

Lorena Kremer: Identifizierung von Phosphorylierungsstellen der Stress-aktivierten MAPKinasen in SREBP-1a . 2001

Mitogen-activated protein (MAP) Kinasen sind wichtige Mediatoren der Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Nukleus, wobei sie letztlich auf viele zelluläre Prozesse wie z. B. Proliferation, Differenzierung und Apoptose Einfluß nehmen. Sie modulieren via Phosphorylierung im wesentlichen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und vermitteln so eine spezifische genregulatorische Antwort auf extrazelluläre Stimuli. Mittlerweile konnten in Säugetierzellen verschiedene Subgruppen identifiziert werden, die sich in ihrer Substratspezifität und Regulation unterscheiden: die extracellulär signal-regulierten Kinasen (ERKs), die stress-aktivierten Protein Kinasen (SAPKs)/cJun N-terminal Kinasen (JNKs) sowie die cytokine-suppressive anti-inflammatorische drug-binding Protein Kinasen (CSBP)/p38-Kinasen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der Cholesterin-regulierte Transkriptionsfaktor *sterol-regulatory element binding protein (SREBP)-1a* ein Substrat der JNK-MAPKinasen und p38-MAPKinasen *in vitro* ist. Für diese Untersuchungen wurde die in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-3X klonierte aminoterminal Domäne von SREBP-1a (SREBP-1a NT) als GST-Fusionsprotein exprimiert. Nach Aufreinigung des GST-SREBP-1a-Fusionsproteins wurde dieses in Phosphorylierungsansätzen mit den aktivierten MAPKinasen JNK2 bzw. JNK3 und p38a, b bzw. g eingesetzt. Die weitere Charakterisierung der Phosphorylierungsreaktion ergab für SREBP-1a NT eine spezifische Phosphorylierung durch die MAPKinasen. In der Anionenaustausch-HPLC des tryptisch verdauten, phosphorylierten SREBP-1a NT konnte nach der Reaktion mit den JNK-MAPKinasen eine Fraktion isoliert werden, die den Hauptphosphat einbau beinhaltete. Die nachfolgenden Untersuchungen identifizierten für die JNK-MAPKinasen das Serin 117 als Hauptphosphorylierungsstelle in SREBP-1a. Entsprechende Analysen mit den p38-MAPKinasen zeigten, daß das Serin 117 nicht ihre Hauptphosphorylierungsstelle in SREBP-1a war. Denn es konnte ein zu dem nach JNK-Phosphorylierung unterschiedliches Elutionsprofil in der Anionenaustauschchromatographie aufgezeichnet werden. Statt einer prädominanten Fraktion wurden fünf ermittelt. Dementsprechend wies die Sequenzierung *reversed-phase* chromatographierter, phosphorylierter Peptide von SREBP-1a NT mit MALDI-Massenspektrometrie und Edmanabbau Serin 63 und Threonin 426 als Hauptphosphorylierungsstellen aus. Im weiteren wurden diese Phosphorylierungsstellen durch *in vitro* DNA-Mutagenese der pGEX-3X-Ausgangsvektoren gegen Alanin respektive Valin substituiert und die entsprechenden Fusionsproteine hergestellt. Die Phosphorylierung dieser mutierten Proteine war signifikant reduziert und die korrespondierenden HPLC-Fractionen mit Phosphat einbau waren durch die Mutagenese eliminiert worden. Die funktionale Bedeutung der *in vitro* Phosphorylierung durch die JNK- bzw. p38-MAPKinasen von SREBP-1a NT auf die DNA/Proteinwechselwirkung sowie die transkriptionale Aktivität wurde in *electromobility shift assays* (EMSA) respektive Reporteranalysen untersucht. Die DNA/Proteinwechselwirkung von SREBP-1a wies im nichtphosphorylierten Zustand keine Präferenz bezüglich der Bindung der beiden Bindungselemente, *sre-1* bzw. *E-box*, auf. Wurde JNK-phosphoryliertes SREBP-1a NT eingesetzt, konnte weder mit dem *sre-1* noch mit dem *E-box* DNA-Fragment eine Veränderung der DNA/Proteinwechselwirkung identifiziert werden. Obwohl die p38-MAPKinasen SREBP-1a NT an anderen Aminosäuren phosphorylieren, konnte auch durch Phosphorylierung mit der p38-Kinase keine Änderung der DNA/Proteinbindung hervorgerufen werden. Reporteranalysen in HepG2-Zellen zusammen mit Kinasen der JNK- bzw. p38-MAPKinasenkaskade MEKK1 respektive MEK3 zeigten eine deutliche Steigerung der trans-Aktivität bei SREBP-1a NT. Diese Induktion war im Fall der SREBP-1a NT S117A-Mutante bei Kotransfektion mit MEKK1 signifikant vermindert. Die Reporteranalysen mit der MEK3 und den SREBP-1a NT S63A- sowie T426V-Mutanten zeigten ein komplexeres Bild. War die trans-aktivierende Wirkung der Serin 63 zu Alanin Mutante deutlich reduziert, konnte bei der Threonin 426 zu Valin Mutante keine Veränderung ermittelt werden. Diese Ergebnisse zeigen:

1. REBP-1a ist Substrat der JNK- sowie p38-MAPKinasen. 2. SREBP-1a wird durch die JNK spezifisch an Serin 117 und durch die p38-Kinasen spezifisch an Serin 63 sowie Threonin 426 phosphoryliert. 3. Erste funktionale Untersuchungen zeigen, daß Serin 63 und 117 eine besondere Bedeutung in der trans-Aktivität zukommt.

Dies indiziert, daß SREBP-1a durch verschiedene MAPKinasekaskaden differentiell phosphoryliert wird und möglicherweise ein genregulatorischer Konvergenzpunkt verschiedener extrazellulärer Signale darstellt.

Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a is a cholesterol sensitive transcription factor modulating transcription rate of several genes. Previous experiments showed that this transcription factor is a substrate for ERK 1/2 MAPKinase. In order to understand if SREBP-1a is also a substrate of JNK- and p38-MAPKinase the transcriptional active domain of SREBP-1a (aa1-460) was expressed as glutathion-S-transferase (GST) fusion protein and phosphorylated by the MAP kinases JNK2/3 and the three isoforms (a, b, g) of p38, *in vitro*. Anion exchange chromatography HPLC of trypsinized SREBP-1a phosphorylated by JNK2/3 revealed one phosphopeptide, corresponding to serine 117 (S117). HPLC analyses of mutated SREBP-1a (S117→A117) indicated that S117 is the specific major phosphorylation site for JNK2/3. In contrast, mutation of serine 117 to alanine did not abolish phosphate incorporation by p38 isoforms. Mass spectrometry analyses indicated serine 63 and threonine 426 as major phosphorylation sites in case of the p38 isoforms. Shift gel experiments showed that the phosphorylation of SREBP-1a does not influence the capacity of the transcription factor to bind to the cis-elements *sre-1* or *E-box*. Using reporter gene analyses in HepG2 cells we could show that MEKK1 a kinase which activates JNK, could improve the trans-activity of SREBP-1a wildtype, this induction was dramatically reduced in case of SREBP-1a S117A mutant. Analogous experiments using MEK3, an activator of p38-MAPKinases showed for SREBP-1a S63A mutant a reduction of the transcriptional activity. In contrast, trans-activity induction of SREBP-1a T426V mutant was not affected. This indicates that SREBP1a is differentially phosphorylated by various MAP kinase cascades and might be a gene regulatory link between metabolic and inflammatory signals.