

Acylierung von Lysinen: Erweiterung des Repertoires**

Christian A. Olsen*

In memoriam Jerzy W. Jaroszewski

Acetylierung · Crotonylierung · Epigenetik ·
Proteinmodifikation · Succinylierung

Das eukaryotische Genom ist in Chromatinfasern gepackt, die aus Nucleosomen aus Histonoctamerkomplexen bestehen, um die sich die chromosomale DNA windet (Abbildung 1).^[1] Damit die Transkriptionsmaschinerie Zugang zur DNA erlangen kann, kommen verschiedenste Enzyme zum Einsatz, welche die Seitenketten der Histonschwänze modifizieren, die wiederum die Packung der Nucleosomteilchen regulieren.^[2] Diese posttranslationalen Modifikationen (PTMs) der Histone resultieren in einem „Histon-Code“, von dem man annimmt, dass er die Rekrutierung von Transkriptions- und/oder Repressionsfaktoren steuert und so die Transkriptionsaktivität des Genoms reguliert. Der „Code“ ist hoch dynamisch, und die modifizierten Histone sollten vielleicht eher als Knoten in einem dynamischen Netzwerk betrachtet werden. Die Kombinationen aus posttranslationalen Modifikationen werden beständig durch Enzyme wie Histonacetyltransferasen (HATs), Lysindesacetylasen (HDACs und Sirtuine), Serin/Threoninkinasen, Lysin/Argininmethylelasen und -demethylasen und Ubiquitinligasen abgeändert.^[3] Obgleich die enzymatischen Mechanismen noch nicht gut verstanden sind, wurden die Effekte der Lysinacetylierung (Struktur 1) auf die Struktur und Funktion des Chromatins ausführlich untersucht, und zwei auf die Enzyme der HDAC-Gruppe abzielende Wirkstoffe sind zur Behandlung kutaner T-Zell-Lymphome zugelassen worden.^[4] Für die Lysinacetylierung in Proteinen wurde jedoch jüngst gezeigt, dass es sich um eine allgemeine posttranskriptionale Modifikation handelt, deren regulatorische Funktion über epigenetische Prozesse im Zusammenhang mit der Histonacetylierung hinausgeht.^[5] Im Speziellen konnte nachgewiesen werden, dass die Acetylierung von Proteinen Auswirkungen auf den Stoffwechsel hat.^[6]

Nun wurde eine Serie von Acylierungen (Crotonylierung, Malonylierung und Succinylierung; siehe Strukturformeln 2–4 in Abbildung 1) als posttranskriptionale Modifikationen von Lysinen in Histonen und anderen Proteinen identifiziert.^[7] Hier werden diese jüngeren Entwicklungen zusammengefasst

und ausgewählte Methoden vorgestellt, die für weitere Studien dieser neuartigen posttranskriptionalen Modifikationen geeignet sind.

Eine kürzlich veröffentlichte Proteomikstudie, die auf einer massenspektrometrischen Analyse beruhte, steigerte die Zahl bekannter Histonmodifizierungen um etwa 70%. Für 28 der modifizierten Lysinreste in Histonpeptiden wurde gezeigt, dass es sich bei der Modifikation um das bis dahin nicht beschriebene ε-N-Crotonyllisin (Kcr) handelt.^[7a] Überzeugende Beweise für diesen Befund lieferten mehrere Methoden. Zunächst verglichen die Autoren *in vivo* gebildete Peptide mit chemisch synthetisierten Vergleichspeptiden durch hochauflösende MS/MS und HPLC-Coelutionsexperimente mit Hochdurchsatz-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). Des Weiteren wurde ein spezifischer Anti-Kcr-Antikörper erzeugt und in Western-Blots und Immunfärbungen eingesetzt. Schließlich bestätigten Isotopenmarkierungsexperimente mit [D₄]Crotonyl das Vorliegen von 19 der 28 Lysincrotonylierungen in HeLa-Zellkulturen. Interessanterweise schienen einige der modifizierten Lysinreste zwar Crotonylierung, aber keine Acetylierung eingehen zu können, sodass Lysinacetylierung (Kac) und -crotonylierung unterschiedliche Sätze von Genen markierten.^[7a] Die Studie wirft mehrere interessante Fragen auf, nämlich welche Proteine diese neuartigen posttranskriptionalen Histonmodifikationen transkribieren, löschen und/oder ablesen und welche Einflüsse die Lysincrotonylierung auf die Struktur und Funktion des Chromatins hat.

Die Succinylierung von Lysinen wurde als eine weitere neuartige posttranskriptionale Modifikation in *E. coli* entdeckt und verifiziert,^[7b] und die Malonylierung und Succinylierung von Lysinen wurde außerdem auch in Säugetierzellen nachgewiesen.^[7c] Letztere Studie basierte auf einer Röntgenkristallstruktur von Sirtuin 5, einer Nicotinamidadenindinucleotid(NAD)-abhängigen Hydrolase aus der Sir2-Proteinfamilie (silent information regulator 2). Im Cokristall von Sirtuin 5 mit einem ε-N-Thioacetyllysin-haltigen Peptid beobachteten die Autoren ein Puffermolekül mit einer Sulfonatgruppe im aktiven Zentrum. Auf der Grundlage dieses Befundes und der Beobachtung, dass Sirtuin 5 als eine sehr schwache Desacetylase wirkt, wurde eine Serie alternativer Substrate entworfen, darunter Varianten mit malonylierten und succinylierten Lysinen. Es zeigte sich, dass das Enzym gegen bestimmte succinylierte Substrate bis zu 1000-fach katalytisch effizienter war als gegen vergleichbare acetylierte Substrate. Eine zweite Cokristallstruktur von Sirtuin 5, dieses Mal mit einem ε-N-Succinyllysin-haltigen Sub-

[*] Prof. C. A. Olsen
Department of Chemistry, Technical University of Denmark
Kemitorvet 207, 2800 Kgs. Lyngby (Dänemark)
E-Mail: cao@kemi.dtu.dk
Homepage: <http://www.organic.kemi.dtu/research/olsen>

[**] Dank gilt der Lundbeck Foundation (Young Group Leader Fellowship) und dem Danish Independent Research Council – Natural Sciences (Steno Grant No. 10-080907) für finanzielle Unterstützung.

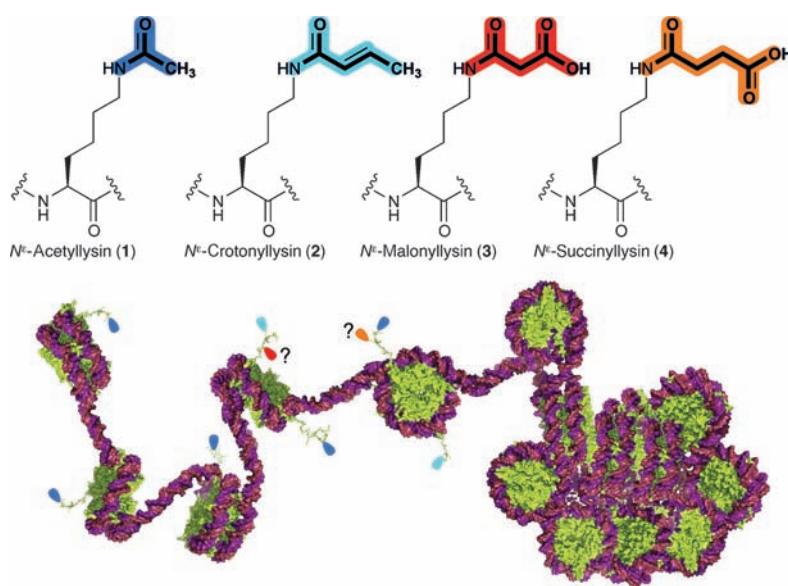


Abbildung 1. Oben: Molekülstrukturen der ϵ -N-Acetyllysinreste. Unten: Nucleosomteilchen (pdb 1ZBB)^[1b] mit farblichen Markierungen, die die post-translationalen Acylierungen von Lysinen markieren. Acetylierungen und Crotonylierungen wurden an Histonschwänzen identifiziert, während Malonylierungen und Succinylierungen bislang nur an anderen Proteinen als Histonen identifiziert wurden.

strat, bestätigte die vorhergesagten Enzym-Substrat-Wechselwirkungen.^[7c] Diese Bindungsaaffinitäten wurden ausgenutzt, um FLAG-markiertes Sirtuin 5 zur Affinitätsreinigung mehrerer Malonyl- und Succinyl-haltiger Proteine einzusetzen (das FLAG-Epitop hat die Aminosäuresequenz (N→C) DYKDDDDK). Darüber hinaus fand man in Sirtuin5-Knockout-Mäusen einen gegenüber Wildtyp-Mäusen signifikant verringerten Grad an Lysinsuccinylierung.^[7e] Die identifizierten Proteine waren sämtlich Stoffwechselenzyme, was darauf hinweist, dass diese neu entdeckten Lysinacylierungen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Stoffwechselregulation und der N-Acetyl-Funktionalisierung spielen.^[6,7c]

Sirtuin 5 war das einzige humane Sirtuin, bei dem in dieser neuen Studie Demalonylase- und Desuccinylaseaktivität nachgewiesen werden konnte. Da es in den Mitochondrien lokalisiert ist, überrascht es nicht, dass alle Peptide mit Malonyl- und Succinylmarkierungen ausnahmslos von mitochondrialen Proteinen stammten. Es bleibt abzuwarten, ob der Zweck der Lysinmalonylierung und -succinylierung darin besteht, die Lysinacetylierung bei der Stoffwechselregulation zu ergänzen, oder ob diese neuen Modifikationen außerdem auch eine Rolle bei der epigenetischen Regulierung der Struktur und Funktion des Chromatins spielen. Andererseits wurde die Lysincrotonylierung an Histonlysinresten gefunden, und sie scheint hier die Lysinacetylierung in ihrer epigenetisch regulierenden Funktion zu unterstützen. Ob diese posttranskriptionale Modifikation Einfluss auf den Chromatinumbau und/oder das Transkriptionsgeschehen hat, müssen weitere Untersuchungen erweisen.

Die hier vorgestellten Studien werfen zahlreiche interessante Fragen auf, zu denen ribosomale^[8] und chemische Synthesen^[9] von Peptiden mit wohldefinierten Kombinationen posttranskriptionaler Modifikationen wertvolle Informationen liefern könnten. Fortschritte in der chemischen Proteinsynthese haben sich außerdem als entscheidend für Stu-

dien der Chromatinkompaktierung erwiesen.^[10] Nicht zuletzt könnte neben massenspektrometrischen Proteomikmethoden, die sich zur Erforschung dieser Systeme als sehr nützlich erwiesen haben,^[11] auch die NMR-Spektroskopie eine hilfreiche Methode sein, um Einblick in diese Vorgänge *in situ* zu gewinnen.^[12]

Eingegangen am 12. Januar 2012
Online veröffentlicht am 28. Februar 2012

- [1] a) K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **1997**, 389, 251; b) T. Schalch, S. Duda, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **2005**, 436, 138.
- [2] a) G. J. Narlikar, H. Y. Fan, R. E. Kingston, *Cell* **2002**, 108, 475; b) A. J. Ruthenburg, H. Li, D. J. Patel, C. D. Allis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 983.
- [3] a) M. Biel, V. Wascholowski, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3248; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3186; b) T. Kouzarides, *Cell* **2007**, 128, 693; c) C. D. Allis, S. L. Berger, J. Cote, S. Dent, T. Jenuwien, T. Kouzarides, L. Pillus, D. Reinberg, Y. Shi, R. Shiekhattar, A. Shilatifard, J. Workman, Y. Zhang, *Cell* **2007**, 131, 633.
- [4] a) P. A. Marks, R. Breslow, *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25, 84; b) P. Guan, H. Fang, *Drug Discoveries Ther.* **2010**, 4, 388.
- [5] C. Choudhary, C. Kumar, F. Gnad, M. L. Nielsen, M. Rehman, T. C. Walther, J. V. Olsen, M. Mann, *Science* **2009**, 325, 834.
- [6] a) S. Zhao, W. Xu, W. Jiang, W. Yu, Y. Lin, T. Zhang, J. Yao, L. Zhou, Y. Zeng, H. Li, Y. Li, J. Shi, W. An, S. M. Hancock, F. He, L. Qin, J. Chin, P. Yang, X. Chen, Q. Lei, Y. Xiong, K. L. Guan, *Science* **2010**, 327, 1000; b) Q. Wang, Y. Zhang, C. Yang, H. Xiong, Y. Lin, J. Yao, H. Li, L. Xie, W. Zhao, Y. Yao, Z. B. Ning, R. Zeng, Y. Xiong, K. L. Guan, S. Zhao, G. P. Zhao, *Science* **2010**, 327, 1004.
- [7] a) M. Tan, H. Luo, S. Lee, F. Jin, J. S. Yang, E. Montellier, T. Buchou, Z. Cheng, S. Rousseaux, N. Rajagopal, Z. Lu, Z. Ye, Q. Zhu, J. Wysocka, Y. Ye, S. Khochbin, B. Ren, Y. Zhao, *Cell* **2011**, 146, 1016; b) Z. Zhang, M. Tan, Z. Xie, L. Dai, Y. Chen, Y. Zhao, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 58; c) J. Du, Y. Zhou, X. Su, J. J. Yu, S.

- Khan, H. Jiang, J. Kim, J. Woo, J. H. Kim, B. H. Choi, B. He, W. Chen, S. Zhang, R. A. Cerione, J. Auwerx, Q. Hao, H. Lin, *Science* **2011**, *334*, 806.
- [8] T. J. Kang, S. Yuzawa, H. Suga, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1166.
- [9] A. L. Garske, S. S. Oliver, E. K. Wagner, C. A. Musselman, G. LeRoy, B. A. Garcia, T. G. Kutateladze, J. M. Denu, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 283.
- [10] Beispiele: a) M. Shogren-Knaak, H. Ishii, J.-M. Sun, M. J. Pazin, J. R. Davie, C. L. Peterson, *Science* **2006**, *311*, 844; b) B. Fierz, C. Chatterjee, R. K. McGinty, M. Bar-Dagan, D. P. Raleigh, T. W. Muir, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 113; c) *ChemBioChem* **2011**, *12*, 181–335 (Schwerpunkttheft Epigenetik).
- [11] H. C. Eberl, M. Mann, M. Vermeulen, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 224.
- [12] A. Dose, S. Liokatis, F. X. Theillet, P. Selenko, D. Schwarzer, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 419.

Neugierig? Sachbücher von WILEY-VCH

MICHAEL GROß

Der Kuss des Schnabeltiers

und 60 weitere irrwitzige Geschichten aus Natur und Wissenschaft

ISBN: 978-3527-32490-3
September 2009 278 S. mit 26 Abb.
Gebunden € 24,90

Groß berichtet von winzigen „Bärtierchen“, die schon mal einen „Winterschlaf“ von 100 Jahren machen; von Fröschen, die man getrost küssen kann, auch wenn sie sich nicht in Prinzen verwandeln; von der Rekonstruktion genetischer Codes, die uns irgendwann einen echten Jurassic Park bescheren könnten. „Die Maus, die in die Kälte ging“, „Bakterien halten zusammen“ oder „Die spinnen, die Spinnen!“ – Michael Groß hat Spaß an den intelligenten und mitunter etwas bizarren Erfindungen der Natur. Spannende Phänomene, dazu ungewöhnliche Forscherpersönlichkeiten und neueste Technologien stellt er in 61 Kapiteln vor.

Der Chemiker und Wissenschaftsjournalist, der auch für Magazine wie „Nature“ oder „New Scientist“ schreibt, zeigt, dass Wissenschaft Spaß macht, Neugier weckt und den eigenen Forschergeist beflügelt.



529340908_hu

WILEY-VCH

Wiley-VCH • Tel. +49 (0) 62 01-606-400 • Fax +49 (0) 62 01-606-184 • E-Mail: service@wiley-vch.de

www.wiley-vch.de/sachbuch