

Nicole Engel  
Dr. med.

## **Untersuchungen zur Regulation der Expression und Aktivität der humanen Histondeacetylase SIRT1 (Silent Information Regulator 1) und deren Bedeutung für das Zellüberleben**

Geboren am 27.09.1982 in Riesa  
Staatsexamen am 01.12.2008 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Mahlknecht, PhD (SUNY)

Schon seit mehreren Jahrzehnten ist die Untersuchung der Organisation und Umsetzung der Erbinformation sowie die Regulation der Genexpression Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Neben dem genetischen Code wird dabei zunehmend der epigenetische Code propagiert, d.h. die Regulation der Genexpression auf einer der DNA übergeordneten Ebene, der der posttranslationalen Histonmodifikationen. Zu diesen zählen neben Phosphorylierung, Methylierung und Ubiquitinylierung auch die Acetylierung, wodurch es insbesondere durch letztere durch die Ausbildung von Euchromatin zu einer vermehrten Genexpression kommt. Durch die entgegengesetzte Reaktion der Deacetylierung kommt es wiederum zur Ausbildung von Heterochromatin und damit zum „Silencing“ der entsprechenden Gene. In der eukaryotischen Zelle stehen diese beiden Reaktionen in einem Gleichgewicht zueinander, so dass eine geordnete Genexpression stattfinden kann. Acetylierung und Deacetylierung sind prinzipiell an allen Proteinen möglich und regulieren so neben der Genexpression auch den Funktionszustand anderer Proteine. Die dafür verantwortlichen Enzymgruppen sind die Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs).

Die humanen Histondeacetylasen werden entsprechend ihrer Homologie zu den Hefeproteinen eingeteilt in drei Klassen: die klassischen HDACs Klasse I und II und die NAD<sup>+</sup>-abhängigen HDACs der Klasse III, die Sirtuine. Bis heute sind sieben Vertreter der Sirtuine beschrieben worden (SIRT1-SIRT7), wobei insbesondere dem SIRT1 (silent information regulator 1) eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese, der Regulation von Zelldifferenzierung, der Regulation von Zellmetabolismus sowie der Zellalterung und Apoptose zugeschrieben wird. Neben Histonen (große Präferenz für H4K<sub>16</sub>) zählen auch Proteine wie p53 und FOXO zu den Zielstrukturen des Enzyms. Insbesondere die Beteiligung von SIRT1 an der Karzinogenese und damit die Betrachtung der Histondeacetylase als möglicher neuer Angriffspunkt in der Therapie machen es notwendig, die Regulation der Expression und Aktivität des Enzyms besser zu verstehen. Neben Nicotinamid, Dihydrocoumarin, Cambinol und Sirtinol als SIRT1-Inhibitoren konnten auch bereits verschiedene Aktivatoren des Enzyms identifiziert werden: so z.B. Resveratrol als bisher potentester Aktivator der Histondeacetylase.

Das zentrale Anliegen dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener Medikamente auf die Zellalterung sowie die Aktivität und Expression von SIRT1 zu untersuchen und dabei mit Augenmerk auf eine mögliche Signalkaskade den Promotor des *Sirt1*-Gens näher zu analysieren. Dazu wurden in einem Screening verschiedener im klinischen Alltag häufig angewandter Medikamente drei Aktivatoren der SIRT1-Expression in PBMCs identifiziert: Thyroxin, Insulin und Nitroprussid (NO-Donor).

Parallel zur Proteinanalyse wurden aus den peripheren mononukleären Blutzellen Histone isoliert und auf ihren Acetylierungszustand an H4K<sub>16</sub> untersucht: dabei zeigte sowohl die Behandlung mit Thyroxin als auch mit Nitroprussid eine vermehrte Deacetylierung dieser SIRT1-Zielstruktur, was mit einer erhöhten Aktivität des Enzyms vereinbar ist. Die Behand-

lung mit Insulin zeigte trotz der erhöhten SIRT1-Expression keine vermehrte Deacetylierung an H4K<sub>16</sub>.

Eine erhöhte Expression bzw. Aktivität der Histondeacetylase bewirkt insbesondere in Hefezellen ein verlängertes Zellüberleben bzw. eine erhöhte replikative Lebensdauer. Übereinstimmend mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten konnte für humane Zellen (hier PBMCs) diese Beobachtung nicht grundsätzlich bestätigt werden: lediglich durch die Behandlung der PBMCs mit Nitroprussid konnte ein verlängertes Zellüberleben erreicht werden, nicht aber durch die Behandlung mit Thyroxin oder Insulin.

Im Hinblick auf eine mögliche Signalkaskade wurde in einer theoretischen Analyse des *Sirt1*-Promotors NFκB als potentieller Transkriptionsfaktor identifiziert, der bereits als ein Vermittler des NO-Signalweges bekannt ist. Mit Hilfe von Luciferase-Assays wurde dieser Zusammenhang experimentell überprüft, wozu zunächst Luciferase-exprimierende Vektoren mit unterschiedlichen *Sirt1*- Promotorlängen kloniert wurden. Im Ergebnis der Luciferase-Assays wurde anstatt der aktivierenden Funktion von NFκB auf den *Sirt1*- Promotor dieses als Inhibitor desselben erkannt. Damit wurde eine NFκB-vermittelte Wirkung von Nitroprussid als NO-Donor zwar nicht bestätigt, es konnte jedoch nach p53 und FOXO3a ein weiterer Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der die *Sirt1*- Promotoraktivität hemmt.

Abschließend wurde der Einfluss der Histondeacetylase SIRT1 auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB untersucht, wobei übereinstimmend mit einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit eine Verringerung der Aktivität von NFκB als Transkriptionsfaktor beobachtet wurde. Es existiert demnach ähnlich wie bei p53 und FOXO3a im Sinne eines gewissen Regelkreises sowohl ein Einfluss des Transkriptionsfaktors NFκB auf die Histondeacetylase SIRT1 als auch ein Einfluss von SIRT1 auf NFκB.

Die zentrale Fragestellung der Arbeit nach der Beeinflussbarkeit der Expression und Aktivität der humanen Histondeacetylase SIRT1 durch Medikamente und die Bedeutung für das Zellüberleben konnte damit beantwortet werden. Zudem wurde der Transkriptionsfaktor NFκB als Inhibitor der SIRT1-Expression identifiziert und gleichzeitig ein hemmender Einfluss der Histondeacetylase SIRT1 auf die Aktivität von NFκB gezeigt.