

Barbara Maria Zschörnig
Dr. sc. hum.

Die Proteinkinase CK2-vermittelte Phosphorylierung der humanen Histondeacetylase Sirtuin 1 (SIRT1)

Geboren am 16.09.1977 in Leverkusen

Diplom der Fachrichtung Biochemie am 26.11.2004 an der Universität Regensburg

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Schirmer

Histondeacetylasen (HDACs) sind eine Klasse von Proteinen, die im Zusammenspiel mit Histonacetylasen (HATs) durch reversible Acetylierung der ϵ -Aminogruppe spezifischer Lysinreste am Amino-Terminus von Histonen, einen maßgeblichen Anteil an der definierten Genregulation und somit der Aufrechterhaltung der Zellintegrität besitzen. Nicht weniger bedeutend ist die Interaktion von HDACs mit zahlreichen Nicht-Histonproteinen, wodurch eine Vielzahl grundlegender zellulärer Prozesse wie beispielsweise Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose reguliert werden.

Bisher wurden im Menschen vier Klassen von HDACs beschrieben, wobei die sieben Proteine der Klasse III (SIRT1-7) aufgrund ihrer Homologie zum zunächst in *Saccharomyces cerevisiae* identifizierten Protein Sir2 (*silent information regulator 2*) auch „Sirtuine“ genannt werden. Im Gegensatz zu Klasse I, II und IV HDACs ist ihre enzymatische Aktivität an die Verfügbarkeit des Kofaktors Nicotinadenin dinukleotid (NAD^+) gekoppelt. Sirtuine unterscheiden sich in ihrem enzymatischen Mechanismus somit grundlegend von Klasse I, II und IV HDACs bei denen es sich um Zink-abhängige Hydrolasen handelt.

Das zu Sir2 orthologe, humane Protein Sirtuin 1 (SIRT1) ist ein Zellkernprotein, dem eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der Transkription, des Metabolismus, sowie der zellulären Stressantwort und Apoptose zugeschrieben wird. Diese Beteiligung an fast allen fundamentalen zellulären Prozessen beruht auf der Fähigkeit sowohl Histone (mit einer Präferenz für acetyliertes Lysin 16 von Histon H4), als auch zahlreiche Nicht-Histonproteine wie z.B. das Tumorsupressorprotein p53 zu deacetylieren und somit deren Funktionen zu modulieren. Der Schwerpunkt der Untersuchungen in den letzten Jahren, lag hauptsächlich auf der Identifikation neuer Interaktionspartner und Substrate von SIRT1 bzw. auf der Analyse der biologischen Relevanz der SIRT1-vermittelten Deacetylierung dieser zellulären Schlüsselproteine. Dabei waren besonders die biologische Konsequenzen der spezifischen Deacetylierung des Tumorsupressors p53 und des Lysin 16 von Histon H4 von Interesse, aufgrund derer SIRT1 zunehmend als therapeutisches Zielprotein für die Behandlung von Tumorerkrankungen betrachtet wird. Inhibitoren von Klasse I und II HDACs befinden sich bereits erfolgreich in klinischen Studien bzw. werden teilweise schon zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt. Da SIRT1 - und Sirtuine im allgemeinen - aufgrund ihres unterschiedlichen enzymatischen Mechanismus nicht durch Hemmstoffe der Klasse I und II HDACs inhibierbar sind, wurden bereits erste Modulatoren der SIRT1-Aktivität entwickelt, die jedoch nur eine moderate Spezifität besitzen. Vor diesem Hintergrund ist die Analyse SIRT1-spezifischer Regulationsmechanismen, die bisher nur in wenigen Studien untersucht wurde, von grundlegender Bedeutung, da sie einen Beitrag zur Weiterentwicklung dieser Inhibitoren leisten könnte.

In Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals direkt gezeigt, dass SIRT1 posttranslational durch reversible Phosphorylierung modifiziert wird. Ergänzend zu massenspektrometrischen Untersuchungen des Zellkernextraktes asynchroner HeLa Zellen, konnte ein carboxy-

terminaler Bereich von SIRT1 (AS 643-691) als Hauptphosphorylierungsregion und innerhalb dieses Bereiches die Aminosäuren Serin 659 und Serin 661 als *in vivo* Phosphorylierungsstellen von SIRT1 identifiziert werden. Diese carboxy-terminale Phosphorylierung wird durch die Proteinkinase CK2 vermittelt, wobei SIRT1 eindeutig als *in vitro* und *in vivo* Substrat von CK2 identifiziert wurde. Ebenso wurde der Nachweis erbracht, dass es sich bei Serin 659 und Serin 661 um die im C-Terminus lokalisierten CK2-Phosphorylierungsstellen handelt. CK2 stellt bisher die einzige identifizierte SIRT1-phosphorylierende Kinase dar.

Die funktionelle Bedeutung der CK2-vermittelten Phosphorylierung von SIRT1 wurde noch nicht aufgeklärt. Da die bisher identifizierten Funktionen von SIRT1 ausschließlich auf der Deacetylierung von Histonen, sowie zahlreichen im Zellkern lokalisierten Nicht-Histonproteinen beruhen, könnten Mechanismen, die die subzelluläre Lokalisation von SIRT1 beeinflussen, eine wichtige Rolle bei dessen Regulation spielen. Ein Einfluß der CK2-vermittelten Phosphorylierung auf die subzelluläre Lokalisation von SIRT1 wurde jedoch durch die Analyse von EGFP-Fusionproteinen der Phosphorylierungsmutanten von Serin 659 und 661, sowie durch die Untersuchung der Lokalisation von endogenem SIRT1 unter Inhibition der zellulären CK2-Aktivität eindeutig ausgeschlossen. Ob die reversible Phosphorylierung einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von SIRT1 besitzt, konnte mit den verwendeten Methoden nicht abschließend geklärt werden und Bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Vermutung, dass die CK2-vermittelte, carboxy-terminale Phosphorylierung von SIRT1 tatsächlich eine regulatorische Bedeutung besitzen könnte, wird zum einen durch die Hypothese gestützt, dass die innerhalb der Sirtuin Familie divergenten amino- und carboxy-terminalen Regionen nur eine geringe evolutionäre Konservierung besitzen und daher vermutet wird, dass diese an der spezifischen Regulation der einzelnen Sirtuine beteiligt. Zum anderen stellt die reversible Phosphorylierung bereits einen etablierten Regulationsmechanismus für Klasse I und II Histondeacetylasen und seit kurzem auch für SIRT2 dar, welches ebenfalls innerhalb seiner carboxy-terminalen Domäne phosphoryliert wird.