs und nachgeschalteter proinflammatorischer Gene wie IL6, IL1B, IL12B, TNF, CCL14, NOS2, CCR7, und COX2. Knockdown von Aurora-A mittels siRNA führt zu einer signifikanten Abnahme an phosphoryliertem NF- κ B p65 sowie phosphorylierter IKK α/β und I κ B α (Ding et al., 2015).

Im Kontext des NF- κ B-Signalwegs wird auch das Protein HMG-I erwähnt (Zhang and Verdine, 1999), welches das einzige in der anti-AMP Immunpräzipitation nach 48-stündiger CbFic2 E66G Überexpression in Makrophagen als AMPyliert identifizierte Protein ist (Abbildung 18). HMG-I steht in starkem Zusammenhang mit der Aktivierung von Makrophagen (Xue et al., 2014). Es ist als Mitglied der *high mobility group A* (HMGA) Proteinfamilie im Nukleus lokalisiert (Lund et al., 1983) und verändert die Struktur des Chromatins, indem es mit seinen AT-hook DNA-Bindungsmotiven (Huth et al., 1997) an die kleine Furche A/T-reicher DNA-Sequenzen bindet (Solomon et al., 1986). HMG-I kann so die Bildung von sogenannten Enhanceosomen initiieren (Panne et al., 2007; Thanos et al., 1993) und in der Folge im Kontext weitläufiger zellulärer Prozesse (Sumter et al., 2016) Chromatin in eine offene - und damit transkriptionell aktive - Struktur überführen (Benecke and Eilebrecht, 2015). LPS-Stimulation induziert HMG-I, welches wiederum die Expression von Prostaglandin G/H Synthase 2 (PTGS2), auch Cyclooxygenase-2 (COX2) genannt, hochreguliert (Cai et al., 2020). Nach 48-stündiger CbFic2 E66G Expression in THP-1 basierten Makrophagen liegt PTGS2 in der anti-AMP IP signifikant abgereichert vor (Tabelle 4). Bei der Identifizierung des AMPylierten HMG-I-Peptids sind alle im Abschnitt des betroffenen Peptids infrage kommenden AMPylierungsstellen auch bekannte Phosphorylierungsstellen (pSer35, pThr38, pSer43, pSer48, pThr52) (Dephoure et al., 2008). Für Ser35 und Thr52 wurde berichtet, dass Phosphorylierung durch die Homeodomain-interacting Protein Kinase-2 (HIPK2) oder Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1, manchmal auch als cdc2 bezeichnet) zu einer reduzierten DNA-Bindungsaffinität und, damit einhergehend, zu einer transkriptionellen Aktivierung führt (Nissen et al., 1991; Reeves et al., 1991; Zhang and Wang, 2007). Es bleibt zu klären, ob AMPylierung in diesem Proteinabschnitt zu einem ähnlichen Effekt führt.

Interessanterweise steht HMG-I auch im direkten Kontext der Histon H3 Phosphorylierung: Für die dreifach negative Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 konnte gezeigt werden, dass die Herabregulation von HMG-I eine reduzierte Histon H3 Ser10 und Ser28 Phosphorylierung durch die Ribosomale Protein S6 Kinase alpha-3 (RSK2) auf dem Ras-Raf-MEK1/2-Erk1/2-Signalweg zur Folge hat (Penzo et al., 2019). Damit könnte eine AMPylierung von HMG-I eine Reduktion der Histonphosphorylierung bewirken, welche anschließend mit AMPylierung durch CbFic2 ersetzt werden könnte. AMPylierung von HMG-I würde bei einem Molekulargewicht des Proteins von 11 kDa in WB-Analysen möglicherweise mit dem Signal der Histon H3 AMPylierung überlagern und so unentdeckt bleiben.

Das in der anti-AMP IP nach CbFic2 E66G Überexpression angereicherte nicht-kanonische Histon H3.3 (Tabelle 2) kann neben den Phosphorylierungsstellen Ser10 und Ser28 der kanonischen Variante zusätzlich auch am ausgetauschten Ser31 durch IKK α (Armache et al., 2020) phosphoryliert werden (Hake et al., 2005). Diese Modifikation wird direkt mit der Trimethylierung an Lys36 durch die Histon-Lysin-N-Methyltransferase SETD2 (Edmunds et al., 2008) in Verbindung gebracht und tritt im Kontext LPS-induzierter Transkriptionsaktivierung in

Makrophagen auf (Armache et al., 2020). Das in der anti-AMP IP ebenfalls angereicherte Histon Macro-H2A.1 (Tabelle 2) (Chakravarthy et al., 2005) unterdrückt die Transkription (Doyen et al., 2006) durch Inhibition der NF- κ B Bindung (Angelov et al., 2003). Allerdings sind die bekannten transkriptionsreprimierenden Phosphorylierungsstellen aus Histon H2A, Ser1 (Zhang et al., 2004) und Thr120 (K. Kim et al., 2013), welche potenziell für die AMPylierung rekombinanten Histons H2A durch CbFic2 E66G in Frage kämen, in Macro-H2A.1 nicht konserviert. Eine direkte Modifikation von Macro-H2A.1 durch CbFic2 E66G auf Basis der *in vitro* nachgewiesenen Modifikationsstellen von Histon H2A ist daher eher unwahrscheinlich.

Die hier dargestellten Daten der anti-AMP IP geben demnach starke Hinweise darauf, dass CbFic2 die Immunantwort in Makrophagen herabreguliert. In Kombination mit den Ergebnissen des *Kinase activity profiling* spricht vieles dafür, dass diese Effekte über den NF- κ B Signalweg vermittelt werden.

4.6 Immunmodulation im Kontext der *C. burnetii* Infektion

Im Vergleich der Wirtsreaktion gegenüber Coxiellen mit und ohne funktionalem T4SS konnten einige Erkenntnisse zur effektorenbedingten Modulation des Immunsystems von Makrophagen während der *C. burnetii* Infektion gesammelt werden, ohne dass dabei ein verantwortlicher Effektor identifiziert werden konnte (Clemente et al., 2018; Sobotta et al., 2016). Entscheidende Teile dieser Beobachtungen lassen sich mit von CbFic2 induzierten Effekten in THP-1 basierten Makrophagen zur Deckung bringen. So konnte in aus Monozyten gewonnenen Makrophagen gezeigt werden, dass in den ersten drei Stunden nach Infektion mit *C. burnetii* Cytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-12, und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) stark hochreguliert, aber mit Start der intrazellulären Bakterienreplikation wieder unterdrückt werden; dabei ist besonders die Translation und Sekretion von IL-1 β inhibiert (Sobotta et al., 2016). Nach 48-stündiger CbFic2 E66G Expression in THP-1 basierten Makrophagen liegt IL-1 β in der anti-AMP IP signifikant abgereichert vor (Tabelle 4). In einer weiteren Studie wurden Makrophagen entweder mit *C. burnetii* WT oder einer der beiden T4BSS Mutanten Δ icm bzw. dotA (die beide unfähig sind, Effektoren zu sezernieren) infiziert. Dabei wurde ein drastischer Unterschied in der Immunantwort auf *C. burnetii* WT (mit Effektorensekretion) im Vergleich zu den Mutanten (ohne Effektorensekretion) beobachtet, welcher vor allem diejenigen Signalwege betrifft, die durch die proinflammatorischen Cytokine IL-1 α und IL-1 β , Chemokinaktivität und Phosphorylierung von NF- κ B induziert werden (Clemente et al., 2018). An anderer Stelle konnte bei Infektionen mit (avirulentem) *C. burnetii* NMII gezeigt werden, dass in Abhängigkeit der Effektorensekretion die Phosphorylierung der NF- κ B Untereinheit RelA deutlich reduziert ist (Mahapatra et al., 2016), und ihre nukleäre Lokalisation durch den Effektor NopA gestört wird (Burette et al., 2020). Dabei scheint jedoch die NF- κ B vermittelte Modulation des Immunsystems durch Coxiellen ein schmaler Grat zu sein: Die

vollständige Inhibition des NF- κ B Signalwegs führt zu einem stark eingeschränkten Infektionsverlauf (Mahapatra et al., 2016).

Bereits zum Zeitpunkt 24 h nach Infektion mit *C. burnetii* dotA (frühere Zeitpunkte wurden nicht gemessen) ist die zelluläre Expression von IL-1 α , IL-1 β , und TNF α im Vergleich zum sekretionskompetenten WT stark hochreguliert, ein Effekt der nach 48 h deutlich schwächer auftritt (Clemente et al., 2018). Damit scheint besonders im frühen Verlauf der Coxielleninfektion die Sekretion von Effektoren die Immunantwort der Makrophagen aktiv zu unterdrücken. Bedenkt man, dass die Effektorenssekretion von *C. burnetii* etwa 8 h nach Infektion, in Makrophagen bereits sehr schwach 4 h nach Infektion, beobachtet werden kann (Newton et al., 2013), könnte CbFic2 bereits deutlich früher als bisher angenommen sezerniert werden, um Einfluss auf die Immunantwort zu nehmen. Dies erklärt möglicherweise, warum die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sekretionsexperimente zu den Zeitpunkten 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi und 96 hpi kein positives Ergebnis gezeigt haben.

Die Modulation des NF- κ B Signalwegs als Infektionsstrategie ist auch aus anderen intrazellulären Pathogenen bekannt (Ge et al., 2009; Le Negrate, 2012; Pallett et al., 2014; Rahman and McFadden, 2011; Sun et al., 2016). So verändert die AMPylierung von Rho GTPasen durch das FIC-Enzym VopS aus *V. parahaemolyticus* die NF- κ B Signalgebung (Woolery et al., 2014). Für den *Shigella flexneri* Effektor OspF konnte gezeigt werden, dass er Mitogen-aktivierte Kinasen (MAPKs) dephosphoryliert, sodass die Histon H3 Phosphorylierung an Ser10 Gen-abhängig unterbunden wird und in der Folge NF- κ B nicht binden kann (Arbibe et al., 2007). *Streptococcus pneumoniae* induziert Histon H3 Dephosphorylierung an Ser10 durch Dephosphorylierung und Aktivierung der Protein Phosphatase 1 (PP1) mittels der Effektoren PLY und SpxB (Dong et al., 2020). Ähnliches konnte für *Listeria monocytogenes* und andere Pathogene gezeigt werden (Hamon et al., 2007), allerdings bleibt der genaue Mechanismus ungeklärt. Auch *Leishmania amazonensis* modifiziert die Expression NF- κ B abhängiger Gene in Makrophagen durch die Veränderung von Histon H3 Modifikationen an den Promotoren proinflammatorischer Gene (Lecoeur et al., 2020). Das Zusammenspiel von Histon H3 Modifikationen und NF- κ B scheint dabei ein etabliertes System darzustellen (Dong and Hamon, 2020).

5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CbFic2 in einem komplexen und reziproken Zusammenspiel aus Automodifikation, DNA-Bindung und Targetmodifikation steht. Für FIC-Proteine untypisch zeigt CbFic2 Automodifikation unabhängig vom inhibitorischen Motiv auch im WT, ohne dabei sein Zielprotein AMPylieren zu können. Erst die DNA-Bindung in Kombination mit der E66G-Mutation im inhibitorischen Motiv führt zu einer Modifikationsaktivität gegenüber seinem Zielprotein. Interessanterweise reduziert die DNA-Bindung die Automodifikation gleichermaßen im WT wie der E66G-Mutante, während die Automodifikation wiederum die Affinität zu DNA reduziert. Die DNA-Bindung wird dabei sowohl von der HTH-Domäne als auch vom N-Terminus vermittelt, wobei die Deletion des N-Terminus CbFic2 *in cellulo* deaktiviert und *in vitro* zu einem unlöslichen Protein führt.

Dementsprechend ist es wichtig, den Einfluss des N-Terminus auf DNA-Bindung und enzymatische Aktivität durch gezielte Mutationen in potentiellen Dimerisierungsoberflächen zu studieren. Der Identifizierung der Automodifikationsstellen mittels LC-MS/MS sollte ebenfalls Aufmerksamkeit geschenkt werden, damit in Mutationsanalysen die Auswirkungen auf Struktur und enzymatische Aktivität untersucht werden können.

Die physiologische Konsequenz der CbFic2 AMPylierung von Histon H3 und wahrscheinlich auch HMG-I zeigt sich in einer globalen Herabregulation der Kinaseaktivität sowie der NF- κ B vermittelten Modulation der Immunreaktion. Diese Ergebnisse benötigen extensive Validierung: Die AMPylierung von HMG-I muss sowohl *in vitro* als auch durch IP *in cellulo* bestätigt, die Position der Modifikation bestimmt und die Auswirkung auf DNA-Bindung durch HMG-I untersucht werden.

Des Weiteren sollte der zeitliche Verlauf der AMPylierung besonders in den ersten Stunden der CbFic2-Expression in THP-1 Makrophagen beobachtet werden, um eine mögliche Reihenfolge in der Targetmodifikation zu bestimmen. In diesem Kontext wäre es auch interessant, die Langlebigkeit der eingeführten AMPylierung in Makrophagen zu untersuchen, indem die CbFic2-Expression unterbrochen wird. Um zu prüfen, ob CbFic2 tatsächlich die LPS-induzierte Immunreaktion modulieren kann, sollten die stabilen THP-1 Makrophagen mit LPS stimuliert, und im Anschluss die CbFic2-Expression induziert werden, um IL-Produktion und Sekretion in qPCR und ELISA Experimenten, die AMPylierungsmuster in WB, und die An- und Abreicherung beteiligter Proteine in einer erneuten IP zu untersuchen. Zusätzlich dazu ist ein spezifischer Nachweis der in der Diskussion identifizierten Spieler und ihrer PTMs, mit besonderem Fokus auf NF- κ B Schlüsseleinheiten, anzuraten. Hier wäre es auch spannend, das Zusammenspiel der Histon H3 AMPylierung mit benachbarten Modifikationen wie Acetylierung an Lys14 oder Trimethylierung an Lys36 zu analysieren.

Die wohl entscheidendsten Experimente sind jedoch die Identifizierung einer möglichen spezifischen DNA-Bindungssequenz für CbFic2 durch ChIP-Sequenzierung sowie eine Transkriptomanalyse nach CbFic2 E66G Expression in THP-1 Makrophagen. Dies dürfte klären, ob CbFic2 tatsächlich an z. B. NF- κ B Promotorregionen bindet, und der in der anti-AMP IP beobachtete Trend zur Immunmodulation Bestand hat.

6 Material und Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Gene für die Expression in *E. coli* Codon-optimiert, indem seltene Codons weggelassen wurden. Die Klonierung der Plasmide erfolgte durch sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung (SLIC) (Jeong et al. 2012). Alle Punktmutanten, die nicht in der hauseigenen Bibliothek vorhanden waren, wurden durch Q5-Mutagenese mutiert.

PCRs wurden mit dem Thermocycler T100 (BioRad, Hercules, USA) durchgeführt. DNA wurde mit dem Monarch® DNA-Gel-Extraktionskit (New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA) nach Herstellerangaben aus dem Gel beziehungsweise mit dem Wizard® SV Gel- und PCR-Clean-Up-System (Promega, Fitchburg, USA) nach Herstellerangaben aus der Lösung gereinigt.

6.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mit 10x Probenpuffer (50 % Glycerin, 10 mM EDTA, 0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol FF) gemischt und durch 1 %ige (w/v) Agarose-Gelelektrophorese in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris pH 7,6, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) analysiert, welche mit G-stain (SERVA-Elektrophorese, Heidelberg, Deutschland) angefärbt wurde. Die DNA-Banden wurden auf dem UV-Transilluminator Biometra TI3 (Biometra, Göttingen, Deutschland) sichtbar gemacht und ihre Größe wurde anhand der 2-log-DNA-Leiter 0,1-10,0 kb (NEB) geschätzt.

6.1.2 T4-SLIC Klonierung

Für die T4-SLIC-Klonierung wurde das zu klonierende Gen durch PCR amplifiziert und der Zielvektor mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Alle DNA-Produkte wurden aus dem Gel gereinigt, und das PCR-amplifizierte Gen durch die Exonukleaseaktivität der T4-Polymerase in den linearisierten Vektor eingefügt, mit anschließendem Annealing und spontaner Ligation.

Insert-Generierung durch PCR

Die zu klonierenden Gene wurden aus Template-Plasmiden der hauseigenen Plasmidbibliothek unter Verwendung von ca. 34 bp Primern mit je 17 bp Überhang (Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, USA) amplifiziert. In 50 µl Gesamtvolumen wurden 5x Q5 Reaktionspuffer (NEB), 5 % DMSO, 50 ng Template, 2 mM jedes Primers, 2 mM dNTPs (Jena Bioscience, Jena, Deutschland) und 0,5 µl Q5 High-Fidelity-DNA-Polymerase (NEB) gemischt und einem PCR-Zyklus von 98 °C für 30 s, mit folgenden 30 Zyklen von 98 °C 10 s, T_{primer} 15 s, 72 °C 15 s und einem Endschritt von 72 °C 2 min unterzogen. Die PCR-Produkte wurden aus dem Gel gereinigt.

Linearisierung des Vektors durch Restriktionsenzyme

2 µg Vektor wurden mit 0,5 µl der beiden passenden Restriktionsenzyme (NEB) in Gegenwart von 10x CutSmart-Puffer (NEB) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Vektor aus dem Gel gereinigt.

Tabelle 6: Liste aller verwendeten Vektoren und ihrer Resistenzen

Vektor	Herkunft	Antibiotika-Resistenz in <i>E. coli</i>
pGEX-4T-1	GE Healthcare, Chicago, Illinois	Ampicillin
pMAL	NEB	Ampicillin
pSF	Oxford Genetics Ltd, Oxford, UK	Ampicillin
pET19	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts	Ampicillin
pet51b(+)	Merck Millipore	Ampicillin
pCW57	Addgene, #89181	Ampicillin
pProEx™-HTb	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA.	Ampicillin

Exonukleasebehandlung

In einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden 100 ng Backbone mit einem 3x molaren Überschuss des Inserts in Gegenwart von 10x Puffer 2.1 (NEB) und 0,5 µl T4-Polymerase (NEB) gemischt. Nach exakt 2,5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung für 10 min auf Eis transferiert, bevor sie in kompetente Mach1-Zellen transformiert wurde.

6.1.3 Ortsspezifische Mutagenese

Die Punktmutagenese von Genen wurde mit dem Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB) und dem jeweiligen WT als Template durchgeführt, wenn die Mutante nicht in der hauseigenen Plasmidbibliothek vorhanden war. Primer (IDT) wurden unter Verwendung des NEBaseChanger Tools entworfen. Die Mutagenese wurde nach Herstellerprotokoll unter Verwendung von 12,5 µl Endreaktionsvolumen in der PCR-Reaktion durchgeführt.

6.1.4 Analytischer Restriktionsverdau

In 20 µl Gesamtvolumen wurden 0,5 µl jedes Restriktionsenzym (NEB) auf 0,5-1,5 µg DNA in Gegenwart von 10x CutSmart-Puffer (NEB) eingesetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Positive Klone wurden zur Sanger-Sequenzierung geschickt.

6.1.5 Transformation

Klonierungsstämme lagen Z-kompetent vor, Expressionsstämme waren chemisch kompetent (Tabelle 7). NEB® Stable Zellen zur Klonierung der pCW57-Zielplasmide (Tabelle 12) zur stabilen Zelllinien-Generierung wurden von NEB bezogen und nach Herstellerangaben verwendet (NEB). Nach der Transformation wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten ausplattiert, die mit geeigneten Antibiotika zur Selektion des Plasmids ergänzt waren, und über Nacht bei 37 °C gezüchtet.

Z-kompetente Zellen

Z-kompetente Zellen wurden mit dem Mix & Go E. coli Transformation Kit (Zymo Research, Irvine, USA) nach Herstellerprotokoll hergestellt. 50 ng Plasmid wurde zu 20 µl kompetenten Zellen gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert, bevor die Ausplattierung auf eine Agarplatte erfolgte, die mit entsprechenden Antibiotika supplementiert war.

Chemisch kompetente Zellen

50 ng Plasmid wurde zu 200 µl chemisch kompetenten Zellen gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde anschließend für 2 min bei 42 °C mit Hitzeschock behandelt und erneut für 2 min auf Eis gelegt. 1 ml SOC-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) wurde zugegeben und die Zellen wurden 45 min bei 37 °C, 600 *rounds per minute* (rpm) inkubiert, bevor sie auf eine mit entsprechenden Antibiotika supplementierte Agarplatte plattiert wurden.

Tabelle 7: Übersicht aller verwendeten *E. coli*-Stämme

Liste aller genutzten *E. coli* Stämme für Klonierung (Mach1, NEB® Stable) und rekombinante Expression. NEB® Stable wurde von NEB bezogen.

E. coli Stamm	Genotyp
Mach1	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 hsdR</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) Δ <i>recA1398 endA1 fhuA</i>
NEB® Stable	F' <i>proA+B+ lacI^q Δ(lacZ)M15 zzzf::Tn10 (Tet^R)/ Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80<i>dlacZ</i>ΔM15 <i>recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i></i>
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻) gal dcm (DE3)</i>
BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>
Lemo21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS/ pLemo(Cam^R)</i>
Rosetta (DE3) 2	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm pRARE2³ (Cam^R)</i>

6.1.6 Mini und Midi Präparation von Plasmiden

Eine einzelne Kolonie wurde von einer Transformationsplatte entnommen und für die Inokulation von 5 ml LB (Mini) oder 100 ml LB (Midi), ergänzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, verwendet. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, bevor die Plasmide mit dem PureYield™ Plasmid Miniprep- oder Midiprep-System (Promega) präpariert wurden.

6.1.7 Sanger-Sequenzierung

In einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden 5 µl 5 µM Primer mit 50-100 ng Plasmid-DNA gemischt. Die Sanger-Sequenzierung und Analyse wurde von GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) oder Microsynth (Balgach, Schweiz) durchgeführt.

Tabelle 8: Liste verwendeter Plasmide für die Antikörper-Generierung

Aminosäuren (aa); Fusionsproteine/tags: Maltose binding protein (MBP), green fluorescent protein (GFP), Glutathion-S-Transferase (GST), HaloTag® (Halo), Hexahistidin (His₆), Decahistidin (His₁₀), Strep-Tag® II (Strep), FLAG®-Tag (Flag); Protease-Spaltstellen: Tobacco-Etch-Virus (TEV), Enterokinase (EK)

Protein	Insert	Vektor	Beschreibung	Referenz
Cdc42	humanes Cdc42 1-179 aa Q61L	pGEX-4T-1	GST-TEV N-terminal	(Barthelmes et al., 2020)
Rab1b	humanes Rab1b 3-174 aa	pMAL	His ₆ -MBP-TEV N-terminal	(Schoebel et al., 2009)
IbpA	<i>Histophilus somni</i> IbpA 3483-3797 aa I3455C	pSF	His ₁₀ -MBP-TEV-3xFlag N-terminal	B. Gulen
VopS	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> VopS 31-387 aa	pMAL	His ₆ -MBP-TEV N-terminal	(Barthelmes et al., 2020)
DrrA	<i>Legionella pneumophila</i> DrrA 8-533 aa	pET19	His ₆ -TEV N-terminal	(Müller et al., 2010)
Rab8a	Humanes Rab8a 6-176 aa	pet51b(+)	Strep-EK N-terminal, His ₁₀ C-terminal	
AnkX	<i>Legionella pneumophila</i> AnkX 1-800 aa	pSF	His ₁₀ -GFP-TEV N-terminal	(Ernst et al., 2020)
BiP	humanes BiP 19-654 aa	pProEx™-HTb	His ₆ -TEV N-terminal	J. Fauser ⁱⁱ
FICD	humanes FICD 102-458 aa E234G	pMAL	His ₆ -Halo-TEV-Strep N-terminal	J. Fauser ⁱⁱ

Tabelle 9: Liste generierter Plasmide für rekombinante CbFic2-Studien

Aminosäuren (aa); Fusionsproteine/tags: *green fluorescent protein* (GFP), Decahistidin (His₁₀), Twin-Strep-Tag® (TS); Protease-Spaltstellen: Tobacco-Etch-Virus (TEV), Enterokinase (EK)

Protein	Insert	Vektor	Beschreibung
CbFic2 WT	<i>C. burnetii</i> CBU_0822	pSF	His ₁₀ -GFP-TEV N-terminal
CbFic2 E66G	<i>C. burnetii</i> CBU_0822 E66G	pSF	His ₁₀ -GFP-TEV N-terminal
CbFic2 H205A	<i>C. burnetii</i> CBU_0822 H205A	pSF	His ₁₀ -GFP-TEV N-terminal
CbFic2 E66G 1-300 aa	<i>C. burnetii</i> CBU_0822 E66G 1-300 aa	pSF	His ₁₀ -GFP-TEV N-terminal
TS-CbFic2 WT	<i>C. burnetii</i> CBU_0822	pSF	His ₁₀ -GFP-TEV-TS-EK N-terminal
TS-CbFic2 E66G	<i>C. burnetii</i> CBU_0822 E66G	pSF	His ₁₀ -GFP-TEV-TS-EK N-terminal
TS-CbFic2 H205A	<i>C. burnetii</i> CBU_0822 H205A	pSF	His ₁₀ -GFP-TEV-TS-EK N-terminal
TS-CbFic2 E66G 1-300 aa	<i>C. burnetii</i> CBU_0822 E66G 1-300 aa	pSF	His ₁₀ -GFP-TEV-TS-EK N-terminal
TS-H3 1-36 aa	Humanes H3.1 1-36 aa	pSF	His ₁₀ -GFP-TEV-TS-EK N-terminal

6.2 Zellbiologische Methoden

6.2.1 Zellkultur

Die Zellen wurden im angegebenen Medium (Tabelle 10) in einem 37 °C-Inkubator mit 5 % CO₂ und befeuchteter Atmosphäre inkubiert.

Die Zellen wurden mit Trypanblaufärbung 0,4 % in Kombination mit den Countess™-Zellzählkammer-Objektträgern und dem Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen, Carlsbad, USA) gezählt, und ihre Vitalität bestimmt.

Die Zellen wurden durch Entfernen des Mediums, sanftes Waschen mit 1x Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) und Trypsinierung mit 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Thermo Fisher Scientific) passagiert, bis sich die Zellen leicht ablösen und in eine einzelne Zellsuspension pipettiert werden konnten. Die Reaktion wurde 1:10 mit Medium gequench und die Zellen in eine neue Kulturschale (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. THP-1 Zellen wurden rigoros zwischen 3-8x10⁵ Zellen/ml gehalten, um ein ungewolltes Differenzieren zu verhindern.

Tabelle 10: Liste verwendeter Zelllinien, Kulturmedien und deren Herkunft

Zelllinie	Medium	Herkunft
HEK293	DMEM + 10 % FBS	DSMZ ACC-305
HEK293-T	RPMI-1640 Medium + 10 % FBS	Sabine Windhorst, Institut für Biochemie und Signaltransduktion, UKE
CHO-K1 FlpIn	RPMI-1640 Medium + 10 % FBS	Thermo Fisher Scientific Ralf Fliegert, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, UKE
SKOV3	McCoy's 5A Medium + 10 % FCS	Leticia Oliveira-Ferrer, Klinik für Gynäkologie, UKE
HROC24	DMEM/Ham's F12 + 10 % FCS + 3 mM Glutamin	Yuan-Na Lin, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, UKE
Jurkat-Subklon JMP	RPMI-1640 Medium + 10 % NCS	DMSZ verifiziert Ralf Fliegert, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, UKE
Huvec	Medium 199 ohne Phenolrot + 6,6 % FCS + 33 % EBM™-2 Endothelial Cell Growth Basal Medium-2	Nabelschnur-Isolat; Volker Huck, Zentrum für Innere Medizin/Diagnostik, UKE; Kurt Hecher, Abteilung für Geburtshilfe und Fetalmedizin, UKE
HELA	DMEM + 10 % FBS	DSMZ ACC-57
THP-1	RPMI-1640 Medium + 10 % FBS	ATCC TIB-202

6.2.2 Transiente Transfektion von HEK293 Zellen mit Lipofectamin^{vi}

3x10⁵ Zellen/ml wurden mit 2 ml/Well in einer Standard 6w-Platte (Sarstedt) am Tag vor der Transfektion ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) der Zellen gewechselt. 2 µg DNA (Tabelle 11) wurden in 150 µl OptiMEM (Thermo Fisher Scientific), und ebenso 6 µl Lipofetamin2000 (Thermo Fisher Scientific) in 150 µl OptiMEM verdünnt, vermischt, 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, und tropfenweise zu

den ausgesäten Zellen gegeben. 48 h nach der Transfektion wurde die Zellen geerntet und mit RIPA-Puffer (Thermo Fisher Scientific) lysiert, bzw. Histone extrahiert.

Tabelle 11: Von Adam Cichy generierte Plasmide zur transienten GFP-CbFic2 Expression in Säugetierzellen

Plasmid (AG Itzen)	Nr.	Insert	Vektor	N-term. Tag	C-term. Tag	MW
M0704		CbFic1 WT	pAC-N1		GFP	68.5 kDa
M0638		CbFic1 E55G	pAC-N1		GFP	68.5 kDa
M0639		CbFic1 H189A	pAC-N1		GFP	68.5 kDa
M0900		CbFic1 WT	pAC-C2	GFP		67.1 kDa
M0901		CbFic1 E55G	pAC-C2	GFP		67.1 kDa
M0902		CbFic1 H189A	pAC-C2	GFP		67.1 kDa
M0706		CbFic2 WT	pAC-N1		GFP	72.3 kDa
M0642		CbFic2 E66G	pAC-N1		GFP	72.3 kDa
M0643		CbFic2 H205A	pAC-N1		GFP	72.3 kDa
M0906		CbFic2 WT	pAC-C2	GFP		70.9 kDa
M0907		CbFic2 E66G	pAC-C2	GFP		70.9 kDa
M0908		CbFic2 H205A	pAC-C2	GFP		70.9 kDa
M0909		CbFic2 E66G 1-300 aa	pAC-C2	GFP		61.9 kDa
M0707		CbFic2 WT 1-300 aa	pAC-N1		GFP	62.8 kDa
M0715		CbFic2 E66G 1-300 aa	pAC-N1		GFP	62.8 kDa
M0716		CbFic2 H205A 1-300 aa	pAC-N1		GFP	62.8 kDa
M1195		CbFic2 1-43 aa	pAC-N1		GFP	33.8 kDa
M1110		CbFic2 E66G 1-362 aa	pAC-C2	GFP		68.8 kDa
M1112		CbFic2 E66G 1-362 aa	pAC-N1		GFP	70.3 kDa
M1115		CbFic2 E66G 1-371 aa	pAC-C2	GFP		69.9 kDa
M1116		CbFic2 E66G 41-378 aa	pAC-N1		GFP	67.5 kDa
M1109		CbFic2 E66G 86-378 aa	pAC-C2	GFP		61.1 kDa
M1111		CbFic2 E66G 86-378 aa	pAC-N1		GFP	62.7 kDa
M1255		CbFic2 300-362 aa	pAC-C2	GFP		34.2 kDa
M1256		CbFic2 300-378 aa	pAC-C2	GFP		36.2 kDa
M1196		CbFic2 363-378 aa	pAC-C2	GFP		29.2 kDa
M0758		Ctrl.	pAC-N1		GFP	
M0786		Ctrl.	pAC-C2	GFP		

6.2.3 Zellstress/Stimulation

Thapsigargin, Cycloheximid

90 % konfluente CHO-K1 FlpIn oder HEK293 Zellen wurden entweder mit 0,5 μ M Thapsigargin (Biosynth Carbosynth, Staad, Schweiz) für 2 h oder 100 μ g/ml Cycloheximid (Sigma-Aldrich) für 4 h stimuliert. Die Zellen wurden 2-mal mit DPBS (Sigma-Aldrich) gewaschen und in M-PER-Puffer (Thermo Fisher Scientific), ergänzt mit cComplete EDTA freiem Protease-Inhibitor (Roche,

Basel, Schweiz), lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

Anisomycin

Stabile, differenzierte THP-1 Zellen mit oder ohne Doxycyclin-Stimulus wurden für 2 h oder 5 h mit 188,5 nM Anisomycin (Sigma-Aldrich) stimuliert. Die Zellen wurden 2-mal mit DPBS gewaschen und in RIPA-Puffer (Thermo Fisher Scientific), ergänzt mit cOMplete EDTA freiem Protease-Inhibitor (Roche) und PPI (20 mM β -Glycerophosphat, 100 μ M Natrium Orthovanadat, 50 mM Natrium Fluorid, 20 mM Natrium Pyrophosphat und 10 mM Natrium Butyrat) lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

6.2.4 Generierung von stabilen THP-1-Zelllinien

Tabelle 12: Zielplasmide zur Generierung stabiler THP-1 Zelllinien

Zielprotein	Zielplasmid	Resistenz
ctrl	pCW57-GFP-P2A-MCS	G418
CbFic2 WT	pCW57-GFP-P2A-CbFic2 WT	G418
CbFic2 E66G	pCW57-GFP-P2A-CbFic2 E66G	G418
CbFic2 H205A	pCW57-GFP-P2A-CbFic2 H205A	G418
V5-CbFic2 WT	GFP-P2A-V5-CbFic2 WT	G418
V5-CbFic2 E66G	GFP-P2A-V5-CbFic2 E66G	G418
V5-CbFic2 H205A	GFP-P2A-V5-CbFic2 H205A	G418

Virusproduktion in HEK293-T Zellen

Pro angestrebter stabiler Zelllinie (inklusive Kontrollplasmid und Kontrolle ohne Zielplasmid) wurden 5×10^6 HEK293-T Zellen in einer 10 cm Schale in THP-1 Nährmedium (RPMI-1640 + 10 % FBS) ausgesät. Einen Tag später wurden die HEK293-T Zellen zur Virusproduktion mittels Lipofectamin2000 (Thermo Fisher Scientific) mit dem jeweiligen Zielplasmid und den Packungsplasmiden transfiziert: 10 μ g Zielplasmid (Tabelle 12), 10 μ g pMDLg/PRRE Gag-Pol (211), 5 μ g P_RSV_Rev (212) und 2 μ g VSV-G pCMV (203) wurden zu 750 μ l OptiMEM-Medium (Thermo Fisher Scientific) gegeben. Für jeden Ansatz wurden 40 μ l Lipofectamine2000 zu 750 μ l OptiMEM-Medium gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Plasmide und Lipofectamin in OptiMEM wurden gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Das Medium der HEK293-T-Zellen wurde entfernt, die Zellen mit DPBS (Sigma-Aldrich) gewaschen, und 5 ml frisches RPMI-1640 + 10 % FBS-Medium zugegeben. Die Plasmid-Lipofectamin-Mischung wurde zu den Zellen gegeben und 3 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden weitere 5 ml RPMI-1640 + 10 % FBS-Medium zu den Zellen geben, und die Zellen für 24 h kultiviert.

Lentivirale Transduktion mit 24 h, 48 h und 72 h Titer

24 h später (24 h Titer) wurden je Ansatz (inklusive Kontrollplasmid und Kontrolle ohne Zielplasmid) 1 ml 5×10^5 THP-1-Zellen in einer 6w-Platte für Suspensionskultur (Sarstedt) frisch ausgesät. Der 10 ml Virusüberstand wurde von den HEK-293-T-Zellen mit einer Spritze entfernt und mit einem Sterilfilter (0,45 µm) in 2 ml aliquotiert. Zu den HEK-293-T-Zellen wurden 10 ml frisches RPMI-1640 + 10 % FBS-Medium gegeben, und die Zellen wurden für 24 h weiter kultiviert. Je 2 ml des filtrierten Virusüberstandes wurden auf die THP-1-Zellen gegeben (in Summe 3 ml Medium/Well), und die THP-1 befüllten 6w-Platten für 1 h bei 500 x g, RT, spinfiziert, bevor sie für 24 h weiter kultiviert wurden. Der restliche Virusüberstand wurde langsam eingefroren und bei -80°C gelagert. 24 h später (48 h Titer) wurde der gleiche Ablauf wiederholt (in Summe 5 ml Medium/Well). 24 h später (72 h Titer) wurde der Virusüberstand abgenommen und filtriert wie beschrieben, bevor die HEK293-T Zellen verworfen wurden. Die THP-1 Zellen wurden gezählt, und bei $> 3 \times 10^5$ Zellen/Well je auf 2x 6w-Platten à 2,5 ml/Well aufgeteilt. Pro stabiler Zelllinie wurden 2x 2 ml des steril filtrierten Virusüberstandes auf die THP-1-Zellen gegeben (Summe 2x 4,5 ml/Well), bevor sie für 1 h bei 500 x g, RT, spinfiziert wurden. Der restliche Virusüberstand wurde eingefroren und bei -80°C gelagert. Nach 24 h wurde das Medium der THP-1-Zellen erneuert, indem beide Wells mit THP-1-Zellen pro Zielplasmid vereint (Summe 9 ml/Zielplasmid) und bei 300 x g für 5 min bei RT abzentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand verworfen, und 5 ml frisches Medium zugegeben. Jeder Ansatz wurde in eine T25-Flasche für Suspensionskultur (Sarstedt) überführt und aufrecht für 48 h inkubiert.

Selektion

48 h nach der Medien-Erneuerung und 72 h nach dem letzten Virustiter wurde die Selektion mit G418 Disulfat-Salz (Sigma-Aldrich) bei 300 ng/µl, wie anhand der Kill-Kurve bestimmt, gestartet. Während dieser Phase wurde die Zelldichte zwischen $0,2 \times 10^6$ und $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml durch Verdünnung mit G418-haltigem Medium alle 2-3 Tage gehalten. Dabei wurde die Zellvitalität verfolgt. Während der Selektion wurden keine Zellen verworfen, bei Bedarf wurde die Kulturflasche vergrößert. Als die Kontrollzellen ohne Zielplasmid komplett gestorben waren und die stabilen Zelllinien eine Vitalität von über 90 % erreicht hatten, wurde ein signifikanter Anteil je stabiler Zelllinie Kulturmedium + 5 % DMSO eingefroren. Die erfolgreiche Generierung der stabilen Zelllinie wurde durch WB gegen das Zielprotein CbFic2 bzw. Mikroskope gegen GFP bestätigt.

6.2.5 Differenzierung von THP-1-Zellen

THP-1 Zellen wurden in 10 cm Schalen (Sarstedt) mit einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml in RPMI-1640 + 10 % FBS, versetzt mit 25 nM PMA (Sigma-Aldrich), ausgesät. Zellen wurden für 48 h differenziert, bevor das Medium zu PMA-freiem RPMI-1640 + 10 % FBS gewechselt wurde,

um differenzierte Zellen (adhärent) zu erholen und undifferenzierte Zellen (nicht adhärent) zu entfernen (Lund et al., 2016).

6.2.6 Expression von CbFic2 in stabilen THP-1 Makrophagen

Stabile THP-1 Zelllinien wurden wie beschrieben differenziert. 1 µg/ml Doxycyclin (Sigma-Aldrich) wurde zum Kulturmedium gegeben und alle 24 h erneuert.

6.2.7 Zellyse

M-PER

Das Zellpellet wurde 2-mal mit DPBS gewaschen und mit M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce, Rockford, USA) unter Zugabe von cOmplete EDTA freiem Protease-Inhibitor (Roche) und Phosphatase Stop (Roche) für 10 min bei RT unter Rotation inkubiert. Das Zelllysate wurde anschließend für 15 min bei 20000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Konzentration wurde mittels Bradford Assay bestimmt und das Zelllysate eingefroren und bei -80 °C gelagert.

RIPA

Das Zellpellet wurde 2-mal mit DPBS gewaschen und mit RIPA-Lyse- und Extraktionspuffer (Thermo Fisher Scientific) unter Zugabe von cOmplete EDTA freiem Protease-Inhibitor (Roche) und PPI für 15 min bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Das Zelllysate wurde anschließend für 15 min bei 20000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Konzentration wurde mittels Bradford Assay bestimmt und das Zelllysate eingefroren und bei -80 °C gelagert.

6.2.8 Acide Histonextraktion

HEK293-Zellen wurden gezählt, geerntet und 2-mal mit eiskaltem DPBS gewaschen. Pellets wurden in Triton-Extraktions-Puffer (TEB: DPBS, 0,5 % Triton X-100 (v/v)), versetzt mit PPI, bei einer Zelldichte von 10^7 Zellen pro ml resuspendiert. Zellen wurden zur Lyse für 10 min unter leichter Agitation auf Eis inkubiert. Proben wurden bei 6500 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert um die Zellkerne zu pelletieren, der Überstand wurde verworfen. Die Zellkerne wurden erneut in der Hälfte des TEB-Volumens resuspendiert und wie vorher zentrifugiert. Pellets wurden in 0,2 N HCl bei einer Dichte von 4×10^7 Nuklei pro ml resuspendiert und über Nacht bei 4 °C Säureextrahiert. Proben wurden bei 6500 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, um die Kern-Trümmer zu pelletieren. Der Histon-haltige saure Überstand wurde mit 1/10 des Volumens 2 M NaOH neutralisiert und der Proteingehalt mit dem Bradford-Assay bestimmt. Aliquots wurden bei -20 °C eingefroren.

6.2.9 Immunpräzipitation

anti-AMP IP für WB

AMPylierte Proteine wurden entweder aus gereinigten rekombinanten BiP- und BiP-AMP-Proben oder aus CHO-K1-Lysaten, die entweder mit Thapsigargin oder Cycloheximid gestresst waren, mit dem Antikörper 17G6 unter Verwendung von Pierce ChIP-grade Protein A/G Magnetic Beads (Thermo Fisher Scientific) gemäß dem Herstellerprotokoll ausgefällt: In einem Gesamtvolumen von 500 µl wurden 20 µg rekombinantes Protein oder 1 mg Lysat mit 10 µg Antikörper 17G6 in 25 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 % Glycerin, 1 % NP40 über Nacht bei 4 °C inkubiert, bevor sie mit 25 µl äquilibrierten Beads für 1 h bei Raumtemperatur präzipitiert wurden. Die Beads wurden anschließend 2-mal mit dem Bindepuffer gewaschen, bevor die AMPylierten Proteine mit 100 µl 1x Laemmli für 15 min bei 30 °C eluiert wurden. Die Lysat-Elutionen wurden in einem SpeedVac alpha RVC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Christ), Osterode am Harz, Deutschland) ohne Hitze auf 20 µl konzentriert. Für rekombinante Proteinproben wurden je 7,5 µl Input und ungebundene Probe inklusive 5x Laemmli-Puffer und 2,5 µl konzentrierte Elution, für Lysatproben je 5 µl Input und ungebundene Probe inklusive 6x Laemmli-Puffer und 20 µl konzentrierte Elution wie beschrieben mittels 12 % SDS PAGE und WB analysiert.

anti-AMP IP nach Methanol/Chloroform-Fällung für WB

Für die Immunpräzipitation nach Methanol/Chloroform-Fällung wurden 250 µg CHO-K1-Lysat - unbehandelt oder gestresst mit entweder Thapsigargin oder Cycloheximid - mit 3 Volumina Methanol verdünnt und gevortext, bevor 1 Volumen Chloroform (Sigma-Aldrich) hinzugefügt und die Proben gevortext wurden. 3 Volumina ddH₂O wurden zugegeben, die Proben gevortext, bevor sie bei 15000 rpm für 2 min bei 4 °C zentrifugiert wurden. Die wässrige obere Phase wurde vorsichtig abgesaugt, 3 Volumina Methanol wurden zugegeben, die Proben gevortext, bevor sie bei 15 000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert wurden. Danach wurden der Überstand entfernt und die Proteinpellets an der Luft getrocknet. Die trockenen Proteinpellets wurden in 25 µl 1 M NaOH resuspendiert, bevor 80 µl Bindungspuffer (25 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 % Glycerin) zugegeben und der pH-Wert mit 10 % HCl auf 7,5 eingestellt wurde. 2,5 µg Antikörper 17G6 wurden zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert, bevor sie mit 25 µl äquilibrierten Pierce ChIP-grade Protein A/G Magnetic Beads (Thermo Fisher Scientific) für 1 h bei Raumtemperatur präzipitiert wurden. Die Beads wurden 2-mal mit dem Bindepuffer gewaschen, bevor die AMPylierten Proteine mit 50 µl 1x Laemmli für 15 min bei 30 °C eluiert wurden. Jeweils 5 µl der Input- und ungebundenen Probe inklusive 6x Laemmli-Puffer, und 20 µl der Elution wurden mittels 12 % SDS PAGE und WB wie beschrieben analysiert.

anti-H3 IP für WB

Histon H3 wurde aus RIPA lysierten HEK293-Zellen unter Verwendung von Pierce ChIP-grade Protein A/G Magnetic Beads (Thermo Fisher Scientific) gemäß dem Herstellerprotokoll ausgefällt:

In einem Gesamtvolumen von 200 µl wurden 50 µg Lysat mit 1 µg anti-Histon H3 Antikörper ab1791 (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) in 25 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 % Glycerin über Nacht bei 4 °C inkubiert, bevor sie mit 25 µl äquilibrierten Beads für 1 h bei Raumtemperatur präzipitiert wurden. Die Beads wurden anschließend 3-mal mit dem Bindepuffer gewaschen, bevor die AMPylierten Proteine mit 50 µl 1x Laemmli für 15 min bei 30 °C eluiert wurden. Je 10 µl Input und ungebundene Probe inklusive 6x Laemmli-Puffer und 10 µl Elution wurden wie beschrieben mittels 15 % SDS PAGE und WB analysiert.

anti-AMP IP für LC-MS/MS

Alle verwendeten Chemikalien in diesem Versuchsaufbau waren *proteomic grade*, es wurden ausschließlich low-binding Reaktionsgefäße (Sarstedt) verwendet.

Glycerol-freier anti-AMP-Antikörper 17G6 wurde für 10 min, 16000 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Um die Elution des Antikörpers mit dem Zielprotein zu vermeiden, wurde 17G6 kovalent mit den Beads gekoppelt. Dazu wurden 7 mg magnetische Dynabeads™ M-270 Epoxy Beads (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben des Dynabeads™ Co-Immunoprecipitation Kits (Thermo Fisher Scientific) mit 180 µg 17G6 gekoppelt und mit einer Konzentration von 10 mg/ml 17G6-gekoppelter Beads bei 4 °C gelagert.

250 µg differenzierte THP-1 Lysate nach 48 h CbFic2 E66G bzw. CbFic2 H205A Expression wurden in biologischen und technischen Triplikaten Methanol/Chloroform gefällt, wie oben beschrieben. Pellets wurden in einem finalen Volumen von 100 µl Bindepuffer (25 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl) gelöst und mit 5 M NaOH der pH auf 7,5 eingestellt. 100 µl magnetische, Epoxy-gekoppelte anti-AMP-Antikörper Beads pro Ansatz wurden mit 900 µl Bindepuffer gewaschen, in 100 µl Bindepuffer resuspendiert und mit dem gelösten Proteinpellet vereint. Proben wurden über Nacht bei 4 °C invertierend inkubiert und anschließend 3-mal mit 200 µl Bindepuffer gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und gebundene Proteine mit 120 µl 0,5 M NH₄OH, 0,5 mM EDTA für 20 min bei RT eluiert. Der Vorgang wurde wiederholt, und die Eluate vereint. Die Elutionen wurden in einem SpeedVac alpha RVC (Christ) ohne Hitze getrocknet, und anschließend an Dr. Christoph Krisp^{ix} zum Trypsin-Verdau und zur LC-MS/MS Analyse übergeben.

6.2.10 Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenz wurden Zellen wie angegeben in 8w µ-Slides (ibidi, Gräfelfing, Deutschland) ausgesät.

Fixierung

Das Medium wurde entfernt und Zellen mit warmen DPBS gewaschen. Anschließend wurden Zellen für 15 min bei 37 °C mit warmem 4 % PFA in Medium + 10 % FCS fixiert.

Permeabilisierung

Fixierte Zellen wurden 3x für je 5 min mit warmem 0,1 % Triton X-100 in DPBS inkubiert, und anschließend 3x mit warmem DPBS gewaschen.

Antikörper- und DAPI-Färbung

Permeabilisierte Zellen wurden mit primärem Antikörper 17G6 1:100 über Nacht bei 4 °C in DPBS + 4 % FCS inkubiert. Zellen wurden 3x für 10 min mit DPBS gewaschen und mit sekundärem Antikörper anti-mouse atto568 1:2000 in DPBS + 4 % FCS für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden Zellen mit DAPI 1:2000 in DPBS für 4 min gegengefärbt. Zellen wurden 3x für 10 min mit DPBS gewaschen, und bis zur Visualisierung mit PBS bedeckt lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Mikroskopie

Zellen wurden mit dem EVOS M5000 Imaging System (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung des GFP- (Ex. 470/ Em. 525 nm) und DAPI-Cubes (Ex. 357/Em. 447 nm) visualisiert.

6.3 Proteinchemische Methoden

Rekombinantes humanes Histon H3.1 wurde von NEB (M2503S) und aktives humanes PARP3 von Sigma-Aldrich (SRP0194-10UG, Lot #8050330111) bezogen. Humanes pSer111 Rab1b war ein freundliches Geschenk von Dr. Sophie Vieweg und wurde wie zuvor veröffentlicht hergestellt (Vieweg et al., 2020).

6.3.1 Rekombinante Expression

Alle für die Überexpression verwendeten *E. coli*-Stämme (Tabelle 7) wurden aus dem hauseigenen Stock gewonnen. Plasmid-DNA (50 ng) wurden wie in Kapitel 6.1.5 beschrieben in kompetente Zellen retransformiert.

Eine einzelne Kolonie wurde entnommen und in 50 ml LB-Medium, ergänzt mit den jeweiligen Antibiotika, bei 37 °C über Nacht kultiviert. 3 l LB-Medium, ergänzt mit den jeweiligen Antibiotika, wurden im Verhältnis 1:100 (v/v) mit der durchgewachsenen Vorkultur beimpft und bei 37 °C, 180 rpm bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,8 kultiviert. Die Zellen wurden auf 30 °C abgekühlt und die rekombinante Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden bei 180 rpm und den in Tabelle 13 und

Tabelle 14 aufgeführten Bedingungen kultiviert, bevor sie durch Zentrifugation bei 5000 x g, 30 min, 20 °C geerntet wurden. Das Zellpellet wurde mit 1x PBS pH 7,5 gewaschen, bevor es bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren wurde.

Tabelle 13: Expressions- und Lysebedingungen für rekombinante Proteine in Antikörper-Generierung

Protein	<i>E. coli</i> Stamm	Zeit, Temperatur	Puffer A	Addition
Cdc42	BL21 (DE3)	20 h bei 25 °C	50 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM β-Me, 10 μM GDP	1 mM PMSF, DNase I
Rab1b	BL21 (DE3)	20 h bei 25 °C	50 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM β-Me, 10 μM GDP	1 mM PMSF, DNase I
IbpA	BL21 (DE3)	20 h bei 20 °C	50 mM HEPES pH 8,0, 500 mM LiCl, 2 mM β-Me	1 mM PMSF, DNase I
VopS	Lemo21	20 h bei 20 °C	50 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM β-Me	1 mM PMSF, DNase I
DrrA	BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	20 h bei 20 °C	50 mM HEPES pH 8,0, 500 mM LiCl, 2 mM β-Me	1 mM PMSF, DNase I
Rab8a	BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	20 h bei 20 °C	50 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM β-Me, 10 μM GDP	1 mM PMSF, DNase I
AnkX	BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	20 h bei 20 °C	50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, 2 mM β-Me	1 mM PMSF, DNase I
BiP	Rosetta 2	3 h bei 37 °C	50 mM HEPES pH 7,4, 400 mM NaCl, 20 mM Imidazol	1 mM PMSF, DNase I
FICD	Rosetta 2	20 h bei 23 °C	50 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM β-Me	1 mM PMSF, DNase I

Tabelle 14: Expressions- und Lysebedingungen für rekombinante Proteine im Kontext von CbFic2

Protein	<i>E. coli</i> Stamm	Zeit, Temperatur	Puffer A	Addition
CbFic2 alle Versionen	Lemo21	20 h bei 23 °C	20 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM β-Me	1 mM PMSF, 0,075% PEI
TS-H3 1-36 aa	Rosetta 2	3 h bei 37 °C	20 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM β-Me	1 mM PMSF

6.3.2 Bakterielle Zellyse

Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in 10 ml kaltem Puffer A (Tabelle 13, Tabelle 14) pro 5 ml Zellpellet resuspendiert. Nach eventueller (Tabelle 13) Zugabe von DNase I (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) wurden die Zellen mit der Constant Cell Disruption Unit (Constant Systems, Low March, Vereinigtes Königreich) bei 2,1 kbar aufgeschlossen und nach Zugabe von 1 mM PMSF und eventueller (Tabelle 14) Zugabe von 0,075 % PEI bei 48000 x g für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde weiter gereinigt.

6.3.3 NiNTA-Affinitätschromatographie

Der Überstand nach dem Zellaufschluss, der überexprimiertes His-getaggtetes Protein enthält, wurde auf eine voräquilibrierte Ni²⁺-beladene HiTrap 5 ml Chelating HP Säule (GE Healthcare) oder Ni²⁺-beladene Bio-Scale mini Nuvia IMAC Cartridge (BioRad) geladen, die in Puffer A (Tabelle 13, Tabelle 14) äquilibriert wurde. Die Säule wurde mit 30 mM Imidazol gewaschen und His-getaggtetes Protein mit einem 5 ml fraktionierten Gradienten von 30 mM - 350 mM Imidazol über 20 Säulenvolumina eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels SDS PAGE analysiert und

entweder für die TEV-Protease-Spaltung oder für die Größenausschlusschromatographie (SEC) vereint.

6.3.4 Glutathion-Affinitätschromatographie

Für GST-markierte Proteine (Cdc42) wurde der Überstand nach dem Zellaufschluss auf eine voräquiliibrierte GST-Trap-Säule (GE Healthcare) geladen und mit 3-5 Säulenvolumina des gleichen Puffers A, ergänzt mit 10 mM Glutathion, eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels SDS PAGE analysiert und für die TEV-Protease-Spaltung vereint.

6.3.5 TEV-Protease-Spaltung

Für die TEV-Protease-Spaltung der Tags nach der NiNTA-Chromatographie wurden zu je 45 mg Protein einer Größe von 68 kDa 1 mg His₆-getaggtter TEV-Protease aus dem hauseigenen Stock zugegeben. Die Mischung wurde gegen 5 l TEV-Dialysepuffer (Tabelle 15, Tabelle 16) bei 4 °C über Nacht in Dialyseschläuchen mit einem Molekulargewichts-Cut-off (MWCO) von 12000-14000 Da bzw. MWCO von 6000-8000 (TS-H3 1-36 aa) und 29 mm Durchmesser (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) dialysiert. Am nächsten Morgen wurde die Proteinlösung für 10 min bei 5000 rpm, 4 °C zentrifugiert, bevor sie ein zweites Mal der NiNTA-Affinitätschromatographie zugeführt wurde. Im Unterschied zum ersten Durchlauf eluiert das Protein aufgrund des fehlenden His-Tags im Durchfluss oder im 30 mM Imidazol-Waschschritt, während die TEV-Protease an die Säule bindet. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels SDS PAGE analysiert, vereint, und für die Injektion auf eine präparative Größenausschlusschromatographie konzentriert.

Tabelle 15: Reinigungspuffer für rekombinante Proteine in Antikörper-Generierung

Protein	TEV-Dialysepuffer	SEC-Puffer
Cdc42	50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM β -Me, 10 μ M GDP	20 mM HEPES pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTE, 10 μ M GDP
Rab1b	50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM β -Me, 10 μ M GDP	20 mM HEPES pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM Dithioerythritol (DTE), 10 μ M GDP
IbpA	20 mM HEPES pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM β -Me	20 mM HEPES pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM DTE
VopS	-	20 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
DrrA	20 mM HEPES pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM β -Me	20 mM HEPES pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM DTE
Rab8a	-	20 mM HEPES pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTE, 10 μ M GDP
AnkX	20 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, 2 mM β -Me	20 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM β -Me
BiP	20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl	20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM KCl, 10 mM MgCl ₂

FICD	20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM β-Me	20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM TCEP, 5 % Glycerin
-------------	---	--

Tabelle 16: Reinigungspuffer für rekombinante Proteine im Kontext von CbFic2

Protein	TEV-Dialysepuffer	SEC-Puffer
CbFic2	20 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl,	20 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl,
alle Versionen	1 mM MgCl ₂ , 1 mM β-Me	1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
TS-H3 1-36 aa	20 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl,	20 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl
	1 mM β-Me	

6.3.6 Präparative Größenausschlusschromatographie

Nach der ersten bzw. der zweiten NiNTA-Chromatographie wurde die Proteinlösung unter Verwendung von Amicon Ultra Zentrifugalfiltereinheiten (Merck Millipore) mit angemessenem MWCO auf unter 2 ml konzentriert, 5 min bei 20000 rpm, 4 °C, zentrifugiert und je nach Molekulargewicht einer Größenausschlusschromatographie auf einer HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200pg-Säule (GE Healthcare) oder einer 75pg-Säule unter Verwendung eines SEC-Puffers (Tabelle 15, Tabelle 16) unterzogen. Der Lauf abzüglich des Totvolumens der Säule wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden mittels SDS PAGE analysiert, die Zielprotein-haltigen Proben vereint, unter Verwendung von Amicon Ultra Zentrifugalfiltereinheiten (Merck Millipore) mit angemessenem MWCO auf etwa 10 mg/ml konzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

6.4 Allgemeine analytische Methoden

6.4.1 Bestimmung der Protein- und DNA-Konzentration

UV-Spektroskopie

Protein- und DNA-Konzentrationen wurden mit dem NanoDrop 2000 UV-VIS (Thermo Fisher Scientific) durch ihre spezifische Absorption bei 280 nm bzw. 260 nm bestimmt.

Bradford-Assay

Alle Zelllysatkonzentrationen wurden in 1:200 Verdünnung mit dem BioRad Protein Assay (BioRad) unter Einbeziehung einer BSA-Verdünnungsreihe nach Herstellerangaben bestimmt. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentrationen auf die BSA-Standardkurve geeicht.

6.4.2 SDS PAGE Analyse

Proben wurden in SDS-PAGE-Probenpuffer (Laemmli) (62 mM Tris-HCL, pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β-Me, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau) gelöst und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Für die WB-Analyse von Zelllysaten wurden 20 µg Protein Gesamtmenge, für

Histonextraktionen 10 µg aufgetragen. 5 µl Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa bzw. 10-250 kDa) (NEB) wurden als Standard verwendet.

Tris-Glycin-Gele

Gele wurden unter Verwendung von 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS), 4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS), einer Acrylamid/Bis Lösung 37.5:1 (30 % w/v); 2,6 % Crosslinker (Serva) und den Polymerisationsstartern 200x 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat und 2000x Tetramethylethyldiamin (TEMED) (VWR International, Radnor, USA) in einem Mini Protean™ Tetra System (BioRad) gegossen.

12 % oder 15 %ige Tris-Glycin-Gele wurden bei RT mit 60 mA pro Gel (Puffer: 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS, 192 mM Glycin) laufen gelassen.

Bis-Tris Gele

Gele wurden unter Verwendung von 3x Gelpuffer (1 M Bis-Tris, Sigma-Aldrich), einer Acrylamid/Bis Lösung 37.5:1 (30 % w/v); 2,6 % Crosslinker (Serva) und den Polymerisationsstartern 200x 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat und 2000x Tetramethylethyldiamin (TEMED) (VWR) in einem Mini Protean™ Tetra System (BioRad) gegossen.

10 %, 12 % oder 15 %ige Bis-Tris Gele wurden bei RT in 1x low-MW Laufpuffer (50 mM MES, 50 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS) supplementiert mit 5 mM Natrium Bisulfit bei 30 mA pro Gel laufen gelassen.

Nach der Auftrennung wurden die Proteinbanden mit einer der folgenden Färbemethoden visualisiert.

Coomassie Färbung

Die Gele wurden in 0,15 % (w/v) Coomassie-Blau R250, 44 % (v/v) Ethanol, 12 % (v/v) Essigsäure für 10 min getränkt, bevor sie mit 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt wurden.

Silbernitrat-Färbung

Das Gel wurde für 5 min mit 60 ml 50 % (v/v) Aceton, 1,5 ml 50 % (v/v) Trichloressigsäure und 25 µl 35 % (v/v) Formaldehyd fixiert. Es wurde 3-mal für einige Sekunden mit ddH₂O gewaschen, bevor das Gel 5 min in 60 ml 50 % (v/v) Aceton und anschließend 1 min in 60 ml ddH₂O, 100 µl 10 % (w/v) Na₂S₂O₃ x 5 H₂O getränkt wurde. Wiederum wurde 3-mal für einige Sekunden mit ddH₂O gewaschen. Das Gel wurde für 8 min in 60 ml ddH₂O, 800 µl 20 % (w/v) AgNO₃, 600 µl 35 % (v/v) Formaldehyd inkubiert. Das Gel wurde 3-mal für einige Sekunden mit ddH₂O gewaschen. Das Gel wurde in 60 ml ddH₂O, 1,2 g Na₂CO₃, 25 µl 35 % (v/v) Formaldehyd, 25 µl 10 % (w/v) Na₂S₂O₃ x 5 H₂O eingeweicht, bis sich die gewünschten Banden entwickelten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 % (v/v) Essigsäure beendet.

6.4.3 Western Blot Analyse

200 ng bzw. 50 ng rekombinantes Protein bzw. 20 µg Zellysat bzw. 10 µg Histoneextraktion wurden durch 15 %, 12 % oder 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde als Sandwich mit Whatman-Papier und einem Transferpuffer aus 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 % Methanol auf eine MeOH-aktivierte Immobilon®-P-Membran (Merck Millipore) übertragen. Für das Blotting wurde ein konstanter Strom von 0,7 mA/cm² für 2 h an den halbtrockenen Blotter V20-SDP (SCIE-PLAS, Cambourne, Vereinigtes Königreich) angelegt. Nach dem Blotting wurde die PVDF-Membran mit 1x Roti®-Block (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit 0,1 % Tween20 (TBS-T) für 1 h blockiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper in die Blockierungslösung gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran 3-mal für 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend für 1 h mit einem sekundären Antikörper-Peroxidase-Konjugat in TBS-T inkubiert. Wiederum wurde die Membran 3-mal für 10 min in TBS-T gewaschen, bevor das Peroxidase-Signal mit dem SuperSignal™ West Dura (Thermo Fisher Scientific) entwickelt und die Chemolumineszenz mit der Intas ECL Chemocam (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland) detektiert wurde.

Antikörper: Vor-Immun-Seren und Antiseren nach der 3. Immunisierung (GenScript Biotech, Piscataway Township, USA) wurden 1:1000 verwendet. Zellüberstand von Hybridom-Klonen und Subklonen (GenScript) wurde 1:10 verwendet. Gereinigte monoklonale Maus anti-AMP-Antikörper 17G6, 1G11, 7C11 (GenScript) wurden 1:1000 (0,5 µg/ml) eingesetzt. Monoklonaler Maus anti-GAPDH-Antikörper sc-47724 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) wurde 1:1000 verwendet. Der polyklonale Kaninchen anti-Histon-H3-Antikörper ab1791 (Abcam) wurde im Verhältnis 1:5000 verwendet. Der monoklonale Maus anti-Histon-H3 (phospho S10)-Antikörper ab14955 (Abcam) wurde 1:1000 eingesetzt. Der monoklonale Kaninchen anti-Histon-H3 (phospho S28)-Antikörper ab32388 (Abcam) wurde 1:2000 eingesetzt. Der polyklonale Kaninchen anti-AMPyliertes-Tyrosin-Antikörper ABS184 (Merck Millipore) wurde im Verhältnis 1:1000 verwendet. Der polyklonale Kaninchen anti-pan-AMPyliertes-Threonin-Antikörper 09-890 (Sigma-Aldrich) wurde 1:2000 verwendet. Rekombinantes Kaninchen anti-pan-ADP-Ribose-Bindungsreagenz MABE1016 (Merck Millipore) wurde 1:1000 verwendet. Polyklonaler Kaninchen anti-GRP78/BiP-Antikörper PA5-34941 (Thermo Fisher Scientific) wurde 1:5000 verwendet. Huhn anti-CbFic2-Antikörper (AG Kaspers, LMU, München) wurde 1:500 eingesetzt. Das rekombinante Kaninchen anti-GFP-Reagenz (Thermo Fisher Scientific) wurde 1:2000 eingesetzt. Der monoklonale Maus anti-V5-Antikörper 2F11F7 (Thermo Fisher Scientific) wurde 1:500 eingesetzt.

Sekundäres Ziegen-anti-Maus-IgG (H + L) HRP-Konjugat (Thermo Fisher Scientific) wurde im Verhältnis 1:20000 verwendet. Sekundäres Ziegen-anti-Kaninchen-IgG HRP-Konjugat (Sigma-Aldrich) wurde im Verhältnis 1:40000 verwendet. Sekundäres Kaninchen-anti-Huhn-IgY (IgG)

(H+L) HRP-Konjugat (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) wurde 1:10000 verwendet. Rekombinantes Strep-Tactin® HRP-Konjugat (IBA) wurde 1:1000 eingesetzt.

Die angegebenen Additive wurden während der Primärantikörper-Inkubation in einer Endkonzentration von 1 μ M für Adenosin (Jena Bioscience), AMP (Sigma-Aldrich), ADP (Biosynth Carbosynth), ATP (Biosynth Carbosynth), ADPR (Sigma-Aldrich), NAD⁺ (Biosynth Carbosynth) bzw. 1 mM für MnCl₂, MgCl₂ (VWR) eingesetzt. Die Hydroxylamin-Behandlung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Gibson et al., 2017): Nach der Entwicklung der Membran mit anti-AMP-Antikörpern wurde die Membran mit 1 M Hydroxylamin (Sigma-Aldrich) in 1x Roti-Block für 8 h bei Raumtemperatur inkubiert, 3-mal in TBS-T gewaschen, erneut für 1 h bei Raumtemperatur blockiert und mit einer zweiten Runde anti-AMP-Antikörper inkubiert. Alle Western Blots mit rekombinanten Proteinen wurden als technische Duplikate durchgeführt. Die Analyse von Zellysatsproben wurde als biologisches Duplikat durchgeführt. Es werden repräsentative Blots gezeigt; wenn nicht anders angegeben, repräsentieren die Zeilen gleiche Belichtungszeiten von identischen Blots. Alle Helligkeits- und Kontrastveränderungen wurden gleichmäßig auf das gesamte Bild angewendet. Beschneidungen, z. B. aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte, werden durch einen Bruch im Bildrahmen angezeigt.

6.4.4 Massenspektrometrische Analyse von gereinigten Proteinen

2 μ l Proteinprobe mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml wurde auf eine ProSwift™ RP-4H 1 x 50 mm Säule (Thermo Fisher Scientific) injiziert. Die Proben wurden mit einem 2-minütigen Gradienten aus 5 %-34 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure bei 0,2 ml/min eluiert. Die MS-Messungen wurden mit einer amaZon speed ESI-LCMS (Bruker Daltonik, Billerica, USA), Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die resultierenden Ionenspektren wurden mit der Software Magic Transformer (MagTran) dekonvolviert (Zhang und Marshall, 1998).

6.5 CbFic2-spezifische Methoden

6.5.1 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Komplementäre Sequenzen (fw, rv) (Tabelle 18, Tabelle 17) wurden im äquimolaren Verhältnis in ddH₂O gemischt, und für 5 min bei 95 °C in einem Metallblock inkubiert. Anschließend wurden die Proben langsam im Metallblock auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Extinktionskoeffizienten und molekulare Masse wurden mit dem IDT Oligo Analyzer (IDT) berechnet. Zur Bestimmung der Konzentration der hybridisierten, doppelsträngigen Oligonukleotide wurde, im Unterschied zu den einzelsträngigen Oligonukleotiden, die Hypochromizität des Extinktionskoeffizienten des Doppelstrangs gegenüber der Summe der Extinktionskoeffizienten der zugehörigen Einzelstränge beachtet. Damit berechnet sich der

Extinktionskoeffizient ε_{ds} der dsDNA aus den Extinktionskoeffizienten ε_{ss} der Einzelstränge wie folgt:

$$\varepsilon_{ds} = (\varepsilon_{ss, fw} + \varepsilon_{ss, rv}) \times (1 - h) \quad (1)$$

mit

$$h = (0,059 \times fGC) + (0,287 \times fAT) \quad (2)$$

fGC bezeichnet dabei den Anteil an Guanin- und Cytosin-Basen, und fAT den Anteil an Adenin- und Thymin-Basen.

6.5.2 LC-MS/MS Analyse der anti-AMP IP^{ix}

Alle Proben wurden von Dr. Christoph Krisp^{ix} im gleichen Volumen mit Trypsin verdaut und anschließend mittels LC-MS/MS analysiert. Die quantitative Analyse der An- und Abreicherung identifizierter Proteine erfolgte mit Proteome Discoverer 2.4 über die Summe der integrierten Flächen unter der Kurve im Chromatogramm aller identifizierten Peptide eines Proteins. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Student's t-Test (p-value < 0,05) berechnet.

6.5.3 Kinase activity profiling^{viii}

Kinase activity profiling wurde von PD Dr. Malte Kriegs^{viii} durchgeführt wie bereits beschrieben (Arni et al., 2017). Es wurden STK-PamChip® -Arrays und eine PamStation®12 (PamGene International, 's-Hertogenbosch, Niederlande) gemäß den Herstellerprotokollen verwendet. Kurz gesagt, jeder Array enthält 140 individuelle Peptid-Phospho-Sites, die Analoga von Substraten für die entsprechenden Serin-/Threonin-Kinasen sind. Die HEK293-Lysate nach Überexpression von GFP-CbFic2 E66G bzw. GFP-CbFic2 H205A wurden mit M-PER Lyse hergestellt, der EDTA-freien Halt Protease Inhibitor Cocktail (Pierce) enthält. 1 µg Protein und 400 µM ATP bzw. AMPNPP wurden gemischt und auf jeden Array aufgetragen. Die sequenzspezifische Peptidphosphorylierung wurde während der Reaktion mit anti-Phospho-Ser/Thr-Antikörpern bzw. anti-AMP-Antikörper 17G6 nachgewiesen, gefolgt von der Detektion mit sekundären polyklonalen FITC-Antikörpern (PamGene International). Für die Signalaufzeichnung wurde eine CCD-Kamera und die Evolve-Software v. 1.0 (PamGene International) verwendet. Die Qualität der Signale wurde kontrolliert. Zur weiteren Datenanalyse wurden die endgültigen Signalintensitäten log₂-transformiert und mit der BioNavigator Software Version 6.3.67.0 (BN6, PamGene International) weiterverarbeitet. Der log₂-Fold-Change (log₂ FC) wurde herangezogen, um festzustellen, ob Gene hoch- oder herunterreguliert wurden.

6.5.4 CbFic2 AutoAMPylierungsassay mittels WB

Für die Automodifikation und Co-Inkubation verschiedener CbFic2 Varianten wurden 0,1 mg/ml (ca. 2,5 µM) der angezeigten CbFic2 Versionen allein oder in Gegenwart der angezeigten CbFic2

Version in An- und Abwesenheit von 2,5 μM 20 bp dsDNA bzw. 1 mM ATP in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM TCEP bei 37 °C über Nacht inkubiert. Proben wurden 1:10 mit Laemmli verdünnt, und 10 μl , d. h. 100 ng, je Probe mittels 12 % SDS-PAGE und anschließendem anti-AMP WB auf AutoAMPylierung untersucht.

Für die Analyse von CbFic2 WT allein wurden 0,5 μM (0,02 mg/ml) CbFic2 WT in An- und Abwesenheit von 0,5 μM 20 bp dsDNA und An- und Abwesenheit von 1 mM ATP in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM TCEP bei 37 °C inkubiert. Zeitpunkte wurden genommen, indem die jeweilige Probe 1:1 mit 2x Laemmli versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert wurde. 10 μl , d. h. 100 ng, je Probe wurden mittels 12 % SDS-PAGE und anschließendem anti-AMP WB auf AutoAMPylierung untersucht.

6.5.5 CbFic2 AutoAMPylierungsassay mittels MS

In 100 μl Gesamtvolumen wurden 0,2 mg/ml (ca. 4,5 μM) CbFic2 WT oder CbFic2 E66G oder TS-CbFic2 WT oder TS-CbFic2 E66G in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM TCEP, 1 mM ATP je in An- und Abwesenheit von 5 μM 20 bp dsDNA bei 37 °C im Autosampler der LC-MS inkubiert. Das Experiment wurde je in Anwesenheit von 2 μM TS-H3 1-36 aa bzw. Histon H3.1 wiederholt. Proben wurden stündlich mit der maXis II ETD ESI LCMS (Bruker Daltonik), gekoppelt an die Elute UHPLC (Bruker), unter Verwendung einer ProSwift™ RP-4H 1 x 50 mm Säule (Thermo Fisher Scientific) analysiert. Der Grad der Automodifikation wurde durch den spezifischen Massenzuwachs der AMPylierung von 329 Da erfasst. Die Quantifizierung der AMPylierung erfolgte über den Anteil des spezifischen Signals an der Gesamtintensität aller CbFic2 Signale.

6.5.6 TS-H3 1-36 aa AMPylierungsassay mittels MS

Für die zeitaufgelöste Betrachtung der TS-H3 1-36 aa AMPylierung durch TS-CbFic2 E66G wurden 50 μM TS-H3 1-36 aa mit 5 μM TS-CbFic2 E66G, 5 μM dsDNA und 1 mM ATP in 20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT bei 37 °C inkubiert. Wie angegeben wurden dabei unterschiedliche dsDNA Konstrukte (Tabelle 17), bzw. Salzkonzentrationen eingesetzt.

Nach Probennahme wurde TS-CbFic2 E66G durch Hitze (70 °C, 10 min) inaktiviert, für 5 min bei 21000 x g, 4 °C abzentrifugiert und anschließend über LC-MS (6.4.4) analysiert. Spektren wurden mit MagTran dekonvolviert, und die Peaks über die Gauß-Funktion integriert. Die AMPylierung wurde über die Fläche des unAMPylierten Peptids berechnet. Wenn angegeben, wurden Messungen in Triplikaten durchgeführt. Wenn angeführt, repräsentieren Daten den Mittelwert mit Standardabweichung als Fehlerbalken. Reaktionsgeschwindigkeiten wurden durch lineare Regression des linearen Anfangsbereichs verglichen und mit GraphPad Prism 4.0 aufbereitet.

Tabelle 17: Randomisierte DNA Oligonukleotide zur Verwendung als Co-Substrat für CbFic2

Länge in bp	GC-Gehalt	Sequenz fw	Sequenz rv
20 bp	40 %	AGTTTAGTGCCTAATCTGA	TCAGATTAGCGCACTAAACT
10 bp	40 %	TACGATGTAC	GTACATCGTA
5 bp	40 %	CATGT	ACATG
20 bp	60 %	ACGATGCGTCACCCGGTATG	CATACCGGGTGACGCATCGT
10 bp	60 %	GCACTCGGAT	ATCCGAGTGC
5 bp	60 %	CAGTG	CACTG
20 bp	20 %	CTATTCAAGATAATAAGTTT	AAACTTATTATCTTGAATAG
10 bp	20 %	ATATTGCATA	TATGCAATAT
5 bp	20 %	ATGTA	TACAT
11 bp	40 %	TTTAGTGCCT	AGCGCACTAAA
12 bp	40 %	TTTAGTGCCTA	TAGCGCACTAAA
13 bp	40 %	TTTAGTGCCTAA	TTAGCGCACTAAA
14 bp	40 %	TTTAGTGCCTAAT	ATTAGCGCACTAAA
15 bp	40 %	TTTAGTGCCTAATC	GATTAGCGCACTAAA
16 bp	40 %	TTTAGTGCCTAATCT	AGATTAGCGCACTAAA
17 bp	40 %	TTTAGTGCCTAATCTG	CAGATTAGCGCACTAAA
18 bp	40 %	TTTAGTGCCTAATCTGA	TCAGATTAGCGCACTAAA
19 bp	40 %	GTTTAGTGCCTAATCTGA	TCAGATTAGCGCACTAAAC
40 bp	40 %	TTGATTACCGTCAGTTGGAGC CCATATTATACATGAAGAC	GTCTTCATGTATAATATGGGCT CCAAGTACGGTAATCAA
60 bp	40 %	TCACTCAAGAAGCAGACACAG TAAGACACGGTTAGCTGATT GTTTATCGATTAGGTCAA	TTGACCTAATCGATAACAAT CAGCTAAACCGTGTCTTACTGT GTCTGCTTCTTGAGTGA

6.5.7 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

In einem finalen Ansatz von 5 µl/Well wurde TS-CbFic2 E66G in molaren Äquivalenten wie angegeben gegen eine gleichbleibende Menge von 40 ng 20 bp dsDNA 10 mM Tris pH 7,0, 1 mM EDTA; 100 mM KCl, 1 mM DTT, 5 % (v/v) Glycerol, 0,01 mg/ml BSA titriert.

Alle nicht-Protein-Komponenten wurden vermischt und auf Raumtemperatur gebracht, bevor das Protein zugegeben und das Gemisch für 60 min bei 20 °C inkubiert wurde.

PAGE Gele wurden unter Verwendung von 10x TAE-Puffer (400 mM Tris, 25 mM EDTA, pH 7,8) bzw. 4x Tris-Glycin Puffer (100 mM Tris-Base, 800 mM Glycin), einer Acrylamid/Bis Lösung 37.5:1 (30 % w/v); 2,6 % Crosslinker (Serva) und den Polymerisationsstartern 200x 10 % (w/v) Ammoniumsulfat und 2000x Tetramethylethylendiamin (TEMED) (VWR) in einem Mini Protean™ Tetra System (BioRad) gegossen. Vor Auftragung der Protein-DNA-Proben wurden die Gele mit 5 µl Ladepuffer (1 mM Tris, 0,1 mM EDTA, 5 % Glycerol, 0,0001 % (w/v) Bromphenolblau, 0,0001 % (w/v) Xylencyanol FF) beladen und mit 70 V/Gel für 60 min in 1x TAE bzw. 25 mM Tris, 200 mM Glycin pH 8,5 laufen gelassen. Anschließend wurden die Taschen

ausgewaschen, 5 µl des Protein-DNA Gemisches geladen, und das Gel bei 70 V/Gel für 2 h laufen gelassen. DNA wurde 1:10 000 mit GelStar (Lonza, Basel, Schweiz) gefärbt.

6.5.8 Fluoreszenzanisotropie

Tabelle 18: Oligonukleotide für Fluoreszenzanisotropie

Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{(260\text{ nm})}$ und molekulare Massen (MW) wurden mit dem IDT Oligo Analyzer (IDT) berechnet, unter Verwendung von 5'-6FAM als Label in Ermangelung von 5'-FITC.

Oligonukleotid	MW [Da]	$\epsilon_{(260\text{ nm})}$ [$\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$]	Hersteller
5'-FITC-20bp_40%GC_fw	6 715	217 760	Eurofins, Luxemburg
5'-FITC-40bp_40%GC_fw	12 836	416 060	Eurofins
5'-FITC-60bp_40%GC_fw	19 074	622 360	Eurofins
20bp_40%GC_rv	6 085	195 600	IDT
40bp_40%GC_rv	12 294	394 100	IDT
60bp_40%GC_rv	18 414	573 400	IDT

Die Oligonukleotide wurden bei Bedarf wie bereits beschrieben (6.5.1) hybridisiert. Die Konzentrationen aller verwendeten Proteine wurden mittels Bradford bestimmt. Alle Datenpunkte wurden in technischen Triplikaten mit dem Pipettierroboter epMotion 5075t (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in schwarzen low-binding, flat-bottom 384w Platten (Thermo Fisher Scientific) pipettiert. Pro Well wurden 20 µl 1 nM 5'-FITC gelabelte dsDNA oder ssDNA in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP vorgelegt. 20 µM bzw. 50 µM der angegebenen CbFic2-Version im gleichen Puffer dienten als Startpunkt einer Verdünnungsreihe um den Faktor 0,75 über 31 Datenpunkte. Der letzte Datenpunkt entspricht Puffer ohne Protein. Pro Triplikat wurden 10 µl der Verdünnungsreihe zum vorgelegten Liganden gegeben. Die Platte wurde für 10 min bei 25 °C inkubiert, bevor die Fluoreszenzanisotropie im Plattenleser Spark (Tecan, Männedorf, Schweiz) nach 10 s Orbitalschütteln mit einer Anregung bei 485 nm, Bandbreite 20 nm und einer Emission bei 535 nm, Bandbreite 25 nm, Gain 70 bei 25 °C gemessen wurde. Die technischen Triplikate wurden gemittelt und die Anisotropie jeweils auf den größten und kleinsten Wert je Datenset normiert. Die Standardabweichung wurde als Fehlerbalken abgebildet. Die Daten wurden für einzelne Bindungsereignisse mit dem „*Specific binding with Hill slope*“ Modell (3) in GraphPad Prism 4.0 gefittet, bei zwei Bindungsereignissen wurde das „*Two sites - Specific binding only*“ Modell (4) herangezogen.

Specific binding with Hill slope

$$Y = \frac{B_{\max} \times X^h}{Kd^h + X^h} \quad (3)$$

mit B_{\max} als Maximum der spezifischen Bindung in der gleichen Einheit wie Y, Kd als Konzentration des Liganden bei halb-maximaler Bindung in der gleichen Einheit wie X, h als Hill Slope und Indikator von Kooperativität.

Two sites - Specific binding only

$$Y = \frac{B_{max}^{Hi} \times X}{Kd^{Hi} + X} + \frac{B_{max}^{Lo} \times X}{Kd^{Lo} + X} \quad (4)$$

mit B_{max}^{Hi} und B_{max}^{Lo} als Maxima der spezifischen Bindungen an die zwei Bindungsstellen in der gleichen Einheit wie Y, Kd^{Hi} und Kd^{Lo} als entsprechende Gleichgewichtskonstanten in der gleichen Einheit wie X.

6.5.9 Enzymgebundener Immunsorbent Assay (ELISA)

0,2 mg/ml (25 μ M) TS-H3 1-36 aa wurden mit 5 μ M CbFic2 E66G, 5 μ M 20 bp dsDNA und 2 mM ATP in 20 mM HEPES pH 7,5, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 1 mM DTT bei 37 °C inkubiert, bis TS-H3 1-36 aa vollständig AMPyliert vorlag.

Der gesamte Assay, ausgenommen die Wasch-Schritte, wurden unter Verwendung des Pipettierroboters epMotion 5075t (Eppendorf) durchgeführt.

Strep-Tactin® XT beschichtete Microplatten (12 x 8-Well Streifen) (IBA, Göttingen, Deutschland) wurden mit 0,001 mg/ml TS-H3 1-36 aa –AMP in 200 μ l/Well TBS-T für 2 h bei RT beschichtet, und anschließend 3-mal mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Platte über Nacht bei 4 °C mit 200 μ l/Well 1x Roti-Block (Roth) in TBS-T blockiert. Platte wurde 3-mal mit TBS-T gewaschen, und anschließend je in technischen Duplikaten mit 100 μ l/Well 0,5 μ M CbFic2 WT oder CbFic2 E66G in An- und Abwesenheit von 0,5 μ M 20 bp dsDNA und An- und Abwesenheit von 1 mM ATP in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM TCEP bei 37 °C abgeklebt inkubiert. Zeitpunkte wurden genommen, indem ein ganzer 8w-Streifen entnommen, 3-mal mit TBS-T gewaschen und in TBS-T auf 4 °C gelagert wurde. Anschließend wurden alle Streifen gleichzeitig mit 100 μ l/Well anti-AMP-Antikörper 17G6 1:5000 (100 ng/ml) in 1x Roti-Block, TBS-T über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde 3-mal mit TBS-T gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit 100 μ l/Well sekundärem Ziegen-Anti-Maus-IgG (H+L) HRP-Konjugat (Thermo Fisher Scientific) 1:10000 in TBS-T inkubiert, und erneut 3-mal mit TBS-T gewaschen. Platten wurden anschließend für 5 min mit 100 μ l/Well 1-Step™ Slow TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific) inkubiert, die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 100 μ l/Well 2 M H_2SO_4 gestoppt. Die Absorption bei 450 nm wurde mit dem Plattenleser Spark (Tecan) gemessen. Mittelwerte der technischen Duplikate wurden auf den Wert bei 0 min (höchster Wert) normiert. Mittelwerte und die Standardabweichung als Fehlerbalken wurden mittels GraphPad Prism 4.0 abgebildet.

6.5.10 Thermal Shift Assay (TSA)

Die Proben wurden in dem Real Time PCR-Cycler Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit einem Heizprofil von 25-95 °C bei einer Geschwindigkeit von 1 °C/min erwärmt und die

Fluoreszenz bei 465 nm angeregt und die Emission bei 590 nm gemessen. Die Schmelztemperatur als Wendepunkt der Fluoreszenzzunahme nach thermischer Proteinfaltung durch Bindung von SYPRO™ Orange (Sigma-Aldrich) an exponierte hydrophobe Bereiche wurde im Nullpunkt der zweiten Ableitung einer jeden Schmelzkurve bestimmt. Bei Einfachmessungen wurde jeder Wert allein, bei Triplikaten der Mittelwert mit Standardabweichung als Fehlerbalken mit GraphPad Prism 4.0 aufgetragen.

Puffer Optimierung

In einer 0,2 ml 96w-PCR-Platte wurden pro Well in einem Gesamtvolumen von 10 µl 4 µg TS-CbFic2 E66G, 10x SyproOrange in 20 mM HEPES pH 7,0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT vorgelegt. Anschließend wurde wie angegeben 10 µl 2x Puffer zugegeben, die Platte abzentrifugiert und wie angegeben gemessen.

DNA-Bindung

In technischen Triplikaten wurde in einer 0,2 ml 96w-PCR-Platte pro Well in einem Gesamtvolumen von 20 µl 4 µg (4 µM) TS-CbFic2 E66G oder 2 µg Rab1b, 5x SyproOrange in 20 mM HEPES pH 7,0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT in An- und Abwesenheit von je 4 µM 20 bp dsDNA und 4 µM TS-H3 1-36 aa nach Zentrifugation wie angegeben gemessen

6.6 anti-AMP-Antikörper spezifische Methoden¹

6.6.1 Festphasenpeptidsynthese (SPPS)ⁱ

Die Peptide S2 und S3 (Abbildung S 1, Abbildung S 2) wurden auf einem MultiSyntech Syro I automatisierten Peptidsynthesizer unter Verwendung von Tentagel Rink-Amid-Harz als Festphase unter Verwendung von 8 Äquivalenten Aminosäure und 7,8 Äquivalenten HBTU, 7,8 Äquivalenten HOBt und 16 Äquivalenten DIPEA in DMF synthetisiert. Der Threonin-AMP-Baustein S1 (Smit et al., 2011) wurde wie unten beschrieben manuell gekoppelt. Das Harz wurde durch Behandlung mit DCM (15 min) vorgequollen. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch Behandlung mit 2-mal 3 min, gefolgt von 1-mal 9 min 20 vol % Piperidin in DMF. Das Harz wurde 3-mal mit DMF gewaschen. Der Baustein S1 (1,7 Äquivalente) wurde mit 1,6 Äquivalenten HATU, 1,6 Äquivalenten HOAt und 3,5 Äquivalenten DIPEA in DMF gekoppelt. Die Kupplungsreaktion wurde für 4 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Das N-terminale Acetyl-Capping wurde durch Zugabe von 50 Äquivalenten Essigsäureanhydrid und 50 Äquivalenten DIPEA in NMP zum Harz erreicht (1 h), gefolgt von Waschen mit DMF. Vor der Spaltung wurde das Harz gründlich mit DCM (5-mal), Isopropanol (5-mal) und Diethylether (5-mal) gewaschen. Die Peptide wurden mit 5 % TIPS und 5 % Wasser in TFA gespalten (1 x 2 h + 2 x 10 min). Den vereinigten TFA-Fractionen wurde zusätzlich 10 % Wasser zugesetzt und eine Stunde lang inkubiert, um eine vollständige Hydrolyse des Acetonidanteils zu gewährleisten. Das Spaltgemisch wurde im Vakuum zur Trocknung eingedampft. Der resultierende Feststoff wurde in einem Minimum an TFA gelöst

und durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Diethylether ausgefällt. Das Präzipitat wurde in Wasser/Acetonitril gelöst und anschließend über Nacht lyophilisiert. Reine Peptide wurden nach der Aufreinigung durch präparative HPLC erhalten. Präparative HPLC-Aufreinigungen der Peptide wurden mit einem Agilent 1260 Infinity Series Gerät durchgeführt, das mit einer Phenomenex Luna (5 μ M, C18(2) 100 Å, 250 x 21,2 mm) Säule ausgestattet war. Die verwendeten mobilen Phasen waren Wasser mit 0,1 % TFA (Eluent A) und Acetonitril mit 0,1 % TFA (Eluent B). Die analytische HRMS-HPLC wurde auf einem Gerät der Serie Agilent 1290 Infinity II durchgeführt, das mit einer Agilent Extend (1,8 μ M, C18, 100 Å, 50 x 2,1 mm) Säule ausgestattet und mit einem Agilent 6230 TOF LC/MS Gerät verbunden war. Die verwendeten mobilen Phasen waren Wasser mit 0,1 % FA (Eluent A) und Acetonitril mit 0,1 % FA (Eluent B).

6.6.2 Präparation des Immunogens (GenScript)

Das Peptid S2 (ACNH-CGAGT(AMP)GAG-NH₂) wurde mit KLH und BSA als Immunogen über sein N-terminales Cystein konjugiert.

6.6.3 Phase I: Immunisierung (GenScript)

3 BALB/c- und 2 C57 BL/6-Mäuse wurden entweder mit S2 konjugiert mit KLH (Gruppe A, BALB/c-Mäuse #8534 - #8536 und C57 BL/6-Mäuse #8537 - #8538) oder BSA (Gruppe B, BALB/c-Mäuse #8539 - #8541 und C57 BL/6-Mäuse #8542 - #8543) immunisiert, entsprechend dem konventionellen Protokoll von GenScript (Tabelle 19), was insgesamt 10 immunisierte Mäuse ergab.

Tabelle 19: Konventionelles Immunisierungsprotokoll von GenScript

Insgesamt 10 Mäuse, je 2-mal 3 BALB/c- und 2 C57 BL/6-Mäuse, wurden entweder mit KLH-CGAGT(AMP)GAG-NH₂ oder BSA-CGAGT(AMP)GAG-NH₂ immunisiert.

Prozedur	Zeitplan	Dosierung und Verabreichung	Adjuvant
Vor-Immun-Blutung	t = - 4 Tage		
Primäre Immunisierung	t = 0 Tage	50 μ g /Tier, i.p.	CFA
Boost 1	t = 14 Tage	25 μ g / Tier, i.p.	IFA
Test-Blutung 1	t = 21 Tage		
Boost 2	t = 28 Tage	25 μ g / Tier, i.p.	IFA
Test-Blutung 2	t = 35 Tage		
Finaler Boost	t = 50 \pm 7 Tage	25 μ g / Tier, i.p.	IFA
Zell-Fusion	4 Tage nach finalem Boost		

Testblutung: 7 Tage nach jedem Immunisierungs-Boost wurden immunisierte Tierseren mittels indirektem ELISA und kompetitivem ELISA auf Immunantwort von GenScript getestet. Die WB-Auswertung von Vor-Immun-Seren und Seren nach der 3. Immunisierung gegen 200 ng gereinigtes Protein/Spur mit einer 1:1000-Verdünnung wurde wie beschrieben in-house

durchgeführt. Die Tiere #8538 (Gruppe A) und #8542 (Gruppe B), beide C57 BL/6-Mäuse, wurden für Phase II ausgewählt (Abbildung S 3).

6.6.4 Phase II: Zellfusion und Screening (GenScript)

Für die Zellfusion und Ausplattierung der Klone wurden zwei Fusionen durch Elektrofusion durchgeführt. Die durchschnittliche Fusionseffizienz bei GenScript ist etwa 1 Hybridom/2000 Splenozyten, damit wären die erwarteten Hybridomklone $\sim 2 \times 10^4$. Alle fusionierten Zellen von jeder Zellfusion wurden in 96-Well-Platten plattiert. Bis zu 15 Platten wurden für jede Fusion verwendet. Für das primäre Binder-Screening wurde das konditionierte Medium mittels ELISA mit dem Zielpeptid gescreent. Beim Bestätigungsscreening wurde das konditionierte Medium der für das primäre Binderscreening positiven Klone gegen das positive Screeningmaterial (Cdc42-Thr-AMP) und das Gegenscreeningmaterial (Cdc42) gescreent. Die erwarteten Klone sollten positiv gegen die Zielpeptide und das positive Screeningmaterial sein, während sie negativ gegen das negative Peptid und das Gegenscreeningmaterial sein sollten. Für die Klonexpansion und das Einfrieren wurden 10 positive Klone in 24-Well-Platten expandiert. 2 ml Überstand (konditioniertes Medium) wurden für jeden Klon gesammelt und die Zellen wurden eingefroren, um Klonverluste zu vermeiden (GenScript). Die konditionierten Medien aller 10 positiven Klone wurden in-house mittels WB gegen 200 ng gereinigtes Protein/Linie unter Verwendung einer 1:10-Verdünnung wie beschrieben analysiert. Die Klone 17G6 (#8542), 1G11 und 7C11 (#8538) wurden für Phase III ausgewählt (Abbildung S 3).

6.6.5 Phase III: Subklonierung, Screening, Expansion (GenScript)

Für die Subklonierung wurden 3 positive primäre Klone durch limitierende Verdünnung subkloniert, um sicherzustellen, dass die Subklone von einer einzigen parentalen Zelle abgeleitet sind. Die Klone wurden für maximal 3 Generationen getragen. Die Subklonierung wurde wie zuvor mittels ELISA gescreent. Für die Kryokonservierung von Monoklonen wurden zwei stabile subklonale Zelllinien jedes elterlichen Klons, basierend auf dem Ergebnis des ELISA (GenScript), für die Kryokonservierung ausgewählt. Positive Zellüberstände wurden mittels WB gegen 200 ng gereinigtes Protein/Spur unter Verwendung einer 1:10-Verdünnung intern wie beschrieben ausgewertet. Die stabilen subklonalen Zelllinien 17G6-1 (Isotyp IgG2b, κ), 1G11-F3-3 (Isotyp IgG2b, κ) und 7C11-1 (Isotyp IgG2a, κ) wurden für die Produktion ausgewählt und isotypisiert, und die Zelllinien sowohl bei GenScript und als auch in-house gelagert. Sie wurden mit dem PCR-Mykoplasmen-Detektionsset (TAKARA BIO INC, Kusatsu, Japan) negativ auf Mykoplasmen getestet.

6.6.6 Sequenzierung der variablen Antikörper-Domäne (GenScript)

Die RNA wurde aus gefrorenen Hybridomazell-Lysaten gemäß der technischen Anleitung des TRIzol®-Reagens (Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc.) isoliert. Die RNA wurde dann unter Verwendung von Isotyp-spezifischen Anti-Sense-Primern oder universellen Primern gemäß der technischen Anleitung des PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Kusatsu, Japan) in cDNA revers transkribiert. Die Antikörperfragmente von V_H und V_L wurden gemäß der *Standard Operating Procedure* (SOP) der *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) von GenScript amplifiziert. Amplifizierte Antikörperfragmente wurden separat in einen Standard-Klonierungsvektor kloniert. Die Kolonie-PCR wurde durchgeführt, um nach Klonen mit Inserts der richtigen Größe zu screenen. Nicht weniger als fünf Kolonien mit Inserts der korrekten Größe wurden für jedes Fragment sequenziert. Die Sequenzen verschiedener Klone wurden aligniert und die Konsensussequenzen dieser Klone wurden bereitgestellt (GenScript) (8.1.3).

6.6.7 anti-AMP-Antikörper-Produktion (GenScript)

Drei stabile subklonale Zelllinien wurden jeweils in 11 Rollerflaschen-Zellkultur unter Verwendung von SFM + 2 % low IgG FBS-Nährmedium kultiviert. Der monoklonale Antikörper wurde aus dem Überstand über Protein A gereinigt und in PBS, pH 7,4 mit 0,02 % Natriumazid als Konservierungsmittel gelagert. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE und die Konzentration mittels NanoDrop-Spektrophotometer A280nm (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) gemessen (GenScript). Auf diese Weise wurden 36,38 mg 7C11 mit 95 % Reinheit, 17,10 mg 17G6 mit 91 % Reinheit und 30,99 mg 1G11 mit 92 % Reinheit hergestellt.

6.6.8 *In vitro* Modifikation rekombinanter Proteine für WB-Analysen

In vitro AMPylierung von rekombinanten Proteinen

Für Cdc42-Thr-AMP wurden 200 µM Cdc42 mit 10 µM VopS in Gegenwart von 800 µM ATP in 20 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTE bei 20 °C über Nacht inkubiert. Für Cdc42-Tyr-AMP wurden 10 µM Cdc42 mit 0,1 µM IbpA in Anwesenheit von 1 mM ATP in 20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP, 10 µM GDP bei 20 °C über Nacht inkubiert. Für Rab1-Tyr-AMP wurden 10 µM Rab1b in Gegenwart von 50 µM ATP und 0,1 µM DrrA bei 25 °C inkubiert, wie zuvor beschrieben (Müller et al., 2010). AMPyliertes Cdc42 und Rab1b wurden durch Größenausschlusschromatographie auf einer HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75pg-Säule (GE Healthcare) in 20 mM HEPES pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTE, 10 µM GDP gereinigt und die vollständige AMPylierung wurde durch MS bestätigt. Für H3-Thr-AMP und autoAMPyliertes FICD wurden 30 µM H3.1 mit 25 µM FICD in Gegenwart von 10 mM ATP in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT bei 20 °C über Nacht inkubiert. Für BiP-Thr-AMP wurden 50 µM BiP mit 2,5 µM FICD in Gegenwart von

1,5 mM ATP in 25 mM HEPES pH 7,4, 100 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ für 2 h bei 30 °C inkubiert. BiP-AMP wurde mit Protino™ NiNTA Agarose (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) in den zuvor aufgelisteten Puffern gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt.

***In vitro* NMPylierung von Cdc42 durch IbpAⁱⁱ**

10 µM Cdc42 wurden mit 0,1 µM IbpA in Gegenwart von 0,5 mM entweder CTP, UTP, TTP, GTP, N6pATP (Jena Bioscience) und 2'-Azido-2'-dATP (TriLink BioTechnologies, San Diego, USA) in 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM TCEP, 10 µM GDP bei 20 °C über Nacht inkubiert. Die erfolgreiche NMPylierung wurde durch MS bestätigt (Abbildung S 4).

***In vitro* Auto-Mono-ADP-Ribosylierung von PARP3**

500 ng PARP-3 (Sigma-Aldrich) wurden bei 25 °C in einem Reaktionsvolumen von 100 µl in 20 mM HEPES pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 0,01 % NP-40, 25 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml *Salmon sperm*-DNA (Thermo Fisher Scientific), 0,1 mg/ml BSA (NEB) in Gegenwart von 250 µM NAD⁺ für 30 min inkubiert, wie zuvor veröffentlicht (Gibson et al., 2017). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5x Laemmli gestoppt, gefolgt von einer Erwärmung auf 95 °C für 5 min.

***In vitro* Phosphocholinierung von Rab1b durch AnkXⁱⁱⁱ**

10 µM Rab1b wurde mit 0,1 µM AnkX in Gegenwart von 1 mM CDP-Cholin (Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA) für 2 h bei 23 °C inkubiert, wie zuvor veröffentlicht (Goody et al., 2012). Der Einbau der Phosphocholinierung wurde mittels MS bestätigt.

***In vitro* Biotinylierung von Rab8a**

200 mM EZ-Link® Maleimide-PEG2-Biotin (Thermo Fisher Scientific) Stammlösung in DMSO wurde 1:10 in 1x PBS auf eine Endkonzentration von 20 mM Maleimide-PEG2-Biotin verdünnt. 200 µM Maleimide-PEG2-Biotin wurden zu 100 µM Rab8a in PBS für 2 h auf Eis gegeben, bevor Rab8a in einem Amicon-Filter (Merck Millipore, 10 kDa MWCO) 3-mal mit PBS gewaschen wurde. Der Einbau der Biotinylierung wurde mittels MS bestätigt.

6.6.9 Analytische Größenausschlusschromatographie (aSEC)

In 100 µl wurden 40 µg Antigen mit 60 µg Antikörper gemischt, darunter 50 µM Vitamin B₁₂ als interner Standard. 90 µl Probe wurden auf eine Superdex 10/300 200pg-Säule (GE Healthcare) injiziert, die an ein Prominence HPLC-System (Shimadzu, Kyōto, Japan) gekoppelt war, und bei 0,5 ml/min für 60 min in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl betrieben. Protein-Retentionszeiten wurden bei 280 nm (A280nm) detektiert und die Intensitäten wurden auf Vitamin B₁₂ normiert. Peaks, die Antigen-Antikörper-Komplexe enthielten, wurden in 500 µl Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden mit 6x Laemmli versetzt und in einem SpeedVac alpha RVC (Christ) ohne Hitze auf 200 µl konzentriert. 10 µl konzentrierte Fraktionen wurden mittels 15 % SDS PAGE analysiert und Silber-gefärbt.

7 Literaturverzeichnis

- Adams, J.A., McGlone, M.L., Gibson, R., Taylor, S.S., 1995. Phosphorylation Modulates Catalytic Function and Regulation in the cAMP-Dependent Protein Kinase. *Biochemistry* 34, 2447–2454.
- Ahmad, K., Henikoff, S., 2002. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* 9, 1191–1200.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Albers, M.F., Van Vliet, B., Hedberg, C., 2011. Amino acid building blocks for efficient Fmoc solid-phase synthesis of peptides adenylylated at serine or threonine. *Org. Lett.* 13, 6014–6017.
- Anderson, B.J., Larkin, C., Guja, K., Schildbach, J.F., 2008. Using Fluorophore-Labeled Oligonucleotides to Measure Affinities of Protein-DNA Interactions. *Methods Enzymol.* 450, 253–272.
- Andrabi, M., Mizuguchi, K., Ahmad, S., 2014. Conformational changes in DNA-binding proteins: Relationships with precomplex features and contributions to specificity and stability. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 82, 841–857.
- Anest, V., Hanson, J.L., Cogswell, P.C., Steinbrecher, K.A., Strahl, B.D., Baldwin, A.S., 2003. A nucleosomal function for *ikb* kinase- α in *nf- κ b*-dependent gene expression. *Nature* 423, 659–663.
- Angelov, D., Molla, A., Perche, P.Y., Hans, F., Côté, J., Khochbin, S., Bouvet, P., Dimitrov, S., 2003. The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol. Cell* 11, 1033–1041.
- 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, 231–262.
- 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- κ B to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nat. Immunol.* 8, 47–56.
- Archuleta, A.J., Stutzke, C.A., Nixon, K.M., Browning, M.D., 2011. Optimized Protocol to Make Phospho-Specific Antibodies that Work, in: Alexander E. Kalyuzhny (Ed.), *Signal Transduction Immunohistochemistry: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* Springer Science+Business Media, pp. 69–88.
- Armache, A., Yang, S., Martínez de Paz, A., Robbins, L.E., Durmaz, C., Cheong, J.Q., Ravishankar, A., Daman, A.W., Ahimovic, D.J., Klevorn, T., Yue, Y., Arslan, T., Lin, S., Panchenko, T.,

- Hrit, J., Wang, M., Thudium, S., Garcia, B.A., Korb, E., Armache, K.J., Rothbart, S.B., Hake, S.B., Allis, C.D., Li, H., Josefowicz, S.Z., 2020. Histone H3.3 phosphorylation amplifies stimulation-induced transcription. *Nature* 583, 852–857.
- Arni, S., Le, T.H.N., de Wijn, R., Garcia-Villegas, R., Dankers, M., Weder, W., Hillinger, S., 2017. Ex vivo multiplex profiling of protein tyrosine kinase activities in early stages of human lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 8, 68599–68613.
- Baca, O.G., Klassen, D.A., Aragon, A.S., 1993. Entry of *Coxiella burnetii* into host cells. *Acta Virol.* 37, 143–155.
- Baca, O.G., Scott, T.O., Akporiaye, E.T., DeBlassie, R., Crissman, H.A., 1985. Cell cycle distribution patterns and generation times of L929 fibroblast cells persistently infected with *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* 47, 366–369.
- Baker, M., 2015. Blame it on the antibodies. *Nature* 521, 274–276.
- Banga, S., Gao, P., Shen, X., Fiscus, V., Zong, W.-X., Chen, L., Luo, Z.-Q., 2007. *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 5121–5126.
- Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R., 1994. COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77, 895–907.
- Barthelmes, K., Ramcke, E., Kang, H.S., Sattler, M., Itzen, A., 2020. Conformational control of small GTPases by AMPylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 5772–5781.
- 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., 2011a. Dot/Icm type IVB secretion system requirements for *coxiella burnetii* growth in human macrophages. *MBio* 2, e00175-11.
- Beare, P.A., Howe, D., Cockrell, D.C., Omsland, A., Hansen, B., Heinzen, R.A., 2009. Characterization of a *Coxiella burnetii* *ftsZ* mutant generated by Himar1 transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.* 191, 1369–1381.
- Beare, P.A., Larson, C.L., Gilk, S.D., Heinzen, R.A., 2012. Two systems for targeted gene deletion in *Coxiella burnetii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4580–4589.
- Beare, P.A., Sandoz, K.M., Omsland, A., Rockey, D.D., Heinzen, R.A., 2011b. Advances in genetic manipulation of obligate intracellular bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 2, 97.
- Benecke, A.G., Eilebrecht, S., 2015. RNA-mediated regulation of HMGA1 function. *Biomolecules* 5, 943–957.
- Bernhards, R.C., Xing, J., Vogelaar, N.J., Robinson, H., Schubot, F.D., 2009. Structural evidence suggests that antiactivator ExsD from *Pseudomonas aeruginosa* is a DNA binding protein. *Protein Sci.* 18, 503–513.

- Bhogaraju, S., Kalayil, S., Liu, Y., Bonn, F., Colby, T., Matic, I., Dikic, I., 2016. Phosphoribosylation of Ubiquitin Promotes Serine Ubiquitination and Impairs Conventional Ubiquitination. *Cell* 167, 1636-1649.e13.
- Bredehorst, R., Ferro, A.M., Hilz, H., 1978. Production of Antibodies against ADP-ribose and 5'-AMP with the Aid of N6-Carboxymethylated ADP-ribose Conjugates. *Eur. J. Biochem.* 82, 105–113.
- Brennan, M.A., Cookson, B.T., 2000. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol. Microbiol.* 38, 31–40.
- Brennan, R.G., Matthews, B.W., 1989. The Helix-Turn-Helix DNA Binding Motif. *J. Biol. Chem.* 264, 1903–1906.
- Briassouli, P., Chan, F., Savage, K., Reis-Filho, J.S., Linardopoulos, S., 2007. Aurora-A regulation of nuclear factor- κ B signaling by phosphorylation of I κ B α . *Cancer Res.* 67, 1689–1695.
- Brough, D., Rothwell, N.J., 2007. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 β is cytosolic and precedes cell death. *J. Cell Sci.* 120, 772–781.
- 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, 1831–1843.
- Burette, M., Allombert, J., Lambou, K., Maarifi, G., Nisole, S., Di Russo Case, E., Blanchet, F.P., Hassen-Khodja, C., Cabantous, S., Samuel, J., Martinez, E., Bonazzi, M., 2020. Modulation of innate immune signaling by a *Coxiella burnetii* eukaryotic-like effector protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 13708–13718.
- Burgess, R.R., 1991. Use of Polyethyleneimine in Purification of DNA-Binding Proteins. *Methods Enzymol.* 208, 3–10.
- Cai, Z.L., Shen, B., Yuan, Y., Liu, C., Xie, Q.W., Hu, T.T., Yao, Q., Wu, Q.Q., Tang, Q.Z., 2020. The effect of HMGA1 in LPS-induced myocardial inflammation. *Int. J. Biol. Sci.* 16, 1798–1810.
- Calzuola, I., Gianfranceschi, G.L., Marsili, V., 2000. Binding citrate/DNA in presence of divalent cations. Potential mimicry of acidic peptides/DNA interactions. *Mol. Biol. Rep.* 28, 43–46.
- Cao, X., 2016. Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 35–50.
- Carey, K.L., Newton, H.J., Lührmann, 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.
- Casey, A.K., Moehlman, A.T., Zhang, J., Servage, K.A., Krämer, X.H., Orth, X.K., 2017. Fic-mediated deAMPylation is not dependent on homodimerization and rescues toxic AMPylation in flies. *J. Biol. Chem.* 292, 21193–21204.
- Casey, A.K., Orth, K., 2018. Enzymes Involved in AMPylation and deAMPylation. *Chem. Rev.*

- 118, 1199–1215.
- Cassimeris, L., 2002. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 18–24.
- Chakravarthy, S., Gundimella, S.K.Y., Caron, C., Perche, P.-Y., Pehrson, J.R., Khochbin, S., Luger, K., 2005. Structural Characterization of the Histone Variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7616–7624.
- Chambers, K.A., Scheck, R.A., 2020. Bacterial virulence mediated by orthogonal post-translational modification. *Nat. Chem. Biol.* 16, 1043–1051.
- Charpentier, X., Oswald, E., 2004. Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 β -lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J. Bacteriol.* 186, 5486–5495.
- Chauhan, K., Kalam, H., Dutt, R., Kumar, D., 2019. RNA Splicing: A New Paradigm in Host–Pathogen Interactions. *J. Mol. Biol.* 431, 1565–1575.
- 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.
- Cichy, A.L., 2016. Untersuchungen zur Substratidentifizierung von Fic-Proteinen aus *Coxiella burnetii* und *Legionella longbeachae*. Technische Universität München.
- Clemente, T.M., Mulye, M., Justis, A. V., Nallandhighal, S., Tran, T.M., Gilk, S.D., 2018. *Coxiella burnetii* blocks intracellular interleukin-17 signaling in macrophages. *Infect. Immun.* 86, e00532-18.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Howe, D., Mead, D.J., Heinzen, R.A., 2004. Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. *J. Bacteriol.* 186, 7344–7352.
- 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 Struct. Funct. Bioinforma.* 75, 264–271.
- Dawicki-McKenna, J.M., Langelier, M.F., DeNizio, J.E., Riccio, A.A., Cao, C.D., Karch, K.R., McCauley, M., Steffen, J.D., Black, B.E., Pascal, J.M., 2015. PARP-1 Activation Requires Local Unfolding of an Autoinhibitory Domain. *Mol. Cell* 60, 755–768.
- 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, 13286–13300.
- Dephoure, N., Zhou, C., Villén, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., Gygi, S.P., 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10762–10767.
- Derrick, E.H., 1937. “Q” Fever, a New Fever Entity: Clinical Features, Diagnosis and Laboratory Investigation. *Med. J. Aust.* 2, 281-299 pp.
- Ding, L., Gu, H., Gao, X., Xiong, S., Zheng, B., 2015. Aurora Kinase A Regulates M1 Macrophage Polarization and Plays a Role in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Inflammation* 38, 800–811.
- Dong, W., Hamon, M.A., 2020. Revealing eukaryotic histone-modifying mechanisms through bacterial infection. *Semin. Immunopathol.* 42, 201–213.
- Dong, W., Rasid, O., Chevalier, C., Connor, M., Eldridge, M.J.G., 2020. *Streptococcus pneumoniae* Infection Promotes Histone H3 Dephosphorylation by Modulating Host PP1 Phosphatase. *Cell Rep.* 30, 4016-4026.e4.
- Donnelly, M.L.L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L.E., Gani, D., Ryan, M.D., 2001. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein “cleavage” mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: A putative ribosomal “skip.” *J. Gen. Virol.* 82, 1013–1025.
- Doyen, C.-M., An, W., Angelov, D., Bondarenko, V., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P., Dimitrov, S., 2006. Mechanism of Polymerase II Transcription Repression by the Histone Variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1156–1164.
- Dresler, J., Klimentova, J., Pajer, P., Salovska, B., Fucikova, A.M., Chmel, M., Schmoock, G., Neubauer, H., Mertens-Scholz, K., 2019. Quantitative Proteome Profiling of *Coxiella burnetii* Reveals Major Metabolic and Stress Differences Under Axenic and Cell Culture Cultivation. *Front. Microbiol.* 10, 2022.
- Edgerton, H., Johansson, M., Keifenheim, D., Mukherjee, S., Chacón, J.M., Bachant, J., Gardner, M.K., Clarke, D.J., 2016. A noncatalytic function of the topoisomerase II CTD in Aurora B recruitment to inner centromeres during mitosis. *J. Cell Biol.* 213, 651–664.
- Edmunds, J.W., Mahadevan, L.C., Clayton, A.L., 2008. Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *EMBO J.* 27, 406–420.
- Egelhofer, T.A., Minoda, A., Klugman, S., Lee, K., Kolasinska-Zwierz, P., Alekseyenko, A.A., Cheung, M.S., Day, D.S., Gadel, S., Gorchakov, A.A., Gu, T., Kharchenko, P. V., Kuan, S., Latorre, I., Linder-Basso, D., Luu, Y., Ngo, Q., Perry, M., Rechtsteiner, A., Riddle, N.C., Schwartz, Y.B., Shanower, G.A., Vielle, A., Ahringer, J., Elgin, S.C.R., Kuroda, M.I., Pirrotta, V., Ren, B., Strome, S., Park, P.J., Karpen, G.H., Hawkins, R.D., Lieb, J.D., 2011.

- An assessment of histone-modification antibody quality. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 91–94.
- Eiting, M., Hagelüken, G., Schubert, W.-D., Heinz, D.W., 2005. The mutation G145S in PrfA, a key virulence regulator of *Listeria monocytogenes*, increases DNA-binding affinity by stabilizing the HTH motif. *Mol. Microbiol.* 56, 433–446.
- Engel, P., Goepfert, A., Stanger, F. V., Harms, A., Schmidt, A., Schirmer, T., Dehio, C., 2012. Adenylation control by intra- or intermolecular active-site obstruction in Fic proteins. *Nature* 482, 107–110.
- Ernst, S., Ecker, F., Kaspers, M.S., Ochtrop, P., Hedberg, C., Groll, M., Itzen, A., 2020. *Legionella* effector AnkX displaces the switch II region for Rab1b phosphocholination. *Sci. Adv.* 6, eaaz8041.
- Escargueil, A.E., Plisov, S.Y., Filhol, O., Cochet, C., Larsen, A.K., 2000. Mitotic phosphorylation of DNA topoisomerase II α by protein kinase CK2 creates the MPM-2 phosphoepitope on Ser-1469. *J. Biol. Chem.* 275, 34710–34718.
- Fink, S.L., Cookson, B.T., 2006. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *J. Immunol.* 202, 1913–1926.
- Finlay, B.B., McFadden, G., 2006. Anti-immunology: Evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* 124, 767–782.
- 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, 30821–30827.
- Garcia-Pino, A., Zenkin, N., Loris, R., 2014. The many faces of Fic: structural and functional aspects of Fic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 39, 121–129.
- Ge, J., Xu, H., Li, T., Zhou, Y., Zhang, Z., Li, S., Liu, L., Shao, F., 2009. A *Legionella* type IV effector activates the NF-kappaB pathway by phosphorylating the IkappaB family of inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 13725–13730.
- Gibson, B.A., Conrad, L.B., Huang, D., Kraus, W.L., 2017. Generation and Characterization of Recombinant Antibody-like ADP-Ribose Binding Proteins. *Biochemistry* 56, 6305–6316.
- Giet, R., Glover, D.M., 2001. *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Biol.* 152, 669–681.
- Gilmore, T.D., Gerondakis, S., 2011. The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. *Genes and Cancer* 2, 695–711.
- 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.
- Goody, P.R., Heller, K., Oesterlin, L.K., Müller, M.P., Itzen, A., Goody, R.S., 2012. Reversible phosphocholination of Rab proteins by *Legionella pneumophila* effector proteins. *EMBO J.* 31, 1774–1784.

- Grammel, M., Hang, H., Conrad, N.K., 2012. Chemical Reporters for Monitoring RNA Synthesis and Poly(A) Tail Dynamics. *ChemBioChem* 13, 1112–1115.
- Grammel, M., Luong, P., Orth, K., Hang, H.C., 2011. A Chemical Reporter for Protein AMPylation. *J Am Chem Soc* 133, 17103–17105.
- Gu, W., Roeder, R.G., 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595–606.
- Gulen, B., Rosselin, M., Fauser, J., Albers, M.F., Pett, C., Krisp, C., Pogenberg, V., Schlüter, H., Hedberg, C., Itzen, A., 2020. Identification of targets of AMPylating Fic enzymes by co-substrate-mediated covalent capture. *Nat. Chem.* 12, 732–739.
- Ha, T.K., Hansen, A.H., Kildegaard, H.F., Lee, G.M., 2019. BiP Inducer X: An ER Stress Inhibitor for Enhancing Recombinant Antibody Production in CHO Cell Culture. *Biotechnol. J.* 14, 1900130.
- Hackstadt, T., 1996. Biosafety concerns and *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.* 4, 341–342.
- Hake, S.B., Garcia, B.A., Kauer, M., Baker, S.P., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Allis, C.D., 2005. Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6344–6349.
- Ham, H., Woolery, A.R., Tracy, C., Stenesen, D., Krämer, 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.
- Hamon, M.A., Batsché, E., Régnault, B., To, N.T., Seveau, S., Muchardt, C., Cossart, P., 2007. Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13467–13472.
- Hao, Y.-H.H., Chuang, T., Ball, H.L., Luong, P., Li, Y., Flores-Saaib, R.D., Orth, K., 2011. Characterization of a rabbit polyclonal antibody against threonine-AMPylation. *J. Biotechnol.* 151, 251–254.
- Hattori, T., Koide, S., 2018. Next-generation antibodies for post-translational modifications. *Curr. Opin. Struct. Biol.*
- Hedberg, C., Itzen, A., 2015. Molecular perspectives on protein adenylation. *ACS Chem. Biol.* 10, 12–21.
- Heilig, R., Broz, P., 2018. Function and mechanism of the pyrin inflammasome. *Eur. J. Immunol.* 48, 230–238.
- Heinzen, R.A., Scidmore, M.A., Rockey, D.D., Hackstadt, T., 1996. Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 64, 796–809.
- Henzel, 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, 348–360.
- Hoffmann, C., Finsel, I., Otto, A., Pfaffinger, G., Rothmeier, E., Hecker, M., Becher, D., Hilbi, H., 2014. Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified Legionella-containing vacuoles from macrophages. *Cell. Microbiol.* 16, 1034–1052.
- Hoover, T.A., Culp, D.W., Vodkin, M.H., Williams, J.C., Thompson, H.A., 2002. Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the *Coxiella burnetii* Nine Mile strain. *Infect. Immun.* 70, 6726–6733.
- Höpfner, D., Fauser, J., Kaspers, M.S., Pett, C., Hedberg, C., Itzen, A., 2020. Monoclonal Anti-AMP Antibodies Are Sensitive and Valuable Tools for Detecting Patterns of AMPylation. *iScience* 23, 101800.
- Howe, D., Shannon, J.G., Winfree, S., Dorward, D.W., Heinzen, R.A., 2010. *Coxiella burnetii* phase I and II variants replicate with similar kinetics in degradative phagolysosome-like compartments of human macrophages. *Infect. Immun.* 78, 3465–3474.
- Hsu, F., Luo, X., Qiu, J., Teng, Y.-B., Jin, J., Smolka, M.B., Luo, Z.-Q., Mao, Y., 2014. The Legionella effector SidC defines a unique family of ubiquitin ligases important for bacterial phagosomal remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 10538–10543.
- Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M., Allis, C.D., 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ip11/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102, 279–291.
- Hupp, T.R., Lane, D.P., 1994. Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr. Biol.* 4, 865–875.
- Huth, J.R., Bewley, C.A., Nissen, M.S., Evans, J.N.S., Reeves, R., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., 1997. The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat. Struct. Biol.* 4, 657–665.
- Huynh, K., Partch, C.L., 2015. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Curr. Protoc. protein Sci.* 79, 28.9.1-28.9.14.
- Jassal, B., Matthews, L., Viteri, G., Gong, C., Lorente, P., Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Cook, J., Gillespie, M., Haw, R., Loney, F., May, B., Milacic, M., Rothfels, K., Sevilla, C., Shamovsky, V., Shorser, S., Varusai, T., Weiser, J., Wu, G., Stein, L., Hermjakob, H., D’Eustachio, P., 2020. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 48, D498–D503.
- Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the Histone Code. *Science* (80-). 293, 1074–1081.
- Kampschreur, L.M., Hagenaars, J.C.J.P., Wielders, C.C.H., Elsmann, P., Lestrade, P.J., Koning, O.H.J., Oosterheert, J.J., Renders, N.H.M., Wever, P.C., 2012. Screening for *Coxiella burnetii* seroprevalence in chronic Q fever high-risk groups reveals the magnitude of the Dutch Q fever outbreak. *Epidemiol. Infect.* 141, 1–5.
- Khater, S., Mohanty, D., 2015. In silico identification of AMPylating enzymes and study of their divergent evolution. *Sci. Rep.* 5, 10804.

- Kielkowski, P., Buchsbaum, I.Y., Becker, T., Bach, K., Cappello, S., Sieber, S.A., 2020a. A Pronucleotide Probe for Live-Cell Imaging of Protein AMPylation. *ChemBioChem* 21, 1285–1287.
- Kielkowski, P., Buchsbaum, I.Y., Kirsch, V.C., Bach, N.C., Drukker, M., Cappello, S., Sieber, S.A., 2020b. FICD activity and AMPylation remodelling modulate human neurogenesis. *Nat. Commun.* 11, 1–13.
- Kim, J.H., Lee, S.-R., Li, L.-H., Park, H.-J., Park, J.-H., Lee, K.Y., Kim, M.-K., Shin, B.A., Choi, S.-Y., 2011. High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. *PLoS One* 6, e18556.
- Kim, K., Kim, J.M., Kim, J.S., Choi, J., Lee, Y.S., Neamati, N., Song, J.S., Heo, K., An, W., 2013. VprBP Has Intrinsic Kinase Activity Targeting Histone H2A and Represses Gene Transcription. *Mol. Cell* 52, 459–467.
- Kim, S., Broströmer, E., Xing, D., Jin, J., Chong, S., Ge, H., Wang, S., Gu, C., Yang, L., Gao, Y.Q., Su, X.D., Sun, Y., Xie, X.S., 2013. Probing allostery through DNA. *Science* (80-.). 339, 816–819.
- 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, 1–9.
- Kingdon, H.S., Shapiro, B.M., Stadtman, E.R., 1967. Regulation of glutamine synthetase, VIII. 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.
- Kjos, I., Vestre, K., Guadagno, N.A., Borg Distefano, M., Progida, C., 2018. Rab and Arf proteins at the crossroad between membrane transport and cytoskeleton dynamics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1865, 1397–1409.
- Kornberg, R.D., 1974. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* (80-.). 184, 868–871.
- Kotewicz, K.M., Ramabhadran, V., Sjoblom, N., Vogel, J.P., Haenssler, E., Zhang, M., Behringer, J., Scheck, R.A., Isberg, R.R., 2017. A Single Legionella Effector Catalyzes a Multistep Ubiquitination Pathway to Rearrange Tubular Endoplasmic Reticulum for Replication. *Cell Host Microbe* 21, 169–181.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705.
- Kozak, S., Lercher, L., Karanth, M.N., Meijers, R., Carlomagno, T., Boivin, S., 2016. Optimization of protein samples for NMR using thermal shift assays. *J. Biomol. NMR* 64, 281–289.
- Kubori, T., Hyakutake, A., Nagai, H., 2008. Legionella translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Mol. Microbiol.* 67, 1307–1319.
- Kuley, R., Bossers-deVries, R., Smith, H.E., Smits, M.A., Roest, H.I.J., Bossers, A., 2015. Major differential gene regulation in *Coxiella burnetii* between in vivo and in vitro cultivation models. *BMC Genomics* 16, 953.

- Kumar, A., Clerici, M., Muckenfuss, L.M., Passmore, L.A., Jinek, M., 2019. Mechanistic insights into mRNA 3'-end processing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 59, 143–150.
- Laguna, R.K., Creasey, E.A., Li, Z., Valtz, N., Isberg, R.R., 2006. A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 18745–18750.
- Lane, A.B., Giménez-Abián, J.F., Clarke, D.J., 2013. A novel chromatin tether domain controls topoisomerase II α dynamics and mitotic chromosome formation. *J. Cell Biol.* 203, 471–486.
- Langelier, M.F., Ruhl, D.D., Planck, J.L., Kraus, W.L., Pascal, J.M., 2010. The Zn³ domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. *J. Biol. Chem.* 285, 18877–18887.
- Langelier, M.F., Zandarashvili, L., Aguiar, P.M., Black, B.E., Pascal, J.M., 2018. NAD⁺ analog reveals PARP-1 substrate-blocking mechanism and allosteric communication from catalytic center to DNA-binding domains. *Nat. Commun.* 9, 1–13.
- Larson, C.L., Beare, P.A., Voth, D.E., Howe, D., Cockrell, D.C., Bastidas, R.J., Valdivia, R.H., Heinzen, R.A., 2015. *Coxiella burnetii* effector proteins that localize to the parasitophorous vacuole membrane promote intracellular replication. *Infect. Immun.* 83, 661–670.
- Le Negrato, G., 2012. Subversion of innate immune responses by bacterial hindrance of NF- κ B pathway. *Cell. Microbiol.* 14, 155–167.
- Lecoeur, H., Prina, E., Rosazza, T., Weil, R., Meng, G., Spä Th Correspondence, G.F., 2020. Targeting Macrophage Histone H3 Modification as a *Leishmania* Strategy to Dampen the NF- κ B/NLRP3-Mediated Inflammatory Response. *CellReports* 30, 1870-1882.e4.
- Lee, J.H., Berger, J.M., 2019. Cell cycle-dependent control and roles of DNA topoisomerase II. *Genes* 10, 859.
- Lefranc, M.P., 2003. IMGT, the international ImMunoGeneTics database®. *Nucleic Acids Res.* 31, 307–310.
- Letunic, I., Khedkar, S., Bork, P., 2021. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Res.* 49, D458–D460.
- 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, 1701–1706.
- 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.
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V.G., Wu, H., Lieberman, J., 2016. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 535, 153–158.
- 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.
- Lucius, A.L., Jezewska, M.J., Bujalowski, W., 2006. Allosteric interactions between the nucleotide-binding sites and the ssDNA-binding site in the PriA helicase-ssDNA complex. *Biochemistry* 45, 7237–7255.
- Lugrin, J., Martinon, F., 2018. The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations. *Immunol. Rev.* 281, 99–114.
- Lund, M.E., To, J., O'Brien, B.A., Donnelly, S., 2016. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J. Immunol. Methods* 430, 64–70.
- Lund, T., Holtlund, J., Fredriksen, M., Laland, S.G., 1983. On the presence of two new high mobility group-like proteins in HeLa S3 cells. *FEBS Lett.* 152, 163–167.
- 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.
- Ma, Q. feng, Babbitt, P.C., Kenyon, G.L., 1988. Adenosine 5'-[α,β -Imido]triphosphate, a Substrate for T7 RNA Polymerase and Rabbit Muscle Creatine Kinase. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 4060–4061.
- MacDonald, L.J., Kurten, R.C., Voth, D.E., 2012. *Coxiella burnetii* alters cyclic AMP-Dependent protein kinase signaling during growth in macrophages. *Infect. Immun.* 80, 1980–1986.
- Machner, M.P., Isberg, R.R., 2007. A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science* (80-). 318, 974–7.
- Madariaga, M.G., Rezai, K., Trenholme, G.M., Weinstein, R.A., 2003. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect. Dis.* 3, 709–721.
- Mahapatra, S., Gallaher, B., Smith, S.C., Graham, J.G., Voth, D.E., Shaw, E.I., 2016. *Coxiella burnetii* Employs the Dot/Icm Type IV Secretion System to Modulate Host NF- κ B/RelA Activation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 188.
- Mallik, R., Kundu, A., Chaudhuri, S., 2018. High mobility group proteins: the multifaceted regulators of chromatin dynamics. *Nucl.* 61, 213–226.
- Marmorstein, R., Trievel, R.C., 2009. Histone modifying enzymes: Structures, mechanisms, and specificities. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1789, 58–68.
- Martinon, F., Burns, K., Tschoop, J., 2002. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell* 10, 417–426.
- Matsushima, K., Taguchi, M., Kovacs, E.J., Young, H.A., Oppenheim, J.J., 1986. Intracellular localization of human monocyte associated interleukin 1 (IL 1) activity and release of biologically active IL 1 from monocytes by trypsin and plasmin. *J. Immunol.* 136, 2883–2891.
- 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.*
- Meijsing, S.H., Pufall, M.A., So, A.Y., Bates, D.L., Chen, L., Yamamoto, K.R., 2009. DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* (80-.). 324, 407–410.
- Meyer, T., Hilz, H., 1986. Production of anti-(ADP-ribose) antibodies with the aid of a dinucleotide-pyrophosphatase-resistant hapten and their application for the detection of mono(ADP-ribosyl)ated polypeptides. *Eur. J. Biochem.* 155, 157–165.
- Millar, J.A., Valdés, R., Kacharia, F.R., Landfear, S.M., Cambronne, E.D., Raghavan, R., 2015. *Coxiella burnetii* and *Leishmania mexicana* residing within similar parasitophorous vacuoles elicit disparate host responses. *Front. Microbiol.* 6, 794.
- Misra, V.K., Hecht, J.L., Yang, A.S., Honig, B., 1998. Electrostatic contributions to the binding free energy of the λ cl repressor to DNA. *Biophys. J.* 75, 2262–2273.
- Monod, M.Y., Giudicelli, V., Chaume, D., Lefranc, M.P., 2004. IMGT/JunctionAnalysis: The first tool for the analysis of the immunoglobulin and T cell receptor complex V-J and V-D-J JUNCTIONs. *Bioinformatics* 20.
- Moos, A., Hackstadt, T., 1987. Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. *Infect. Immun.* 55, 1144–1150.
- Mosalos, G., Gilmore, T.D., 1993. v-Rel and c-Rel are differentially affected by mutations at a consensus protein kinase recognition sequence. *Oncogene* 8, 721–730.
- Mosalos, G., Hamer, P., Capobianco, A.J., Laursen, R.A., Gilmore, T.D., 1991. A protein kinase-A recognition sequence is structurally linked to transformation by p59v-rel and cytoplasmic retention of p68c-rel. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5867–5877.
- Mosley, B., Dower, S.K., Gillis, S., Cosman, D., 1987. Determination of the minimum polypeptide lengths of the functionally active sites of human interleukins 1 α and 1 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 4572–4576.
- Moss, J., Yost, D.A., Stanley, S.J., 1983. Amino acid-specific ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.* 258, 6466–6470.
- Mukherjee, S., Liu, X., Arasaki, K., McDonough, J., Galàn, J.E., Roy, C.R., 2011. Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase. *Nature* 477, 103–106.
- Müller, M.P., Peters, H., Blümer, J., Blankenfeldt, W., Goody, R.S., Itzen, A., 2010. The Legionella Effector Protein DrrA AMPylates the Membrane Traffic Regulator Rab1b. *Science* (80-.). 329, 946–949.
- Müller, M.P., Shkumatov, A. V., Oesterlin, L.K., Schoebel, S., Goody, P.R., Goody, R.S., Itzen, A., 2012. Characterization of enzymes from *Legionella pneumophila* involved in reversible adenylation of Rab1 protein. *J. Biol. Chem.* 287, 35036–35046.

- Myrset, A.H., Bostad, A., Jamin, N., Lirsac, P.N., Toma, F., Gabrielsen, O.S., 1993. DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein. *EMBO J.* 12, 4625–4633.
- Neunuebel, M.R., Chen, Y., Gaspar, A.H., Backlund, P.S., Yergey, A., Machner, M.P., 2011. De-AMPylation of the Small GTPase Rab1 by the Pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* (80-.). 333, 453–456.
- Newton, H.J., McDonough, J.A., Roy, C.R., 2013. Effector Protein Translocation by the *Coxiella burnetii* Dot/Icm Type IV Secretion System Requires Endocytic Maturation of the Pathogen-Occupied Vacuole. *PLoS One* 8, e54566.
- Nissen, M.S., Langan, T.A., Reeves, R., 1991. Phosphorylation by cdc2 kinase modulates DNA binding activity of high mobility group I nonhistone chromatin protein. *J. Biol. Chem.* 266, 19945–19952.
- Nogales, E., 2000. Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 277–302.
- Noroy, C., Lefrançois, T., Meyer, D.F., 2019. Searching algorithm for Type IV effector proteins (S4TE) 2.0: Improved tools for Type IV effector prediction, analysis and comparison in proteobacteria. *PLOS Comput. Biol.* 15, e1006847.
- Oeckinghaus, A., Ghosh, S., 2009. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a000034.
- Ohlendorf, D.H., Anderson, W.F., Matthews, B.W., 1983. Many gene-regulatory proteins appear to have a similar α -helical fold that binds DNA and evolved from a common precursor. *J. Mol. Evol.* 19, 109–114.
- Omsland, A., Cockrell, D.C., Howe, D., Fischer, E.R., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Porcella, S.F., Heinzen, R.A., 2009. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 4430–4434.
- Pallett, M.A., Berger, C.N., Pearson, J.S., Hartland, E.L., Frankel, G., 2014. The type III secretion effector NleF of enteropathogenic *Escherichia coli* activates NF- κ B early during infection. *Infect. Immun.* 82, 4878–4888.
- Panne, D., Maniatis, T., Harrison, S.C., 2007. An Atomic Model of the Interferon- β Enhanceosome. *Cell* 129, 1111–1123.
- Parker, N.R., Barralet, J.H., Bell, A.M., 2006. Seminar Q fever. *Lancet* 367, 679–88.
- Penzo, C., Arnoldo, L., Pegoraro, S., Petrosino, S., Ros, G., Zanin, R., Wiśniewski, J.R., Manfioletti, G., Sgarra, R., 2019. HMGA1 modulates gene transcription sustaining a tumor signalling pathway acting on the epigenetic status of triple-negative breast cancer cells. *Cancers (Basel)*. 11, 1105.
- Plagemann, P.G.W., Wohlhueter, R.M., 1980. Permeation of Nucleosides, Nucleic Acid Bases, and Nucleotides in Animal Cells. *Curr. Top. Membr. Transp.* 14, 225–330.

- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B., 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science* (80-.). 282, 2085–2088.
- 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.
- Preissler, S., Rato, C., Perera, L.A., Saudek, V., Ron, D., 2016. FICD acts bifunctionally to AMPylate and de-AMPylylate the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 23–29.
- Radhakrishnan, G.K., Splitter, G.A., 2012. Modulation of host microtubule dynamics by pathogenic bacteria. *Biomol. Concepts* 3, 571–580.
- Radulescu, A.E., Cleveland, D.W., 2010. NuMA after 30 years: The matrix revisited. *Trends Cell Biol.* 20, 214–222.
- Rahman, M.M., McFadden, G., 2011. Modulation of NF- κ B signalling by microbial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 291–306.
- Reboutier, D., Troadec, M.B., Cremet, J.Y., Fukasawa, K., Prigent, C., 2012. Nucleophosmin/B23 activates aurora a at the centrosome through phosphorylation of serine 89. *J. Cell Biol.* 197, 19–26.
- Reck-Peterson, S.L., Redwine, W.B., Vale, R.D., Carter, A.P., 2018. The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 382–398.
- Record, M.T., Anderson, C.F., Lohman, T.M., 1978. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: The roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity. *Q. Rev. Biophys.* 11, 103–178.
- Reed, R.R., Grindley, N.D.F., 1981. Transposon-mediated site-specific recombination in vitro: DNA cleavage and protein-DNA linkage at the recombination site. *Cell* 25, 721–728.
- Reeves, R., Langan, T.A., Nissen, M.S., 1991. Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc2 kinase: Reduction of binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1671–1675.
- Rhee, S., Martin, R.G., Rosner, J.L., Davies, D.R., 1998. A novel DNA-binding motif in MarA: The first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 10413–8.
- Rigillo, G., Vilella, A., Benatti, C., Schaeffer, L., Brunello, N., Blom, J.M.C., Zoli, M., Tascetta, F., 2018. LPS-induced histone H3 phospho(Ser10)-acetylation(Lys14) regulates neuronal and microglial neuroinflammatory response. *Brain. Behav. Immun.* 74, 277–290.
- 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.
- Roy, C.R., Cherfils, J., 2015. Structure and function of Fic proteins. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 631–640.
- Rupesh, K.R., Smith, A., Boehmer, P.E., 2015. Ligand induced stabilization of the melting temperature of the HSV-1 single-strand DNA binding protein using the thermal shift assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 454, 604–608.
- Saccani, S., Pantano, S., Natoli, G., 2002. p38-dependent marking of inflammatory genes for increased NF- κ B recruitment. *Nat. Immunol.* 3, 69–75.
- Sandoz, K.M., Popham, D.L., Beare, P.A., Sturdevant, D.E., Hansen, B., Nair, V., Heinzen, R.A., 2016. Transcriptional profiling of *Coxiella burnetii* reveals extensive cell wall remodeling in the small cell variant developmental form. *PLoS One* 11, 1–24.
- 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 adenylation/AMPylation and the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 290, 8482–8499.
- Sauer, R.T., Yocum, R.R., Doolittle, R.F., Lewis, M., Pabo, C.O., 1982. Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. *Nature* 298, 447–451.
- Sawicka, A., Hartl, D., Goiser, M., Pusch, O., Stocsits, R.R., Tamir, I.M., Mechtler, K., Seiser, C., 2014. H3S28 phosphorylation is a hallmark of the transcriptional response to cellular stress. *Genome Res.* 24, 1808–20.
- Sawicka, A., Seiser, C., 2012. Histone H3 phosphorylation – A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie* 94, 2193–2201.
- Schlundt, A., Buchner, S., Janowski, R., Heydenreich, T., Heermann, R., Lassak, J., Geerlof, A., Stehle, R., Niessing, D., Jung, K., Sattler, M., 2017. Structure-function analysis of the DNA-binding domain of a transmembrane transcriptional activator. *Sci. Rep.* 7, 1–16.
- Schoebel, S., Cichy, A.L., Goody, R.S., Itzen, A., 2011. Protein LidA from *Legionella* is a Rab GTPase supereffector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 17945–50.
- 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, 1060–1072.
- 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, 5857–5864.
- Segal, G., Purcell, M., Shuman, H.A., 1998. Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 1669–74.
- 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 USA* 100, 5455–5460.
- Shi, Y., 2017. Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 655–670.
- Smit, C., Blümer, J., Eerland, M.F., Albers, M.F., Müller, M.P., Goody, R.S., Itzen, A., Hedberg, C., 2011. Efficient synthesis and applications of peptides containing adenylylated tyrosine residues. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 50, 9200–9204.
- So, E.C., Schroeder, G.N., Carson, D., Mattheis, C., Mousnier, A., Broncel, M., Tate, E.W., Frankel, G., 2016. The Rab-binding profiles of bacterial virulence factors during infection. *J. Biol. Chem.* 291, 5832–5843.
- Sobotta, K., Hillarius, K., Mager, M., Kerner, K., Heydel, C., Menge, C., 2016. *Coxiella burnetii* infects primary bovine macrophages and limits their host cell response. *Infect. Immun.* 84, 1722–1734.
- Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G.R., Rampersaud, N., Dyson, M.H., Hazzalin, C.A., Mahadevan, L.C., Arthur, J.S.C., 2003. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J.* 22, 2788–2797.
- Solomon, M.J., Strauss, F., Varshavsky, A., 1986. A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A·T base pairs in duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 1276–1280.
- Sory, M.-P., Cornelis, G.R., 1994. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol. Microbiol.* 14, 583–594.
- Sreelatha, A., Yee, S.S., Lopez, V.A., Park, B.C., Kinch, L.N., Pilch, S., Servage, K.A., Zhang, J., Jiou, J., Karasiewicz-Urbańska, M., Łobocka, M., Grishin, N. V., Orth, K., Kucharczyk, R., Pawłowski, K., Tomchick, D.R., Tagliabracci, V.S., 2018. Protein AMPylation by an Evolutionarily Conserved Pseudokinase. *Cell* 175, 809-821.e19.
- Stanger, F. V, Burmann, B.M., Harms, A., Aragão, 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.* 113, E529–E537.
- Stebbins, C.E., Galaán, J.E., 2001. Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* 412, 701–705.
- Steinberg, R.A., Cauthron, R.D., Symcox, M.M., Shuntoh, H., 1993. Autoactivation of catalytic (C alpha) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2332–2341.
- Sumter, T.F., Xian, L., Huso, T., Koo, M., Chang, Y.-T., Almasri, T.N., Chia, L., Inglis, C., Reid, D., Resar, L.M.S., 2016. The High Mobility Group A1 (HMGA1) Transcriptome in Cancer and Development. *Curr. Mol. Med.* 16, 353–393.

- Sun, C., Chan, F., Briassouli, P., Linardopoulos, S., 2007. Aurora kinase inhibition downregulates NF- κ B and sensitises tumour cells to chemotherapeutic agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 220–225.
- Sun, H., Kamanova, J., Lara-Tejero, M., Galán, J.E., 2016. A Family of Salmonella Type III Secretion Effector Proteins Selectively Targets the NF- κ B Signaling Pathway to Preserve Host Homeostasis. *PLOS Pathog.* 12, e1005484.
- Suter, D.M., 2020. Transcription Factors and DNA Play Hide and Seek. *Trends Cell Biol.* 30, 491–500.
- Tan, Y., Luo, Z.-Q., 2011. Legionella pneumophila SidD is a deAMPylase that modifies Rab1. *Nature* 475, 506–509.
- Thanos, D., Du, W., Maniatis, T., 1993. The high mobility group protein HMG I(Y) is an essential structural component of a virus-inducible enhancer complex. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 58, 73–81.
- The UniProt Consortium, 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45, D158–D169.
- 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.
- Thompson, J.E., Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Ghosh, S., 1995. I κ B- β regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- κ B. *Cell* 80, 573–582.
- Thomson, S., Clayton, A.L., Hazzalin, C.A., Rose, S., Barratt, M.J., Mahadevan, L.C., 1999. The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO J.* 18, 4779–4793.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., Elliston, K.O., Ayala, J.M., Casano, F.J., Chin, J., Ding, G.J.F., Egger, L.A., Gaffney, E.P., Limjuco, G., Palyha, O.C., Raju, S.M., Rolando, A.M., Salley, J.P., Yamin, T.T., Lee, T.D., Shively, J.E., MacCross, M., Mumford, R.A., Schmidt, J.A., Tocci, M.J., 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 356, 768–774.
- Townson, S.A., Samuelson, J.C., Bao, Y., Xu, S., yong, Aggarwal, A.K., 2007. BstYI Bound to Noncognate DNA Reveals a “Hemispecific” Complex: Implications for DNA Scanning. *Structure* 15, 449–459.
- Truttmann, M.C., Cruz, V.E., Guo, X., 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, 1–26.
- Truttmann, M.C., Ploegh, H.L., 2017. rAMPing Up Stress Signaling: Protein AMPylation in Metazoans. *Trends Cell Biol.*

- Urbanus, M.L., Quaile, A.T., Stogios, P.J., Morar, M., Rao, C., Di Leo, R., Evdokimova, E., Lam, M., Oatway, C., Cuff, M.E., Osipiuk, J., Michalska, K., Nocek, B.P., Taipale, M., Savchenko, A., Ensminger, A.W., 2016. Diverse mechanisms of metaeffector activity in an intracellular bacterial pathogen, *Legionella pneumophila*. *Mol. Syst. Biol.* 893, 1–20.
- van der Hoek, W., Morroy, G., Renders, N.H.M., Wever, P.C., Hermans, M.H.A., Leenders, A.C.A.P., Schneeberger, P.M., 2012. Epidemic Q Fever in Humans in the Netherlands, in: Toman, R., Heinzen, R.A., Samuel, J.E., Mege, J.-L. (Eds.), *Coxiella Burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 329–364.
- Van Loenhout, J.A.F., Wielders, C.C.H., Morroy, G., Cox, M.J.M., Van Der Hoek, W., Hautvast, J.L.A., Paget, W.J., Van Der Velden, J., 2015. Severely impaired health status of non-notified Q fever patients leads to an underestimation of the true burden of disease. *Epidemiol. Infect.* 143, 2580–2587.
- 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, 561–573.
- Viadiu, H., Aggarwal, A.K., 2000. Structure of BamHI bound to nonspecific DNA: A model for DNA sliding. *Mol. Cell* 5, 889–895.
- Vieweg, S., Mulholland, K., Brauning, B., Kacharia, N., Lai, Y.-C., Toth, R., Singh, P.K., Volpi, I., Sattler, M., Groll, M., Itzen, A., Muqit, M.M.K., 2020. PINK1-dependent phosphorylation of Serine111 within the SF3 motif of Rab GTPases impairs effector interactions and LRRK2 mediated phosphorylation at Threonine72. *Biochem. J.*
- Vogel, J.P., Andrews, H.L., Wong, S.K., Isberg, R.R., 1998. Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* (80-.). 279, 873–6.
- Voth, D.E., Broderdorf, L.J., Graham, J.G., 2012. Bacterial Type IV secretion systems: Versatile virulence machines. *Future Microbiol.* 7, 241–257.
- Voth, D.E., Howe, D., Heinzen, R.A., 2007. *Coxiella burnetii* inhibits apoptosis in human THP-1 cells and monkey primary alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 75, 4263–4271.
- Vyas, S., Matic, I., Uchima, L., Rood, J., Zaja, R., Hay, R.T., Ahel, I., Chang, P., 2014. Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Nat. Commun.* 5, 4426.
- Wang, K., Rodgers, M.E., Toptygin, D., Munsen, V.A., Brand, L., 1998. Fluorescence study of the multiple binding equilibria of the galactose repressor. *Biochemistry* 37, 41–50.
- Wang, P., Silverman, S.K., 2016. DNA-Catalyzed Introduction of Azide at Tyrosine for Peptide Modification. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 55, 10052–10056.
- Weinberg, R.L., Freund, S.M.V., Veprintsev, D.B., Bycroft, M., Fersht, A.R., 2004a. Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. *J. Mol. Biol.* 342, 801–811.
- Weinberg, R.L., Veprintsev, D.B., Bycroft, M., Fersht, A.R., 2005. Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *J. Mol. Biol.* 348, 589–596.

- Weinberg, R.L., Veprintsev, D.B., Fersht, A.R., 2004b. Cooperative binding of tetrameric p53 to DNA. *J. Mol. Biol.* 341, 1145–1159.
- Weiss, G., Schaible, U.E., 2015. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* 264, 182–203.
- Welner, D., Dedic, E., Van Leeuwen, H.C., Kuijper, E., Bjerrum, M.J., Østergaard, O., Jørgensen, R., 2014. Protein expression, characterization, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a Fic protein from *Clostridium difficile*. *Acta Crystallogr. Sect. FStructural Biol. Commun.* 70, 827–831.
- Willems, E., Dedobbeleer, M., Digregorio, M., Lombard, A., Lumapat, P.N., Rogister, B., 2018. The functional diversity of Aurora kinases: A comprehensive review. *Cell Div.* 13, 7.
- Woolery, A.R., Yu, X., LaBaer, J., Orth, K., 2014. AMPylation of Rho GTPases subverts multiple host signaling processes. *J. Biol. Chem.* 289, 32977–32988.
- 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 Adenylylation. *Mol. Cell* 34, 93–103.
- Xiao, J., Worby, C.A., Mattoo, S., Sankaran, B., Dixon, J.E., 2010. Structural basis of Fic-mediated adenylylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1004–1010.
- Xu, Y., Zhou, P., Cheng, S., Lu, Q., Nowak, K., Hopp, A.K., Li, L., Shi, X., Zhou, Z., Gao, W., Li, D., He, H., Liu, X., Ding, J., Hottiger, M.O., Shao, F., 2019. A Bacterial Effector Reveals the V-ATPase-ATG16L1 Axis that Initiates Xenophagy. *Cell* 178, 552-566.e20.
- Xue, J., Schmidt, S. V, Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T.D., Emde, M., Schmidleithner, L., Ganesan, H., Nino-Castro, A., Mallmann, M.R., Labzin, L., Theis, H., Kraut, M., Beyer, M., Latz, E., Freeman, T.C., Ulas, T., Schultze, J.L., 2014. Resource Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* 40, 274–288.
- Yachdav, G., Kloppmann, E., Kajan, L., Hecht, M., Goldberg, T., Hamp, T., Hönigschmid, P., Schafferhans, A., Roos, M., Bernhofer, M., Richter, L., Ashkenazy, H., Punta, M., Schlessinger, A., Bromberg, Y., Schneider, R., Vriend, G., Sander, C., Ben-Tal, N., Rost, B., 2014. PredictProtein - An open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Res.* 42, W337-43.
- Yamamoto, Y., Verma, U.N., Prajapati, S., Kwak, Y.-T., Gaynor, R.B., 2003. Histone H3 phosphorylation by ikk- α is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* 423, 655–659.
- Yang, Y., Yue, Y., Song, N., Li, C., Yuan, Z., Wang, Y., Ma, Y., Li, H., Zhang, F., Wang, W., Jia, H., Li, P., Li, X., Wang, Q., Ding, Z., Dong, H., Gu, L., Li, B., 2020. The YdiU Domain Modulates Bacterial Stress Signaling through Mn²⁺-Dependent UMPylation. *Cell Rep.* 32, 108161.

- 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* (80-.). 323, 269–272.
- Yoshida, M.M., Ting, L., Gygi, S.P., Azuma, Y., 2016. SUMOylation of DNA topoisomerase II α regulates histone H3 kinase Haspin and H3 phosphorylation in mitosis. *J. Cell Biol.* 213, 665–678.
- Yu, S.H., Chiang, W.C., Shih, H.M., Wu, K.J., 2004. Stimulation of c-Rel transcriptional activity by PKA catalytic subunit β . *J. Mol. Med.* 82, 621–628.
- 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, 3164–3176.
- 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, 965–976.
- Zhang, Q., Wang, Y., 2007. Homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) phosphorylates HMGA1a at Ser-35, Thr-52, and Thr-77 and modulates its DNA binding affinity. *J. Proteome Res.* 6, 4711–4719.
- Zhang, X.M., Verdine, G.L., 1999. A small region in HMG I(Y) is critical for cooperation with NF- κ B on DNA. *J. Biol. Chem.* 274, 20235–20243.
- Zhang, Y., Griffin, K., Mondal, N., Parvin, J.D., 2004. Phosphorylation of histone H2A inhibits transcription chromatin templates. *J. Biol. Chem.* 279, 21866–21872.
- Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Ghosh, S., 1997. The transcriptional activity of NF- κ B is regulated by the I κ B- associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 89, 413–424.
- Zhou, K., Gaullier, G., Luger, K., 2019. Nucleosome structure and dynamics are coming of age. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 3–13.
- Zlokarnik, G., Negulescu, P.A., Knapp, T.E., Mere, L., Burren, N., Feng, L., Whitney, M., Roemer, K., Tsien, R.Y., 1998. Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with β -lactamase as reporter. *Science* (80-.). 279, 84–88.

8 Anhang

8.1 Ergänzende Daten zu monoklonalen anti-AMP-Antikörpern¹

8.1.1 Peptidsynthese

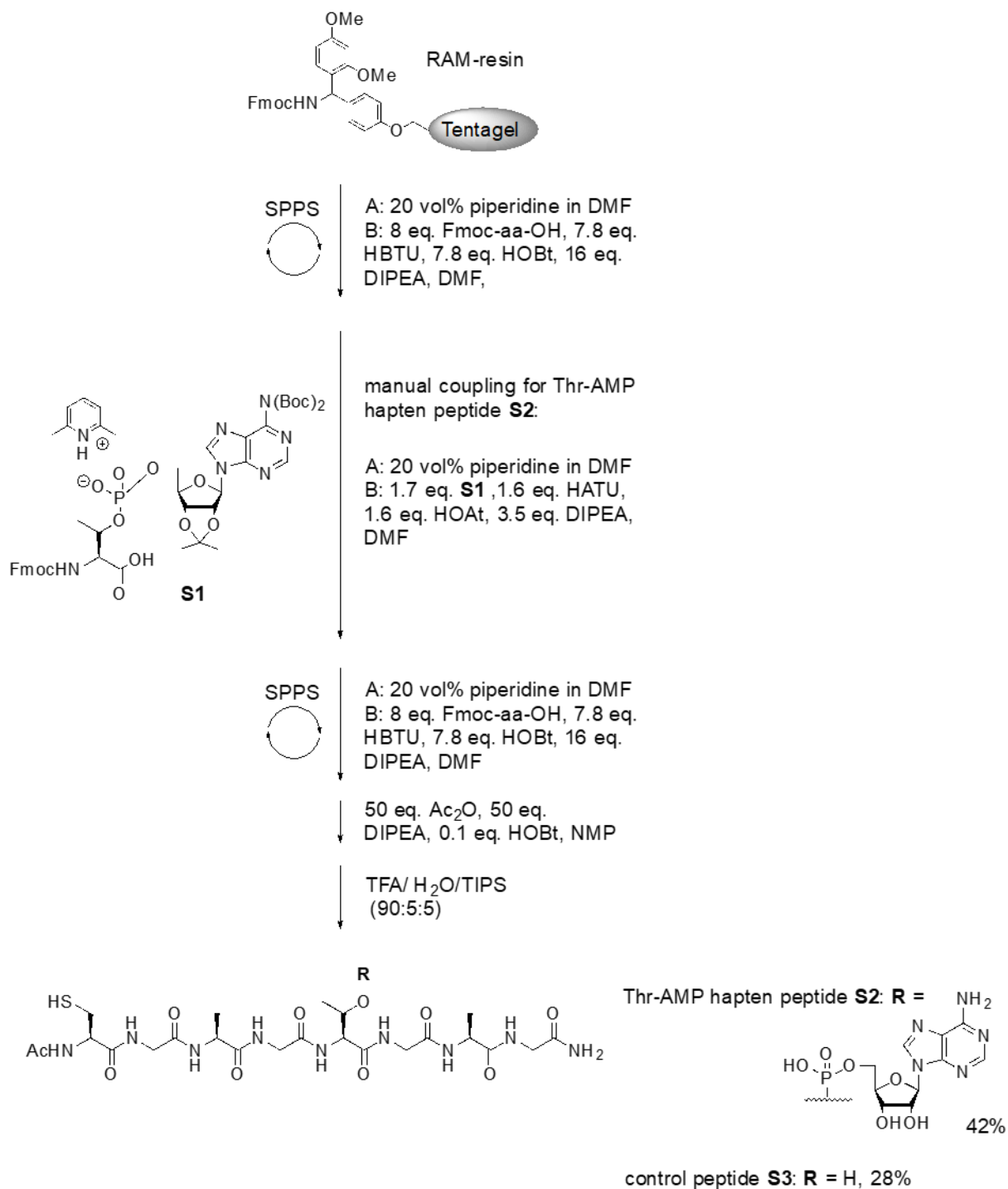


Abbildung S 1: Schema der Peptid-Festphasensynthese für Peptide S2 und S3

Alle Arbeiten wurden durchgeführt von Dr. Christian Pett.¹ Die Abbildung wurde unverändert übernommen aus (Höpfner et al., 2020) (CC BY 4.0).

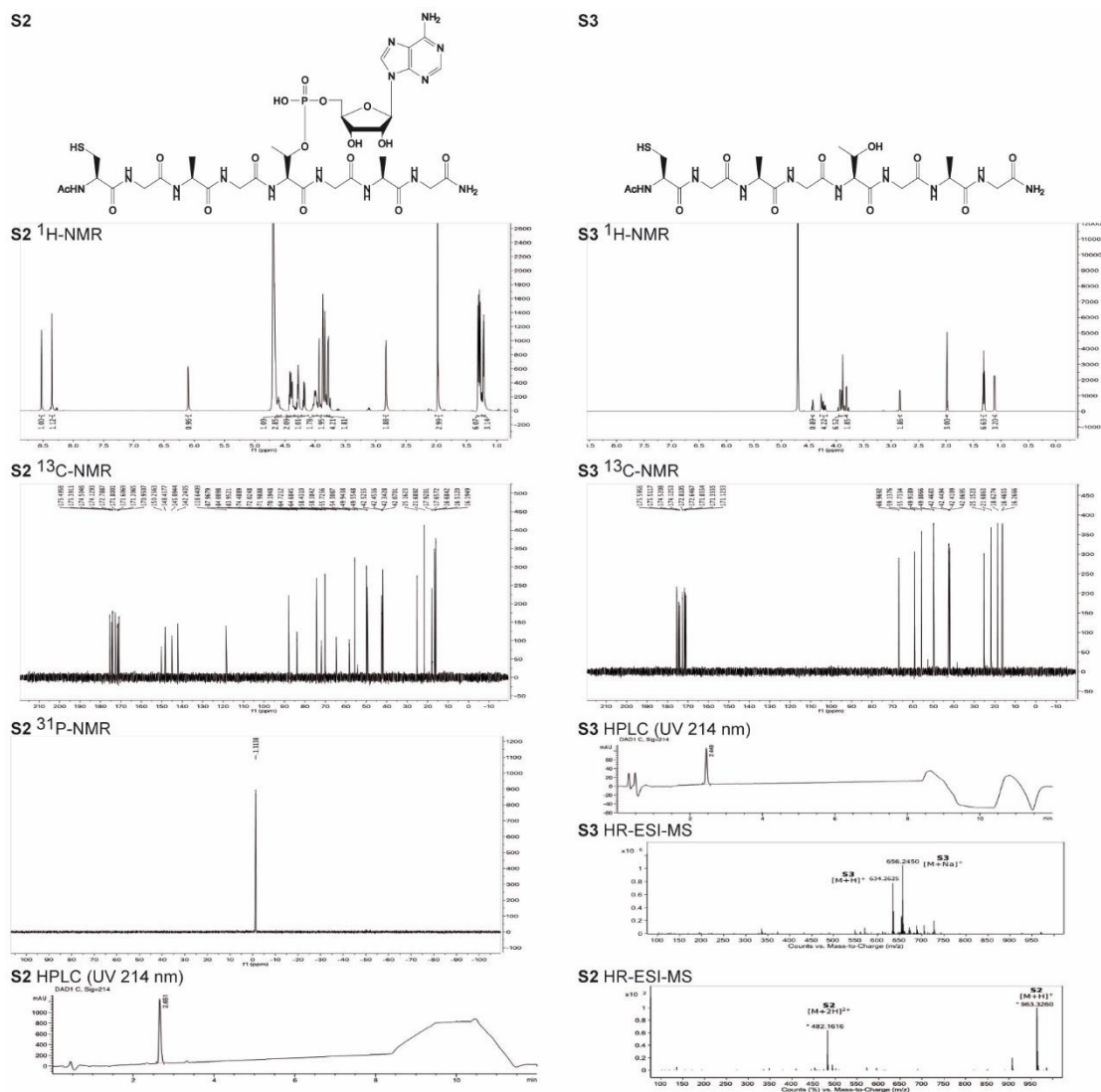


Abbildung S 2: Qualitätskontrolle der synthetisierten Peptide S2 und S3¹

Das Thr-AMP Hapten-Peptid Ac-CGAGT(AMP)GAG-NH₂ (**S2**) wurde auf 100 mg (25 µmol) Tentagel-S-RAM Resin synthetisiert. Ausbeute: 42 % (10,0 mg, 10,4 µmol). **Analytische HPLC** $R_t = 2,651$ min (A/B, (98 : 2) → (75 : 25), 500 µl/min, 7 min); **Präparative HPLC** $R_t = 8,945$ min (A/B, (97.5 : 2.5) → (50 : 50), 20 ml/min, 10 min). **HR-ESI-MS**, m/z : 482,1616 ($[M+2H]^{2+}$, calc. 482,1606), 963,3260 ($[M+H]^+$, calc. 963,3139). **¹H NMR** (600 MHz, D₂O) δ : 8,52 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 4,62-4,59 (m, 1H), 4,43-4,39 (m, 3H), 4,31-4,27 (m, 2H), 4,18 (q, $J = 7,3$ Hz, 1H), 4,04-3,97 (m, 2H), 3,94 (sbr, 2H), 3,87 (s, 2H), 3,84 (s, 2H), 3,79 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H), 2,83 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H), 1,98 (s, 3H), 1,31 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H), 1,28 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H), 1,22 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H). **³¹P NMR** (242,9 MHz, D₂O) δ : -1,31 (s). **¹³C NMR** (125,9 MHz, D₂O) δ : 175,50, 175,39, 174,50, 174,13, 172,79, 171,80, 171,61, 171,21, 170,95, 150,25, 148,09, 142,24, 118,64, 118,64, 87,97, 84,01, 83,95, 74,49, 72,02, 71,99, 70,19, 64,72, 64,68, 58,43, 58,38, 55,73, 49,94, 49,55, 42,52, 42,45, 42,34, 42,07, 25,16, 21,69, 17,92, 16,68, 16,19. Das Threonin Peptid Ac-CGAGTGAG-NH₂ (**S3**) wurde auf 100 mg (25 µmol) Tentagel-S-RAM Resin synthetisiert. Ausbeute: 28 % (4,4 mg, 6,9 µmol). **Analytische HPLC** $R_t = 2,449$ min (A/B, (98 : 2) → (75 : 25), 500 µl/min, 7 min); **Präparative HPLC** $R_t = 7,148$ min (A/B, (97.5 : 2.5) → (50 : 50), 20 ml/min, 10 min). **HR-ESI-MS**, m/z : 634,2625 ($[M+H]^+$, calc. 634,2613), 656,2450 ($[M+Na]^+$, calc. 656,2433). **¹H NMR** (600 MHz, D₂O) δ : 4,43 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H), 4,29-4,18 (m, 4H), 3,94-3,88 (m, 6H), 3,81 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H), 2,85 (d, $J = 6,2$ Hz, 2H), 1,98 (s, 3H), 1,33-1,30 (m, 6H), 1,12 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H). **¹³C NMR** (125,9 MHz, D₂O) δ : 175,60, 175,51, 174,52, 174,13, 172,81, 172,65, 171,86, 171,36, 171,12, 66,97, 59,14, 58,38, 55,73, 49,92, 49,80, 42,47, 42,45, 42,41, 42,07, 25,15, 21,69, 18,63, 16,47, 16,27. Die Abbildung wurde unverändert übernommen aus (Höpfner et al., 2020) (CC BY 4.0).

8.1.2 Antikörper-Generierung und –Selektion gegen native Epitope¹

Nach drei Boosts wurden die Seren der immunisierten Mäuse auf ihre Fähigkeit, das Peptid-Hapten-Konjugat und natives Cdc42-Thr-AMP im ELISA zu erkennen, untersucht. Dabei wurden nur positive Treffer auf ihre WB-Leistung bei verschiedenen AMPylierten Proteinen untersucht, um eine vom Backbone unabhängige Erkennung und eine mögliche Seitenkettenverzerrung zu überprüfen. Von zehn immunisierten Mäusen waren fünf in der Lage, natives Cdc42-Thr-AMP im ELISA genauso gut zu erkennen wie das AMPylierte Hapten, ohne eine Bindung von Cdc42 allein zu zeigen. Alle waren im WB positiv gegen alle getesteten Proteine, wobei keine Präferenz für AMPylierung an Threonin-Seitenketten zu beobachten war und alle Seren sowohl mit Tyrosin- als auch mit Threonin-Modifikationen reagierten. Nach der letzten Blutung wurden die beiden positiven Tiere #8538 und #8542, beide C57 BL/6-Mäuse, mit überlegener Erkennung von nativen und denaturierten Targets in WB und ELISA und ohne erkennbaren Hintergrund gegen unmodifizierte Proteine und Peptide ausgewählt, um eine Zellfusion mit Hybridomazellen durchzuführen.

Die Auswertung mittels ELISA ergab 10 Klone, die in der Lage waren, natives Cdc42-Thr-AMP zu erkennen und die anschließend für WB-Tests wie oben beschrieben ausgewählt wurden. Die Leistungsunterschiede zwischen den Klonen erwiesen sich als sehr viel größer als zwischen den Mäuseserumproben, wobei viele Klone eine fehlende universelle Erkennung aller Targets, einen hohen Hintergrund oder starke Unterschiede in der Erkennungsstärke in Abhängigkeit vom AMPylierten Protein zeigten. Zwei vielversprechende Klone, 7C11 und 17G6, die eine sehr gute Erkennung aller AMPylierten Proteine im WB unabhängig von ihrer modifizierten Seitenkette, eine native Erkennung von Cdc42-Thr-AMP im ELISA und einen geringen Hintergrund aufweisen, wurden für die Subklonierung und anschließende Produktion und Reinigung ausgewählt. Ein weiterer Klon, 1G11, wurde aufgrund seiner unerwarteten Entwicklung einer Tyrosin-spezifischen Erkennung, trotz Immunisierung mit einem Threonin-modifizierten Peptid, ausgewählt.

Die Subklonierung und das Upscaling für die Antikörperproduktion birgt das Risiko, Bindungsfähigkeiten zu verlieren. Ein Klon, 1G11-1, verlor während der Subklonierung seine AMPylierungserkennung und musste erneut kloniert werden (1G11-F2-3) (Wechsel der Isotypen von IgG1 zu IgG2b). Ein weiterer Klon, 17G6-1, verlor seine Leistung während des Upscalings für die Antikörperproduktion und musste neu angesetzt werden. Daher ist ein rigoroses erneutes Testen nach jedem Schritt entscheidend. Interessanterweise verlor der Klon 1G11 nach dem Upscaling für die Produktion seine klare Präferenz für Tyrosin-AMPylierung (Abbildung 3A). Die Tyrosin-spezifische Erkennung des Antikörpers 1G11 konnte jedoch in Gegenwart von 1 mM MnCl₂ deutlich gesteigert werden (Abbildung 5B).

Für alle drei endgültigen Hybridom-Zelllinien 17G6-1, 7C11-1 und 1G11-F2-3 wurde die Sequenzierung der variablen Domäne des Antikörpers von GenScript als Service durchgeführt.

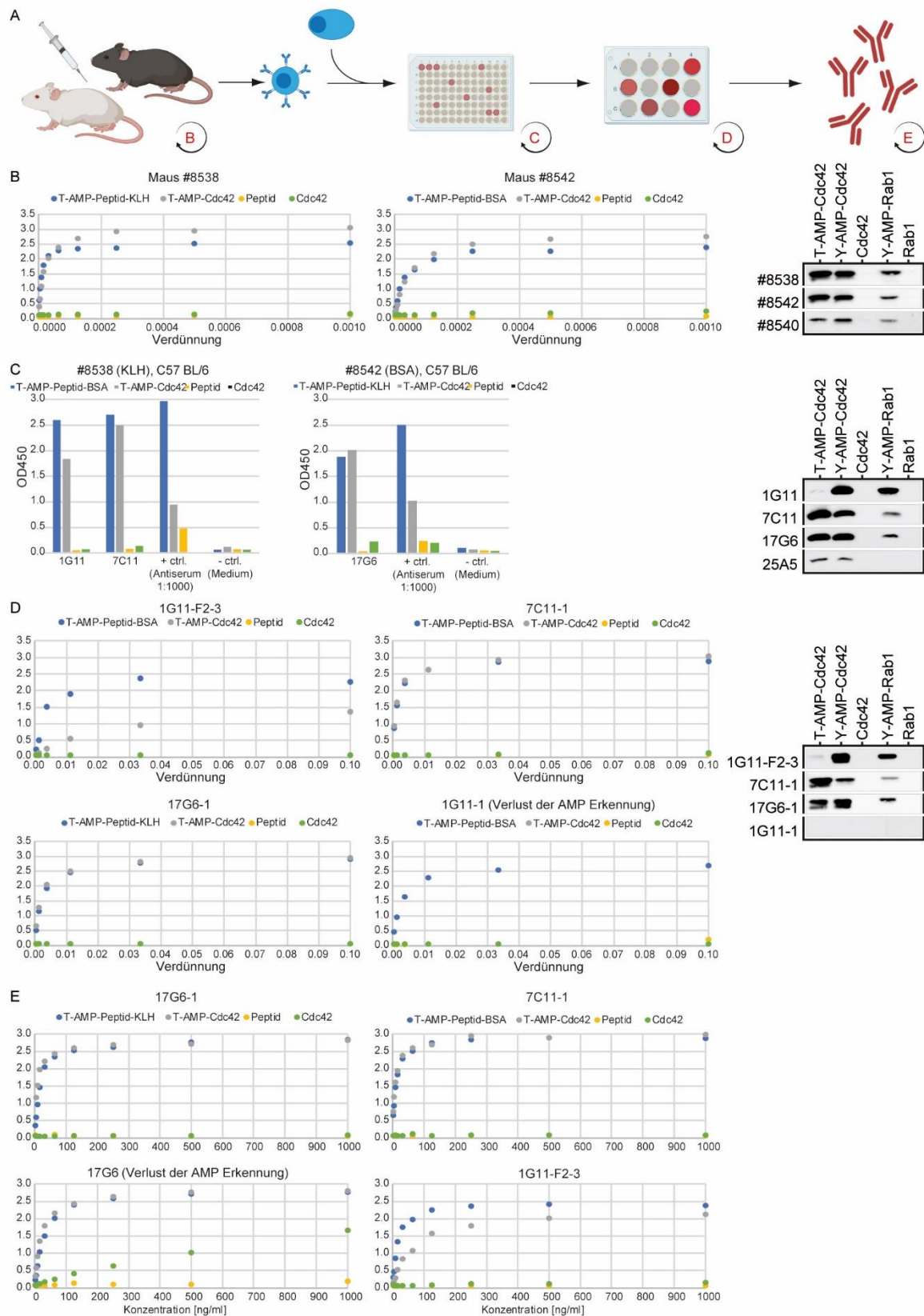


Abbildung S 3: Antikörper-Generierung und -Selektion gegen native Epitope

(A) Immunisierungsprotokoll von Mäusen. Die Auswertungszeitpunkte sind durch kreisförmige Pfeile gekennzeichnet. B-D Auswertung hinsichtlich der Erkennung der AMPylierung in WB und ELISA von (B) Mäuseseren (C) parentalen Hybridoma-Klonen, (D) Subklonen und (E) produzierten und gereinigten Antikörpern. Die Abbildung wurde unverändert übernommen aus (Höpfner et al., 2020) (CC BY 4.0).

8.1.3 Antikörper-Sequenzen der variablen Domäne

Antikörper 17G6-1

Schwere Kette: DNA Sequenz (411 bp)

Signalsequenz-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTTCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGTCCTCTCTG
AGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA
TATCCTGTAAGGCTTCTGGATACACGTTCACTGACTACTATCTGAACTGGGTGAAGCA
GAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTCATCCTAACAAAGGTATTAA
TAAGTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAG
TACAGCCTACATGGAGCTCCGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGT
GCAAGATACTACGGTAAGAGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCATGGTCACC
GTCTCCTCA

Schwere Kette: Aminosäure Sequenz (137 aa)

Signalpeptid -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MGWSWIFLFLLSGTAGVLS^EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDY^LNWVKQS
HGKSLEWIGDIHPNKGINKYNQFKFKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARY
YGKRYFDVWGTGTMVTVSS

Leichte Kette: DNA Sequenz (396 bp)

Signalsequenz-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTCGGGAAACCAACG
GTGATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCCTTGACAACCAGC
CTCCATCTCTTGCAAGTCACGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTG
AATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTA
AATTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCA
CACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTACTATTGCTGGCAAG
GTACACATTTTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

Leichte Kette: Aminosäure Sequenz (132 aa)

Signalpeptid-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MMSPAQFLFLLVLWIRETN^GDVVM^TQTPL^TLSV^TLGQPASISCKSRQSL^LDSGK^TYL^N
WLLQRP^GQSPK^RLIYL^VSKL^DSGVPDR^FTGSGSG^TDF^TLKISR^VEAE^DLG^VYYC^WQ^GTH^F
PYTFGGG^TKLEIK

Tabelle 20: IMGT Analyse der V(D)J Verknüpfungen von Antikörper 17G6-1

Analyse der Verknüpfung der *Variable* (V), *Diversity* (D) und *Joining* (J) Gene innerhalb der variablen Domäne der schweren (VH) und leichten (VL) Kette mittels des IMGT/JunctionAnalysis Werkzeugs (Lefranc, 2003; Monod et al., 2004).

Sequenz	V-GEN und Allele	Funktionalität	V-REGION Übereinstimmung % (nt)	J-GEN und Allele	D-GEN und Allele	Verknüpfung (aa)	Verknüpfungs-Leseraster
VH	Musmus IGHV1-26*01 F	produktiv	96.53 % (278/288 nt)	Musmus IGHJ1*03 F	Musmus IGHD1-1*01 F	CARYYGKR YFDVW	im Raster
VL	Musmus IGV1-135*01 F	produktiv	98.64 % (290/294 nt)	Musmus IGKJ2*01 F	-	CWQGTHFP YTF	im Raster

Antikörper 7C11-1**Schwere Kette: DNA Sequenz (417 bp)**

Signalsequenz-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTTCTCCTGTCAGGAACTGCACGTGTCCTCTCTG
 AGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA
 TATCCTGTAAGGCTTCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATTAACCTGGGTGAAGCA
 GAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAACCATGGTAGTGC
 TGGCTCCAACCAGAATTTCCAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAG
 CACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGT
 ACAAAGTACTACGGTACTGGCTACAGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACG
 GTCACCGTCTCCTCA

Schwere Kette: Aminosäure Sequenz (139 aa)

Signalpeptid-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MGWSWIFLFLLSGTARVLSVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQS
 HGKSLEWIGDINPNHGSAGSNQNFQKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTKY
 YGTGYRYFDVWGTGTTVTVSS

Leichte Kette: DNA Sequenz (396 bp)

Signalsequenz-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTCGGGAAACCAACG
 GTGATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTTCGGTTACCATTGGACAACCAGC
 CTCCATCTCTTGCAAGTCAAGGCTGAGCCTCTTAGAAAGTGATGGAAAGACATATTT
 GAATTGGTTGTTACAGAGACCAGGCCAGTCTCAAAGCGCCTAATCTATCAGGTGTC
 TAAGCTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTT
 CACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCA
 AGGTACACATTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

Leichte Kette: Aminosäure Sequenz (132 aa)

Signalpeptid-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSRLSLLSDDGKTYLNW
 LLQRPGQSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGHFP
 YTFGGGTKLEIK

Tabelle 21: IMGT Analyse der V(D)J Verknüpfungen von Antikörper 7C11-1

Analyse der Verknüpfung der *Variable* (V), *Diversity* (D) und *Joining* (J) Gene innerhalb der variablen Domäne der schweren (VH) und leichten (VL) Kette mittels des IMGT/JunctionAnalysis Werkzeugs (Lefranc, 2003; Monod et al., 2004).

Sequenz	V-GEN und Allele	Funktio- nalität	V-REGION Übereinstim- mung % (nt)	J-GEN und Allele	D-GEN und Allele	Verknüpfung (aa)	Verknü- pfungs- Leseraster
V _H	Musmus IGHV1- 26*01 F	produktiv	97.22 % (280/288 nt)	Musmus IGHJ1*03 F	Musmus IGHD1-1*01 F	CTKYGTG YRYFDVW	im Raster
V _L	Musmus IGKV1- 135*01 F	produktiv	97.96 % (288/294 nt)	Musmus IGKJ2*01 F	-	CWQGHFP YTF	im Raster

Antikörper 1G11-F2-3**Schwere Kette: DNA Sequenz (423 bp)**

Signalsequenz-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGGGTTGGCTGTGGACCTTGCTATTCCTGATGACAGCTGCCCAAAGTGCCCAAGCA
 CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAACTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAG
 ATCTCCTGCAAGGCTGCTGGGTATACCTTCAACCTATGGAATGAGCTGGGTGAAA
 CAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGCTGGGCTGGATAAACACCTACTCTGGAGTG
 CCAACATATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGATATCTCTGCCA
 GCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCATAAATGAGGACACGGCTGCATATTTCTG
 TACAAGGAGGGACCGTACTATCCTAACTACGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGG
 CACCACTCTCACAGTCTCTCA

Schwere Kette: Aminosäure Sequenz (141 aa)

Signalpeptid-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MGWLWTLFLMATAAQAQSAQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAAGYTFTTYGMSWVKQ
 APGKGLKWLGWINTYSGVPTYADDFKGRFAFSLDISASTAYLQINNLINEATAAYFCTRR
 DRYYPNYDYFDYWGQGTTLTVSS

Leichte Kette: DNA Sequenz (393 bp)

Signalsequenz-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCACCAGTG
 ATGTTTTGTTGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTC
 CATCTCTGAGATCTAGTCAGAGCCTTGACATAGTACTGGAAACACCTATTTAGAA
 TGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAACCTCCTGATCTACAAAGTTTCCACC
 CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGTAGTGGATCAGGGACAGATTTCATA
 CTAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGT
 TCACATGGACCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

Leichte Kette: Aminosäure Sequenz (131 aa)

Signalpeptid-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

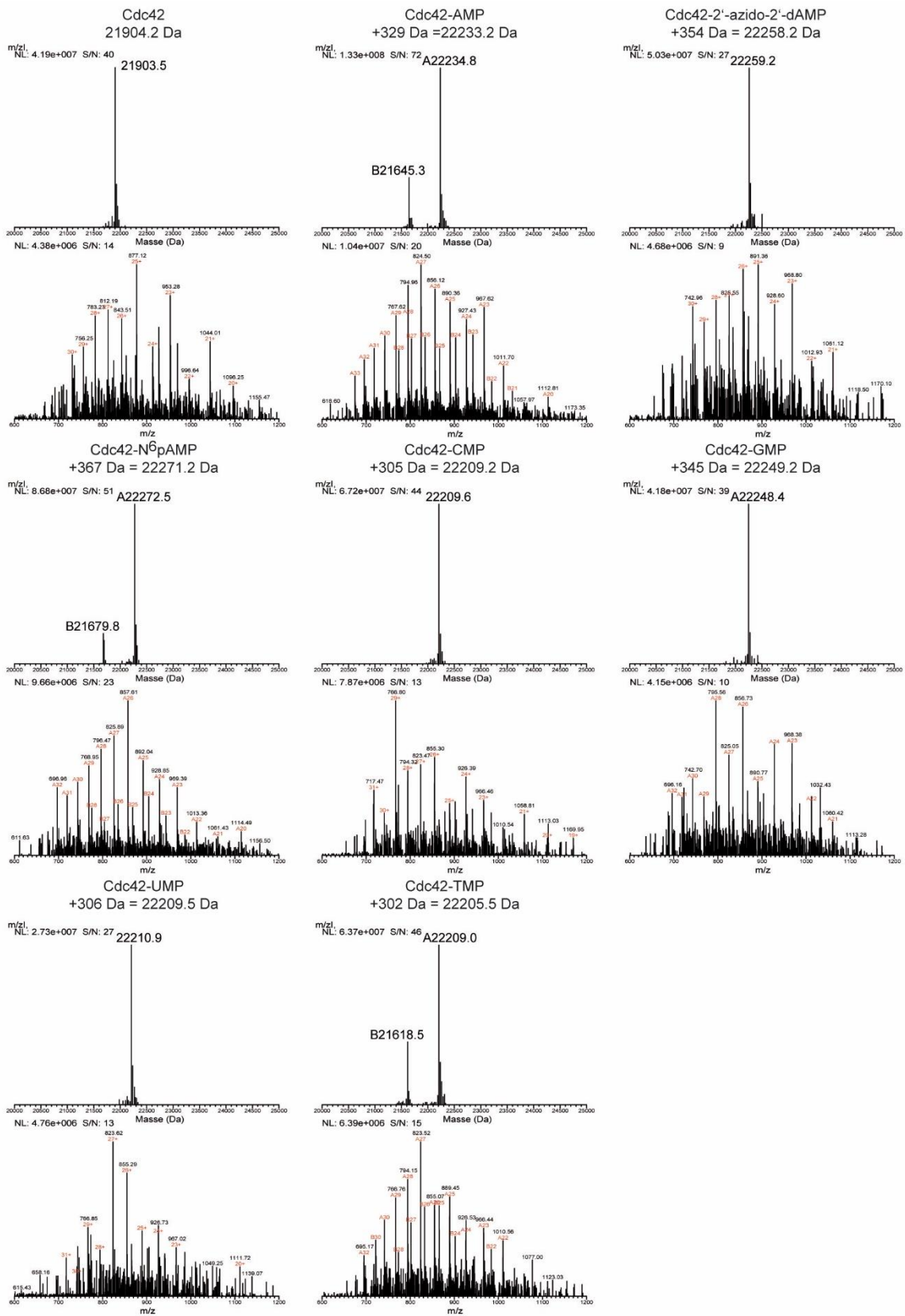
MKLPVRLLVLMFWIPASTSDVLLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYL
 QKPGQSPKLLIYKVSTRFSGVPDRFSGSGTDFILKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPGLTF
 GAGTKLELK

Tabelle 22: IMGT Analyse der V(D)J Verknüpfungen von Antikörper 1G11-F2-3

Analyse der Verknüpfung der *Variable* (V), *Diversity* (D) und *Joining* (J) Gene innerhalb der variablen Domäne der schweren (VH) und leichten (VL) Kette mittels des IMGT/JunctionAnalysis Werkzeugs (Lefranc, 2003; Monod et al., 2004).

Sequenz	V-GEN und Allele	Funktio- nalität	V-REGION Übereinstim- mung % (nt)	J-GEN und Allele	D-GEN und Allele	Verknüpfung (aa)	Verknü- pfungs- Leseraster
VH	Musmus IGHV9- 3*01 F	produktiv	97.57 % (281/288 nt)	Musmus IGHJ2*01 F	Musmus IGHD2-1*01 F	CTRRDRYYP NYDYFDYW	im Raster
VL	Musmus IGKV1- 117*01 F	produktiv	97.62 % (287/294 nt)	Musmus IGKJ5*01 F	-	CFQGSHPGL TF	im Raster

8.1.4 Antikörpercharakterisierung

Abbildung S 4: MS-Bestätigung der NMPylierung durch IbpA in Cdc42ⁱⁱ

Die erwarteten Molekulargewichte sind über den Spektren angegeben. Die Abbildung wurde unverändert übernommen aus (Höpfner et al., 2020) (CC BY 4.0).

8.1.5 AMPylierungsmuster in Zelllysaten

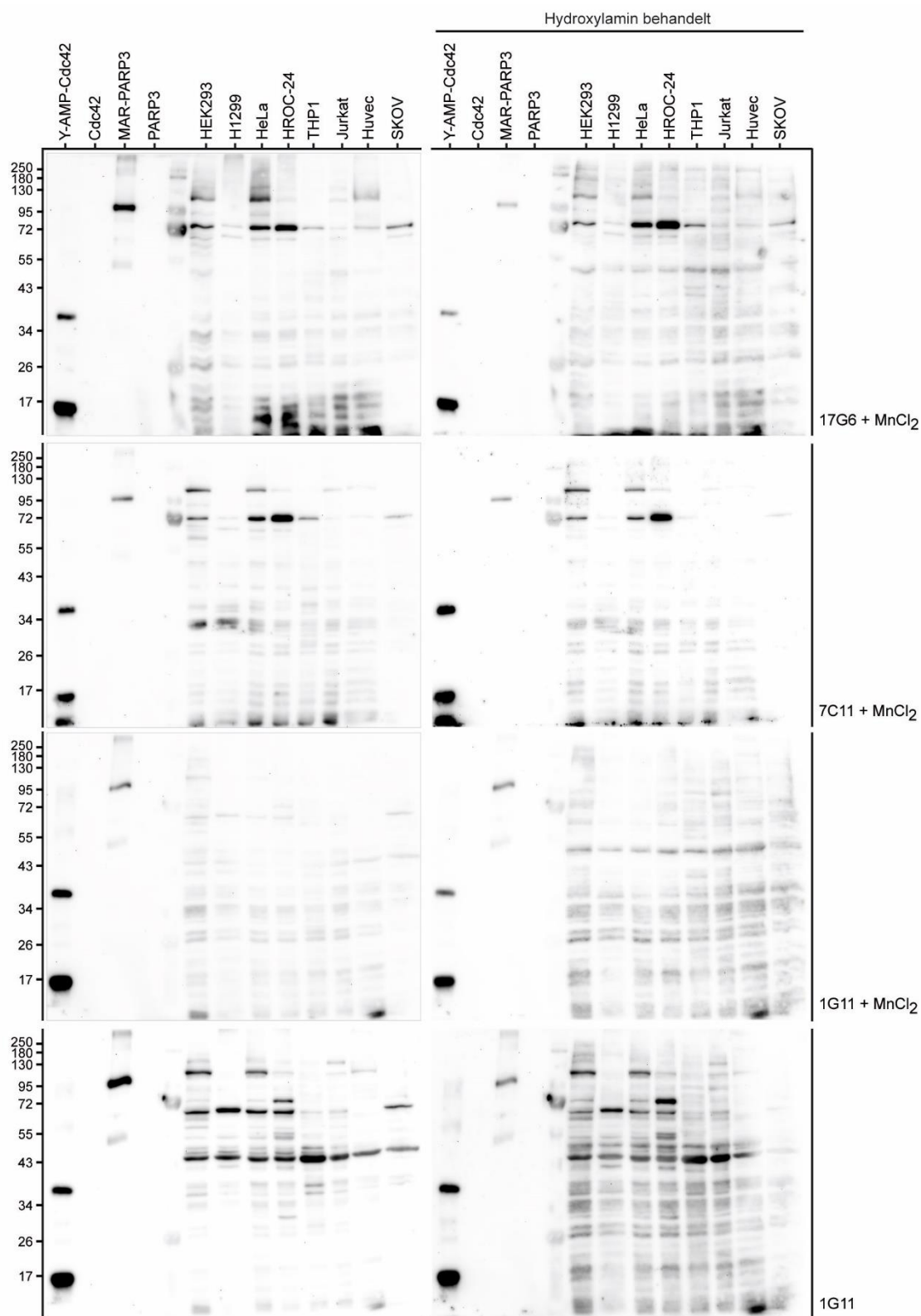


Abbildung S 5: WB-Analyse der AMPylierungsmuster in verschiedenen immortalisierten und Krebszelllinien: vollständige Abbildung aller monoklonaler anti-AMP-Antikörper inklusive Kontrollen

20 µg Zelllysate pro Spur der angegebenen Zelllinien wurden geblottet und mit monoklonalen anti-AMP-Antikörpern wie angegeben unter Verwendung von 1 mM MnCl₂ als Additiv während der Inkubation des primären Antikörpers sondiert. Anschließend wurde der identische Blot mit 1 M Hydroxylamin behandelt, um die ADP-Ribosylierung an Aspartat- und Glutamatresten zu spalten, und mit monoklonalen anti-AMP-Antikörpern in Gegenwart von 1 mM MnCl₂ nachbehandelt.

Im Falle des Antikörpers 1G11 wurde der identische Blot mit 1G11 in Abwesenheit von $MnCl_2$ vor und nach der Hydroxylamin-Behandlung nachbehandelt. Je 10 ng rekombinantes Cdc42-Tyr-AMP bzw. MAR-PARP3 dienen als Positiv-Kontrolle für AMPylierung bzw. ADP-Ribosylierung und erfolgreiche Hydroxylamin-Behandlung. Je 10 ng unmodifizierte Gegenstücke sind als Negativ-Kontrolle enthalten. Die Abbildung wurde unverändert übernommen aus (Höpfner et al., 2020) (CC BY 4.0).

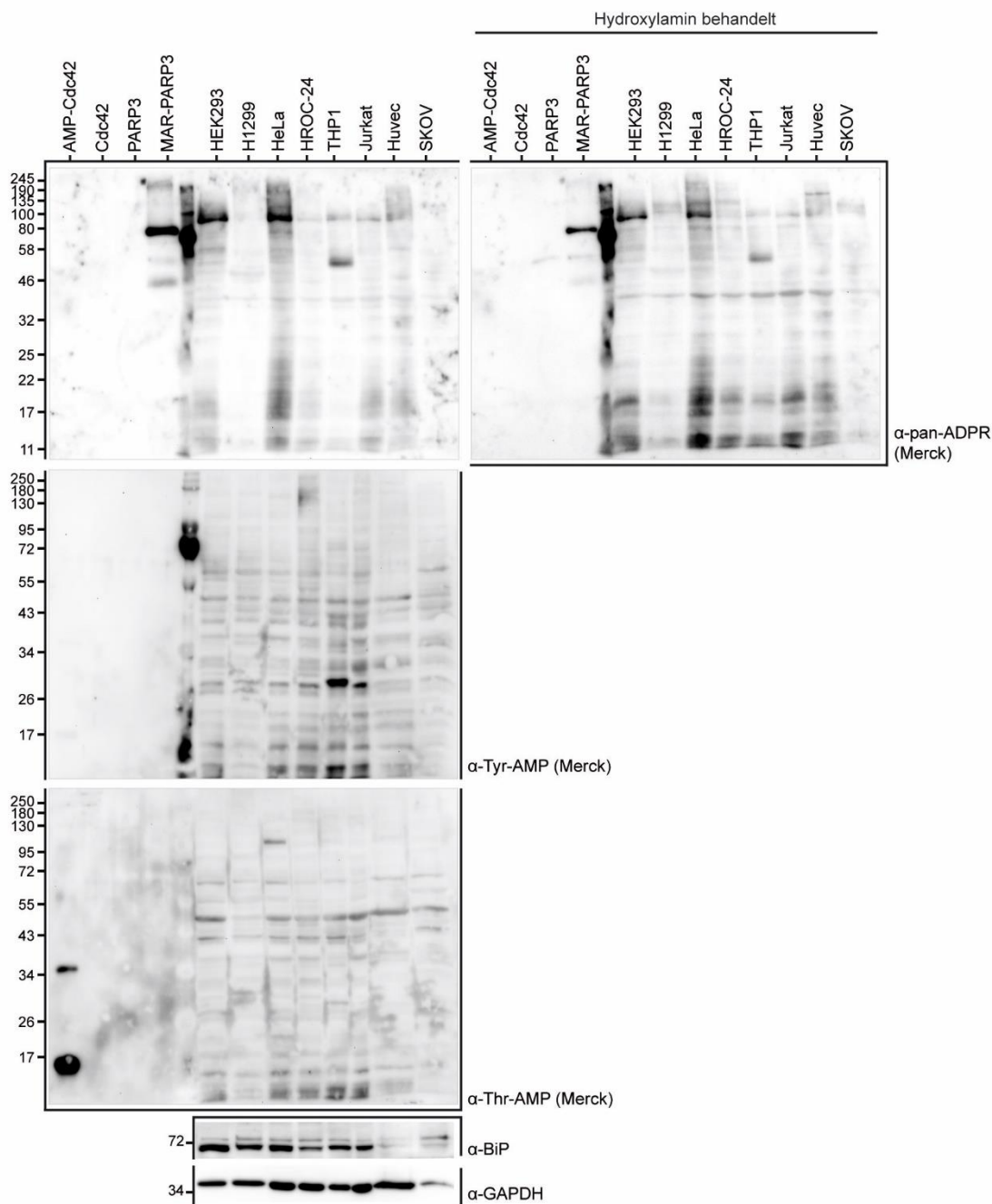


Abbildung S 6: WB-Analyse der AMPylierungsmuster in Zelllinien mittels kommerzieller Antikörper

20 µg Zellysate pro Spur der angegebenen Zelllinien wurden geblottet und mit kommerziellen anti-AMP-Antikörpern wie angegeben sowie mit kommerziellem anti-ADPR-Reagenz sondiert. Für das anti-ADPR-Reagenz wurde der identische Blot anschließend mit 1 M Hydroxylamin behandelt, um die ADP-Ribosylierung an Aspartat- und Glutamat-Resten zu spalten, und erneut mit dem anti-ADPR-Reagenz inkubiert. Der Blot, der zuvor mit kommerziellem anti-Thr-AMP sondiert worden war, wurde gestrippt und mit Antikörpern gegen BiP und GAPDH als Ladekontrolle nachbehandelt. Je 10 ng rekombinantes Cdc42-Tyr-AMP (bzw. Cdc42-Thr-AMP im Falle des anti-Thr-AMP-Antikörpers) bzw. MAR-PARP3 dienen als Positiv-Kontrolle für AMPylierung bzw. ADP-Ribosylierung und erfolgreiche Hydroxylamin-Behandlung. Je 10 ng unmodifizierte Gegenstücke sind als Negativ-Kontrolle enthalten. Die Abbildung wurde unverändert übernommen aus (Höpfner et al., 2020) (CC BY 4.0).

8.2 Ergänzende Daten zu CbFic2

8.2.1 *in vitro* Analysen

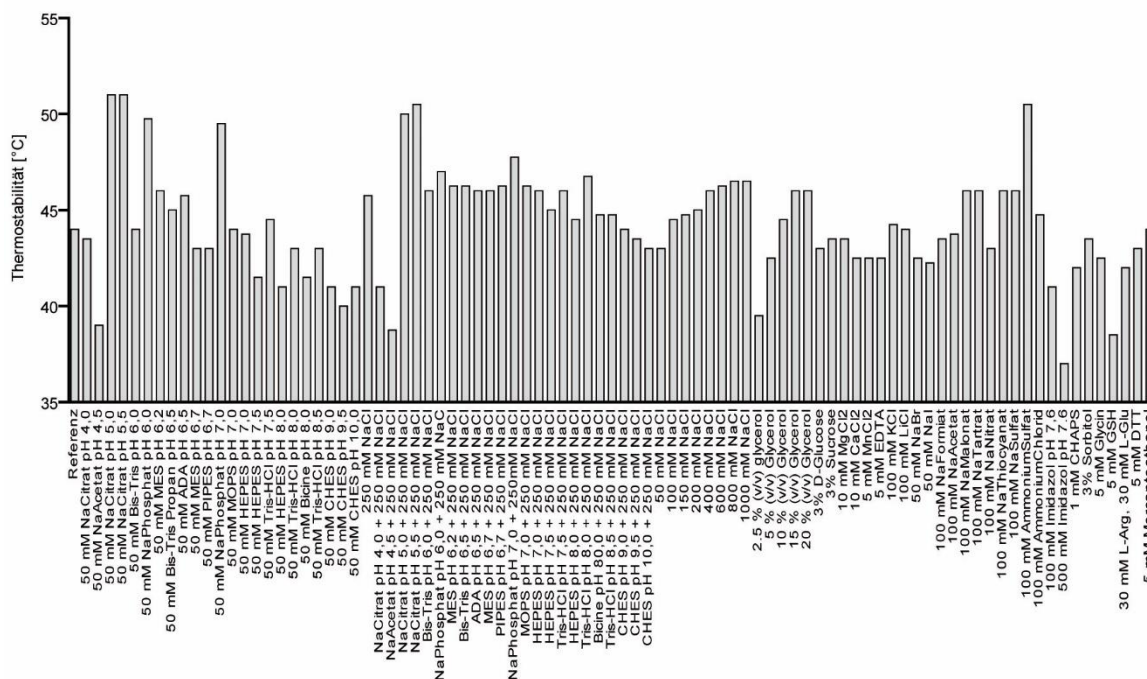


Abbildung S 7: Stabilitätsanalyse von TS-CbFic2 E66G in verschiedenen Puffern mittels TSA

Vollständige Daten zu Abbildung 11 B. Thermische Entfaltung von 4 µg TS-CbFic2 E66G in Gegenwart der angegebenen Puffersubstanzen wurde über SYPRO™ Orange Fluoreszenz verfolgt. Jeder Datenpunkt entspricht einer Einfachmessung.

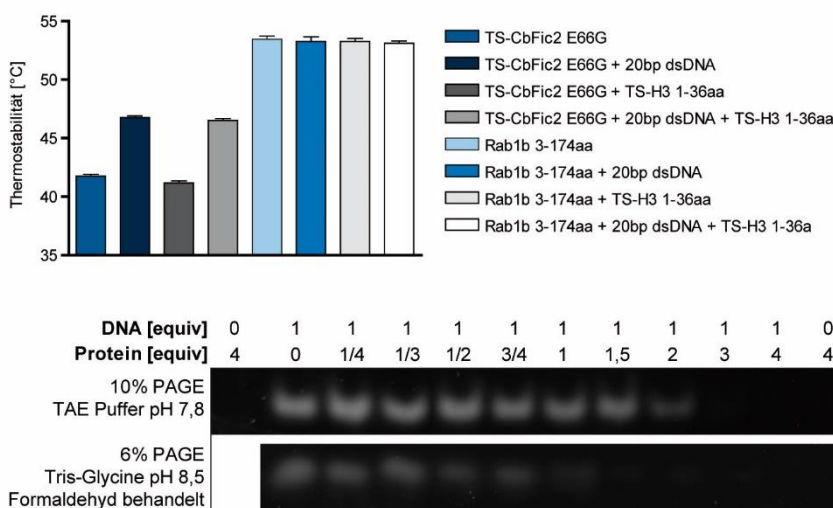


Abbildung S 8: Ergänzende Daten zur DNA-Bindung durch TS-CbFic2 E66G mittels TSA und EMSA

Oben: Vollständige Analyse der Thermostabilität von TS-CbFic2 E66G in An- oder Abwesenheit von 20 bp dsDNA bzw. H3 1-36 aa mittels TSA, inklusive Kontrollexperiment mit nicht-DNA-bindendem Rab1b (Abbildung 12D). Unten: EMSA unter den angegebenen Bedingungen von TS-CbFic2 E66G (Protein) gegenüber 20 bp dsDNA (DNA). DNA wurde mit GelStar angefärbt. Protein läuft nicht ins Gel.

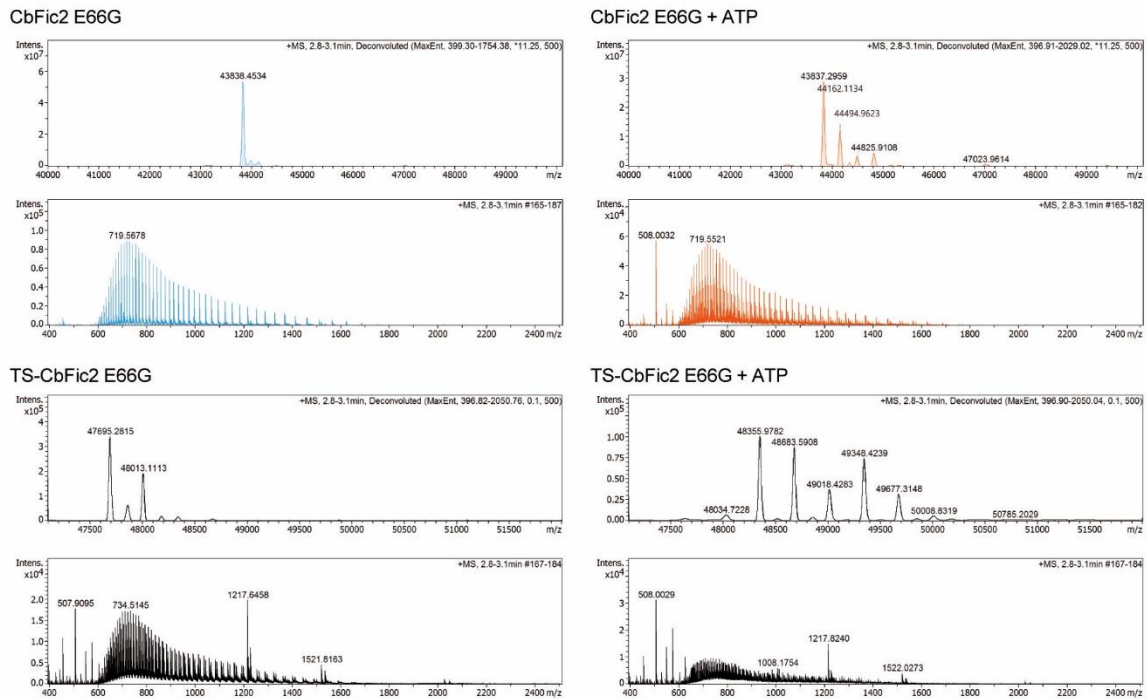


Abbildung S 9: MS-Analyse des Grads der AutoAMPylierung in Fluoreszenzanisotropie
 Ergänzende Daten zu Abbildung 13 G+H. Links: CbFic2 E66G (oben) bzw. TS-CbFic2 E66G (unten) in Abwesenheit von ATP. Rechts: CbFic2 E66G (oben) bzw. TS-CbFic2 E66G (unten) nach Inkubation mit 1 mM ATP für 4 h bei 37 °C. AMPylierung entspricht einem Zuwachs von 329 Da.

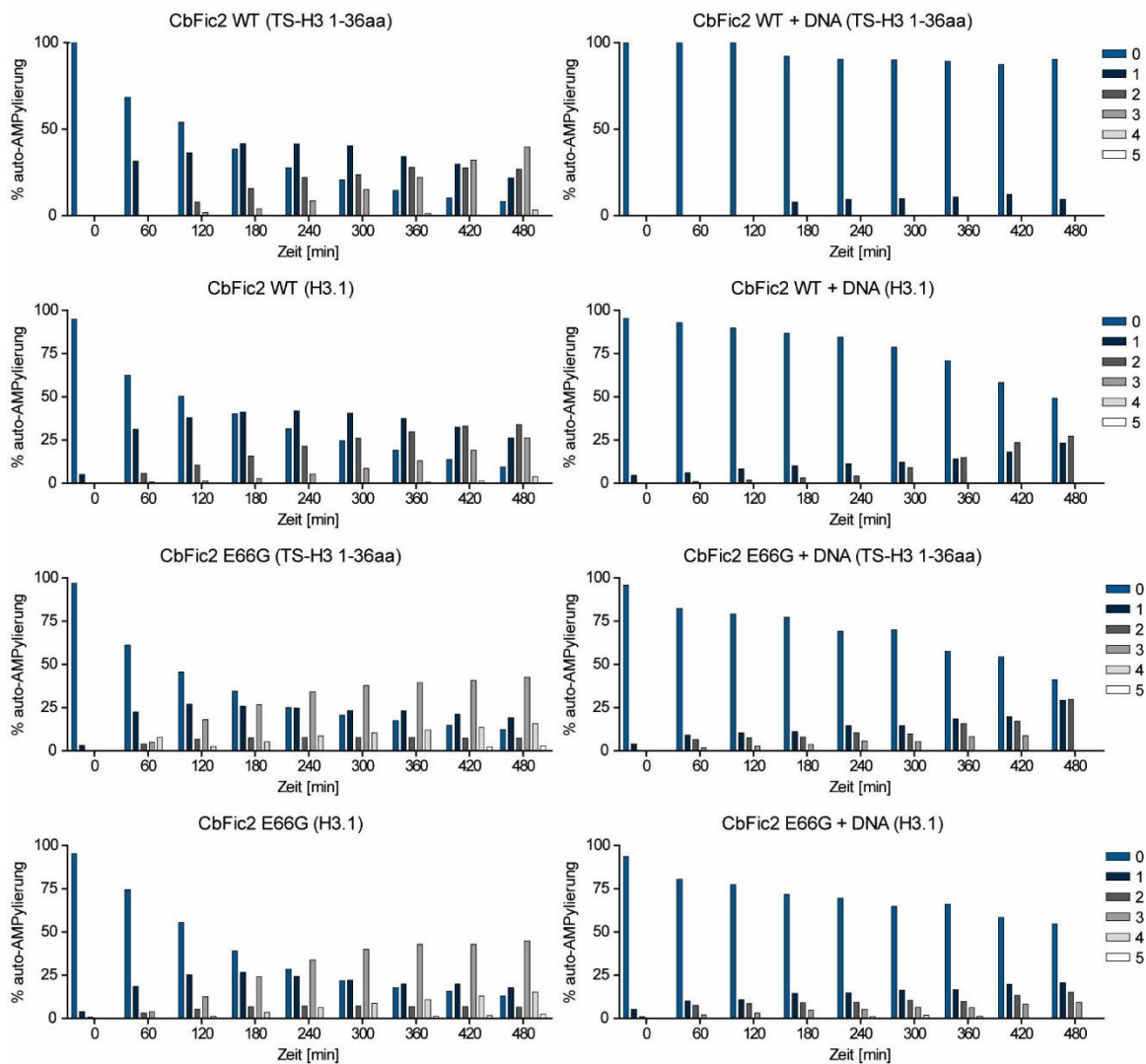


Abbildung S 10: MS-Analyse der AutoAMPylierung CbFic2 WT und E66G in Anwesenheit des Targets
 Ergänzende Daten zu Abbildung 14D. MS-Analyse der AutoAMPylierung von CbFic2 WT oder CbFic2 E66G im zeitlichen Verlauf der Inkubation mit ATP in An- oder Abwesenheit von DNA in Anwesenheit des Targets TS-H3 1-36 aa bzw. H3.1.

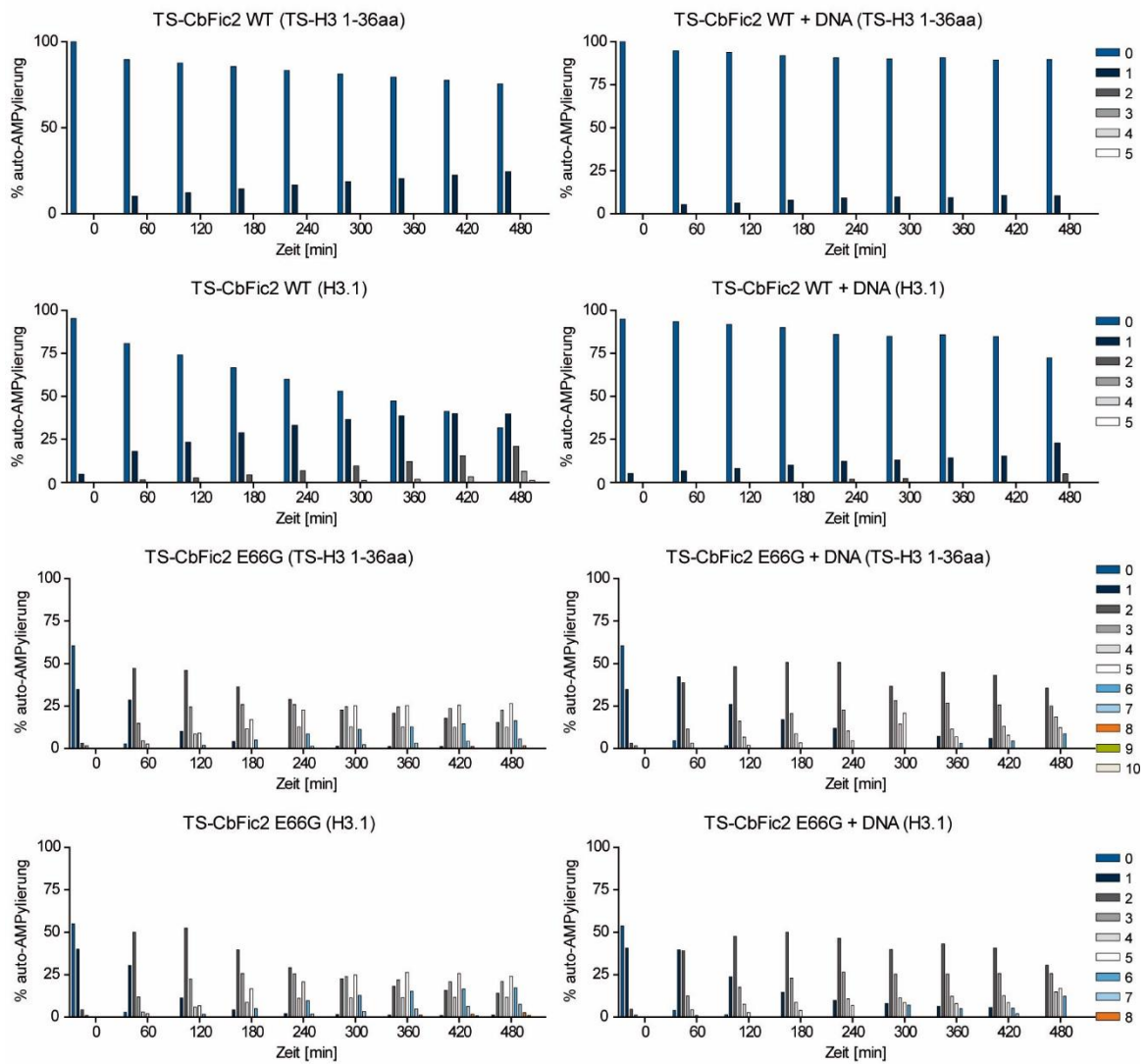


Abbildung S 11: MS-Analyse der AutoAMPylierung von TS-CbFic2 WT und E66G in Anwesenheit des Targets
 Ergänzende Daten zu Abbildung 14D. MS-Analyse der AutoAMPylierung von TS-CbFic2 WT oder TS-CbFic2 E66G im zeitlichen Verlauf der Inkubation mit ATP in An- oder Abwesenheit von DNA in Anwesenheit des Targets TS-H3 1-36 aa bzw. H3.1.

8.2.2 Kinase activity profiling

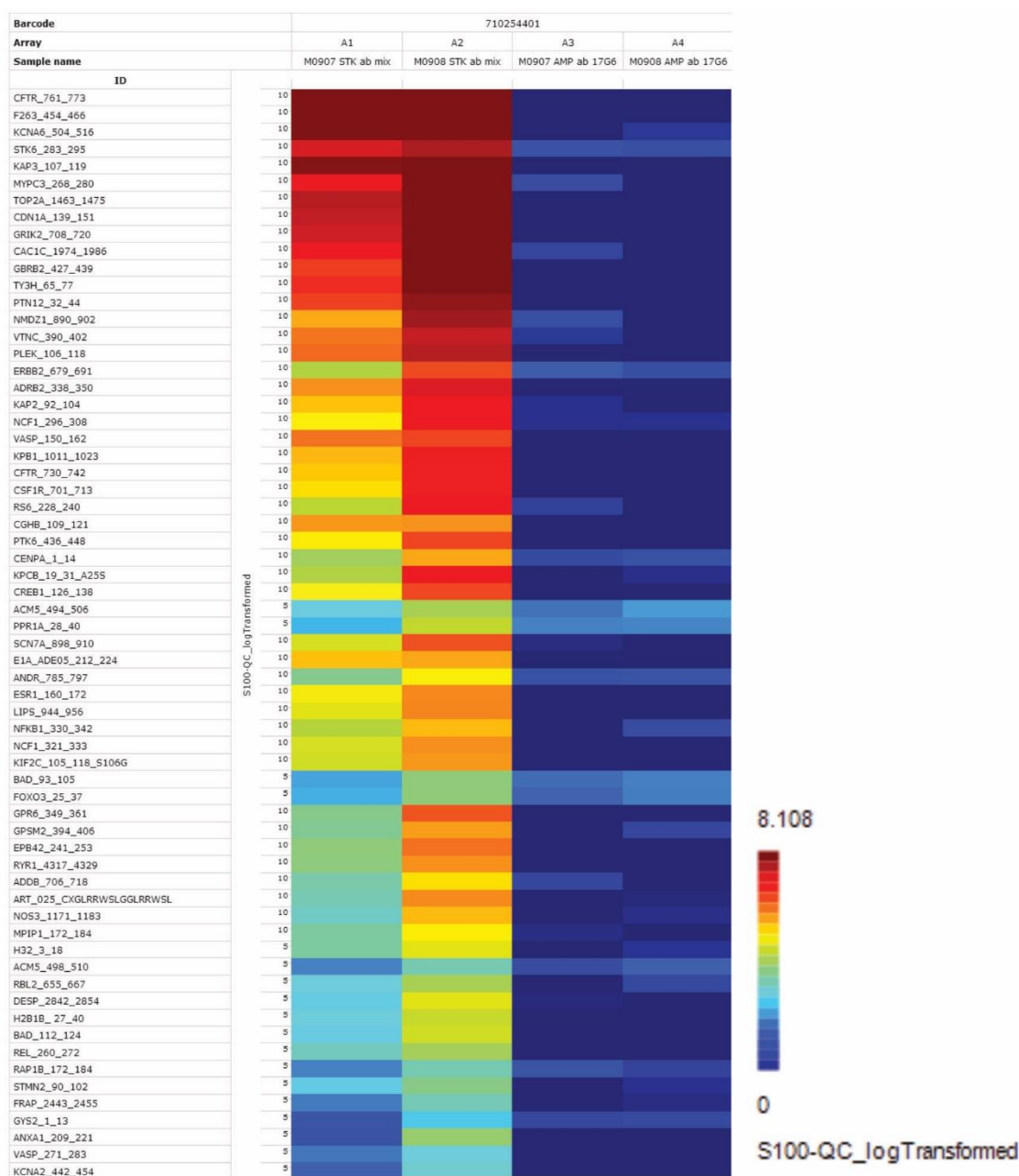


Abbildung S 12: Analyse der globalen Phosphorylierungs- und AMPylierungsaktivität auf STK-Chip

Kinase activity profiling mit HEK293-Lysaten nach transients Expression von GFP-CbFic2 E66G (M0907) für 48 h im Vergleich zur GFP-CbFic2 H205A Expression (M0908). Lysate wurden in Gegenwart von 400 μ M ATP auf STK-PamChip® -Arrays inkubiert und mit der PamStation®12 auf Phosphorylierung mittels anti-Phospho-Ser/Thr-Antikörpern (links) und AMPylierung mittels anti-AMP-Antikörper 17G6 (rechts) untersucht. Datensatz repräsentiert je eine einfach-Bestimmung je CbFic2 Version.

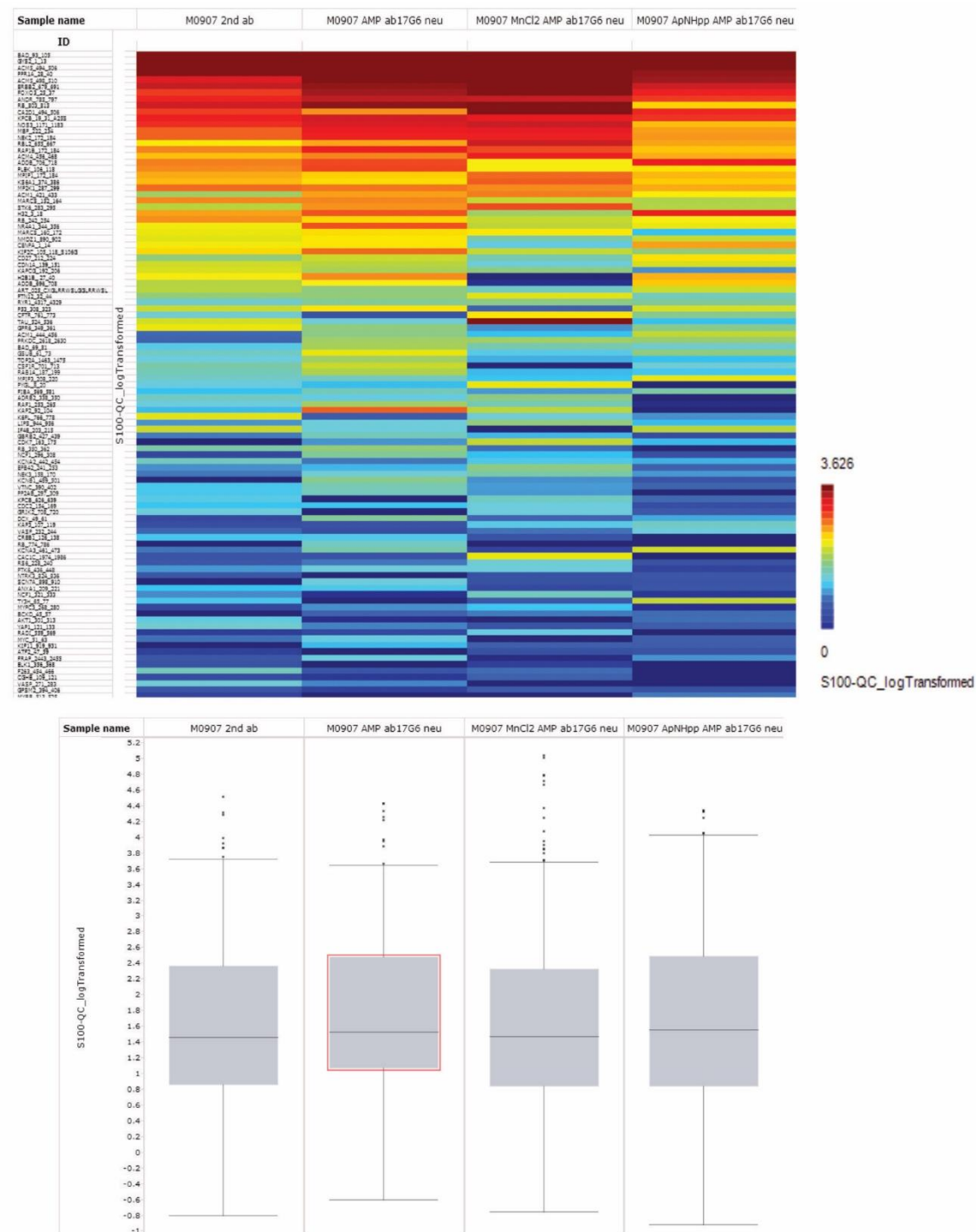


Abbildung S 13: Analyse der globalen AMPylierungsaktivität auf STK-Chip von AMPNPP und MnCl₂
Kinase activity profiling mit HEK293-Lysaten nach transienster Expression von GFP-CbFic2 E66G (M0907) für 48 h im Vergleich zur GFP-CbFic2 H205A Expression (M0908). Lysate wurden in Gegenwart von 400 µM ATP bzw. AMPNPP (ApNHpp) auf STK-PamChip® -Arrays inkubiert und mit der PamStation®12 auf AMPylierung mittels anti-AMP-Antikörper 17G6 in An- und Abwesenheit von MnCl₂ untersucht. Sekundär-Antikörper allein dient als Kontrolle. Datensatz repräsentiert je eine einfach-Bestimmung. Oben: Heatmap, unten: Box-Plot-Diagramm.



Abbildung S 14: Upstream-Kinasenanalyse nach *Kinase activity profiling*

Abbildung der potenziellen Upstream-Kinasen, gelistet nach Specificity Score: Der Unterschied zwischen Proben GFP-CbFic2 E66G (M0907) und GFP-CbFic2 H205A (M0908) wurden auf Basis der Veränderung des PamStation® STK-Peptid Sets analysiert. Die Länge jeder Säule repräsentiert die statistische Veränderung zwischen den Proben. Ein positiver Wert des Scores repräsentiert eine Erhöhung in Probe GFP-CbFic2 E66G (M0907). Die Farbe gibt Hinweis auf die Spezifität des Kinase-Sets an Peptiden.

8.2.3 stabile THP-1 Zelllinien

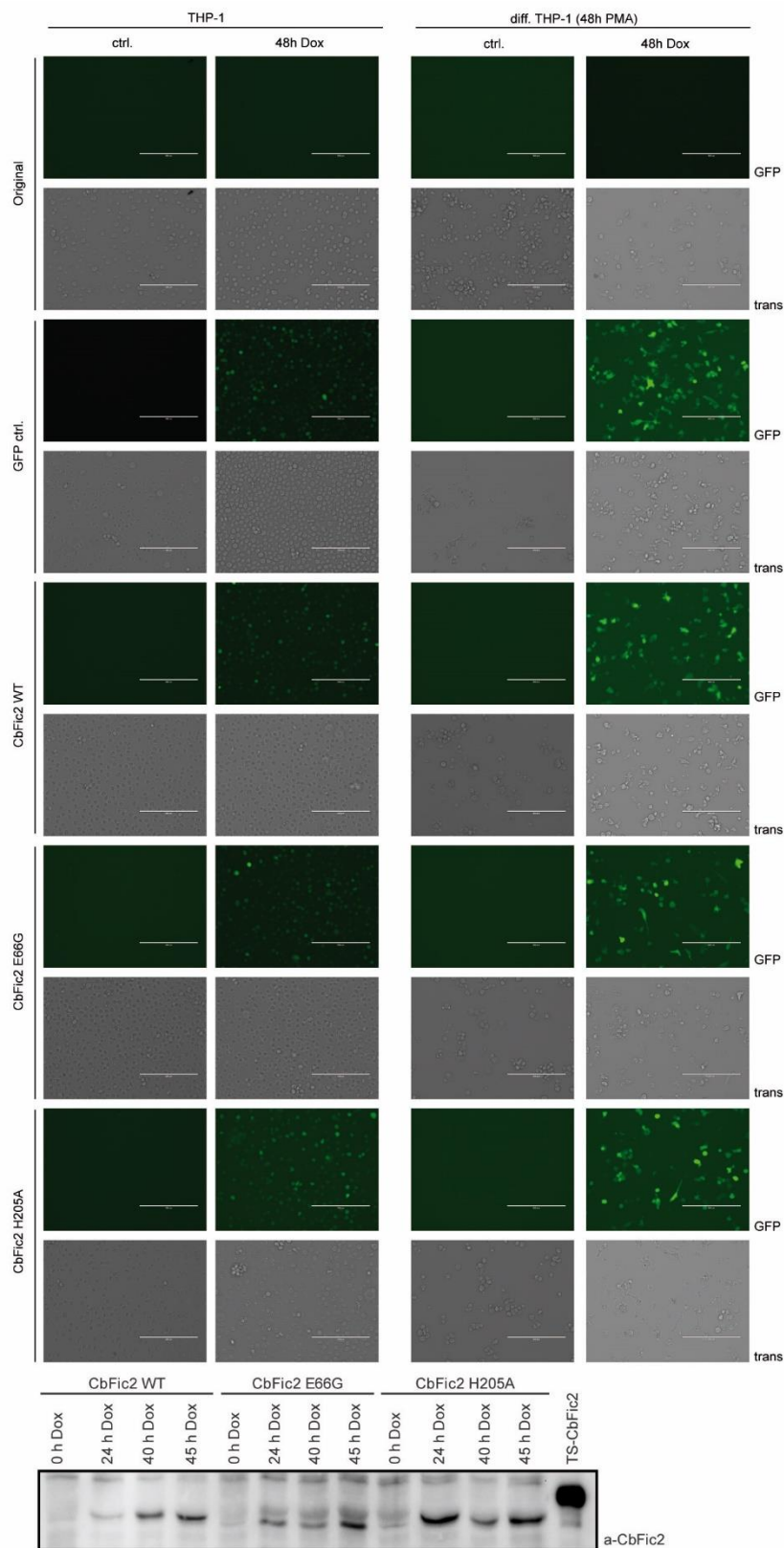


Abbildung S 15: Verifizierung der GFP-P2A-CbFic2 Expression in stabilen THP-1 Zelllinien

THP-1 Zellen (ctrl.) bzw. stabile THP-1 Zelllinien mit den jeweiligen Plasmiden GFP-P2A-CbFic2 WT, GFP-P2A-CbFic2 E66G, GFP-P2A-CbFic2 H205A bzw. dem Leervektor (GFP ctrl.) wurden undifferenziert oder differenziert (diff.) mit Doxycyclin induziert. Die GFP-Fluoreszenz wurde im Vergleich zum Durchlicht (trans) mikroskopisch verfolgt. CbFic2-Expression in 20 µg/Spur differenzierten THP-1 Zellen wurde mittels WB gegen CbFic2 nachgewiesen.

8.2.4 LC-MS/MS Analyse der anti-AMP-IP

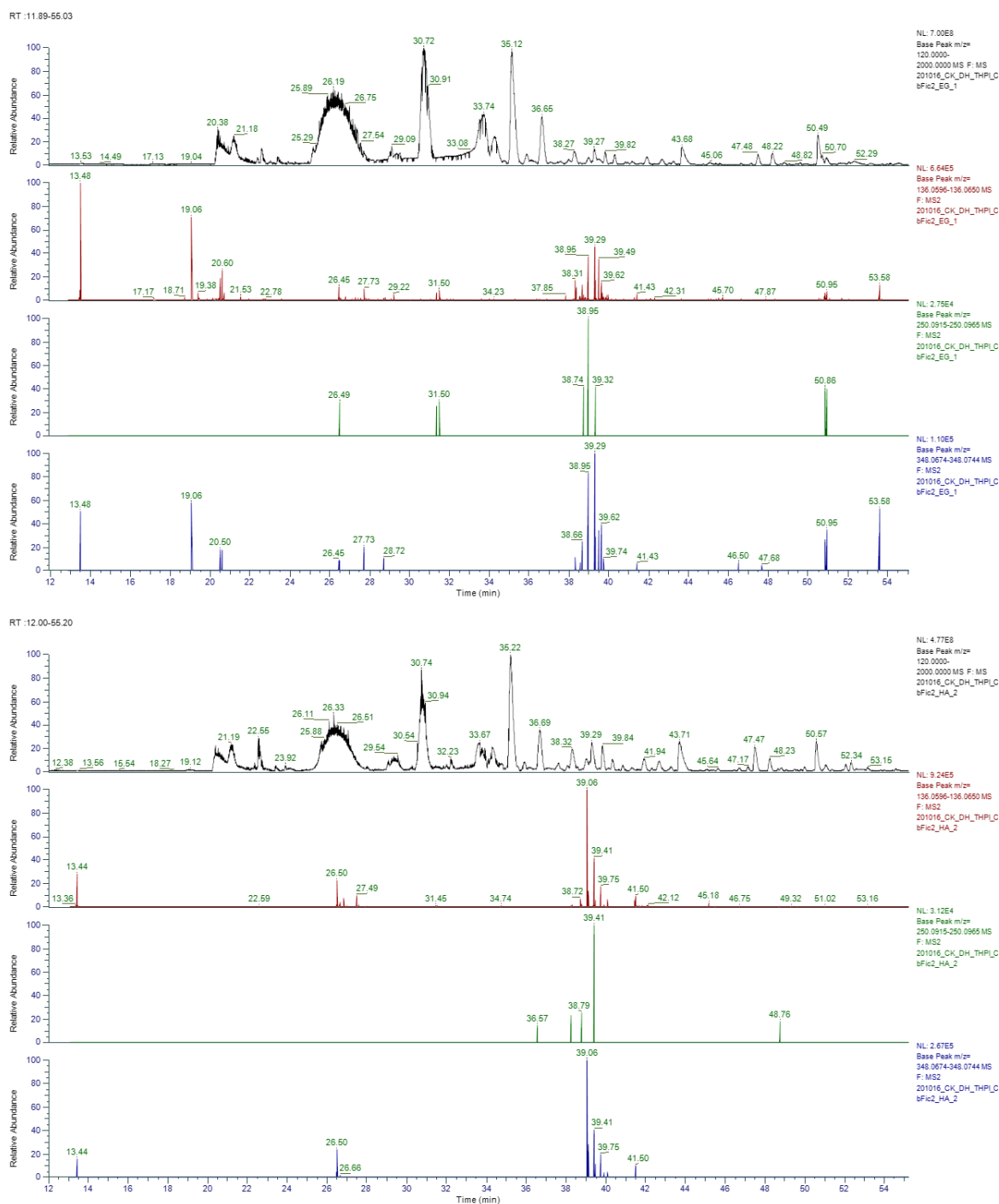


Abbildung S 16: Fragmentierungs-Muster AMPylierter Peptide in anti-AMP-IP Proben

Oben: Beispielhafte Abbildung eines Triplikates der CbFic2 E66G Probe. Unten: Beispielhafte Abbildung eines Triplikates der CbFic2 H205A. AMPylierte Peptide sind durch ein kombiniertes Signal bei m/z 136 (rot) und 348 (blau) identifizierbar.

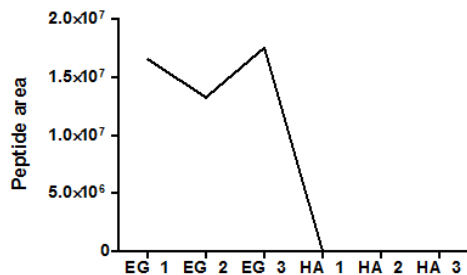


Abbildung S 17: Repräsentation der Verteilung des AMPylierten HMG-I Peptids
HMG-I liegt nur in CbFic2 E66G Proben AMPyliert vor.

8.2.5 Domänen- und Sekundärstruktur-Vorhersage von CbFic2

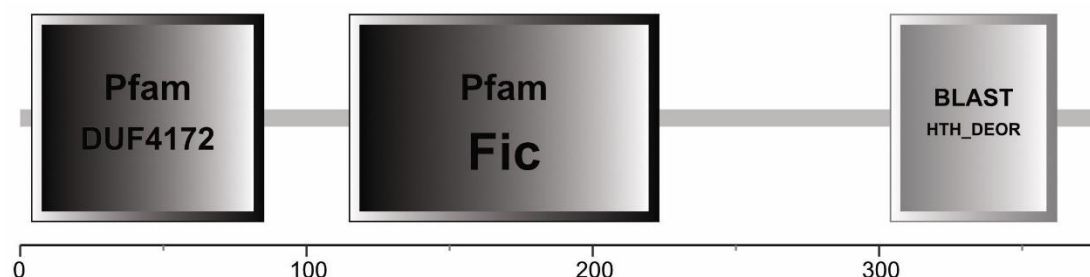


Abbildung S 18: Domänenstruktur-Analyse von CBU_0822 (CbFic2) mit SMART

SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) ermöglicht die Identifikation und Annotation von genetisch mobilen Domänen und die Analyse von Domänenarchitekturen von Proteinen (Letunic et al., 2021; Schultz et al., 1998). Pfam:DUF4172 4-85 aa, 1.6e-32; Pfam:Fic 115-223 aa, 8.3e-19; Blast:HTH_DEOR 304-362 aa, 8e-7

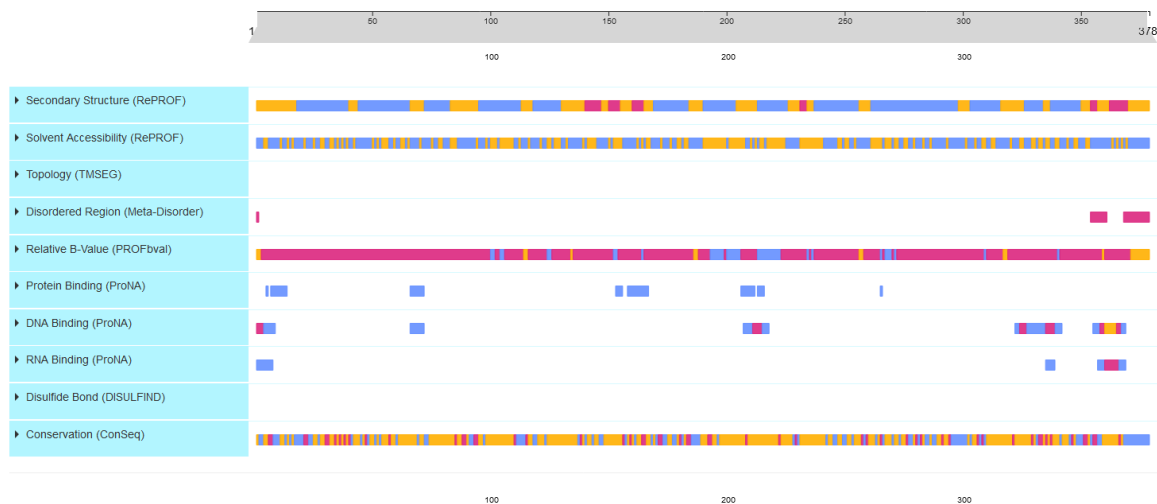
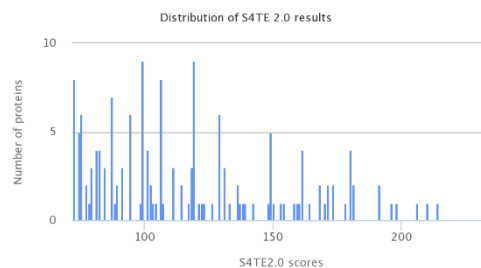


Abbildung S 19: Sequenzanalyse von CBU_0822 (CbFic2) mit PredictProtein

PredictProtein ist ein Meta-Service für die Sequenzanalyse, der strukturelle und funktionelle Eigenschaften von Proteinen vorhersagt (Yachdav et al., 2014). Secondary structure: Helix blau, Faltblatt magenta, Andere gelb. Solvent Accessibility: Exposed blau, Buried gelb. Relative B-Value: 00-30 (gering) blau, 31-70 (mittel) magenta, 71-99 (hoch) gelb. Protein-binding (reliability score: 48; GO:0005515), DNA-binding (reliability score: 64; GO:0003677), RNA-binding (reliability score: 31; GO:0003723). Protein Binding (RI: 00-33) blau. DNA-Binding (RI: 00-33) blau, DNA-Binding (RI: 34-66) magenta, DNA-Binding (RI: 67-100) gelb. RNA Binding (RI: 00-33) blau, RNA Binding (RI: 34-66) magenta. RI = reliability index, Verlässlichkeit der positiven Vorhersage. Die Skala der positiven Vorhersage reicht von 0 bis 100. Je höher der Score, desto verlässlicher die Vorhersage.

8.2.6 Sekretion von Coxielleneffektoren



Threshold	Number of S4TE 2.0 putative effectors	Total number of proteins
72	159	1818

Legend

	Protein		Eukaryotic-like domain		Mitochondrial Localization Signal		EPIYA domain		C-ter charge
	Homology		Domain of Unknown Function		E-block		C-ter hydrophobicity		C-ter basicity
	Promoter motif		Nuclear Localization Signal		Coiled-coil		Prenylation domain		Global hydrophilicity

> [AAO89926.1](#) - CBU_0372 - Fic family protein

Lenght: 454 Score: 173

SIL: 1 PIL: 0



```

MRKRNRI RGSRNTPHWYNSKTNQGLLIITSVAILAYLFQNLFNVNSISSDNKTGVAEPPSPA
LRENSEEEPLMLQIILLQLPLQLGLVALCNALKQEKVRRRIITEPKVGLIGNFQKEHPLGRI
VESPLTKAESKRQWKSIIYVITAFPKRVEVCQSMVARWNKIEELVEGLRSSIKITTSQDLKS
LSKEENRFIEKLASVNTINGISLHAGLVSKKESEHASINFRKAYALIQDWVKNREPLSKID
IRTLKLLHALLTRGHSSAFRDKSRI SLGRDGYPTQPSNLDVANDIINFLKSDSPAIIYKAI
TAQELLLSAHLFRDGNHRLASLIRIWWLETHGIPANVISTEEAERLMLLVKPLRMPGAIPPE
EAKQLDFNSKDAETLAGRWFYAPRFLNNGIFSRIELNLERLYIKRKRKEILEMMTSRIEER
LETLCILHCEQNLENRFSY
    
```

Euk-like:	Name	Domain	Start	End	Score	EValue
	Fic	PF02661.17	247	338	32.5	0.000000026
NLS:	Type	Start	Seq	End		
	Monopartite	1	MRKRNRI	8		
Eblock:	Start	Seq	End			
	429	SRIEERLETL	439			

Charges: -1 Basicity: 7 Cter Hydrophobicity: 0 Global Hydrophilicity: -156.5

[Return to genome ...](#)

> [AAO91562.1](#) - CBU_2078 - Fic family protein

Lenght: 348 Score: 158

SIL: 1 PIL: 0



```

MFKPLFQISNQTANALTAIERARGFLEAATLSLEWLEKMQNKALVLEAHHHTTHIEGTQLTLE
ESERLWQGHAEVNPDDAKELLNYREAFELVSNYVGDGEPITEGLIREIHKRLVQGVRGDS
ATPGLYRKIQNYVNSKTKEVIYTPPPAYEISHLMQGLVDWLNEEDIHPVLVSGIAQFQLV
HIHPFLDNGRTARLLSTLCLYRKGYDFKCLFTISEYDRNRADYKAIQSVRENDMDMTGW
LEYFSEGLAVQLREIKDLGKQAIKQSLLSKKHLSEKGLAIDYMTTEGSLSIQQFEKMCPE
VTRRTLQRELKDLIDRGLVRSSGATSNLIYKLEKSAK
    
```

Promoter:	Name	Start	Sequence	End	Score	Strand
	-> Apm	-194	GCGGACCCC TTGAG	-180	0.75	-
Euk-like:	Name	Domain	Start	End	Score	EValue
	Fic	PF02661.17	103	207	77.9	1.9e-22

Charges: 4 Basicity: 9 Cter Hydrophobicity: 0 Global Hydrophilicity: -163.2

[Return to genome ...](#)

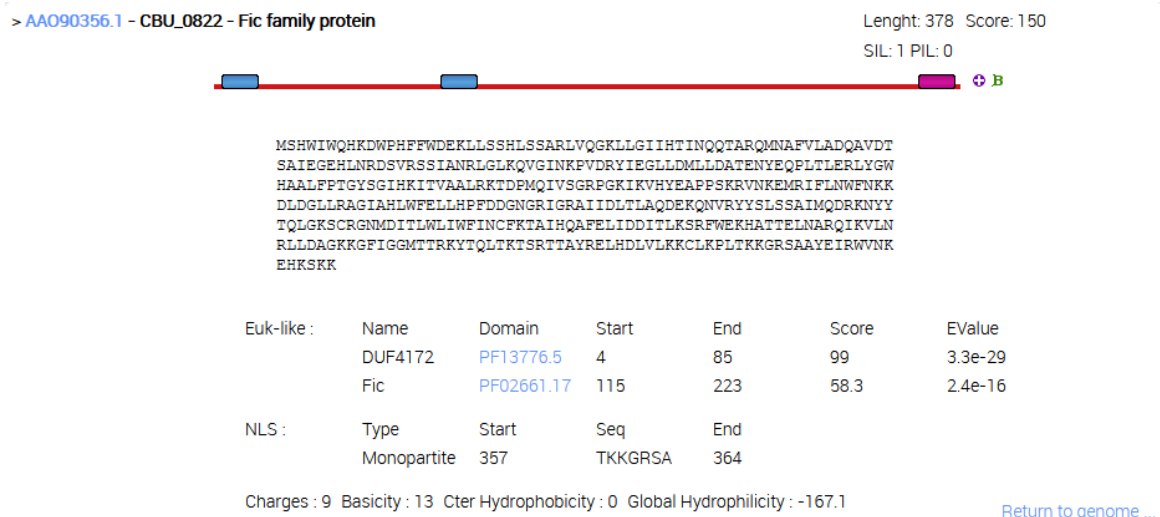


Abbildung S 20: S4TE 2.0 Vorhersage von FIC-Protein-Sekretion

S4TE 2.0 (*Searching Algorithm for Type IV Effector proteins*) ist ein Softwarepaket, das für die Vorhersage von Typ-IV-Effektorproteinen (T4Es) aus vollständigen bakteriellen Genomen und die Analyse ihres genomischen Kontextes entwickelt wurde (Noroy et al., 2019). S4TE 2.0 sagt T4E-Kandidaten anhand einer Kombination von 14 Sequenzmerkmalen (siehe Legende) voraus und ordnet sie ein. Dazu gehören die Homologie zu bekannten Effektoren, die Homologie zu eukaryotischen Domänen, das Vorhandensein von subzellulären Lokalisationssignalen oder Sekretionssignalen. S4TE 2.0 generiert einen Score und sortiert die besten T4E-Kandidaten. Demzufolge liegen die drei FIC-Proteine aus *C. burnetii* RSA 493 CBU_0372 (Score 173), CBU_2078 (Score 158, CbFic1) und CBU_0822 (Score 150, CbFic2) deutlich über dem Schwellenwert von 72 und sind somit vorhergesagte Effektoren. Das letzte verbleibende FIC-Protein CBU_0946 (RhuM) schafft es mit einem Score von 74 nur knapp über den Schwellenwert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Domänenstruktur von CbFic2	10
Abbildung 2: Motivation, Haptendesign und Selektionsstrategie für die Generierung von anti-AMP-Antikörpern	19
Abbildung 3: Bewertung der Spezifität und Selektivität der generierten anti-AMP-Antikörper ...	21
Abbildung 4: Native Bindung von AMPyliertem Antigen durch die monoklonalen anti-AMP-Antikörper	22
Abbildung 5: Erkennung von AMPylierung und MARYlierung in Gegenwart von Additiven.....	25
Abbildung 6: Auswertung der generierten anti-AMP-Antikörper in IP und Anwendung auf Zellysat	27
Abbildung 7: Analyse der AMPylierungsmuster in verschiedenen Krebs- und immortalisierten Zelllinien im WB	29
Abbildung 8: Analyse der AMPylierungsmuster im zeitlichen Verlauf der Coxielleninfektion ...	32
Abbildung 9: Analyse der AMPylierungsmuster nach CbFic2 Expression in HEK293 Zellen mittels WB und IP	35
Abbildung 10: WB-Analyse der AMPylierungsmuster nach Expression verkürzter CbFic2 Versionen in HEK293	36
Abbildung 11: Einfluss von Salz und pH auf die Stabilität und Funktion rekombinanten CbFic2	39
Abbildung 12: Auswirkungen der DNA-Bindung von CbFic2 auf seine Aktivität und Stabilität .	42
Abbildung 13: Anisotropieanalyse der Bindungsaffinitäten von CbFic2 Versionen gegenüber DNA Versionen.....	44
Abbildung 14: Analyse der AutoAMPylierung verschiedener CbFic2 Versionen mittels MS und WB.....	46
Abbildung 15: Analyse der DeAMPylierungsfähigkeit von CbFic2 WT mittels WB und ELISA	49
Abbildung 16: Globale Reduktion der Phosphorylierungsaktivität im <i>Kinase activity profiling</i> ...	51
Abbildung 17: Analyse der AMPylierung in stabilen CbFic2-exprimierenden THP1 Makrophagen	54
Abbildung 18: CID-Fragmentationsspektrum des AMPylierten HMGA1-Peptids.....	56
Abbildung 19 Heatmap der An- und Abreicherung von Proteinen nach anti-AMP-IP	58
Abbildung 20: Regulation von CbFic2 durch DNA-Bindung und Automodifikation	66
Abbildung 21: Modulierte Signalwege durch CbFic2 in menschlichen Zellen.....	73
Abbildung S 1: Schema der Peptid-Festphasensynthese für Peptide S2 und S3	129
Abbildung S 2: Qualitätskontrolle der synthetisierten Peptide S2 und S3	130
Abbildung S 3: Antikörper-Generierung und –Selektion gegen native Epitope	132
Abbildung S 4: MS-Bestätigung der NMPylierung durch IbpA in Cdc42.....	136

Abbildung S 5: WB-Analyse der AMPylierungsmuster in verschiedenen immortalisierten und Krebszelllinien: vollständige Abbildung aller monoklonaler anti-AMP-Antikörper inklusive Kontrollen	137
Abbildung S 6: WB-Analyse der AMPylierungsmuster in Zelllinien mittels kommerzieller Antikörper	138
Abbildung S 7: Stabilitätsanalyse von TS-CbFic2 E66G in verschiedenen Puffern mittels TSA	139
Abbildung S 8: Ergänzende Daten zur DNA-Bindung durch TS-CbFic2 E66G mittels TSA und EMSA	139
Abbildung S 9: MS-Analyse des Grads der AutoAMPylierung in Fluoreszenzanisotropie	140
Abbildung S 10: MS-Analyse der AutoAMPylierung CbFic2 WT und E66G in Anwesenheit des Targets	141
Abbildung S 11: MS-Analyse der AutoAMPylierung von TS-CbFic2 WT und E66G in Anwesenheit des Targets	142
Abbildung S 12: Analyse der globalen Phosphorylierungs- und AMPylierungsaktivität auf STK-Chip.....	143
Abbildung S 13: Analyse der globalen AMPylierungsaktivität auf STK-Chip von AMPNPP und MnCl ₂	144
Abbildung S 14: Upstream-Kinasenanalyse nach <i>Kinase activity profiling</i>	145
Abbildung S 15: Verifizierung der GFP-P2A-CbFic2 Expression in stabilen THP-1 Zelllinien	146
Abbildung S 16: Fragmentierungs-Muster AMPylierter Peptide in anti-AMP-IP Proben	147
Abbildung S 17: Repräsentation der Verteilung des AMPylierten HMG-I Peptids	148
Abbildung S 18: Domänenstruktur-Analyse von CBU_0822 (CbFic2) mit SMART	148
Abbildung S 19: Sequenzanalyse von CBU_0822 (CbFic2) mit PredictProtein	148
Abbildung S 20: S4TE 2.0 Vorhersage von FIC-Protein-Sekretion	150

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste signifikant veränderter Peptide im <i>Kinase activity profiling</i>	52
Tabelle 2: Angereicherte Proteine in LC-MS/MS Analyse nach anti-AMP IP	59
Tabelle 3: Signalwege im Datensatz angereicherter Proteine nach anti-AMP IP	59
Tabelle 4: Abgereicherte Proteine in LC-MS/MS Analyse nach anti-AMP IP	60
Tabelle 5: Signalwege im Datensatz abgereicherter Proteine nach anti-AMP IP	61
Tabelle 6: Liste aller verwendeten Vektoren und ihrer Resistenzen	82
Tabelle 7: Übersicht aller verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme	83
Tabelle 8: Liste verwendeter Plasmide für die Antikörper-Generierung	84
Tabelle 9: Liste generierter Plasmide für rekombinante CbFic2-Studien	84
Tabelle 10: Liste verwendeter Zelllinien, Kulturmedien und deren Herkunft	85
Tabelle 11: Von Adam Cichy generierte Plasmide zur transienten GFP-CbFic2 Expression in Säugetierzellen	86
Tabelle 12: Zielplasmide zur Generierung stabiler THP-1 Zelllinien	87
Tabelle 13: Expressions- und Lysebedingungen für rekombinante Proteine in Antikörper-Generierung	93
Tabelle 14: Expressions- und Lysebedingungen für rekombinante Proteine im Kontext von CbFic2	93
Tabelle 15: Reinigungspuffer für rekombinante Proteine in Antikörper-Generierung	94
Tabelle 16: Reinigungspuffer für rekombinante Proteine im Kontext von CbFic2	95
Tabelle 17: Randomisierte DNA Oligonukleotide zur Verwendung als Co-Substrat für CbFic2	101
Tabelle 18: Oligonukleotide für Fluoreszenzanisotropie	102
Tabelle 19: Konventionelles Immunisierungsprotokoll von GenScript	105
Tabelle 20: IMGT Analyse der V(D)J Verknüpfungen von Antikörper 17G6-1.	133
Tabelle 21: IMGT Analyse der V(D)J Verknüpfungen von Antikörper 7C11-1	134
Tabelle 22: IMGT Analyse der V(D)J Verknüpfungen von Antikörper 1G11-F2-3.	135

