

## Lysinacetylierung und Ageing

# Lysinacetylierung – eine kleine Modifikation mit großer Wirkung

MICHAEL LAMMERS, ROBERT VOGT, MAGDALENA KREMER, LEONA BERNDT  
SYNTHETISCHE UND STRUKTURELLE BIOCHEMIE, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE,  
UNIVERSITÄT GREIFSWALD

**Ageing is the main risk factor for the development of cancer, cardiovascular diseases, neurodegenerative and metabolic disorders. It is important to develop strategies to ensure a healthy ageing process. Caloric/dietary restriction is beneficial for an organism's healthspan and results in changes in cellular lysine acetylation patterns. Therefore, lysine acetylation likely constitutes an important mediator of this intervention. Here we describe recent developments in the research field.**

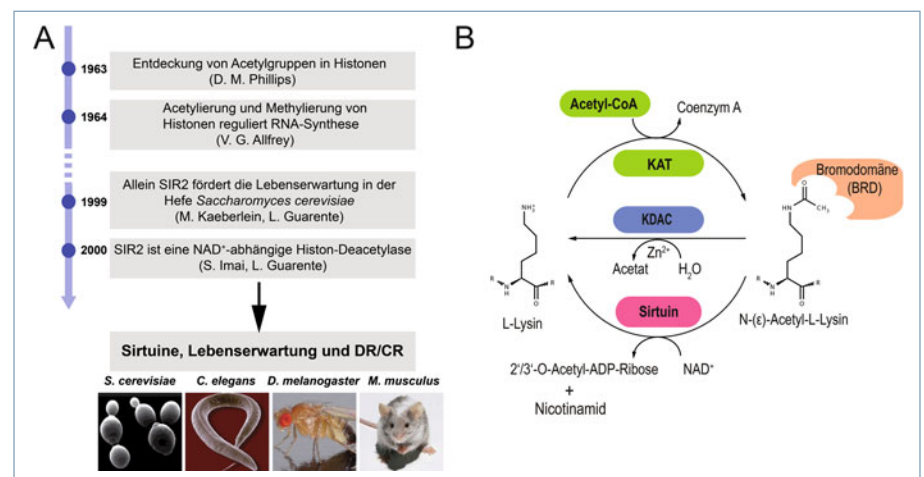
DOI: 10.1007/s12268-019-1067-1  
© Springer-Verlag 2019

■ Schon Anfang der 1930er-Jahre wurde von C. M. McCay, M. F. Crowell und L. A. Maynard festgestellt, dass kalorische Restriktion (*caloric restriction*, CR) die Lebenserwartung von Ratten erhöht. Allerdings zeigten spätere Untersuchungen, dass sich eher die Zusammensetzung der Nahrung (*dietary restriction*, DR) als die beschränkte Kalorienaufnahme positiv auf die Lebenserwartung bzw. auf die gesunde Lebensspanne auswirkt [1]. Heute ist aus Studien mit allen wichtigen Modellorganismen bekannt, dass Sirtuin-Deacetylasen entweder direkt die Lebenserwartung regulieren oder dass sie als Vermittler der kalorischen Restriktion fungieren (zur Historie siehe **Abb. 1A**). Therapeutisch wäre es wünschenswert, die gesundheitsfördernde Wirkung der CR/DR pharmakologisch nachzuahmen. Dazu müssten jedoch die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen genau verstanden sein. Nicht nur die Entfernung von Acetylgruppen von der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinseitenketten durch die Sirtuin-/Lysin-Deacetylasen (KDACs), sondern auch die Anknüpfung der Acetylgruppe an nicht-modifizierte Lysine durch Lysin-Acetyltransferasen (KATs) sind abhängig von zentralen Molekülen des Stoffwechsels. Sirtuine benötigen Nicotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) als Ko-Substrat, und KATs verwenden Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) als Acetylgruppendonor (**Abb. 1B**). So könnte die Acetylierung direkt mit dem

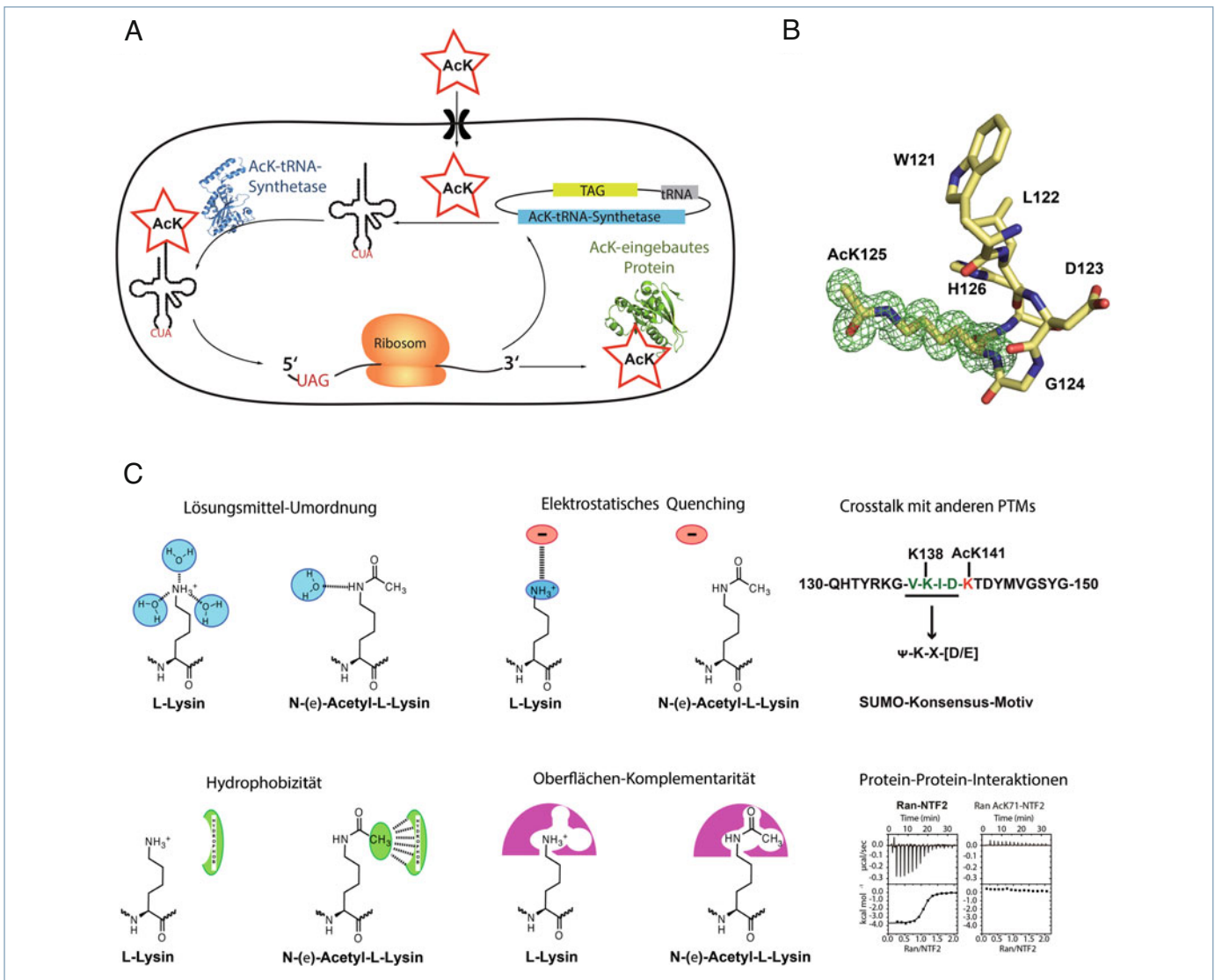
metabolischen Zustand der Zellen gekoppelt und damit ein wichtiger Vermittler der CR/DR sowie eines gesunden Alterungsprozesses sein.

### Synthetisch biologische und strukturelle Studien zur Lysinacetylierung

Moderne Entwicklungen in der biochemischen Methodik ermöglichten erst die Forschung an Lysinacetylierungen. Dazu zählen zum einen die Entwicklung spezifischer Antikörper gegen Acetyllysin. Zum anderen kann über synthetisch biologische Ansätze Acetyllysin stellenspezifisch in rekombinante Proteine eingebaut werden. So können Proteine hergestellt werden, die homogen und quantitativ acetyliert sowie nativ gefaltet sind [2]. Ausbeute und Reinheitsgrad dieser Proteine erlauben biophysikalische Untersuchungen inklusive der Röntgenstrukturanalyse [2]. Das System beruht auf einem Pyrrolyl-syl-tRNA-Synthetase (PyIRS)/tRNA<sub>CUA</sub>-Paar aus Archaeen der Gattung *Methanosarcina*. Das aktive



▲ **Abb. 1:** Posttranslationale Lysinacetylierung. **A**, Entwicklung des Forschungsfeldes der posttranslationalen Lysinacetylierung. Erst in den Jahren 1999/2000 wurde entdeckt, dass die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Deacetylase Sir2 in der Bäckerhefe die Lebensspanne beeinflusst. Heute ist bekannt, dass Sirtuine den Alterungsprozess in vielen Modellorganismen, dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) und der Maus (*Mus musculus*), beeinflusst (unterer Teil modifiziert nach [13]). DR: *dietary restriction*; CR: *caloric restriction*. **B**, enzymatische Regulation posttranslationaler Lysinacetylierung. Lysin-Acetyltransferasen (KATs) und Lysin-Deacetylasen (KDACs) regulieren die Lysinacetylierung. Bromdomänen binden an acetylierte Lysine. Die KDACs werden eingeteilt in die  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängigen klassischen KDACs und die  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Sirtuine, die strukturell nicht miteinander verwandt sind und einen unterschiedlichen katalytischen Mechanismus zur Deacetylierung von Lysinseitenketten verwenden. Durch Bindung Lysin-acetylierter Proteine an Proteine mit Bromdomänen können Protein-Protein-Interaktionen zeitlich und räumlich in Zellen reguliert werden und so z. B. Signaltransduktionskaskaden oder die Rekrutierung einer enzymatischen Aktivität gesteuert werden.



**▲ Abb. 2: A**, Einbau von Acetyllysin in Proteine mittels des *genetic-code expansion concept* (GCEC). Den Zellen wird Acetyllysin (AcK) im Medium bereitgestellt. Die synthetisch evolvierte Acetyllysyl-tRNA-Synthetase aus *Methanosarcina barkeri* belädt die zugehörige tRNA<sub>CUA</sub> mit Acetyllysin. Als Antwort auf ein Amber-Stoppocodon (UAG) kann so stellenspezifisch und kotranslational Acetyllysin in Proteine eingebaut werden. Diese können dann säulenchromatographisch gereinigt werden. So erhält man quantitativ Lysin-acetylierte und nativ gefaltete Proteine. **B**, Ausschnitt aus der Kristallstruktur von K125-acetyliertem Cyclophilin A (PDB: 2X25). **C**, Regulationsmechanismen von Proteinfunktionen durch Lysinacetylierung. Die Acetylierung beeinflusst die Interaktion mit Lösungsmittelmolekülen (oben, links), sie neutralisiert die positive Ladung an der Lysinseitenkette (oben, Mitte) und wechselwirkt mit anderen posttranslationalen Modifikationen (PTMs, PTM-crosstalk), die entweder am selben Lysin stattfinden (direkt) oder in der Nähe eines acetylierten Lysins (indirekt) (oben, rechts). Zudem beeinflusst sie die Hydrophobizität der Lysinseitenketten (unten, links), sie ändert die Oberflächenstruktur und ermöglicht so z. B. die Interaktion mit Bromdomänen (unten, Mitte) und kann Protein-Protein-Interaktionen oder Enzymaktivitäten direkt beeinflussen (unten, rechts).

Zentrum der PylRS wurde synthetisch so evolviert, dass die korrespondierende tRNA<sub>CUA</sub> mit Acetyllysin beladen wird (*genetic-code expansion concept*, GCEC; **Abb. 2A**, [3]). So kann Acetyllysin als Antwort auf ein Amber-Stoppocodon (UAG) an beliebigen Stellen in Proteine eingebaut werden. Dieses System ist orthogonal in *Escherichia coli* sowie in allen gängigen Modellorganismen (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* und *Mus musculus*). Auf diese Weise ist es möglich, die tatsächlichen Auswirkungen

einer Lysinacetylierung zu untersuchen. Diese entsprechen oft nicht denjenigen, die die geläufigen Ersatzaminoaciden Glutamin (für acetyliertes Lysin) oder Arginin (für nicht-acetyliertes Lysin) hervorrufen [4]. Wir haben mit diesem System die ersten Kristallstrukturen eines Proteins mit physiologisch relevanter, posttranslationaler Lysinacetylierung – Cyclophilin A (CypA) – gelöst und den regulatorischen Einfluss der Acetylierung auf die Enzymaktivität analysiert (**Abb. 2B**, [5]). Später konnten wir auch die Struktur eines zwei-

fach acetylierten Proteins, RhoGDI $\alpha$  (*Rho GDP-dissociation inhibitor*), lösen und verschiedene Mechanismen aufklären, mit denen Acetylierungen die Proteinfunktionen beeinflussen (**Abb. 2C**, [6]). Wir untersuchen mithilfe des GCEC auch, wie Sirtuine ihre Substrate erkennen. Einige Sirtuine der Säugetiere weisen eine bemerkenswerte Substratspezifität auf [7]. Für die Vermittlung der Substratspezifität ist neben der primären Aminosäuresequenz auch die dreidimensionale Struktur des Substratproteins wichtig [8].

Hier steht eine Anzeige.



## Identifizierung physiologisch relevanter Lysinacetylierungsstellen

Bis heute wurde eine Vielzahl essenzieller zellulärer Prozesse identifiziert, die durch Lysinacetylierung reguliert werden (z. B. Metabolismus, Translation, Transkription, DNA-Reparatur, Cytoskelettdynamik, Autophagie). Dies wurde unter anderem durch den großen Fortschritt in der quantitativen Massenspektrometrie in den letzten Jahren ermöglicht. Dabei folgte der bloßen Identifizierung eine relative Quantifizierung von tausenden Lysinacetylierungsstellen mittels SILAC (*stable isotope labelling by amino acids in cell culture*). Meist erfolgte bisher keine systemische Bestimmung der Stöchiometrie, also eine Messung absoluter Mengen der posttranslationalen Modifikation (PTM) an bestimmten Lysinen. Dies ist jedoch zur Einschätzung einer physiologischen Relevanz unabdingbar, vor allem wenn die Acetylierung eine Proteinfunktion ausschaltet (*loss-of-function*). Ein Ansatz zur absoluten Quantifizierung ist die chemische Acetylierung aller freien Lysine eines Proteoms mit Deuteriummarkiertem N-Acetoxy succinimid. Ein anschließender Vergleich des Anteils der endogenen Acetylierung (leichte Acetylgruppen) und der chemischen Acetylierung (schwere Acetylgruppen) ermöglicht die Bestimmung der Stöchiometrie. Neue Daten zeigen, dass die Mehrzahl der Stöchiometrien insgesamt sehr niedrig ist (unter einem Prozent). Dennoch gibt es Acetylierungsstellen, die recht hohe Werte erreichen (über 10–97 %) [9, 10]. Diese finden sich vor allem bei Proteinen im Metabolismus, in nukleären Prozessen und in der Translation. Es muss betont werden, dass einzelne spezifisch veränderte Acetylierungsstellen unter definierten Bedingungen von hoher physiologischer Relevanz sein können, auch oder sogar gerade wenn keine globalen Veränderungen des Acetylierungsniveaus stattfinden. Neben der Stöchiometrie ist auch die Regulierbarkeit durch Transferasen und Deacetylasen ein Kriterium zur Einordnung der physiologischen Relevanz einer Acetylierungsstelle.

## Posttranslationale Lysinacetylierung als therapeutischer Ansatz

Veränderte Lysinacetylierungsmuster wurden in vielen verschiedenen Tumorarten sowie bei metabolischen und neurodegenerativen Erkrankungen gefunden. Inhibitoren klassischer KDACs und von Sirtuinen sind daher Ziel intensiver Forschung. Sirtuine können kontextabhängig sowohl als Tumorsuppres-

sor als auch als Onkogenprodukt fungieren. Das zeigt, dass die Aktivierung oder Inhibierung eine therapeutische Strategie darstellen kann. Für SIRT1, das eine Reihe wichtiger Substratproteine hat (p53, FOXO, PGC-1 $\alpha$ ), wurden verschiedene hochpotente und selektive Aktivatoren entwickelt. Dazu zählt auch das Polyphenol Resveratrol, das unter anderem in Rotwein vorkommt. Zudem hat die Erhöhung der Konzentration von NAD<sup>+</sup>-Vorstufen positive Effekte hinsichtlich Krankheitsresistenz und Langlebigkeit. Wir versuchen, therapeutische Sirtuin-Inhibitoren in Form substratbasierter mechanistischer Inhibitoren zu entwickeln. Dabei werden Sequenz und Struktur natürlicher Substrate verwendet und katalytisch sehr schlecht bzw. nicht umsetzbare Analoga von Acetyllysin, wie Trifluoracetyllysin und Thioacetyllysin, in Proteine bzw. Peptide eingebaut (Abb. 2C, [11]). Im Kontext der Lysinacetylierung sind auch Bromdomänen Gegenstand intensiver Forschung. Bromdomänen binden spezifisch an acetylierte Lysine und befinden sich häufig in nukleären Proteinen sowie Acetyltransferasen. BET (*bromodomain and extra-terminal motif*)-Inhibitoren, wie z. B. JQ1, hemmen die Chromatinbindung von BRD2–4 (Transkriptionsregulatoren) durch Blockierung der Bromdomänen. Von JQ1 abgeleitete Moleküle zeigten sich sehr effektiv gegen eine Reihe verschiedener Krebsarten, wie z. B. akute myeloische Leukämie, das multiple Myelom und akute lymphatische Leukämie [12]. Durch die Sequenzierung von kompletten Genomen oder Exomen von Patienten wurden zudem Mutationen in KAT-Genen als ursächlich für verschiedene Tumorarten identifiziert. Diese Beispiele zeigen, dass auch KATs potenzielle therapeutische Ziele darstellen.

## Perspektiven und Zielsetzungen zur posttranslationalen Lysinacetylierung

Die posttranslationale Acetylierung von Lysinseitenketten ist eine dynamische Modifikation, die Proteinfunktionen über verschiedene Mechanismen regulieren kann. Mittels synthetisch biologischer Ansätze ist es neben Acetyllysin möglich, eine Vielzahl weiterer nicht-natürlicher Aminosäuren, inklusive photoaktivierbarer *Crosslinker*, stellenspezifisch in Proteine einzubauen. Wir wollen diese Technik nutzen, um neue Interaktionspartner und Substrate für Deacetylasen und Acetyltransferasen zu identifizieren. Zusammen mit massenspektrometrischen Messungen zur Bestimmung der Acetylierungsstöchiometrien können wir so weitere physiologisch relevante

Acetylierungspositionen identifizieren und charakterisieren. Zukünftige Studien werden wichtige Beiträge dazu liefern, die volle Bedeutung posttranslationaler Lysinacetylierung für die Regulation von Proteinfunktionen und die gegenseitige Wechselwirkung mit anderen PTMs zu verstehen. Außerdem werden diese Untersuchungen zeigen, welchen Beitrag fehlgesteuerte Lysinacetylierungen zur Entstehung schwerwiegender Erkrankungen leisten. Diese Erkenntnisse wiederum werden auch die Entwicklung neuartiger therapeutischer Ansätze vorantreiben.

## Danksagung

Die Projekte zu dieser Thematik werden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt. Vielen Dank an Dr. Florian Heuser für die kritische Durchsicht des Manuskripts. ■

## Literatur

- [1] Piper MD, Partridge L, Raubenheimer D et al. (2011) Dietary restriction and aging: a unifying perspective. *Cell Metab* 14:154–160
- [2] Lammers M (2018) Expression and purification of site-specifically lysine-acetylated and natively-folded proteins for biophysical investigations. *Methods Mol Biol* 1728:169–190
- [3] Neumann H, Hancock SM, Buning R et al. (2009) A method for genetically installing site-specific acetylation in recombinant histones defines the effects of H3 K56 acetylation. *Mol Cell* 36:153–163
- [4] Knyphausen P, Lang F, Baldus L et al. (2016) Insights into K-Ras 4B regulation by post-translational lysine acetylation. *Biol Chem* 397:1071–1085
- [5] Lammers M, Neumann H, Chin JW et al. (2010) Acetylation regulates cyclophilin A catalysis, immunosuppression and HIV isomerization. *Nat Chem Biol* 6:331–337
- [6] Kuhlmann N, Wroblewski S, Scislawski L et al. (2016) RhoGDI $\alpha$  acetylation at K127 and K141 affects binding toward nonprenylated RhoA. *Biochemistry* 55:304–312
- [7] De Boor S, Knyphausen P, Kuhlmann N et al. (2015) Small GTP-binding protein Ran is regulated by posttranslational lysine acetylation. *Proc Natl Acad USA* 112:E3679–E3688
- [8] Knyphausen P, de Boor S, Kuhlmann N et al. (2016) Insights into lysine deacetylation of natively folded substrate proteins by sirtuins. *J Biol Chem* 291:14677–14694
- [9] Weinert BT, Satpathy S, Hansen BK et al. (2017) Accurate quantification of site-specific acetylation stoichiometry reveals the impact of sirtuin deacetylase CobB on the *E. coli* acetylome. *Mol Cell Proteomics* 16:759–769
- [10] Hansen BK, Gupta R, Baldus L et al. (2019) Analysis of human acetylation stoichiometry defines mechanistic constraints on protein regulation. *Nat Commun* 10:1055
- [11] Kuhlmann N, Chollet C, Baldus L et al. (2017) Development of substrate-derived sirtuin inhibitors with potential anticancer activity. *ChemMedChem* 12:1703–1714
- [12] Pervaiz M, Mishra P, Gunther S (2018) Bromodomain drug discovery – the past, the present, and the future. *Chem Rec* 18:1808–1817
- [13] Guarente L (2013) Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev* 27:2072–2085

## Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Michael Lammers  
Synthetische und Strukturelle Biochemie  
Institut für Biochemie  
Universität Greifswald  
Felix-Hausdorff-Straße 4  
D-17487 Greifswald  
Tel.: 03834-420-4356  
michael.lammers@uni-greifswald.de

## AUTOREN

**Michael Lammers**

Jahrgang 1977. Biologiestudium an der Universität Münster, 2003 Diplom in Biologie. 2006 Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, bei Prof. Dr. A. Wittinghofer. 2007–2008 Wissenschaftler im Assay Development in der DIREVO Biotech AG, Köln. 2008–2010 Postdoc am MRC/LMB in Cambridge, UK, bei Dr. L. James und Dr. J. Chin. 2010–2011 Juniorgruppenleiter an der Universität zu Köln, Institut für Genetik, CECAD. 2011–2016 Emmy-Noether-Gruppenleiter und 2016–2018 Heisenberg-Stipendiat an der Universität zu Köln. Seit 2018 Professor für Biochemie, Abteilung Synthetische und Strukturelle Biochemie, Universität Greifswald.

**Robert Vogt**

Jahrgang 1990. 2014–2017 Masterstudium Biochemie an der TU Braunschweig, dort Masterarbeit im Bereich Mikrobiologie bei Prof. Dr. D. Jahn. Seit 2017 Promotion bei Prof. Dr. M. Lammers am Institut für Genetik, Universität zu Köln, und seit 2018 an der Universität Greifswald.

**Magdalena Kremer**

Jahrgang 1989. 2009–2015 Studium der Biomedizinischen Chemie an der Universität Mainz, dort Diplomarbeit im Bereich Neurobiochemie bei Prof. Dr. H. Lüddens. Seit 2016 Doktorandin am Institut für Genetik, CECAD, Universität zu Köln bei Prof. Dr. M. Lammers.

**Leona Berndt**

Jahrgang 1979. 1999–2003 Ausbildung zur Chemielaborantin am Institut für Biochemie der Universität Greifswald. 2003–2018 Chemielaborantin in der Gruppe Molekulare Strukturbiologie, Prof. Dr. W. Hinrichs, Dr. G. Weber. Seit 2018 im Labor von Prof. Dr. M. Lammers, Synthetische und Strukturelle Biochemie am Institut für Biochemie der Universität Greifswald.