

Analyse der biologischen Funktionen von Sirt6 in metabolischen Prozessen



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

- Doctor rerum naturalium -

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem

Fachbereich für Biologie und Chemie (FB 08)

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Christian Smolka

Gießen, 2012

Dekan:

Prof. Dr. Holger Zorn
Institut für Tierökologie und Spezielle Zoologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58
35392 Gießen

Erstgutachter:

Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn
Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Stephanstrasse 24
35392 Gießen

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Dr. Thomas Braun
Abteilung Entwicklung und Umbau des Herzens
Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, W.G. Kerckhoff-Institut
Ludwigstrasse 43
61231 Bad Nauheim

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, W.G. Kerckhoff-Institut in Bad Nauheim angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Zusammenfassung

Sirtuine umfassen eine hoch konservierte Protein Familie, die eine NAD⁺-abhängige Deacetylasefunktion und/oder eine ADP-Ribosyltransferaseaktivität aufweisen. In *S. cerevisiae* und *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass Sirtuine die lebensverlängernden Effekte der kalorischen Restriktion vermitteln und dadurch den Prozess des Alterns regulieren. In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass Sirtuine mit vielen Proteinen assoziieren, die in Prozesse involviert sind, die das Leben eines Organismus steuern. Dazu gehören: die Entwicklung, Differenzierung, Seneszenz, Proliferation, sowie die metabolische Regulation. In der vorliegenden Arbeit wurde eine *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung von Sirt6 durchgeführt, die neue Einblicke in die Funktion von Sirt6 liefern sollte. Der homozygote konstitutive Knock Out von Sirt6 führt in Mäusen zu einem frühzeitigen Tod innerhalb der ersten drei Lebenswochen und erlaubt somit keine Untersuchung der Sirt6 Funktion in adulten Tieren. Durch die Herstellung genetisch veränderter Mäuse, die eine konditionelle Deletion von Sirt6 erlauben, wurde in dieser Arbeit die Voraussetzung zur Analyse der biologischen Funktion von Sirt6 im lebenden adulten Organismus geschaffen. Die zur Kontrolle hergestellte Nullmutation resultierte dabei in demselben Phänotyp, wie er bereits für das konstitutive Knock Out Allel beschrieben ist. Mäuse mit einer leberspezifischen Deletion von Sirt6 zeigten zunächst keine phänotypischen Auffälligkeiten, entwickelten aber mit zunehmendem Alter eine Insulinresistenz und zeigten degenerative Veränderungen in der Leber. Diese Beobachtungen unterstreichen die Funktion von Sirt6 als Regulator metabolischer Prozesse.

Neben der Generierung der konditionellen Sirt6 Maus wurde ein SILAC basiertes Screening nach Interaktionspartnern der Sirtuine Sirt1, Sirt6 und Sirt7 durchgeführt. Durch das Screening konnten bereits bekannte sowie viele unbekannte potentielle Bindungspartner identifiziert werden, die zum Teil auch Überlappungen zwischen den Sirtuinen aufwiesen. Durch Co-Immunopräzipitationen konnten einige der möglichen Interaktionspartner von Sirt6 bestätigt werden, darunter auch Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 1 (GFAT1). GFAT1 ist das Schlüsselenzym des Hexosamin-Biosyntheseweges (HBW). Das Endprodukt des HBW ist UDP-N-Acetylglucosamin, ein Zuckerrest der reversibel und spezifisch an Serin und Threonin gebunden wird und dadurch die Eigenschaften betroffener Proteine verändert. Der HBW funktioniert als Negativregulator der Insulinsignalkaskade und viele Studien belegen, dass eine erhöhte chronische Aktivität des HBW zur Entstehung von Diabetes beiträgt. In der Leber Sirt6 defizienter Tiere konnte in diesem Zusammenhang eine gesteigerte GFAT1 Aktivität gemessen, sowie eine erhöhte globale Protein-O-Glykosylierung detektiert werden. Die Validierung anderer Bindungspartner von Sirt6 deutet an, dass Sirt6 in Prozesse die die Stabilität und den Abbau von mRNA sowie deren Translation steuern und zudem in die Regulation der Stressantwort involviert ist.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	II
1. Einleitung	1
1.1 Einführung in die Familie der Sirtuine	1
1.1.1 Die Entdeckung der Sirtuine.....	1
1.1.2 Die Familie der Säugetier Sirtuine	3
1.1.3 Rolle der Sirtuine im Alterungsprozess.....	4
1.1.4 Sirtuine und die Steuerung metabolischer Prozesse	6
1.2 Einführung in die vielfältigen Funktionen von Sirtuin 6 (Sirt6)	10
1.2.1 Sirt6 reguliert die genomische Integrität und DNA Reparaturmechanismen	11
1.2.2 Sirt6 im Alterungsprozess	12
1.2.3 Regulierung metabolischer Prozesse durch Sirt6	13
1.2.3.1 Sirt6 und Fettmetabolismus.....	13
1.2.3.2 Sirt6 und Glukosehomöostase	14
1.3 Ziele der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.1.1 Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.2 Puffer und Lösungen	18
2.1.3 Enzyme	18
2.1.4 Verwendete Kits	19
2.1.5 Geräte	19
2.1.6 Nährmedien für die Zellkultur	19
2.1.7 Verwendete Primärantikörper.....	19
2.1.8 Verwendete Sekundärantikörper	20
2.1.9 Verwendete Bakterienstämme	20
2.1.10 Verwendete Zelllinien	20

2.1.11	Southern Probe für Genotypisierung	21
2.1.12	Verwendete Oligonukleotide.....	21
2.1.12.1	Oligonukleotide für die Konstruktion des "Targeting"-Vektors.....	21
2.1.12.2	Oligonukleotide für Überexpressionskonstrukte.....	21
2.1.12.3	Oligonukleotide für Mutagenese	22
2.1.12.4	Oligonukleotide für Genotypisierungen.....	22
2.1.12.5	Oligonukleotide für Southern Probe.....	23
2.1.12.6	Oligonukleotide für semi-quantitative RT-PCR und quantitative PCR (Q-PCR).....	23
2.1.12.7	Oligonukleotide für Sequenzierungen.....	23
2.1.13	Verwendete Vektoren.....	24
2.1.14	Verwendete Überexpressionskonstrukte	24
2.1.15	Verwendete Mauslinien	25
2.1.16	Verwendete Software	26
2.2	Methoden	26
2.2.1	Sterilisation von Gebrauchsmitteln und Lösungen.....	26
2.2.2	Generierung der konditionalen Sirt6 Knock Out Maus	26
2.2.2.1	Konstruktion des konditionellen "Targeting"- Vektors	26
2.2.2.2	Kultur, Transformation und Selektion von ES-Zellen der Maus.....	29
2.2.2.3	Isolation genomischer DNA aus ES-Zellen.....	29
2.2.3	Arbeiten mit Versuchsmäusen.....	30
2.2.3.1	Herstellung und Haltung transgener Mäuse	30
2.2.3.2	Tötung von Versuchsmäusen.....	30
2.2.3.3	Isolierung von Mausembryonen aus dem Uterus des Muttertieres	30
2.2.3.4	Präparation von Mausembryofibroblasten (MEF's).....	30
2.2.3.5	Isolierung genomischer DNA aus murinen Schwanzbiopsien	31
	und murinem Gewebe	31
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR).....	31
2.2.4.2	Quantitative PCR (Q-PCR).....	32

2.2.4.3	Mutagenese-PCR.....	32
2.2.4.4	DNA-Sequenzierung	32
2.2.4.5	Konstruktion der Überexpressionskonstrukte	32
2.2.4.6	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	32
2.2.4.7	Reverse Transkriptase PCR zur Herstellung komplementärer DNA (cDNA).....	33
2.2.5	Biochemische Methoden	33
2.2.5.1	Proteinisolation aus Gewebe.....	33
2.2.5.2	Proteinisolation aus kultivierten Zellen	33
2.2.5.3	Proteinbestimmung	33
2.2.5.4	Western Blot Analyse	34
2.2.5.5	Coomassie-Brillant-Färbung von Proteingelen	34
2.2.5.6	Proteinverdau im Gel und Aufbereitung für die Massenspektrometrie	34
2.2.5.7	GFAT1 Aktivitäts-Assay	36
2.2.6	Zellbiologische Methoden.....	37
2.2.6.1	Kultivierung von Zellen.....	37
2.2.6.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	37
2.2.6.3	Transfektion von Zellen.....	37
2.2.7	Immunologische Färbungen.....	38
2.2.8	Immunopräzipitation (IP) mit überexprimierten Proteinen aus Zelllysaten.....	38
2.2.8.1	Immunopräzipitation für die Massenspektrometrie	38
2.2.8.2	Co-Immunopräzipitation (Co-IP).....	39
2.2.9	Überexpression in <i>E. coli</i> und Isolation der Proteine.....	39
2.2.10	HPLC und Massenspektrometrie.....	40
2.2.11	Analyse der LC-MS/MS Daten	40
3.	Ergebnisse	42
3.1	Generierung und Analyse der konditionalen Sirt6 Knock Out Maus.....	42
3.1.1	Konstruktion des konditionellen "Gene-Targeting"-Vektor	42
3.1.2	Homologe Rekombination des Targeting Vektors in ES-Zellen und	
	Generierung chimärer Mäuse.....	43

3.1.3	Etablierung von Mauslinien mit verändertem Sirt6 Allel	45
3.1.3.1	Sirt6 cKO Mäuse enthalten die FRT-flankierte Neomycin-Kassette und die geflochten Exone IV bis VI.....	45
3.1.3.2	Deletion der Neomycin-Kassette mit Hilfe der Flp-Rekombinase zur..... Generierung der Sirt6 Neo Mauslinie	47
3.1.3.3	Überprüfung der Funktionalität des Knock Out Konstrukts durch Cre-..... Rekombinase vermittelte Deletion von Sirt6 und Generierung von	48
3.1.4	Mäuse mit leberspezifischer Deletion von Sirt6 sind phänotypisch unauffällig .	53
3.2	<i>Stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i> (SILAC) basiertes	
	Screening nach potentiellen Interaktionspartnern der Sirtuine 1, 6 und 7	57
3.2.1	Klonierung der murinen Sirtuine in die pTAG(CGY)FP Expressionsvektoren ..	57
3.2.2	Expression der Konstrukte in SILAC markierten HEK 293T Zellen und..... anschließende Immunopräzipitation	58
3.2.3	Identifizierung potentieller Interaktionspartner von Sirt1, Sirt6 und Sirt7	59
3.2.4	Analyse Sirt6 spezifischer Interaktionspartner	60
3.2.4.1	Potentielle Interaktionspartner können in drei Gruppen eingeteilt werden	63
3.2.4.2	Stress assoziierte Proteine, die den mRNA Abbau und die mRNA	
	Stabilität regulieren	64
3.2.4.3	Proteine involviert in DNA Reparaturmechanismen.....	67
3.2.4.4	Proteine die an der Regulation metabolischer Signalwege beteiligt sind ..	68
3.2.4.5	Sirt6 interagiert mit glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 1 (GFAT1) und reguliert dessen Aktivität.....	69
3.2.4.6	Sirt6 deacetyliert GFAT1 und beeinflusst dessen Stabilität	78
4.	Diskussion.....	87
4.1	Die Mauslinien Sirt6 cKO und Sirt6 Neo sind lebensfähig und erlauben die	
	gewebsspezifische Deletion von Sirt6	87
4.2	Homozygote Tiere der Sirt6 cmvKO Linie entsprechen im Phänotyp der..... konstitutiven Deletion von Sirt6	88
4.3	Mäuse mit einer leberspezifischen Deletion von Sirt6 erscheinen zunächst	
	phänotypisch unauffällig	90
4.4	Analyse des SILAC-Interaktionsscreenings.....	93

4.4.1	Reproduzierbarkeit und Validierung der SILAC Daten.....	93
4.4.2	Potentielle Bindungspartner von Sirt6 lassen sich grob in drei Kategorien einteilen.....	95
4.4.3	Überschneidung bei identifizierten Interaktionspartnern von Sirt6 und Sirt7, die in die Regulierung der Stress- und Prozessierungskörperchen involviert..... sind	101
4.4.4	Sirt6 reguliert das Schlüsselenzym des Hexosamin-Biosyntheseweges.....	101
4.5	Ausblick.....	106
5.	Anhang.....	108
5.1	Auflistung potentieller Interaktionspartner von Sirt1, Sirt6 und Sirt7	108
5.2	Abkürzungsverzeichnis	117
5.3	Abbildungsverzeichnis.....	119
5.4	Tabellenverzeichnis.....	120
5.5	Danksagung	122
5.6	Lebenslauf	123
6.	Literaturverzeichnis	124

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Familie der Sirtuine

Normale Zellen des menschlichen Organismus haben nur eine begrenzte replikative Lebensspanne, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Die Zellen sterben ab oder treten in den Status der replikativen Seneszenz ein, nachdem sie eine definierte Anzahl an Teilungen erfahren haben. Viele Mechanismen wie beispielsweise die Reparatur von DNA Schäden, die Abwehr und Beseitigung oxydativer Stressfaktoren und die Regulierung der Telomere sind in die zellulären Alterungsprozesse involviert. Die komplexe biologische Grundlage der menschlichen Zellalterung ist bis heute aber inkomplett und nur wenig verstanden. In den letzten Jahrzehnten wurden immer mehr Gene entdeckt, die das Altern und die Lebensspanne ganzer Organismen kontrollieren. Die Pionierarbeit an funktionellen Untersuchungen wurde dabei an niederen Organismen wie beispielsweise der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* oder dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und wenig später auch der Hausmaus *Mus musculus* durchgeführt. Die dabei identifizierten Proteine und Mechanismen sind sehr stark evolutionär konserviert und eine Untersuchung muriner Proteine ähnlich der des Menschen können vielleicht helfen, den generellen menschlichen Alterungsprozess besser zu verstehen. Besondere Aufmerksamkeit erlangte dabei eine Familie von Regulatoren, genannt Sirtuine, welche vom englischen für "Silent information regulator 2 (Sir2)" abgeleitet wurden und Protein Deacetylase- und mono-ADP-Ribosyltransferase Aktivität besitzen (Blander & Guarente, 2004; Imai *et al.*, 2000).

1.1.1 Die Entdeckung der Sirtuine

Das erste Sirtuin wurde in *Saccharomyces cerevisiae* durch Klar und Kollegen entdeckt (Klar *et al.*, 1979). Ursprünglich war Sir2 (Sir2p) dort unter dem Namen MAR1, für "mating-type regulator 1" bekannt. Es wurde dort basierend auf Beobachtungen einer spontanen Mutation entdeckt, die zur Sterilität aufgrund fehlender Hemmung der zwei stillen Loci *HML* und *HMR* (homothallische mating-type-Kopie links bzw. rechts) führte. Kurz danach wurde eine Reihe von Mutationen, die zu sterilen Phänotypen führten, durch Jasper Rine mit entdeckt, der diese Gruppe von Genen dann entsprechend als *Silent Information Regulator (SIR) 1-4* bezeichnete (Ivy *et al.*, 1985; Landry *et al.*, 2000). Nach und nach wurden dann SIR2 Homologe in Bakterien, Würmern, Fliegen, Pflanzen und Säugetieren entdeckt, was für eine hohe evolutionäre Konservierung der Sirtuin Gen-Familie spricht.

Erst viele Jahre nach der Entdeckung des *SIR2* Gens konnte demonstriert werden, das SIR2 für die Hemmung der rDNA Rekombination sowie der Chromatinstillegung an den Telomeren erforderlich ist (Aparicio *et al.*, 1991; Gottlieb & Esposito, 1989). Kurz danach konnte gezeigt werden, dass die Genhemmung an den *HML* und *HMR* Loci und an den Telomeren mit einer Hypoacetylierung von Histon Proteinen an N-terminalen Lysin einhergeht (Braunstein *et*

al., 1993) und die enzymatische Aktivität essentiell dafür ist (Frye, 2000; Tanny *et al.*, 1999). Anfangs ging man davon aus, dass die ADP-Ribosylierung durch Sir2 die Acetylierung der Histone negativ beeinflusst und es deshalb zur fehlenden Genhemmung in Sir2 Mutanten kommt. Schnell konnte aber gezeigt werden, dass Sir2 Histone deacetyliert und dass diese Aktivität abhängig von der Verfügbarkeit an NAD^+ ist (Imai *et al.*, 2000; Landry *et al.*, 2000). Die NAD^+ -abhängige Deacetylaseaktivität konnte später für eine Vielzahl anderer Sirtuine einschließlich des bakteriellen CobB, des archaebakteriellen SIR2-AF sowie der humanen SIRT1-3 und 5 demonstriert werden (Smith *et al.*, 2000). Diesbezüglich wurden die Sirtuine in die Klasse III der Histon Deacetylasen (HDAC-III) eingeteilt. Histon Deacetylasen der Klasse I und II hingegen benötigen Zink als Kofaktor (Hernick & Fierke, 2005). Während HDAC's der Klasse I und II deacetyliertes Lysin und Acetat generieren, führt die durch die Sirtuine katalysierte Deacetylase-Reaktion durch die Hydrolyse eines Moleküls NAD^+ zur Bildung von deacetyliertem Lysin und je eines Moleküls Nicotinamid und *O*-acetyl-ADP-ribose (OAADPr) (Landry *et al.*, 2000; Tanner *et al.*, 2000). Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der durch die Sirtuine katalysierten Deacetylase- und mono-ADP-Ribosyltransferase Reaktionen.

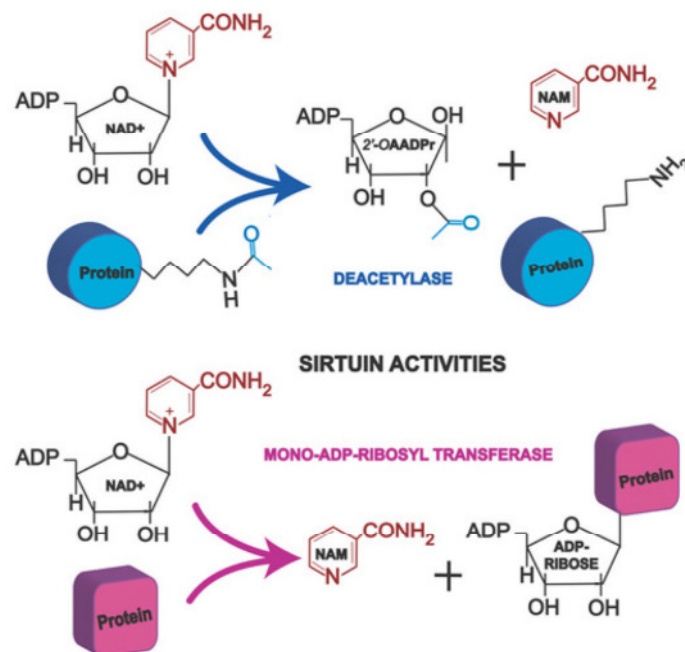


Abbildung 1: Schematische Darstellung der durch die Sirtuine katalysierten enzymatischen Reaktionen.

Sirtuine sind NAD^+ abhängige Deacetylasen und mono-ADP-Ribosyltransferasen. Als Deacetylasen entfernen Sirtuine in Anwesenheit von NAD^+ die Acetylgruppe des Zielproteins und übertragen diese auf NAD^+ . Dadurch entstehen Nicotinamid (NAM), 2'-*O*-acetyl-ADP-Ribose (2'-OAADPr) und freie Lysin Seitenketten am Zielprotein. Als mono-ADP-Ribosyltransferasen übertragen sie den mono-ADP-Ribose-Rest von NAD^+ auf das Zielprotein, wodurch ebenfalls NAM entsteht (Michan & Sinclair, 2007)

Die absolute Notwendigkeit des NAD^+ als Kofaktor essentiell ist, legt nahe, dass die Aktivität der Sirtuine streng mit dem Energiehaushalt und dem Redox Status der Zelle verknüpft ist und Sirtuine als Sensor des metabolischen Status fungieren (Denu, 2003; Guarente, 2000; Lin *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Nicotinamid und reduziertes NADH die enzymatische Aktivität der Sirtuine inhibieren.

1.1.2 Die Familie der Säugetier Sirtuine

Die Familie der Säugetier Sirtuine umfasst 7 Mitglieder, Sirt1-7 (Blander *et al.*, 2004; Frye, 2000). Allen ist eine ca. 260-275 Aminosäuren lange Kerndomäne gemeinsam, die eine NAD^+ -abhängige Deacetylase (DAC) und/oder mono-ADP-Ribosyltransferase (ART) Aktivität aufweist. Die Sirtuine unterscheiden sich lediglich in der Länge ihrer zusätzlichen N- und C-terminal flankierenden Sequenzen (Michan *et al.*, 2007). Eine Unterscheidung der Sirtuine kann auch hinsichtlich ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle vorgenommen werden. Sirt1, Sirt6 und Sirt7 sind kernlokalisierte Proteine, wobei Sirt7 speziell im Nukleolus zu finden ist (Frye, 1999). Sirt2 ist im Zytoplasma lokalisiert (North *et al.*, 2003) und Sirt3, Sirt4 und Sirt5 sind als mitochondriale Proteine beschrieben (Michishita *et al.*, 2005). Ursprünglich wurde angenommen, dass Sirt1 nur im Nukleus zu finden ist, neuere Studien zeigen aber dass Sirt1 auch im Zytoplasma lokalisiert ist (Cohen *et al.*, 2004; Hallows *et al.*, 2006; Tanno *et al.*, 2007).

Unter den Sirtuinen ist Sirt1 das am besten untersuchte und weist eine robuste Deacetylase Aktivität auf (Lim *et al.*, 2010; Vaziri *et al.*, 2001), wohingegen Sirt5 nur eine schwache Deacetylase ist (Nakagawa *et al.*, 2009). Eine neue Studie belegt aber, dass Sirt5 zusätzlich eine *in vitro* Protein-Lysin-Desuccinylase- und Demalonylase Aktivität besitzt (Du *et al.*, 2011). Sirt2, Sirt3 und Sirt6 sind sowohl Deacetylasen als auch mono-ADP-Ribosyltransferasen (Frye, 1999; Liszt *et al.*, 2005; North *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010). Für Sirt4 konnte bisher nur eine mono-ADP-Ribosyltransferase Aktivität beschrieben werden (Haigis *et al.*, 2006). Die enzymatische Aktivität von Sirt7 wird immer noch kontrovers diskutiert. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass Sirt7 p53 *in vitro* deacetyliert, was mit einer Hyperacetylierung von p53 im Myokardium Sirt7 defizienter Mäuse einhergeht (Vakhrusheva *et al.*, 2008). Abbildung 2 gibt eine kurze Übersicht über die Domänenstruktur, die subzelluläre Lokalisierung und die bisher dokumentierten enzymatischen Aktivitäten der sieben humanen Sirtuine.

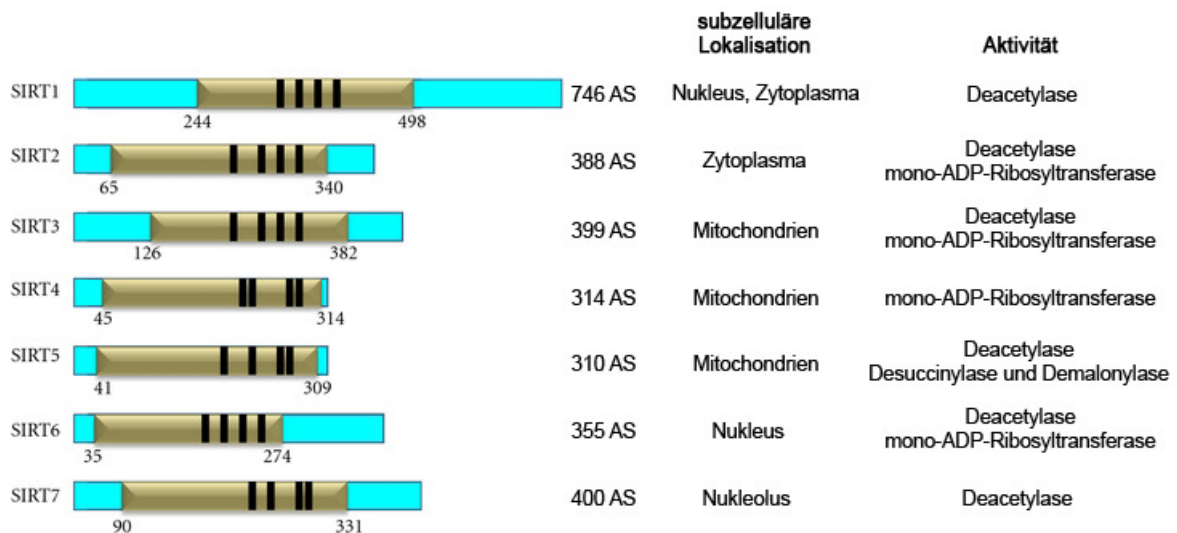


Abbildung 2: Übersicht über die Lokalisation und die Aktivität der 7 humanen Sirtuine.

Die katalytische Kerndomäne ist zwischen allen Sirtuinen hoch konserviert (goldener Kasten) und deren Lage innerhalb der Aminosäuresequenz ist durch Zahlen unterhalb der Kästen gekennzeichnet. Die Gesamtproteidlänge ist rechts neben des jeweiligen Balken in Aminosäuren (AS) angegeben. Die N- und C-terminal flankierenden Sequenzen um die Kerndomäne variieren in ihrer Länge (blaue Kästen). Die Zink Bindedomänen sind in schwarz eingezeichnet. Die Subzelluläre Lokalisation und die bekannten enzymatischen Aktivitäten sind rechts neben den Balken aufgelistet. Bild verändert entnommen aus ((Rajendran *et al.*, 2011).

1.1.3 Rolle der Sirtuine im Alterungsprozess

Erste Beobachtungen, die andeuteten das Sirtuine eine Lebenszeit regulierende Funktion besitzen, wurden in der Hefe gemacht. Die replikative Lebensspanne wird hier als Anzahl der Zellteilungen definiert, die eine Mutterzelle erfahren kann (Kennedy *et al.*, 1995). Etwas später konnte gezeigt werden, das die Deletion von Sirt1 (Hefe Sir2) zu einer Verkürzung des Lebens um ca. 50% führt und eine Überexpression von Sirt1 die Lebensspanne um ca. 30% verlängert (Kaeberlein *et al.*, 1999). In der Hefe resultiert jede Teilung in der Bildung und Anhäufung sogenannter extrachromosomaler rDNA Moleküle (englisch ERC's) die dann letztendlich zur Vergrößerung der Nukleoli, Seneszenz und dem Tod der Zelle führt (Sinclair & Guarente, 1997). Sir2 hemmt die Rekombination an den rDNA Loci und verhindert damit die Bildung der ERC's, was somit zur Verlangsamung des Alterungsprozesses beiträgt (Kaeberlein *et al.*, 1999).

Nachfolgend konnten lebensverlängernde Effekte auch in anderen Organismen wie Würmern und Fliegen beobachtet werden. Im Fadenwurm *C. elegans* reguliert das Sirt1 Homolog Sir2.1 die Lebensspanne in Abhängigkeit eines stromabwärts gelegenen Proteins des Insulin/IGF Signalweges, dem DAF-16. Eine extra Kopie des Sir2.1 Gens sorgt hier für eine Verlängerung der Lebenszeit um ca. 50% (Tissenbaum & Guarente, 2001). Eine direkte Regulierung des Insulin/IGF Signalweges durch Sir2.1 liegt aber nicht vor. Vielmehr interagiert Sir2.1 unter Stressbedingungen unabhängig vom Insulin/IGF Signalweg mit einer

Klasse von Gerüstproteinen (14-3-3) und DAF-16 (Wang *et al.*, 2006; Wang & Tissenbaum, 2006). Ähnlich resultiert auch eine extra Kopie des *Drosophila melanogaster* Sir2 Gens, dSir2, in der Verlängerung des Lebensalters von ca. 18-29% (Rogina *et al.*, 2002). Hier wurde aber vermutet, dass dSir2 das Leben durch Prozesse ähnlich der kalorischen Restriktion verlängert. Allerdings regt eine neue Studie Zweifel an der lebensverlängernden Wirkung der Sirtuine in *C. elegans* und *D. melanogaster* an. Burnett und Kollegen weisen auf fehlende Kontrollen und mangelnde Berücksichtigung des genetischen Hintergrundes bei den durchgeführten Experimenten hin und zeigen das die Überexpression von Sir2 in Wurm und Fliege keinen Einfluss auf die Lebensspanne beider Organismen hat (Burnett *et al.*, 2011). Dennoch scheint *C. elegans* dadurch weniger anfällig gegenüber der Anhäufung toxischer Proteine zu sein. Möglicherweise regulieren Sirtuine hier physiologische Prozesse und sind an der Stressantwort beteiligt, als dass sie direkt in die Regulierung der Lebensspanne eingreifen.

Ob Sirtuine eine direkte Rolle in Alterungsprozessen der Säugetiere spielen wird noch immer diskutiert, die evolutionär hohe Konservierung legt aber nahe dass dies hier ebenso zutrifft. Vielmehr deuten aber viele Studien an, dass die Sirtuine das Altern durch die Regulierung verschiedener Prozesse wie beispielsweise die Stressresistenz, den Fettstoffwechsel und die Glukosehomöostase beeinflussen (Bordone *et al.*, 2006; Brunet *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2004; Kawahara *et al.*, 2009; Kemper *et al.*, 2009; McCord *et al.*, 2009; Moynihan *et al.*, 2005; Rodgers *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). So zeigen transgene Mäuse mit einer moderaten herzspezifischen Überexpression von Sirt1 eine verbesserte Resistenz gegenüber oxydativem Stress und Apoptosis (Alcendor *et al.*, 2007). Auch konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass Sirt7 die Stressresistenz von Kardiomyozyten erhöht und effektiv Apoptosis und die Entwicklung einer inflammatorischen Kardiomyopathie in Mäusen verhindert (Vakhrusheva *et al.*, 2008). Weiterhin führt die DeltaNp63alpha vermittelte Verringerung der Sirt1 Expression zur Ausprägung alterstypischer Erscheinungen und zum vorzeitigen Tod in Mäusen mit einer hautspezifischen Überexpression von p63 (Sommer *et al.*, 2006). Auch für Sirt6 konnte eine lebensverlängernde Wirkung beschrieben werden. So zeigte sich, dass männliche transgene Mäuse mit einer Sirt6 Überexpression länger lebten als ihre Wildtyp Geschwistertiere (Kanfi *et al.*, 2012). Kanfi und Mitarbeiter führen diesen Effekt auf eine erhöhte Expression eines IGF1 bindenden Proteins (IGFBP1) und eine verringerte Verfügbarkeit an IGF1 im Serum zurück. Ähnliches konnte auch für Sirt1 gezeigt werden. Allerdings führt hier nicht die Überexpression sondern der Verlust von Sirt1 zur Erhöhung des IGFBP1 Proteinlevels (Lemieux *et al.*, 2005). Diese Befunde sind insofern interessant, da der Insulin/IGF Signalweg eine entscheidende Rolle im Alterungsprozess von *C. elegans* ausübt (Tissenbaum *et al.*, 2001).

1.1.4 Sirtuine und die Steuerung metabolischer Prozesse

Die Regulation metabolischer Prozesse spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung altersbedingter Krankheiten wie Diabetes, Fettleibigkeit und Arteriosklerose. Ursachen dieser Krankheiten gibt es viele und können unter anderem genetisch bedingt sein oder aber durch den eigenen Lebensstil und verschiedene Umweltfaktoren beeinflusst werden. Eine Reduzierung der Kalorienzufuhr erwies sich dabei als ein sehr entscheidender Faktor bei der Verbesserung der Lebensqualität. Dabei beschreibt die kalorische Restriktion (KR) lediglich die Verringerung der Kalorienaufnahme, ohne dabei mit lebenswichtigen Nährstoffen unterversorgt zu sein. Es zeigte sich, dass auf diese Art und Weise die Lebensspanne verschiedener Organismen wie Hefen, Würmern, Fruchtfliegen, Mäusen und nicht zuletzt auch Primaten verlängert werden konnte (Jiang *et al.*, 2000; Lakowski & Hekimi, 1998; Mair *et al.*, 2003; Weindruch, 1996; Weindruch *et al.*, 1986). Die Abhängigkeit der Sirtuine von NAD⁺ zeichnen die Sirtuine dabei als einen wichtigen Faktor bei der Ausübung der durch KR gezeigten Effekte aus. Erste Hinweise lieferte auch hier die Hefe *S. cerevisiae*. Eine moderate KR (0,5% Glukose) erhöhte die Lebenserwartung und erforderte Sir2 (Lin *et al.*, 2000). Stämme in denen Sir2 oder NPT1 (Nicotinat-Phosphoribosyltransferase 1) mutiert sind, zeigen dagegen keine lebensverlängernden Effekte. Allerdings erforderte eine starke KR (0,05% Glukose) nicht die Anwesenheit von Sir2 und ist wahrscheinlich über den TOR (engl. target of rapamycin) Signalweg reguliert (Kaeberlein *et al.*, 2005).

Ob diese lebensverlängernden Effekte der KR auch in Säugern durch die Sirtuine vermittelt werden ist bis heute ein offenes Thema und kann nicht eindeutig beantwortet werden. Die KR äußert sich hier in der Veränderung vieler physiologischer Merkmale, die im Allgemeinen mit Gesundheit und Langlebigkeit verbunden werden, wie zum Beispiel niedrige Blutglukose, Triglyzerid-, Cholesterin- und Insulinspiegel, geringerer Körperfettanteil oder eine erhöhte Insulinsensitivität und Glukosetoleranz (Koubova & Guarente, 2003). So konnte gezeigt werden, dass die Proteinlevel von Sirt1 während kalorischer Restriktion in verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel Gehirn, Muskel, Leber und Niere der Maus ansteigen (Picard *et al.*, 2004). Allerdings variieren die NAD⁺ Level auch sehr stark während der KR in den einzelnen Organen, was andeutet, dass die Reaktion der Sirtuine auf die KR sehr stark vom entsprechenden Gewebe abhängig ist (Chen *et al.*, 2008). Zudem unterstützen Studien an Sirt1 Knock Out Mäusen, dass viele der durch KR hervorgerufenen positiven Veränderungen durchaus durch Sirt1 reguliert werden und dessen Anwesenheit erfordern (Chen *et al.*, 2005). Auch konnte durch transgene Sirt1 überexprimierende Mäuse gezeigt werden, dass diese Mäuse einige phänotypische Merkmale aufweisen, die denen der KR sehr ähnlich sind. So zeichnen sich die Sirt1 überexprimierenden Mäuse durch niedrigere Cholesterinwerte, eine verbesserte Glukosetoleranz und eine erhöhte metabolische Aktivität aus und sind zudem auch noch dünner als ihre Wildtyp Geschwistertiere (Bordone *et al.*, 2007).

Am Beispiel von transgenen Mäusen, welche Sirt1 in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas überexprimieren, konnte durch zwei unabhängige Studien demonstriert werden, dass Sirt1 eine Rolle bei der Regulierung der Insulinsekretion spielt. Hier fiel auf, dass die Sirt1 überexprimierenden (BESTO) Mäuse eine erhöhte Glukosetoleranz im Vergleich zu den Wildtyp Tieren aufwiesen (Bordone *et al.*, 2006; Moynihan *et al.*, 2005). Die BESTO Mäuse reagierten mit einer deutlich verbesserten Insulinsekretion nach Verabreichung von Glukose und umgekehrt reagierten Sirt1 $-/-$ Mäuse bzw. deren isolierte Inselzellen mit einer verminderten Insulinsekretion. Weiterhin konnte belegt werden, dass Sirt1 an den Promoter des UCP2 Gens bindet und dort dessen Transkription unterdrückt. UCP2 kodiert für das mitochondriale "Uncoupling Protein 2" und entkoppelt die mitochondriale Atmungskette von der ATP Produktion und reduziert damit die Bildung von ATP aus Glukose (Chan *et al.*, 2004). Somit verbessert Sirt1 durch die Blockade der UCP2 Expression eine effiziente Energieproduktion. In Einklang damit zeigten die BESTO Mäuse eine erhöhte ATP Produktion nach der Verabreichung von Glukose, während in Sirt1 Knock Out Tieren kein Anstieg der ATP Produktion zu verzeichnen war (Bordone *et al.*, 2006). Interessanterweise erhöhte sich die UCP2 Transkription durch die Hemmung der Sirt1 Aktivität aufgrund niedriger NAD^+ Level unter Hungerbedingungen im Pankreas. Dies deutet an, dass durch den NAD^+ Haushalt die Sirt1 Aktivität und somit auch die Insulinsekretion sowie die Glukosehomöostase geregelt werden können.

Ein weiteres Organ, das eine tragende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase spielt, ist die Leber. Die ständig wechselnde Verfügbarkeit an Nährstoffen erfordert eine schnelle und adäquate Anpassung an solche Bedingungen, um alle Organe stets mit der benötigten Menge an Glukose bzw. Energie versorgen zu können. So induziert die Leber die Glukoneogenese während Hungerzeiten, um andere Organe, die nicht in der Lage sind Glukose neu zu bilden oder zu speichern, mit dieser zu versorgen. Dabei zeigte sich, dass auch hier die Sirtuine in Form von Sirt1 eine entscheidende Rolle spielen und maßgeblich an der Regulierung der Glukoneogenese beteiligt sind. Beispielsweise interagiert Sirt1 mit dem "Fork-head"-Transkriptionsfaktor FOXO1, einem Protein das die Expression von Genen reguliert, die an der Glukoseneubildung beteiligt sind. So bindet und deacetyliert Sirt1 FOXO1, wodurch dessen Aktivität gesteigert und die Transkription FOXO1 abhängiger Gene begünstigt wird (Frescas *et al.*, 2005; Rodgers & Puigserver, 2007). Dadurch verschiebt sich der Glukosemetabolismus von der Glykolyse in Richtung Glukoneogenese. Allerdings kann die Regulierung der Glukoneogenese durch Sirt1 in zwei Phasen eingeteilt werden. In einer frühen Phase, weniger als 18 Stunden des Hungerns, dämpft Sirt1 die Glukoseneubildung durch Inhibition von TORC2 (engl. "target of rapamycin complex 2") einem Schlüsselprotein der frühen Phase der Glukoneogenese (Liu *et al.*, 2008). Nach einer längeren Hungerphase hingegen interagiert, deacetyliert und

aktiviert Sirt1 PGC1 α (engl. "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha"). Die Aktivierung von PGC1 α , einem essentiellen Koaktivator einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, resultiert dann in der Energiegewinnung durch Fettsäureoxydation und Glukoneogenese (Purushotham *et al.*, 2009; Rodgers *et al.*, 2005). Zusätzlich, deacetyliert und aktiviert Sirt1 auch die Acetyl-CoA-Synthetase 2 (AceCS2) (North & Sinclair, 2007). Dieses Enzym ist von den Bakterien bis hin zum Menschen hoch konserviert und katalysiert die Umsetzung von Acetat zu Acetyl-CoA und gewährleistet somit die Energiegewinnung während langer Hungerphasen. Auch gibt es inzwischen einige leberspezifische Sirt1 Knock Out Studien, die belegen, dass Sirt1 eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase spielt. So führt die Deletion der katalytischen Domäne von Sirt1 in der Leber zu einer Verminderung der Fettsäureoxydation und resultiert in einer gesteigerten Anfälligkeit gegenüber der Entwicklung einer Lebersteatose, ausgelöst durch eine Fett-Diät (Purushotham *et al.*, 2009). Eine andere Studie zeigt, dass es durch die Deletion größerer DNA Bereiche (Exon 5 und 6) von Sirt1, schon bei der normalen Diät zur Ausbildung einer Lebersteatose kommt (Wang *et al.*, 2010). Gegenteilig, verhindert die Adenovirus vermittelte Überexpression von Sirt1 in der Leber die Entstehung einer Diät induzierten Lebersteatose und verbessert die Insulinsensitivität in ob/ob Mäusen (Li *et al.*, 2011). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sirtuine in Form von Sirt1 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Leberhomöostase spielen und zur Verminderung altersbedingter Krankheiten beitragen können.

Auch das Fettgewebe spielt bei der Entwicklung altersbedingter Krankheiten und der Kontrolle des Energiehaushalts eine entscheidende Rolle. Der bevorzugte Speicherort von Fett in Säugern ist das weiße Fettgewebe (WAT). Hier wird das Fett in Form von Triglyzeriden gespeichert und dient in Zeiten eines Glukosemangels als Energielieferant. Während Hungerphasen werden die Triglyzeride als freie Fettsäuren aus dem Fettgewebe in den Blutkreislauf entlassen und stehen somit anderen Organen zur Energiegewinnung zur Verfügung (Flier, 2004). Der Einfluss des Fettgewebes hinsichtlich der Lebenserwartung in Säugern wurde durch Blüher und Kollegen am Beispiel der fettgewebsspezifischen Insulin-Rezeptor Knock Out Maus (FIRKO) untersucht (Blüher *et al.*, 2003). Sie konnten zeigen, dass FIRKO Mäuse im Schnitt ca. 18% länger lebten als Wildtyp Mäuse. Auch der Einfluss der Sirtuine auf die Regulierung der Adipogenese wurde daher untersucht.

So zeigen Mäuse, die einer kalorischen Restriktion unterliegen, eine deutliche Hochregulierung von Sirt1 und zeichnen sich durch Schlankheit und verbesserte Insulinregulierung im Fettgewebe aus. Die verbesserte Insulinregulierung im Fett wiederum sorgt für eine verminderte Fettneusynthese und eine gesteigerte Fettsäurezirkulation durch die erhöhte Mobilisierung von Fettdepots. Picard und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Sirt1 die Adipogenese bremst und gleichzeitig die Lipolyse fördert (Picard *et al.*, 2004). Ein

entscheidender Faktor, der dabei eine Rolle spielt und durch Sirt1 reprimiert wird, ist PPAR γ . Dieser gehört zur Familie der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl von fettgewebsspezifischen Genen kontrollieren. Sirt1 interagiert hier mit dem nukleären Korepressor NCoR (engl. nuclear receptor corepressor) und dem Thyroid Hormon Rezeptor SMRT (engl. silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor), beides Kofaktoren von PPAR γ . Durch die Interaktion von Sirt1 mit den Kofaktoren werden diese an den PPAR γ und den α P2 Promoter rekrutiert. Dadurch wird die Translation PPAR γ abhängiger Faktoren wie beispielsweise CCAAT/enhancer-binding-Proteine (C/EBP) und α P2 inhibiert und die Adipogenese blockiert. Zudem haben Sirt1 Überexpressions- und Deletionsexperimente in Säugerzellen gezeigt, dass die Adipogenese und Fetteinlagerung durch variierende Sirt1 Level reguliert werden können. Ebenfalls durch Sirt1 reguliert und am Fettstoffwechsel beteiligt zu sein, scheint FOXO1. FOXO1 wird durch Sirt1 deacetyliert und dadurch aktiviert. Adiponektin, ein Peptidhormon das in den Fettzellen gebildet wird und umgekehrt mit der Adipogenese korreliert, wird durch FOXO1 reguliert. So haben Übergewichtige eine niedrige Serum-Adiponektin-Konzentration, wodurch auch die Wirkung von Insulin abgeschwächt wird. Durch die Sirt1 abhängige Deacetylierung von FOXO1 wird dessen Interaktion mit C/EBP α verstärkt. Der so geformte Komplex bindet an den Adiponektin Promoter und begünstigt die Translation und somit die Adiponektin Konzentration (Dowell *et al.*, 2003; Qiao & Shao, 2006). Neben der Acetyl-CoA-Synthetase 2, wird auch AceCS1 durch Sirt1 deacetyliert und aktiviert. AceCS1 katalysiert die Synthese von Acetyl-CoA, dem Schlüsselmolekül der mitochondrialen Oxydation und der Fettsynthese. Somit kann Sirt1 den Fettstoffwechsel beeinflussen, indem es durch die AceCS1 Aktivierung die intrazellulären Acetyl-CoA Level reguliert (Hallows *et al.*, 2006). Auch für ein anderes Mitglied der Sirtuin Familie, das Sirt2, konnte gezeigt werden, dass es an der Fettzellendifferenzierung beteiligt ist. Sirt2 ist stark in Fettzellen exprimiert und reguliert dessen Differenzierung durch die Deacetylierung von FOXO1. Die Überexpression von Sirt2 in 3T3L1 Fettvorläuferzellen resultiert in der Inhibierung der Adipogenese wohingegen die Reduktion von Sirt2 zur Verstärkung der Adipogenese führt (Jing *et al.*, 2007; Wang & Tong, 2009). Hier konnte gezeigt werden, dass durch die Deacetylierung durch Sirt2, die Insulin stimulierte Phosphorylierung von FOXO1 inhibiert wird. Dies verstärkt die nukleäre Lokalisation von FOXO1 und begünstigt damit dessen Bindung an den PPAR γ Promoter. Dadurch wird die Translation PPAR γ und in Folge auch die Expression PPAR γ -abhängiger Zielgene geblockt.

Zusammenfassend kann damit belegt werden, dass die Sirtuine in der Lage sind wirkungsvoll in die Pankreas-, Leber- und Fettgewebshomöostase einzugreifen und die mögliche Ausbildung altersbedingter Krankheiten wie Fettleibigkeit, Diabetes und Arteriosklerose zu verhindern.

1.2 Einführung in die vielfältigen Funktionen von Sirtuin 6 (Sirt6)

Neben Sirt1 und Sirt2, ist Sirt6 das wohl mit am besten charakterisierte Mitglied der Sirtuin Familie und rückte in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. In der Maus ist Sirt6 in embryonalen sowie adulten Geweben exprimiert, wobei die höchsten mRNA Level in Gehirn, Herz und Leber detektiert werden konnten. Durch den Austausch des *mSirt6* Locus durch ein LacZ-Reporter-Gen konnte die ubiquitäre Proteinexpression von Sirt6 bestätigt werden. Interessanterweise wurden die höchsten Sirt6 Proteinlevel im Muskel gefunden, wenngleich die mRNA-Level dort im Vergleich zu anderen Geweben relativ gering waren (Liszt *et al.*, 2005). Sirt6 ist im Zellkern, aber nicht in den Nukleoli lokalisiert und eine Anfärbung mit Hoechst legt nahe, dass Sirt6 mit dem Heterochromatin assoziiert ist (Liszt *et al.*, 2005; Michishita *et al.*, 2005). Tatsächlich konnte dann durch Fraktionierungsexperimente gezeigt werden, dass Sirt6 an Chromatin gebunden ist. Lange Zeit war Sirt6 lediglich als ADP-Ribosyltransferase beschrieben (Liszt *et al.*, 2005), erst 2008 konnte durch Michishita und Mitarbeiter auch eine Histon-Deacetylase Aktivität nachgewiesen werden (Michishita *et al.*, 2008). Erste Sirt6 Knock Out Studien in der Maus wurden durch Mostoslavsky durchgeführt (Mostoslavsky *et al.*, 2006). Aus der Knock Out Maus abgeleitete embryonale Stammzellen (ES Zellen) und Mausembryo Fibroblasten (MEF) zeigten einen reduzierten BrdU Einbau und weniger in der S-Phase befindliche Zellen, was auf einen Proliferationsdefekt hinwies. Zudem waren diese Zellen sensitiver gegenüber ionisierender, aber nicht ultravioletter Strahlung. Eine Karyotypisierung zur Analyse des Chromosomensatzes brachte eine Vielzahl an Chromosomen Abnormalitäten zu Tage, was auf Probleme bei der Aufrechterhaltung von DNA-Reparaturmechanismen hindeutete. Sirt6^{-/-} Mäuse wurden entsprechend der Mendelschen Regeln geboren und schienen zunächst normal, wogen aber etwas weniger als ihre Wildtyp Geschwistertiere (Mostoslavsky *et al.*, 2006). Aber schon 2 Wochen nach der Geburt zeigten sich erste gravierende Veränderungen und viele der homozygoten Tiere starben innerhalb der ersten drei bis vier Wochen nach der Geburt. Viele der beobachteten Veränderungen waren Anzeichen für ein vorzeitiges Altern und werden beim Menschen meist mit einem hohen Alter verbunden. Dazu gehören unter anderem der Verlust von subkutanem Fett, das Auftreten einer Kyphose, eine Verringerung der Knochendichte (Osteopenie) und Anzeichen der Kolitis. Zudem wiesen Sirt6 defiziente Mäuse sehr geringe Serum IGF1 Level und beginnend ab dem zwölften Tag nach der Geburt einen stetig sinkenden Blutzuckerspiegel auf, welcher kurz vor dem Tod nicht mehr detektierbar war.

1.2.1 Sirt6 reguliert die genomische Integrität und DNA Reparaturmechanismen

Telomere sind die Schutzkappen der Chromosomen und verhindern End-End-Fusionen, die oft die Ursache für Chromosomenbrüche und das Auftreten von Abnormalitäten sind. Viele Studien zeigen inzwischen, dass Fehlfunktionen der Telomere die Tumorbildung fördern und die Genomintegrität negativ beeinflussen (Gisselsson *et al.*, 2001; Meeker *et al.*, 2004; Meeker *et al.*, 2002). Sirt6 ist im Gegensatz zu den anderen Sirtuinen stark mit dem Chromatin assoziiert (Haigis & Guarente, 2006). In 2008 wurde für Sirt6 erstmals eine NAD⁺ abhängige Histon H3 Lysin 9 (H3K9) Deacetylase Aktivität beschrieben, die Einfluss auf die Chromatinstruktur der Telomere hat (Michishita *et al.*, 2008). Es konnte beobachtet werden, dass Sirt6 spezifisch an das Chromatin der Telomere bindet und dass ein Verlust von Sirt6 zu Telomer-Fehlfunktionen führt und in Chromosom End-Fusionen und zellulärer Seneszenz resultiert. Einige Veränderungen der Telomere zeigen auffällige Ähnlichkeiten zu den Chromosomenveränderungen des Werner-Syndroms (WRN) (Michishita *et al.*, 2008; Multani & Chang, 2007). Das *WRN* Gen kodiert für eine DNA-Helikase die an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt ist. Experimente konnten zeigen, dass Sirt6 spezifisch H3K9 deacetyliert und damit die enge Bindung von WRN an die DNA verhindert. Vermutlich wird durch die Deacetylierung die Kondensation des Chromatins verstärkt und somit eine Bindung von WRN sterisch behindert. In 2009 konnte ebenfalls durch Michishita und Mitarbeiter gezeigt werden, dass Sirt6 auch H3K56 während der S-Phase des Zellzyklus deacetyliert (Michishita *et al.*, 2009).

DNA-Reparaturmechanismen spielen bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität eine wichtige Rolle. So ist die DNA ständigen Gefahren ausgesetzt, die zu teils schwerwiegenden Schäden führen können, wie zum Beispiel Basenfehlpaarungen während der Replikation, DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen oder Oxydation und Alkylierung von Basen. Durch geeignete Reparaturmechanismen können diese Veränderungen aber beseitigt und die Integrität der DNA wieder hergestellt werden. Sirt6 defiziente MEF Zellen und ES Zellen zeigten sich aber deutlich anfälliger gegenüber DNA schädigenden Substanzen (Mostoslavsky *et al.*, 2006). So konnte gezeigt werden, dass Sirt6 die DNA-Integrität durch Regulation der Basenexzisionsreparatur (BER) aber nicht der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) beeinflusst. Bis jetzt konnte aber der Mechanismus, wie Sirt6 die BER kontrolliert, nicht aufgeklärt werden. Es wird spekuliert, dass Sirt6 entweder wichtige an der BER beteiligte Faktoren moduliert oder aber den Zugang zu solchen DNA-Schäden durch Kondensation des Chromatins (durch Deacetylierung) verhindert. Hier müssen weitere Untersuchungen folgen, um aufzuklären, wie Sirt6 in die BER involviert ist. Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass Sirt6 die DNA-abhängige Protein Kinase (DNA-PK) am Chromatin stabilisiert und somit die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) mit reguliert (McCord *et al.*, 2009). Sirt6 bildet mit der DNA-PK einen Komplex und

vermittelt somit die Reparatur von DNA-DSB. Wenn ein DNA-DSB auftritt, sorgt Sirt6 für eine dynamische Deacetylierung von H3K9 des Chromatins. Vielmehr ist Sirt6 auch für die effiziente Translokation der katalytischen Einheit der DNA-PK an den Ort des DNA-DSB notwendig (McCord *et al.*, 2009). Erst vor kurzem verwiesen Mao und Mitarbeiter auf eine weitere Funktion von Sirt6 in der Reparatur von DNA-DSB unter Stressbedingungen (Mao *et al.*, 2011). Zellen rekrutieren Sirt6 an den Ort des DNA-DSB während oxydativen Stress und reparieren den DNA-DSB entweder durch nicht-homologe Endverknüpfung (engl. für nonhomologous end joining, NHEJ) oder durch homologe Rekombination. Unter Stress assoziiert Sirt6 mit der Poly [ADP-ribose] Polymerase 1 (PARP1) und mono-ADP-ribosyliert diese an Lysin 251. Dies aktiviert die Poly-ADP-Ribosylase Aktivität von PARP1 und induziert die Reparatur des DSB. Ein Molekül, das eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-DSB durch die homologe Rekombination spielt, ist CtIP [C-terminal binding protein (CtBP) interacting protein]. Der Prozess der homologen Rekombination wird durch die Initialisierung der DSB-End-Resektion eingeleitet. Die DSB-End-Resektion führt zur Ausbildung einzelsträngiger DNA-Überhänge, an der CtIP beteiligt und erforderlich ist. Kaidi und Mitarbeiter konnten demonstrieren, dass Sirt6 mit CtIP interagiert und auch deacetyliert und somit die DSB-End-Resektion fördert (Kaidi *et al.*, 2010). Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass Sirt6 eine entscheidende Rolle innerhalb der Regulierung und Reparatur von DNA-Schäden einnimmt.

1.2.2 Sirt6 im Alterungsprozess

Die Tatsache, dass die durch Mostoslavsky generierten Sirt6 Knock Out Mäuse vorzeitige Altersmerkmale aufwiesen, entfachte abermals die Idee, dass Sirtuine den Alterungsprozess regulieren. Bislang fehlen aber eindeutige und direkte Beweise für eine solche Annahme. Ein Molekül, das unter Verdacht steht den Alterungsprozess zu beschleunigen ist NF-kappa B. Eine stetige Stimulierung des NF-kappa B Signalweges in Mäusen führt möglicherweise zur Anhäufung altersbedingter Erscheinungen (Adler *et al.*, 2007). NF-kappa B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die meiste Zeit, gebunden an IκB, als Heterodimer im Zytoplasma vorliegt. Wenn die Zelle Stress erfährt, wird IκB ubiquitinyliert und degradiert. Dadurch wird NF-kappa B aus dem Komplex entlassen und translokiert in den Nukleus. Dort angekommen induziert NF-kappa B die Transkription von Genen, die an der unmittelbaren Stressantwort beteiligt sind (Hoffmann & Baltimore, 2006). Den Zusammenhang zwischen Sirt6 und NF-kappa B lieferten 2009 Kawahara und Mitarbeiter (Kawahara *et al.*, 2009). Sie zeigten, dass Sirt6 an die NF-kappa B Untereinheit RELA bindet und H3K9 an den Promotoren von NF-kappa B Zielgenen deacetyliert. Dies führt zur Inhibition NF-kappa B abhängiger Gene und der Runterregulierung des NF-kappa B Signalweges. Diese Entdeckung dokumentiert die Verbindung zwischen Sirt6 und der NF-kappa B Signalkaskade und liefert erste Ansätze wie

Sirt6 den Alterungsprozess auf molekularer Ebene reguliert. Erst kürzlich folgte eine zweite Studie, die andeutet, dass Sirt6 durch Regulierung von NF-kappa B in den Prozess der Hautalterung eingreift. Der Prozess der Hautalterung ist durch den stetigen Verlust an kollagenen Strukturen und einem Verlust an extrazellulärer Matrix gekennzeichnet. Durch Hautbiopsien konnte belegt werden, dass die Menge an Kollagen ab dem 50zigsten Lebensjahr stetig abnimmt und ab dem 80zigsten nur noch geringe Mengen auffindbar sind (El-Domyati *et al.*, 2002; Robert *et al.*, 2009). Sirt6 Knock Down Experimente an humanen Hautfibroblasten (HDF) zeigten, dass es durch den Wegfall von Sirt6 zu einer Hyperaktivierung des NF-kappa B Signalweges kommt und infolgedessen zu einer gestörten Ausbildung der Kollagen-Struktur (Baohua & Li, 2012). Es wird vermutet, dass hyperaktives NF-kappa B gleichzeitig die Kollagen-Synthese aber auch die Degradation beeinflusst und somit zu einer verminderten Ausbildung der Kollagen-Fasern beiträgt.

1.2.3 Regulierung metabolischer Prozesse durch Sirt6

Die erste Sirt6 Knock Out Studie hat es schon angedeutet, Sirt6 scheint nicht nur eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA Schäden und bei der Regulierung des Alterungsprozesses zu spielen, sondern steuert zudem noch einige Stoffwechselprozesse. So zeigten Sirt6 defiziente Mäuse einen stetig sinkenden Blutglukosespiegel, beginnend ab dem zwölften Tag nach der Geburt und ein Querschnitt durch die Haut offenbarte den kompletten Verlust an Unterhautfettgewebe (Mostoslavsky *et al.*, 2006).

1.2.3.1 Sirt6 und Fettmetabolismus

Viel ist noch nicht bekannt darüber, wie Sirt6 den Fettstoffwechsel reguliert. Kanfi und Mitarbeiter generierten aufgrund von Beobachtungen, die sie an Ratten gemacht hatten, eine Maus die Sirt6 in allen Geweben überexprimiert (MOSES Maus). Die Ratten zeigten bei Haltung unter einer kalorischen Restriktion einen Anstieg der Sirt6 Level (Kanfi *et al.*, 2008). Interessanterweise wies die Sirt6 überexprimierende Maus einen ähnlichen Anstieg der Sirt6 Level auf, wie es die Ratten unter kalorischer Restriktion taten. Dies führte zur Annahme, dass die MOSES Mäuse möglicherweise besser vor den Auswirkungen einer Hochfettdiät geschützt sind als Wildtyp Mäuse und daher nicht zur Ausbildung einer Fettleibigkeit kommt. Erste Untersuchungen zeigten, dass es keine Unterschiede zwischen MOSES und Wildtyp Mäusen gab, wenn diese unter einer normalen Standarddiät gehalten wurden (Kanfi *et al.*, 2010). Jedoch konnten durch Fütterung einer Hochfettdiät erste Unterschiede festgestellt werden. So war der Gesamtkörperfettanteil in MOSES Mäusen deutlich geringer als in Wildtyp Mäusen und auch die Menge an viszeralem Fett war in MOSES Tieren um ca. 25% geringer als bei den Wildtyp-Tieren. Weitere Anzeichen einer Fettleibigkeit sind außerdem erhöhte Triglyzerid- und Cholesterinlevel, sowie die vermehrte Verfügbarkeit an frei

zirkulierenden Fettsäuren. Die Menge an Triglyzeriden war um 33% geringer in MOSES Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen und wies ähnliche Level auf, wie bei Tieren denen die Standarddiät gefüttert wurde. Der Level an freien Fettsäuren war um 25% geringer und die an LDL-Cholesterin um ca. 30% weniger im Vergleich zu den Wildtyp Tieren. Bei der Analyse des Transkriptionsprofils des viszeralen Fettgewebes stellten Kanfi und Mitarbeiter fest, dass der am stärksten beeinflusste Signalweg der von PPAR γ war. Die von PPAR γ regulierten Gene sind unter anderem in den Fettmetabolismus, den Fetttransport und die Adipogenese involviert (Kanfi *et al.*, 2010). In den MOSES Mäusen konnte mindestens eine zweifache Reduktion der Expression bei einer Gruppe von PPAR γ regulierten Genen beobachtet werden, obwohl die Expression von PPAR γ selbst nicht verändert war. So war beispielsweise der Level an DGAT1, einem Schlüsselenzym der Triglyzeridsynthese, um 50% in MOSES Tieren reduziert. In weiterführenden Experimenten zeigte sich, dass Sirt6 an den Promoter von DGAT1 bindet und dass diese Bindung 3,5x höher war als in Wildtyp Tieren. Es stellte sich auch heraus, dass die Bindung von Sirt6 an den DGAT1 Promoter nicht die Anwesenheit von PPAR γ erforderte (Kanfi *et al.*, 2010). Auf der anderen Seite war die Transkription von ANGPTL4 (engl. angiopoietin-like protein 4) und A-FABP (engl. adipocyte fatty acid-binding protein) in MOSES Mäusen signifikant reduziert. ANGPTL4 ist ein Negativregulator der Lipoproteinlipase, die die Hydrolyse von Triglyzeriden in freie Fettsäuren katalysiert und somit für die Beseitigung der Fettsäuren aus der Zirkulation sorgt (Yoshida *et al.*, 2002). Die verminderte ANGPTL4 Expression könnte somit die geringeren Triglyzeridlevel in MOSES Mäusen erklären. Eine andere Studie durch Kim und Mitarbeiter demonstrierte Effekte, die durch den leberspezifischen Knock Out von Sirt6 ausgelöst wurden. Der Wegfall von Sirt6 resultiert hier in einer verstärkten Triglyzeridsynthese, einer reduzierten Fettsäureoxydation und der Ausbildung einer Fettleber, auch bei Fütterung einer Standarddiät (Kim *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen zeichnen Sirt6 als mögliches Ziel therapeutischer Behandlungen aus und könnten helfen die Ausbildung einer Fettleber oder Fettleibigkeit zu verhindern.

1.2.3.2 Sirt6 und Glukosehomöostase

Eine weitere Funktion von Sirt6, die man aus den Beobachtungen der Sirt6 Knock Out Mäuse ableiten kann, ist die Regulation der Glukosehomöostase. Die Hauptregulation der Glukosehomöostase in Säugetieren erfolgt durch den Insulinsignalweg. Eine fehlerhafte Regulation resultiert meist in der Ausbildung altersbedingter Krankheiten wie Diabetes und Fettleibigkeit. Sirt6 defiziente Mäuse zeigen schon früh nach der Geburt erste Anzeichen in Form eines sehr geringen Insulinspiegels und einen stetig sinkenden Blutglukosespiegel und sterben innerhalb der ersten 3-4 Wochen (Mostoslavsky *et al.*, 2006). Xiao und Mitarbeiter machten ähnliche Beobachtungen bei ihren Sirt6 Knock Out Mäusen. Sie stellten fest, das

60% der Sirt6 Knock Out Tiere sehr geringe Blutzuckerspiegel aufwiesen und zeitnah nach dem Absetzen von der Mutter starben (Xiao *et al.*, 2010). Die restlichen 40% der Knock Out Tiere die einen etwas höheren Blutzuckerspiegel hatten, überlebten, aber starben innerhalb eines Jahres. Allerdings benutzten sie Mäuse mit einem anderen genetischen Hintergrund als die Gruppe um Mostoslavsky, was den Unterschied bei der Überlebensrate erklären könnte. Sie konnten auch zeigen, dass der letale Phänotyp abhängig von der Verfügbarkeit von Glukose ist, und das der Großteil der Sirt6 defizienten Jungtiere nach dem Absetzen durch die Gabe von glukosehaltigem Wasser gerettet werden konnte. Als Hauptursache für die Hypoglykämie in den Sirt6 $-/-$ Tieren konnte eine verstärkte Glukoseaufnahme in allen untersuchten Geweben verantwortlich gemacht werden. Insulin ist der Hauptfaktor, der den Glukosespiegel im Blut reguliert. Erstaunlicherweise wiesen die Knock Out Tiere aber erheblich geringere Insulinspiegel als die Wildtyp Kontrolltiere auf, was auf eine deutlich erhöhte Insulinsensitivität schließen ließ und durch Glukoseaufnahmetests bestätigt werden konnte. Der Mechanismus hinter der erhöhten Insulinsensitivität war hier in einer erhöhten AKT Phosphorylierung zu finden. AKT liegt stromabwärts in der Insulinsignalkaskade und wird durch Phosphorylierung aktiviert. Sirt6 ist ein Negativregulator der AKT Phosphorylierung und folgerichtig weisen Sirt6 defiziente Mäuse eine erhöhte AKT Aktivierung auf, was die Glukoseaufnahme steigert (Xiao *et al.*, 2010). Eine wichtige Rolle bei der Glukoseaufnahme spielen auch die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4, die den Transport der Glukose durch die Membran hindurch gewährleisten. Hier konnte gezeigt werden, dass Sirt6 Knock Out Tiere eine erhöhte Membranständigkeit von GLUT4 aufwiesen, dessen Proteinlevel aber unverändert im Vergleich zu den Wildtyp Tieren war. Für GLUT1 hingegen konnten erhöhte mRNA- und Proteinlevel nachgewiesen werden (Xiao *et al.*, 2010). Diese Befunde könnten ebenfalls die erhöhte Glukoseaufnahme in den Knock Out Tieren erklären.

Eine weiterer Mechanismus, wie Sirt6 die Glukosehomöostase beeinflusst, konnte durch Zhong und Mitarbeiter aufgeklärt werden (Zhong *et al.*, 2010). Unter aeroben Bedingungen durchläuft Glukose die Glykolyse, den Zitronensäurezyklus und endet durch die oxydative Phosphorylierung in der Atmungskette in der Bereitstellung von Energie in Form von ATP (Prozess der Zellatmung). Unter anaeroben Bedingungen aber wird der Fluss durch den Zitronensäurezyklus blockiert und das Pyruvat der Glykolyse in Laktat umgewandelt. Zudem wird die Glykolyse gefördert. Die Energieausbeute der Glykolyse ist zwar sehr gering im Vergleich zur Zellatmung, gewährleistet aber unter anaeroben Bedingungen die Bereitstellung von Energie bis der Stress vorüber ist. Ein entscheidender Faktor, der an der Umschaltung beteiligt ist, ist Hif1 α (engl. hypoxia inducible factor 1 α) (Lum *et al.*, 2007). Einerseits verstärkt Hif1 α die Expression glykolytischer Gene wie die des GLUT1

Transporters, der Laktat-Dehydrogenase (LDH), der Phosphoglyzeratkinase (PGK-1) und der Phosphofruktokinase-1 (PFK-1) (Hu *et al.*, 2006). Andererseits inhibiert Hif1 α die mitochondriale Atmungskette durch eine Erhöhung der Translation der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK), die wiederum die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) phosphoryliert und inaktiviert (Papandreou *et al.*, 2006). Die PDH ist das Schlüsselenzym, das die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert und somit den Zitronensäurezyklus speist. Zhong und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Sirt6 unter normalen Bedingungen als Korepressor von Hif1 α fungiert und die Expression Hif1 α -abhängiger Gene inhibiert. Dies wiederum spricht auch für erhöhte Glukoseaufnahme welche in Sirt6 defizienten Mäusen beobachtet werden konnte. Um zu testen, ob die beobachtete Hypoglykämie in den Sirt6 Knock Out Tieren auch abhängig von Hif1 α ist, wurden die Mäuse mit einem Hif1 α Inhibitor behandelt. Durch die Behandlung kam es zu einem schnellen und spezifischen Anstieg der Blutglukose, besonders in den Sirt6 -/- Mäusen, was die Abhängigkeit von der Anwesenheit von Hif1 α aufzeigte (Zhong *et al.*, 2010). Zusammenfassend zeigen diese Beobachtungen, dass Sirt6 eine dominante Rolle bei der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase spielt und dass eine chronische Aktivierung der Glykolyse, wie sie in den Sirt6 Knock Out Mäusen zu finden ist, eher nachteilig ist.

1.3 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit diene der *in vivo* und *in vitro* Charakterisierung von Sirt6, einem Mitglied der Sirtuin Familie mit Deacetylase- und/oder mono-ADP-Ribosyltransferase Funktion. Durch die Generierung von genetisch veränderten Mäusen, in denen wichtige Bereiche des Sirt6 Transkripts konditionell deletiert werden können, sollte die Untersuchung der biologischen Funktion von Sirt6 im lebenden, adulten Organismus erfolgen. Im zweiten Teil der Arbeit sollten mit Hilfe eines SILAC basierten Screenings neue potentielle Interaktionspartner von Sirt6 identifiziert werden, die wichtige Ansätze über mögliche Funktionen von Sirt6 liefern sollten. Durch Co-Immunopräzipitation sollten einige Bindungspartner bestätigt und durch *in vitro* Analysen der Einfluss von Sirt6 auf diese Kandidaten untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern im Text nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (NEB) (Schwalbach) und Promega (Mannheim) bezogen.

2.1.1.1 Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (engl. bovine serum albumin)	Invitrogen, Karlsruhe
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Größenstandards	
puc18 Sau3AI	puc18 mit Sau3AI verdaut
λ EcoRI/HindIII	λ -DNA mit EcoRI/HindIII verdaut
DON (6-Diazo-5-oxo-L-norleucin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Filterpapier 0858	Schleicher & Schuell, Dassel
Fruktose-6-Phosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kulturschalen	Nunc, Langenselbold; Greiner, Frickenhausen
LDS-Sample-Puffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
MES-Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
MG132	Sigma-Aldrich, Steinheim
MOPS-Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
Mowiol	Fluka, Buchs
PFA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Fluka, Buchs
Proteinmembran	Whatman Inc., New Jersey, USA
Protran Nitrozellulose Membran BA85	
Proteinstandard (Novex® Sharp Protein Standard)	Invitrogen, Karlsruhe
SDS-Gele (NuPAGE® Novex®)	Invitrogen, Karlsruhe
Sterilfilter NML (0,20 und 0,45 μ m)	Sartorius, Göttingen
Super Frost Ultra Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Super Signal West™ Femto	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
SYBR® Green I Fluoreszein Mix (2x konz.)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

TRIZOL Reagenz®	Invitrogen, Karlsruhe
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
3MM Chromatography Paper	Whatman Inc., New Jersey, USA

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	
1x TBST	20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20
1x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 1,4 mM KH ₂ PO ₄
2x HBS	50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, pH 7,05
5x SDS-Ladepuffer	66 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% SDS, 27% (v/v) Glycerin
5x SDS-Probenpuffer	66 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% SDS
4%PFA/PBS	40 mg/ml Paraformaldehyd (PFA) in PBS, pH 7,4
Ehrlich's Reagenz	2% Dimethylaminobenzaldehyd in 20% Salzsäure
ES-Zell Lysis-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl, 80 µg/ml Proteinase K (frisch zugeben)
Lysis-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 200 µg/ml Proteinase K (frisch zugeben)
Mowiol	2,4 g Mowiol, 6 g Glycerin, 6 ml MilliQ-H ₂ O, 12 ml Tris-HCl (pH 8,5)
Proteinase/Phosphatase-Inhibitoren Mix	4 µg/ml Aprotinin, 500 µg/ml Benzamidin, 4 µg/ml Leupeptin, 1mM Na ₃ VO ₄ , 20 mM NaF, 2 mM PMSF
RIPA	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1% NP-40, 0,25% Na-deoxycholat, 150 mM NaCl
Transferpuffer	12,5 mM Bicine, 12,5 mM Bis-Tris, 0,8 mM EDTA, 20% Methanol

2.1.3 Enzyme

Tabelle 3: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Klenow-Fragment	Promega, Mannheim
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega, Mannheim
<i>PfuTurbo</i> DNA-Polymerase	Stratagene (Agilent Technologies), Waldbronn
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs; Jena Biosciences
RNase A	Boehringer, Ingelheim
RQ1 DNase	Promega, Mannheim
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5 Prime, Hamburg
Trypsin (Peptid Verdau LC-MS/MS)	Promega, Mannheim
Trypsin/EDTA Lösung	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.4 Verwendete Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Colloidal Blue Staining Kit	Invitrogen, Karlsruhe
DC™ Protein Kit	BioRad, München
Nucleobond AX 500 Maxi Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Geräte

Tabelle 5: Erwähnenswerte Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Mikroskope	Axiophot 2	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
	Konfokales Mikroskop (TCS SP2)	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Bensheim
	Z1 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
PCR Maschinen	Thermocycler	SensoQuest, Göttingen
	iCycler iQ Multicolor Real Time PCR Maschine	BioRad, München
Spektralphotometer	NanoDrop 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS HD 2070/2200	Bandelin, Berlin
VersaDoc™ Image System	VersaDoc™ 3000	BioRad, München

2.1.6 Nährmedien für die Zellkultur

Medien und Reagenzien zur Kultivierung tierischer Zellen wurden, sofern nicht anders im Text erwähnt, von PAA (Cölbe) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Tabelle 6: Medien für die Zellkultur

Medium	Zusammensetzung
EinfriermEDIUM	10% DMSO, 90% fötales Kälberserum (FCS)
Proliferationsmedium	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l Glukose, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 20 mM Glutamin

2.1.7 Verwendete Primärantikörper

Tabelle 7: Liste der verwendeten Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
β-O-linked-N-Acetylglucosamine CTD110.6	Maus	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
(CGY)FP Tag	Kaninchen	1:10000 (WB)	BioCat (Evrogen), Heidelberg
c-jun	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling, (NEB), Schwalbach

FLAG M2	Maus	1:2000 (WB) 1:1000 (IF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FLAG M5	Maus	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
hGFAT1	Kaninchen	1:1000 (WB)	Epitomics Inc., Burlingame, USA
G3BP1	Kaninchen Maus	1:500 (IF) 1:500 (IF)	Santa Cruz, Heidelberg
pan-actin	Kaninchen	1:2000 (WB)	Cell Signaling, (NEB), Schwalbach
Sirt6	Kaninchen	1:1000 (WB)	Novus Biologicals, Cambridge, UK
RalA	Maus	1:5000 (WB)	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.8 Verwendete Sekundärantikörper

Tabelle 8: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Name	Spezies	Konjugation	Verdünnung	Bezugsquelle
Alexa Fluor® 594	Ziege	Alexa Fluor 594	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor® 488	Ziege	Alexa Fluor 488	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
HRP	Ziege	Meerrettichperoxidase (HRP)	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

2.1.9 Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 9: Liste verwendeter Bakterienstämme

Name	Beschreibung
<i>XL1-Blue</i>	<i>Stratagene; recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>
<i>EL350</i>	<i>DY380 [(cro-bioA) <> araC-PBADcre]</i>
<i>BL21 (DE3)</i>	<i>F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm (DE3)</i>
<i>BL21 (DE3) pLysS</i>	<i>F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm (DE3) pLysS (CamR)</i>
<i>BL21 CodonPlus-RIL</i>	<i>F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tet^r gal λendA Hte [argU ileY leuW Cam^r]</i>

2.1.10 Verwendete Zelllinien

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien

Name und ATCC-Nr.	Beschreibung
HEK 293T ATCC CRL-11268 TM	humane, embryonale Nierenepithelzelllinie (engl. human embryonic kidney)
U2OS ATCC HTB-96 TM	humane Osteosarcoma-Zelllinie

2.1.11 Southern Probe für Genotypisierung

Tabelle 11: Verwendete Probe für die Southern Blot Genotypisierung

Name	verwendete Oligonukleotide	Erläuterung
3' Sonde	Sirt6 Probe Anfang1 for Sirt6 Probe Anfang1 rev	797 bp PCR-Fragment in pGEM-T-Easy Vektor kloniert und mit NotI/EcoRV herausgeschnitten; resultierendes 280 bp Fragment bei 63°C für Hybridisierung genutzt

2.1.12 Verwendete Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei Invitrogen oder Sigma-Aldrich bestellt.

2.1.12.1 Oligonukleotide für die Konstruktion des "Targeting"-Vektors

Tabelle 12: Liste der für die Konstruktion des "Targeting"-Vektors verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Anlagerungs temp. in °C
6RP_5_SmaI/PmeI	-TCC CCC GGG GTT TAA ACC CAG ACA CCC CGC CGC A-	60
6RP_5_HindIII	-CCC AAG CTT GCC TGG ATC ACA CGC TGG-	
6RP_3_BglII	-GAA GAT CTA TCC ATG TGT CAC AGG CTG C-	62
6RP_3_EcoRI	-GGA ATT CTG TGA TCC TGA TCC CAC TGC-	
6MT_5_XhoI	-CCG CTC GAG CAG CAG GGT TGT CCC CAT C-	62
6MT_5_EcoRV	-CGA TAT CGT AGA CAG ACC TCT TGA GTC T-	
6MT_3_BamHI/NheI/XhoI	-CGC TCG AGG CTA GCG GAT CCC TTC TGA ATG CTG GAA TTC AAT-	60
6MT_3_SacI	-TCC GAG CTC CTG AGA TTC AGT CTT GGT GTC-	
SacII LoxP-Oligo for	-GGA TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA CGA AGT TAT CCG C-	
SacII LoxP-Oligo rev	-CGC CTA TTG AAG CAT ATT ACA TAC GAT ATG CTT CAA TAG G-	

2.1.12.2 Oligonukleotide für Überexpressionskonstrukte

Tabelle 13: Liste der Oligonukleotide für die Generierung der Überexpressionskonstrukte

Name	Sequenz (5'→3')	Anlagerungs temp. in °C
hFMR1 AfIII for	-TCC TTA AGG CCA CCA TGG AGG AGC TGG TGG-	59
hFMR1 Sall rev	-GAG TCG ACG GGT ACT CCA TTC ACG AGT GG-	
hG3BP1 BamHI for	-TCG GAT CCG CCA CCA TGG TGA TGG AGA AGC-	59
hG3BP1 Sall rev	-GAG TCG ACC TGC CGT GGC GCA AGC CC-	
hGFAT1 BamHI for	-TCG GAT CCG CCA CCA TGT GTG GTA TAT TTG-	57
hGFAT1 XhoI rev	-GAC TCG AGC TCT ACA GTC ACA GAT TTG GCA-	
mSirt6 pGEX EcoRI for	-TCG AAT TCA TGT CGG TGA ATT ATG CAG CAG-	60
mSirt6 XhoI rev2	-GAC TCG AGG GCA GCC TCG GTC TTC ACT C-	
mSirt6 HindIII for	-TCA AGC TTG CCA CCA TGT CGG TGA ATT ATG	60

mSirt6 YFP rev (EcoRI)	CAG CAG- -GAG AAT TCG GGC AGC CTC GGT CTT CAC TC-	
mSirt7 BglIII for	-CTA GAT CTC ATG GCA GCC GGT GGC GGT CT-	56
mSirt7 EcoRI rev	-TAG AAT TCT TGC CAC TTT CTT CCT TTT TGC-	

2.1.12.3 Oligonukleotide für Mutagenese

Die Oligonukleotide wurde mit Hilfe des "QuikChange-Primer-Design" Programms von Stratagene generiert und dann bei Sigma-Aldrich bestellt.

Tabelle 14: Liste der Oligonukleotide für die Mutagenese von GFAT1

Name	Sequenz (5'→3')
GFAT1 K25A for	-ATC CTG GAG ACC CTA ATC GCA GGC CTT CAG AGA CTG G-
GFAT1 K25A rev	-CCA GTC TCT GAA GGC CTG CGA TTA GGG TCT CC AGG AT-
GFAT1 K48A for	-GGG ATT TGA TGG AGG CAA TGA TGC AGA TTG GGA AGC CAA TGC-
GFAT1 K48A rev	-GCA TTG GCT TCC CAA TCT GCA TCA TTG CCT CCA TCA AAT CCC-
GFAT1 K56A for	-GAT TGG GAA GCC AAT GCC TGC GCA ATC CAG CTT ATT AAG AAG AA-
GFAT1 K56A rev	-TTC TTC TTA ATA AGC TGG ATT GCG CAG GCA TTG GCT TCC CAA TC-
GFAT1 K67A for	-AAA ATC CAG CTT ATT AAG AAG AAA GGA AAA GTT GCG GCA CTG GAT GAA GAA G-
GFAT1 K67A rev	-CTT CTT CAT CCA GTG CCG CAA CTT TTC CTT TCT TCT TAA TAA GCT GGA TTT T-
GFAT1 K75A for	-GCA CTG GAT GAA GAA GTT CAC GCG CAA CAA GAT ATG GAT TTG GA-
GFAT1 K75A rev	-TCC AAA TCC ATA TCT TGT TGC GCG TGA ACT TCT TCA TCC AGT GC-
GFAT1 K114A for	-TAG CCA CCC CCA GCG CTC TGA TGC AAA TAA TGA ATT TAT CGT TAT TC-
GFAT1 K114A rev	-GAA TAA CGA TAA ATT CAT TAT TTG CAT CAG AGC GCT GGG GGT GGC TA-
GFAT1 K578A for	-GTC TTG AAG GGG CAC TGA AAA TCG CAG AAA TTA CTT ATA TGC ACT CTG-
GFAT1 K578A rev	-CAG AGT GCA TAT AAG TAA TTT CTG CGA TTT TCA GTG CCC CTT CAA GAC-

2.1.12.4 Oligonukleotide für Genotypisierungen

Tabelle 15: Liste der Oligonukleotide für die Genotypisierung durch PCR

Name	Sequenz (5'→3')	Anlagerungs temp. in °C
SacII LoxP forA (P1)	-AAC TGA CTG TTG CGG CAG AG-	59
SacII LoxP revA (P2)	-CCT GTC CCA TTC TGA GGA AC-	
P3 Neo for2 (P3)	-GCA TTC TAG GTG GGG CTC C-	59
P4 Neo rev2 (P4)	-ACG ACA ACC AGG CTG GGT G-	

SacII LoxP forA (P1)	-AAC TGA CTG TTG CGG CAG AG-	59
P4 Neo rev1 (P5)	-GCT GGG ATT AAA GGC ATG CG-	
Flp for	-CTG GAG GAT AAC TTG TTT ATT GC-	54
Flp rev	-CTA ATG TTG TGG GAA ATT GGA GC-	
Cre for	-AGG CTA AGT GCC TTC TCT ACA C-	55
Cre rev	-GAC CAG GTT CGT TCA CTC ATG G-	

2.1.12.5 Oligonukleotide für Southern Probe

Tabelle 16: Verwendete Oligonukleotide für die Generierung der Southern Probe

Name	Sequenz (5'→3')	Anlagerungstemp. in °C
Sirt6 Probe Anfang1 for	-ACT CAA TTG CTC GGG TCT CTA TGT-	57
Sirt6 Probe Anfang1 rev	-TTC CCC TTG TCA CTG CTC TCC TGT-	

2.1.12.6 Oligonukleotide für semi-quantitative RT-PCR und quantitative PCR (Q-PCR)

Tabelle 17: Liste der Oligonukleotide für die semi-quantitative RT-PCR

Name	Sequenz (5'→3')	Anlagerungstemp. in °C
mBECN1 for	-ATG GAG GGG TCT AAG GCG TC-	60
mBECN1 rev	-TCC TCT CCT GAG TTA GCC TCT-	
mCHOP for	-CTG GAA GCC TGG TAT GAG GAT-	60
mCHOP rev	-CAG GGT CAA GAG TAG TGA AGG T-	
mGAPDH for	-GTG GCA AAG TGG AGA TTG TTG CC-	58
mGAPDH rev	-GAT GAT GAC CCG TTT GGC CC-	
mGRP78 for	-CTG AGG CGT ATT TGG GAA AGA A-	60
mGRP78 rev	-TGA CAT TCA GTC CAG CAA TAG TG-	
mLC3B for	-TTA TAG AGC GAT ACA AGG GGG AG-	60
mLC3B rev	-CGC CGT CTG ATT ATC TTG ATG AG-	
mSirt6 HindIII for	-TCA AGC TTG CCA CCA TGT CGG TGA ATT ATG CAG CAG-	60
mSirt6 XhoI rev2	-GAC TCG AGG GCA GCC TCG GTC TTC ACT C-	
m36B4 for	-AAG CGC GTC CTG GCA TTG TCT-	60
m36B4 rev	-CCG CAG GGG CAG CAG TGG T-	

2.1.12.7 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Tabelle 18: Liste der Oligonukleotide für die Klonierungskontrollen

Name	Sequenz (5'→3')
BGH rev	-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-
CMV for	-CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG-
M13 for	-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-
M13 rev	-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-

SacII LoxP forA	-AAC TGA CTG TTG CGG CAG AG-
SacII LoxP revA	-CCT GTC CCA TTC TGA GGA AC-
SP6	-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA-
T7	-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-
YFP seq for	-CAG AGC TGG TTT AGT GAA CC-

2.1.13 Verwendete Vektoren

Tabelle 19. Liste verwendeter Vektoren

Name	Beschreibung und Bezugsquelle
mSir2 α -pUSEamp	mSirt1 in pUSE Vektor kloniert, Upstate Biotechnology, USA
pcDNA 5-TO-FLAG M2	2fache FLAG Sequenz in die XhoI/XbaI Schnittstelle des pcDNA 5-TO Vektors kloniert, freundliche Gabe von Marten Szibor (MPI Bad Nauheim)
pGEM-T-Easy	Promega, Mannheim
pGEX-6P-1	freundliche Gabe von Dr. Stefan Hüttelmaier (Halle/Saale)
pKOII-DTA	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Nabeel Bardeesy, Boston
PL451	freundliche Gabe von Stefan Günther (MPI Bad Nauheim)
pTAG CFP-C	BioCat (Evrogen), Heidelberg
pTAG YFP-N	BioCat (Evrogen), Heidelberg
puc18	(GenBank-Nr.: L09136; Fermentas)

2.1.14 Verwendete Überexpressionskonstrukte

Tabelle 20: Liste verwendeter Überexpressionskonstrukte

Name	verwendete Oligonukleotide	Beschreibung und Bezugsquelle
EGFP-hMOF	-	freundliche Gabe von Yonggang Zhou (MPI Bad Nauheim)
FLAG M5-hIGF2BP2 in pcDNA3.1+	-	freundliche Gabe von Dr. Stefan Hüttelmaier (Halle/Saale)
FLAG M5-hIGF2BP3 in pcDNA3.1+	-	freundliche Gabe von Dr. Stefan Hüttelmaier (Halle/Saale)
FLAG M5-hPCAF	-	freundliche Gabe von Yonggang Zhou (MPI Bad Nauheim)
hCBP-HA	-	freundliche Gabe von Yonggang Zhou (MPI Bad Nauheim)
hFMR1 in pcDNA 5-TO-FLAG M2	hFMR1 AfIII for hFMR1 Sall rev	hFMR1 AfIII/Sall Fragment in die AfIII/XhoI Schnittstelle des pcDNA 5-TO-FLAG M2 Vektors kloniert
hG3BP1 in pcDNA 5-TO-FLAG M2	hG3BP1 BamHI for hG3BP1 Sall rev	hG3BP1 BamHI/Sall Fragment in die BamHI/XhoI Schnittstelle des pcDNA 5-TO-FLAG M2 Vektors kloniert
hGFAT1 in pcDNA 5-TO-FLAG M2	hGFAT1 BamHI for hGFAT1 XhoI rev	hGFAT1 in die BamHI/XhoI Schnittstelle des pcDNA 5-TO-FLAG M2 Vektors kloniert
hGFAT1 in pGEX-6P-1	-	hGFAT1 BamHI/XhoI Fragment aus hGFAT1 in pcDNA 5-TO-FLAG M2 in

		die BamHI/XhoI Schnittstelle des pGEX-6P-1 Vektors kloniert
hPABP1 in pTracerCMV	-	FLAG M5-hPABP1 Fragment in die KpnI/XbaI Schnittstelle des pTracerCMV Vektors kloniert, freundliche Gabe von Jian Fang (MPI Bad Nauheim)
mSirt1 in pTAG CFP-C		Dral Fragment aus mSir2 α -pUSEamp-Konstrukt (siehe Tabelle 19) in die SmaI Schnittstelle von pTAG CFP-C kloniert
mSirt6 in pGEX-6P-1	mSirt6 pGEX EcoRI for mSirt6 XhoI rev2	mSirt6 in die EcoRI/XhoI Schnittstelle des pGEX-6P-1 Vektors kloniert
mSirt6 in pTAG YFP-N	mSirt6 HindIII for mSirt6 YFP rev (EcoRI)	mSirt6 in die HindIII/EcoRI Schnittstelle des pTAG YFP-N Vektors kloniert
mSirt7 in pTAG YFP-N	mSirt7 BglII for mSirt7 EcoRI rev	mSirt7 in die BglII/EcoRI Schnittstelle des pTAG YFP-N Vektors kloniert

2.1.15 Verwendete Mauslinien

Tabelle 21: Verwendete Mauslinien

Linie	Beschreibung
<i>CMV Cre-Deleter</i>	Die konstitutiv exprimierte Cre-Rekombinase in dieser Mauslinie vermittelt die Exzision aller geflochten DNA Bereiche während der Präimplantationsphase der Embryogenese. Angetrieben wird die Cre-Rekombinase von einem β -Aktin Enhancer-Element und einem humanen Zytomegalieviruspromotor (CMV) mit nachgeschalteter β -Globin-Polyadenylierungssequenz aus dem Kaninchen (Niwa <i>et al.</i> , 1991; Thomsen <i>et al.</i> , 1984). Die Integration des Transgens erfolgt nach dem Zufallsprinzip in das X-Chromosom und führt im Fall der Homozygotie zu verringerter Fertilität der Weibchen (Schwenk <i>et al.</i> , 1995). Freundliche Gabe von Klaus Rajewsky über H. von Melchner (Universität Frankfurt).
<i>C57BL/6J</i>	Harlan-Winkelmann, Paderborn
<i>ICR</i>	Harlan-Winkelmann, Paderborn
<i>TG albCre-Deleter</i>	Die hepatozytenspezifische Cre-Rekombinase vermittelt die Exzision aller geflochten DNA Bereiche während der Embryogenese und frühen postnatalen Entwicklung in den Hepatozyten (Kellendonk <i>et al.</i> , 2000). Angetrieben und kontrolliert wird die Cre-Rekombinase durch den Albumin-Promotor. Freundliche Gabe von Thilo Borchardt (MPI Bad Nauheim).
<i>TG Flp-Deleter</i>	Die konstitutiv exprimierte Flp-Rekombinase vermittelt die Rekombination zwischen Flp-Erkennungssequenzen in der frühen Embryogenese und wird durch ein humanes β -Aktin Enhancer-Element angetrieben (Rodriguez <i>et al.</i> , 2000). Freundliche Gabe von S.M. Dymecki (Boston).

2.1.16 Verwendete Software

Tabelle 22: Liste genutzter Software

Software	Hersteller
AxioVision® 4.8	Carl Zeiss Imaging Solutions, Jena
DNASTAR Lasergene®	DNASTAR Inc. (USA)
ImageJ	National Institutes of Health (USA)
Office 2007	Microsoft Corporation (USA)
Photoshop 8.0	Adobe Systems Incorporated (USA)
Quantity One	BioRad, München
MaxQuant 14.14	Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried http://www.maxquant.org/
MASCOT/MASCOT Daemon 2.2.02	Matrix Science Inc., Boston, USA http://www.matrixscience.com/

2.2 Methoden

Molekularbiologische Standardverfahren wurden, wenn nicht explizit im Text erwähnt, folgenden Standardwerken entnommen:

Current Protocols in Molecular Biology

F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl
Wiley Interscience, 1989

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition

J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

2.2.1 Sterilisation von Gebrauchsmitteln und Lösungen

Glaswaren, sofern die Beschaffenheit es zuließ, wurden bei trockener Hitze und 180 °C sterilisiert. Empfindlichere Glaswaren, Plastikwaren, Lösungen und Medien wurden bei 121 °C und bei einem Druck von 2,2 bar für 30 min autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen oder Medien wurden mittels Zelluloseacetatfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm bzw. 0,45 µm steril filtriert.

2.2.2 Generierung der konditionalen Sirt6 Knock Out Maus

2.2.2.1 Konstruktion des konditionellen "Targeting"- Vektors

Die Konstruktion des "Targeting"-Vektors erfolgte im Wesentlichen nach dem Protokoll von Liu *et al.* und beruht auf der Verwendung von Rekombinationsereignissen in Bakterien um den Vektor zu generieren (Liu *et al.*, 2003). Für die konditionale Genausschaltung wurde das konditionale Cre-loxP System verwendet. LoxP Elemente sind palindromische Sequenzen,

die links und rechts der zu deletierenden DNA-Bereiche in das Genom eingebracht, und von der Cre-Rekombinase erkannt werden (Sternberg & Hamilton, 1981). Liegen die flankierenden loxP-Elemente in gleicher Orientierung, wird der dazwischen liegende DNA-Bereich durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten und ein loxP-Element verbleibt am Ort zurück (Sauer & Henderson, 1988). Ausgangspunkt für die Herstellung des "Targeting"-Vektors waren zwei Vektoren. Zum einen war es der *pKOII*-DTA Vektor, der zwei multiple Klonierungsstellen (MCS), eine FRT-flankierte Neo-Kassette, eine loxP-Erkennungsstelle und die Sequenz des Diphtherietoxins A (DTA) enthält. Von diesem Vektor wird aber nur der Teil der Sequenz benötigt, der die Klonierungsstellen und das DTA enthält. Das DTA dient später als negativer Selektionsmarker und erhöht zusätzlich die Rekombinationseffizienz in den embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). Es gewährleistet, dass nur die für die homologe Rekombination benötigten Bereiche in das Genom der ES-Zellen integriert werden. Kommt es dagegen auch zur unerwünschten Integration von Vektorsequenzen, die die DTA-Sequenz enthalten, führt diese Sequenz zur Bildung des Diphtherietoxins A und somit zum Tod der ES-Zelle. Das zweite verwendete Plasmid ist der PL451 Vektor. Dieser enthält ebenfalls zwei multiple Klonierungsstellen mit der dazwischen liegenden FRT-flankierten Neo-Kassette und einer loxP-Erkennungsstelle. Die Neo-Kassette enthält das Gen für die Neomycin-phosphotransferase, die eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 verleiht und als Selektionsmarker späterer Rekombinationsereignisse dient. Der Neomycin-Sequenz sind regulatorische Elemente der Phosphoglyzerat Kinase 2 (PGK) voran geschaltet. Die FRT-Sequenzen ermöglichen das spätere Entfernen der PGK-Neo-Kassette durch die Flp-Rekombinase. In die MCS's des *pKOII*-Vektors werden die genomischen Fragmente kloniert, welche die sequenzspezifische Rekombination des genomischen *Sirt6*-Locus in den *pKOII*-Vektor gewährleisten. In die MCS's des PL451-Vektors werden die genomischen Fragmente kloniert, welche die sequenzspezifische Rekombination der PGK-Neo-Kassette und der hinteren loxP-Erkennungsstelle in den im *pKOII* befindlichen *Sirt6*-Locus ermöglichen. Die zweite loxP-Sequenz wird danach in die Intronsequenz vor dem ersten zu deletierenden Exon kloniert.

Ausgangspunkt für die Herstellung des "Targeting"-Vektors war außerdem ein genomischer Klon (BAC-Nr. CH29-222K13, Bacpac, Oakland), der den kompletten genomischen Locus von *Sirt6* (Exone I-VIII mit den jeweiligen Introns), sowie große Abschnitte des 5' und 3' untranslatierten Bereiches von *Sirt6* enthielt. Zunächst wurde dieser Klon in elektrokompente Bakterien des *E. coli* Stammes EL350 transformiert, selektioniert und entsprechende Glycerol-Stocks angelegt. Diese Bakterien besitzen eine Cre-Rekombinase und erlauben die spätere homologe Rekombination eines Teils des *Sirt6* Locus in den *pKOII*-Vektor. Parallel dazu wurde der *pKOII*-Vektor generiert. Zunächst wurden mittels PCR die Bereiche aus dem genomischen *Sirt6*-Locus generiert, die in die MCS des *pKOII*-Vektors

kloniert werden sollten und später die homologe Rekombination des kompletten *Sirt6*-Locus mit 7,6 kbp des 5' untranslatierten Bereichs und 1,7 kbp des 3' untranslatierten Bereichs ermöglichen. Die PCR für das 522 bp große 5' Fragment erfolgte mit den Oligonukleotiden 6RP_5_SmaI/PmeI und 6RP_5_HindIII und die des 540 bp großen 3' Fragments mit 6RP_3_BglIII und 6RP_3_EcoRI. Mit dem Oligonukleotid 6RP_5_SmaI/PmeI wurde eine zusätzliche PmeI Restriktionsschnittstelle eingefügt, die die spätere Linearisierung des gesamten "Targeting"-Vektors erlaubte. Die beiden Fragmente wurden dann in die entsprechenden MCS des *pKOII*-Vektors kloniert und anschließend mit SacII und XhoI verdaut. Dadurch wurde die zum jetzigen Zeitpunkt unerwünschte PGK-Neo-Kassette entfernt und der *pKOII*-Vektor enthielt nun die beiden 5' und 3' Fragmente sowie einen Rest des Vektor-Rückgrats mit der DTA-Sequenz (Größe ca. 3,5 kbp). Nun erfolgte die Transformation des 3,5 kbp *pKOII*-Konstrukts in die EL350 Bakterien, die zuvor mit dem BAC 222K13 transformiert wurden. Nach erfolgreicher homologer Rekombination enthielt der *pKOII*-Vektor nun den erwünschten Teil des genomischen *Sirt6* Locus (*Sirt6-pKOII*-Konstrukt). Von positiven Klonen wurden dann ebenfalls Glycerol-Stocks für die spätere Verwendung angelegt. Parallel dazu wurde auch der PL451 Vektor kloniert. Mittels PCR wurden hier die Bereiche aus dem genomischen Locus von *Sirt6* generiert, die in die MCS's des PL451 Vektors kloniert werden sollten und später die homologe Rekombination der PGK-Neo-Kassette in den *pKOII*-Vektor mit dem genomischen *Sirt6* Locus ermöglichen. Für die PCR des 471 bp langen 5' Fragments wurden die Oligonukleotide 6MT_5_XhoI und 6MT_5_EcoRV und für die des 474 bp großen 3' Fragments die Oligonukleotide 6MT_3_BamHI/NheI/XhoI und 6MT_3_SacI verwendet. Da sich ein Fehler in dem Oligonukleotid 6MT_3_SacI befand, wurde dieses Fragment zunächst in den T-Vektor kloniert und mittels BamHI/NotI Restriktionsverdau herausgeschnitten und dann in die entsprechende 3' MCS des PL451 Vektors kloniert. Anstelle der SacI Schnittstelle hätte die SacII Schnittstelle verwendet werden sollen. Für die Klonierungsstrategie des gesamten "Targeting"-Vektors ergab sich dadurch aber kein Nachteil. Ebenso wurde das 5' Fragment in den PL451 Vektor kloniert. Der fertige PL451 Vektor wurde dann mit XhoI und SacII verdaut und das erwünschte ca. 3 kbp große Gesamtfragment enthielt schließlich das 5'- und 3' Fragment mit der dazwischen liegenden PGK-Neo-Kassette mit der hinteren loxP-Erkennungsstelle. Nun erfolgte die Transformation des PL451 Fragments in die EL350 Bakterien mit dem *Sirt6-pKOII*-Konstrukt. Nach erfolgreicher homologer Rekombination konnte somit ein Konstrukt generiert werden, das aus dem DTA-Rückgrat des *pKOII*-Vektors, des genomischen *Sirt6* Locus mit den 5' und 3' homologen Armen sowie der PGK-Neo-Kassette mit der hinteren loxP-Stelle zwischen Exon VI und Exon VII bestand. Zum Schluss erfolgte noch die Einführung der vorderen loxP-Erkennungsstelle in die SacII Schnittstelle in das 3. Intron zwischen Exon III und IV. Dazu wurden zwei komplementäre Oligonukleotide

generiert, die die Sequenz für die loxP-Stelle enthielten. Durch einmaliges Aufkochen und anschließendes, langsames Abkühlen erfolgte die Aneinanderlagerung beider Oligonukleotide. Diese wurden danach in die SacII Schnittstelle des 3. Introns kloniert. Der fertige "Targeting"-Vektor umfasste somit eine PGK-Neo-Kassette mit einem 7,6 kbp langem 5'-Arm sowie einem 2,2 kbp langem 3'-Arm, der die Analyse homologer Rekombinationsereignisse durch Southern Blot ermöglichte. Nach erfolgter Sequenzanalyse des fertigen "Targeting"-Vektors wurde das gesamte Konstrukt an der 5' gelegenen PmeI Schnittstelle linearisiert, aufgereinigt und dann in embryonale Stammzellen elektroporiert.

2.2.2.2 Kultur, Transformation und Selektion von ES-Zellen der Maus

Die Arbeiten an und mit den ES-Zellen wurden durch Katja Kolditz am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung (MPI) in Bad Nauheim durchgeführt. Die pluripotenten, embryonalen Stammzellen der männlichen Linie R1 (Nagy *et al.*, 1993) wurden in ES-Zellmedium kultiviert. 100 µg des für die Elektroporation verwendeten "Targeting"-Vektors wurde durch einen PmeI-Restriktionsverdau linearisiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde das DNA-Fragment durch eine Ethanol-fällung präzipitiert und in 1xTE gelöst. Für die anschließende Elektroporation (BioRad Genepulser mit 500 µF und 240 V) der vereinzelt ES-Zellen in einer PBS-Suspension wurden 25 µg des linearisierten und aufgereinigten "Targeting"-Vektors verwendet. Die transformierten ES-Zellen wurden dann auf Gelatine (0,1%) beschichteten Kulturplatten für 8-10 Tage mit G418 (250 µg/ml) selektioniert. G418 resistente ES-Klone wurden isoliert und auf Muldenplatten zur weiteren Expansion überführt. Diese Platten waren für die spätere DNA-Isolierung entweder mit Gelatine (0,1%) überzogen oder zur Expansion der ES-Zellen mit mitotisch inaktivierten (Mitomycin C behandelten) primären Maus Fibroblasten beschichtet. Ein Teil der selektionierten und expandierten Zellen wurde für die Analyse durch Southern Blot verwendet. Zusätzlich wurden positive Klone aus der Southern Blot Analyse noch mittels PCR überprüft, um die Anwesenheit der loxP-Erkennungsstelle im langen Arm nachzuweisen. ES-Klone mit einem homologen Rekombinationsereignis wurden daraufhin expandiert, tiefgefroren (5×10^6 Zellen/ml) und bis zur Injektion in C57Bl/6 Mausblastozysten in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.3 Isolation genomischer DNA aus ES-Zellen

In 24-Loch Muldenplatten expandierte ES-Zell-Klone wurden mit 500 µl 1x PBS gewaschen und danach mit 500 µl ES-Zell Lysis-Puffer überschichtet. Nach erfolgter Inkubation bei 37°C für 1-3 Tage wurden 500 µl Isopropanol dazugegeben und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach konnte die genomische DNA mittels eines kleinen Hakens gefischt und in 100 µl 1x TE überführt werden. Anschließend wurde die DNA zum

Lösen für 1-3 Tage bei 55°C inkubiert und konnte dann für die Analyse durch Southern Blot oder PCR genutzt werden.

2.2.3 Arbeiten mit Versuchsmäusen

2.2.3.1 Herstellung und Haltung transgener Mäuse

Mausblastozysten-Injektionen und Embryo-Transfers wurden in der transgenen Einheit des MPI durch Susanne Kreuzer durchgeführt. So wurden je 15-20 ES-Zellen in Mausblastozysten des Inzuchtstammes C57Bl/6 injiziert und je 8-10 Blastozysten in scheinsschwangere C57Bl/6 Mäuse transplantiert. Die erhaltenen chimären Nachkommen, sowie alle Tiere der Folgegenerationen wurden entsprechend den geltenden Tierschutzbestimmungen in dafür vorgesehenen Käfigen und Räumen in der Versuchstierhaltung des MPI gehalten. Die Tiere erhielten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Die behördliche Zulassung der transgenen Manipulationen erfolgte durch das Regierungspräsidium Giessen.

2.2.3.2 Tötung von Versuchsmäusen

Die Mäuse wurden, entsprechend dem jeweiligen Versuchsaufbau, durch zervikale Dislokation getötet.

2.2.3.3 Isolierung von Mausembryonen aus dem Uterus des Muttertieres

Für die Gewinnung von Mausembryonen bzw. embryonaler Gewebe wurden die Elterntiere entsprechend verpaart und die Trächtigkeit mittels Vaginal-Plug Methode bestimmt. Der Tag, an dem ein Vaginalpfropf festgestellt werden konnte, wurde als Tag 0,5 nach der Empfängnis angenommen. Davon ausgehend wurde der Tag der Entnahme berechnet und das jeweilige Embryonalstadium mit einem E vor dem Tag gekennzeichnet. Trächtige Tiere wurden dann getötet und die Uteri durch einen Bauchdeckenschnitt entnommen. Die Uteri wurden anschließend in eiskaltem PBS gewaschen, die Embryonen bzw. Gewebe herauspräpariert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert oder in flüssigem Stickstoff gefroren.

2.2.3.4 Präparation von Mausembryofibroblasten (MEF's)

Für die Embryopräparation wurden heterozygote Tiere der Sirt6 cmvKO Linie miteinander verpaart, die Embryonen am Tag E14.5 entnommen und einzeln in 5 cm Zellkulturschalen bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle weiteren Arbeiten unter einer Sterilbank. Die inneren Organe der Embryonen wurden dann entfernt und verworfen, der Kopf diente der Genotypisierung durch PCR. Der Rest des Embryos wurde mit einem sterilen Skalpell fein zerkleinert und für 10 min in 5 ml 0,25% Trypsin in 1x

PBS bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte ein Abstoppen des Verdauens durch Zugabe von 5 ml 10% FCS in DMEM. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren weiter vereinzelt und durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 300 x g pelletiert. Danach wurden die Zellen in 24 ml 10% FCS in DMEM resuspendiert und in je 3x 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Nach 2 Tagen Inkubation wurde dann je ein Kryostock pro 10 cm Zellkulturschale angelegt.

2.2.3.5 Isolierung genomischer DNA aus murinen Schwanzbiopsien und murinem Gewebe

Mausschwanzbiopsien (0,5 cm) oder entsprechend große Gewebestückchen wurden mit Proteinase K (200 µg/ml) in 500 µl Lysis-Puffer über Nacht bei 55°C unter Schütteln verdaut. Nach Präzipitation durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und Waschen mit 70% Ethanol wurde die genomische DNA in 50-100 µl sterilem H₂O-Millipore gelöst. Für die folgende Genotypisierung durch PCR wurde dann 1 µl und für die Southern Blot Analyse 20 µl der DNA-Lösung verwendet.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR)

Die PCR dient der exponentiellen Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* und erfolgte unter der Verwendung der hitzestabilen *Taq* DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988). Für die Genotypisierung wurde die *Taq* DNA-Polymerase von 5 PRIME und für Klonierungsarbeiten die *Pfu* DNA-Polymerase von Promega benutzt. Die Anlagerungstemperatur (T_{an}) der Oligonukleotide wurde grob nach folgender Formel berechnet:

$$T_{an} = (4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)) - 5^{\circ}\text{C},$$

wobei G, C, A und T für die vier Basen der DNA stehen. Die jeweils verwendete T_{an} der Oligonukleotide ist in der entsprechenden Tabelle aufgeführt.

Ein 25 µl Standard PCR-Ansatz enthielt PCR-Puffer, *Enhancer* (optional), 2 mM MgCl₂, dNTP-Mix (0.2 mM pro Nukleotid), spezifische Sinn- und Gegensinn-Oligonukleotide (jeweils 100 pmol), 0.2 U *Taq* DNA-Polymerase, Matrizen-DNA-Lösung (10-100 ng/µl) und ddH₂O. Einer initialen Denaturierung (3 min, 95°C) folgten 20-40 Zyklen mit je 30 s, 95°C (Denaturierung), 30 s, 56-68°C (Oligonukleotid-Anlagerung) und 1 min/kb, 72°C (Extension). Dem letzten Zyklus folgte dann noch eine finale Extension von 5 min bei 72°C.

2.2.4.2 Quantitative PCR (Q-PCR)

Mit Hilfe der Q-PCR ist es möglich quantitative Unterschiede der mRNA Expression durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen zu bestimmen. Bei dem hier verwendeten Fluoreszenzfarbstoff handelte es sich um SYBR® Green I, der sich in die doppelsträngige DNA während der Elongationsphase der PCR einlagert und als fertiger 2x Mix bei Thermo Fisher bestellt wurde. Ein typischer PCR Ansatz beinhaltete 12,5 µl SYBR Green Mix, je 1 µl Oligonukleotid (2,5 pmol), 10 µl cDNA (1:50 verdünnt) und 0,5 µl MilliQ-H₂O. Die PCR Bedingungen wurden entsprechend den Herstellerangaben von Thermo Fisher gewählt. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter Tabelle 17 zu finden.

2.2.4.3 Mutagenese-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein abgewandeltes Verfahren der PCR angewendet, um einzelne Punktmutationen (Lysin zu Alanin) in die DNA-Sequenz von GFAT1 einzuführen. Hierzu wurde die *PfuTurbo* DNA-Polymerase AD der Firma Stratagene benutzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 14 aufgelistet. Die Mutagenese-PCR wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.2.4.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten erfolgte basierend auf der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) und wurde außerhalb des Instituts durch die Firma Seqlab in Göttingen durchgeführt. Ein typischer Ansatz, der zur Sequenzierung abgegeben wurde, sah wie folgt aus: 7 µl DNA-Lösung (200 ng/µl) und 1 µl Oligonukleotid (10 pmol).

2.2.4.5 Konstruktion der Überexpressionskonstrukte

Eine Auflistung der generierten und verwendeten Überexpressionskonstrukte sind in Tabelle 20 zu finden. Die zu klonierenden Fragmente wurden mittels PCR und spezifischen, das gesamte offene Leseraster umfassenden, Oligonukleotiden amplifiziert. Mit den Oligonukleotiden wurden zusätzliche Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingeführt die eine gerichtete Klonierung in den gewünschten Vektor erlaubten. Eine Auflistung der verwendeten Oligonukleotide ist in Tabelle 13 zu finden.

2.2.4.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des TRIZOL-Reagenz von Invitrogen und wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop Spektralphotometer bestimmt.

2.2.4.7 Reverse Transkriptase PCR zur Herstellung komplementärer DNA (cDNA)

Zur Herstellung wurden 2 µg an Gesamt-RNA für 30 min bei 37°C mit einer Unit RQ1 RNase-freier DNase I inkubiert, um DNA-Reste zu entfernen. Durch Zugabe von 1 µl RQ1 DNase Stopp Lösung und Inkubation bei 65°C für 10 min wurde der DNA-Verdau beendet. Die anschließende cDNA Synthese erfolgte mit Hilfe des SuperScript™ II Reverse Transcriptase von Invitrogen und wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.5 Biochemische Methoden

2.2.5.1 Proteinisolation aus Gewebe

Alle Präparationsschritte wurden bei 4°C in Anwesenheit von Proteinase-Inhibitoren (cOmplete, EDTA-free Mix bzw. Proteinase/Phosphatase Inhibitoren Mix) durchgeführt. Gewebestückchen wurden entsprechend ihrer Größe in 100-500 µl 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen und mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators (Amplitude von 20-60% für mindestens 15 s) bis zur vollständigen Auflösung homogenisiert. Die Homogenate wurden durch Zentrifugation bei 14000 x g für 5 min von unlöslichen Zelltrümmern getrennt und der Überstand in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden bis zur Konzentrationsbestimmung auf Eis inkubiert und danach bei -20°C gelagert.

2.2.5.2 Proteinisolation aus kultivierten Zellen

Für die Verwendung in Western Blot Analysen wurden die Zellen wie Gewebeproben behandelt und entsprechend dem Protokoll, wie unter 2.2.5.1 beschrieben, verarbeitet. Für die weitere Verwendung in Immunopräzipitationsexperimenten wurde ein anderes Protokoll benutzt, da das SDS im 5x SDS-Probenpuffer denaturierend auf die Protein-Protein-Interaktionen wirkt. Auch hier erfolgten alle Schritte bei 4°C in Anwesenheit von Proteinase-Inhibitoren. Entsprechend der Zellmenge wurden die Zellen in 100-1000 µl RIPA-Puffer aufgenommen, mittels Zellschaber von der Kulturschale gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte ein 30 minütiger Inkubationsschritt auf dem Drehrad mit anschließender Zentrifugation bei 3000 x g für 5 min. Der Überstand wurde dann in ein neues Gefäß überführt. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Lysate sofort für die Immunopräzipitationen eingesetzt.

2.2.5.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe des DC™ Protein Kits von BioRad durchgeführt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt nach der *Lowry Methode* (Lowry *et al.*, 1951) und beruht auf der Komplexbildung der Proteine mit dem in der Lösung enthaltenen Kupfer bei einem alkalischen pH-Wert. In Abhängigkeit von der Proteinkonzentration führt dies zu einem charakteristischen blauen Farbumschlag. Die Messung der Absorption bei 750 nm erfolgte in

einer 96 Loch-Mikrotiterplatte. Zur Abschätzung der Konzentration wurde ein Proteinstandard mit einer definierten Menge an Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) mitgeführt.

2.2.5.4 Western Blot Analyse

Je nach Experiment wurden unterschiedliche Mengen an Proteinlösung aus den jeweiligen Präparationen in 5x SDS-Ladepuffer mit 5% DTT verdünnt und dann für 5 min bei 95°C denaturiert. Gebrauchsfertige Stock-Lösungen wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (NuPage 4-12% Bis-Tris Gele und MES-Laufpuffer oder MOPS-Laufpuffer, Invitrogen) mit anschließendem Nass-Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran bei 30 V für 2 h (XCell II™ Blot Module, Invitrogen) in Transferpuffer. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurden die Proteine auf der Membran durch eine mit Wasser auswaschbare Ponceau S Färbung gefärbt und anschließend bis zur Verwendung trocken gelagert. Die Membranen wurden für die Antikörper-Färbung zunächst kurz in 1x TBST gewaschen und dann mit 5% Milchpulver in 1x TBST für 1 h bei RT geblockt. Die Blocklösung wurde danach durch sechsmaliges Waschen für jeweils 5 min mit 1x TBST entfernt. Die Inkubation mit den spezifischen Primärantikörpern erfolgte dann in 3% BSA/1x TBST über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Nach sechsmaligem Waschen für jeweils 5 min mit 1x TBST erfolgte dann die Inkubation mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, speziesspezifischen Sekundärantikörper für 1 h bei RT in 3% Milchpulver in 1x TBST. An diesen Sekundärantikörper ist zusätzlich eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die eine Detektion der Antigen-Antikörperreaktion durch "verstärkte Chemilumineszenz" (SuperSignal West™ Femto, Pierce) mittels des VersaDoc™ 3000 Image Systems erlaubt. Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte dann mit der Software *Quantity One*.

2.2.5.5 Coomassie-Brillant-Färbung von Proteingelen

Die aufgetrennten Gele wurden mittels des Colloidal Blue Staining Kits von Invitrogen entsprechend den Herstellerangaben über Nacht gefärbt und anschließend für 2-6 h mit MilliQ-H₂O entfärbt. Danach wurden die Gele eingescannt und entsprechend für die Massenspektrometrie aufgearbeitet.

2.2.5.6 Proteinverdau im Gel und Aufbereitung für die Massenspektrometrie

Das Coomassie gefärbte Gel wurde fotografiert und mit einer Schnittschablone versehen. Das Gel wurde dann entsprechend der Schnittschablone in einzelne Stücke zerschnitten und die jeweiligen Stücke in geeignete Reaktionsgefäße überführt. Die weitere Verarbeitung erfolgte dann nach folgendem Schema:

- Manuelle Zerkleinerung der Gelscheibe in 1-2 mm³ Würfel
- Überschichtung mit 50mM Ammonium Bikarbonat (ABC) / 50% Ethanol
- Inkubation 20min bei Raumtemperatur
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Wiederholung der vorherigen drei Schritte
- Überschichtung mit 100% abs. Ethanol
- Inkubation 20min bei Raumtemperatur
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Eintrocknen der Gelstücke mittels Vakuum Zentrifuge
- Überschichten mit 10mM DTT in 50mM ABC
- Inkubation 40min bei 56 °C
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Überschichten mit 55mM Iodacetamid in 50mM ABC
- Inkubation 30min bei Raumtemperatur, Dunkelheit
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Überschichtung mit 50mM ABC
- Inkubation 10min bei Raumtemperatur
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Überschichtung mit 100% Ethanol
- Inkubation 10min bei Raumtemperatur
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Überschichtung mit 50mM ABC
- Inkubation 10min bei Raumtemperatur
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Überschichtung mit 100% Ethanol
- Inkubation 10min bei Raumtemperatur
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Wiederholung der vorherigen drei Schritte
- Eintrocknen mit Vakuum Zentrifuge
- Zusatz von 12µg Protease Trypsin, gelöst in 50mM ABC
- Inkubation 15min
- Überschichtung mit 50mM ABC
- Inkubation über Nacht bei 37 °C

Am nächsten Tag:

- Überstand abnehmen und sammeln

- Überschichtung mit 30% Acetonitril / 3% Trifluoressigsäure (TFA)
- Inkubation 30min bei Raumtemperatur
- Überstand abnehmen und sammeln
- Überschichtung mit 70% Acetonitril
- Inkubation 30min bei RT
- Wiederholung der letzten drei Schritte
- Überstand abnehmen und sammeln
- Überschichtung mit 100% Acetonitril (ACN)
- Inkubation 30min bei Raumtemperatur
- Wiederholung der letzten drei Schritte
- Überstand abnehmen und sammeln
- Einengen des Gesamtvolumens auf 80 µl mittels Vakuum Zentrifuge
- Äquilibrierung des C18 Materials (in der Pipettenspitze)
- Proteinprobe 1:1 mit 5%ACN / 1%TFA mischen und vortexen
- Proteinprobe in Pipettenspitze füllen
- Zentrifugation mit 2600 rpm, 4min
- Spitze waschen mit 0,5% Essigsäure
- Zentrifugation mit 2600 rpm, 4min
- Aufbewahrung der Pipettenspitze bis zur Messung bei 4 °C

2.2.5.7 GFAT1 Aktivitäts-Assay

GFAT1 katalysiert den Umsatz von Fruktose-6-Phosphat (F-6-P) und Glutamin zu Glukosamin-6-Phosphat (G-6-P) und Glutamat. Die Menge an gebildetem G-6-P kann dabei durch verschiedene Reaktionen bestimmt werden. Für den GFAT1 Aktivitäts-Assay wurde Lebergewebe von E14.5 Embryonen der Sirt6 cmvKO Linie verwendet. Die Präparation erfolgte wie unter 2.2.3.3 beschrieben. Die Leber wurde immer frisch verwendet und nicht eingefroren. Eine komplette Leber wurde in je 150 µl 1x PBS durch Sonifizieren für 15 s bei 50% homogenisiert und anschließend bei 12000 x g zentrifugiert. Für einen Reaktionsansatz wurden dann 30 µl des Überstandes eingesetzt. Des Weiteren wurden folgende Reagenzien dazugegeben: 20 µl 500 mM F-6-P, 50 µl 75 mM Glutamin, 20 µl 500 mM KPO₄ Puffer pH 7.0, 10 µl 62,5 mM EDTA und MilliQ-H₂O zu 250 µl Gesamtvolumen. Durch Zugabe des Lysates wurde der Assay gestartet und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Reaktionen durch Kochen bei 100 °C für 4 min abgestoppt und 5 min bei 14000 x g zentrifugiert. Für die nächsten Schritte wurden dann 200 µl des Überstandes genutzt. Es folgte die Zugabe von 25 µl gesättigtem NaHCO₃ und 25 µl 5% Essigsäureanhydrid (frisch in MilliQ-H₂O angesetzt). Nun wurden die Reaktionen für 5 min bei RT und anschließend 5 min bei 100 °C geschüttelt. Dann erfolgte die Zugabe von 50 µl 0,8 M Kaliumborat pH 9.1. Nach 7 minütigem Schütteln bei 100 °C und anschließender Abkühlung auf Eis, wurden 750 µl

Ehrlich's Reagenz dazugegeben. Das Ehrlich's Reagenz wurde kurz vorher 1:10 in konzentrierter Essigsäure verdünnt und frisch dazu gegeben. Nach 20 min Inkubation bei 37°C erfolgte ein Farbumschlag welcher dann bei 585 nm gemessen wurde. Die Intensität des Farbumschlages ist dabei proportional zur gebildeten Menge an G-6-P. 5 µl des Ausgangslyates wurden für die Bestimmung der GFAT1 Proteinlevel durch Western Blot verwendet und dienen der Normalisierung der GFAT1 Aktivitätslevel.

2.2.6 Zellbiologische Methoden

2.2.6.1 Kultivierung von Zellen

Die Routine-Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen erfolgte in 6 cm bzw. 10 cm Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden entsprechend ihren Anforderungen in den in Tabelle 6 aufgeführten Medien kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit sterilem 1x PBS gewaschen und durch Inkubation mit einer 0,05% Trypsin/0,2% EDTA-Lösung vom Boden der Platte und aus dem Zellverband gelöst. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an serumhaltigem Medium abgestoppt. Die gewünschte Menge an Zellen wurde anschließend in frischem Medium resuspendiert und entsprechend ausplattiert.

2.2.6.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden wie unter 2.2.6.1 beschrieben trypsiniert und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. 2x10⁶ Zellen wurden dann in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach einer mindestens 24 stündigen Inkubation bei -80°C in extra dafür vorgesehenen Einfrierbehältern wurden die Kryostocks dann in flüssigem Stickstoff gelagert. Ein schnelles Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Nachdem die Zellen in serumhaltiges Medium überführt und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert wurden, konnten die Zellpellets in frischem Medium aufgenommen und entsprechend ausplattiert werden.

2.2.6.3 Transfektion von Zellen

Für die Transfektion von HEK 293T und U2OS Zellen wurde die Kalziumphosphat-Methode angewendet. Diese beruht im Wesentlichen auf der Bildung eines DNA-Kalziumphosphat-Präzipitates, das sich an die Zellen anlagert und dann aufgenommen wird. Pro 10 cm Kulturschale wurden 1-10 µg an DNA in 439 µl MilliQ-H₂O gemischt und dann tropfenweise unter Schwenken 61 µl einer 2M CaCl₂ Lösung zugegeben. Anschließend wurde ebenfalls unter rührenden Bewegungen 500 µl 2x HBS tropfenweise zugegeben. Das fertige Gemisch wurde dann tropfenweise auf der Kulturschale verteilt. Nach einer 24 stündigen Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden erneut für weitere 24 h inkubiert. Dann

erfolgte die Präparation der Zellen entsprechend des Versuchsaufbaus wie unter 2.2.5.1 oder 2.2.5.2 beschrieben.

2.2.7 Immunologische Färbungen

Für immunologische Färbungen transfizierter und behandelter Zellen, erfolgte deren Kultivierung wie unter 2.2.6.1 beschrieben, jedoch in einer 12-Loch Muldenplatte auf runden 13 mm Glasscheiben. Nach erfolgter Behandlung wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und danach mit 4% PFA/1x PBS für 10 min bei RT fixiert. Eine Permeabilisierung der Zellen erfolgte für 5 min mit 0,5% Triton X-100/1x PBS mit anschließendem Waschen mit 1x PBS für je 5 min bei RT. Die Reduzierung unspezifischer Antikörperbindungen wurde durch Blocken mit Tag1 Lösung (0,5% BSA/0,1% Triton X-100/5% Ziegen Serum/1x PBS) für 1 h bei RT erreicht. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 7) in Tag1 Lösung über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Präparate 5x mit 1x PBS gewaschen und für 2 h mit einem Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 8) in 1x PBS bei RT inkubiert. Danach wurde wieder 5x mit 1x PBS gewaschen und es erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol) für 10 min bei RT. Nach erneutem Waschen wurden die gefärbten Objekte dann mit Hilfe von Mowiol eingedeckelt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden dann entsprechende Bilder angefertigt.

2.2.8 Immunopräzipitation (IP) mit überexprimierten Proteinen aus Zelllysaten

2.2.8.1 Immunopräzipitation für die Massenspektrometrie

Hierzu wurden HEK 293T Zellen in einer 10 cm Kulturschale mit 7 µg DNA transfiziert (siehe 2.2.6.3), für 48 h inkubiert und in 750 µl RIPA-Puffer abgeerntet (siehe auch 2.2.5.2). Nach der Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.5.3) wurde dann 1 µg des Lysates in 500 µl RIPA-Puffer für die IP eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation mit 30 µl Sepharose bei 4°C auf dem Drehrad erfolgte eine Zentrifugation bei 3000 x g für 5 min bei 4°C. Die Sepharose wurde zuvor durch zweimaliges Waschen mit RIPA-Puffer äquilibriert und im Volumenverhältnis von 1:1 mit RIPA-Puffer versetzt (Sepharose-Slurry). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und für eine weitere Stunde mit 7 µg des (CGY)FP- oder des FLAG-Antikörpers auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl Sepharose-Slurry schloss sich eine weitere Inkubation über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad an. Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliges Waschen mit RIPA-Puffer, wobei die Sepharose zwischendurch durch eine Zentrifugation bei 3000 x g und 4°C pelletiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Sepharose-Pellet in 50 µl 1x LDS-Sample-Puffer mit 5% DTT resuspendiert und für 10 min bei 70°C inkubiert. Der gesamte Überstand wurde dann auf ein SDS-Gel aufgetragen, aufgetrennt und anschließend Coomassie (siehe 2.2.5.5) gefärbt.

2.2.8.2 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Die Co-IP wurde genutzt, um die Protein-Protein Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen. Dazu wurden beide potentiellen Interaktionspartner in HEK 293T Zellen überexprimiert. Die Transfektion erfolgte wie unter 2.2.6.3 beschrieben, jedoch angepasst auf 6 cm Kulturschalen und mit je 4 µg der zu überexprimierenden Konstrukte. Die Lyse der Zellen erfolgte wie unter 2.2.5.2 beschrieben, jedoch mit 500 µl RIPA-Puffer. Nach der Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.5.3) wurden 500 µg an Lysat in 250 µl RIPA-Puffer für die Co-IP eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation mit 30 µl Sepharose bei 4°C auf dem Drehrad erfolgte eine Zentrifugation bei 3000 x g für 5 min bei 4°C. Die Sepharose wurde zuvor durch zweimaliges Waschen mit RIPA-Puffer äquilibriert und im Volumenverhältnis von 1:1 mit RIPA-Puffer versetzt (Sepharose-Slurry). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und für eine weitere Stunde mit 2 µg des (CGY)FP- oder des FLAG-Antikörpers auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach der Zugabe von 30 µl Sepharose-Slurry schloss sich eine weitere Inkubation über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad an. Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliges Waschen mit RIPA-Puffer, wobei die Sepharose zwischendurch durch eine Zentrifugation bei 3000 x g und 4°C pelletiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Sepharose-Pellet in 30 µl 5x SDS-Ladepuffer mit 5% DTT resuspendiert und für 5 min bei 95°C inkubiert. Der gesamte Überstand wurde dann auf ein SDS-Gel aufgetragen, aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot analysiert. Ein Teil des Lysates wurde mit 5x SDS-Ladepuffer mit 5% DTT auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt und 5 min bei 95°C inkubiert. 10 µg davon wurden zusammen mit der IP auf ein SDS-Gel aufgetragen und dienten der Kontrolle der erfolgten Überexpression.

2.2.9 Überexpression in *E. coli* und Isolation der Proteine

Für die Überexpression wurden die *E. coli* Stämme BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS oder BL21 CodonPlus-RIL verwendet. Zu Testzwecken erfolgte die Expression zunächst im kleinen Maßstab und sollte dann vergrößert werden. Dazu wurden 20 ml LB-Medium mit 200 µl einer Übernachtskultur, aus mit den entsprechenden Plasmiden transformierten *E. coli* Kulturen, angeimpft und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nachdem die Bakterien bis zu einer $OD_{600}=0,5-0,6$ herangewachsen waren, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,1-0,5 mM IPTG induziert und die Bakterien für weitere 0,5-3 h bei 20-37°C schüttelnd inkubiert. Zu Testzwecken wurde innerhalb der Inkubationszeit 1 ml Probe entnommen und durch Zentrifugation bei 3500 x g pelletiert. Das Gesamtprotein wurde wie unter 2.2.5.1 beschrieben isoliert, mittels SDS-Gel aufgetrennt und die Expression durch eine Coomassie-Färbung analysiert. Für die Aufreinigung der überexprimierten Proteine im nativen Zustand wurde nach einem Protokoll von Tao und Mitarbeitern verfahren (Tao *et al.*, 2010), da sich bei ersten Versuchen herausstellte, dass trotz variierender Kulturbedingungen sich die

Bildung von Einschlusskörperchen mit den darin enthaltenen Proteinen nicht vermeiden ließ. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C und unter Zugabe von Protease-Inhibitoren durchgeführt. Dazu wurde 20 ml Kultur durch Zentrifugation bei 3500 x g pelletiert. Das Pellet wurde dann in 400 µl STE-Puffer resuspendiert und die Bakterien durch dreimaliges Sonifizieren für je 20 s bei 50% aufgeschlossen. Die Einschlusskörperchen wurden dann durch Zentrifugation bei 14000 x g bei 4°C pelletiert, in 200 µl 10% Sarkosyl in STE-Puffer durch Pipettieren resuspendiert und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden dann 400 µl 10% Triton X-100 in STE-Puffer, 400 µl STE-Puffer und CHAPS zu 40 mM dazugegeben, sodass die Endkonzentration an Sarkosyl 2% und an Triton X-100 4% betrug. Von allen Zwischenschritten wurden jeweils 5 µl an Proben entnommen und mit 5 µl 5x SDS-Ladepuffer mit 5% DTT für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Analyse erfolgte dann nach Auftrennung über ein SDS-Gel durch eine Coomassie-Färbung.

2.2.10 HPLC und Massenspektrometrie

Ein Agilent 1200 nanoflow Flüssigchromatograph (LC) System (Agilent Technologies, Santa Clara) wurde über eine Nanoelektrospray Quelle (Proxeon Biosystems, Odense) mit einem LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer-Instrument (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verbunden. Die chromatographische Auftrennung der Peptide erfolgte auf *reverse-phase* Säulen (ReproSil-Pur C18-AQ 3 µm resin (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen)). Trypsin verdaute Proteinproben wurden bei einer Flußrate von 0.5 µl/min und einem linearen Gradienten bei einer Flußrate von 0.2 µl/min aufgetrennt. Die Aufnahmen der LTQ-FT Full Scan MS Spektren (m/z Verhältnis 350 bis 1750) erfolgten mit einer Auflösung von $R=60000$ bei $m/z=400$. Für jeden Full Scan wurden die 5 Ionen der stärksten Intensität isoliert und in der linearen Ionenfalle durch Kollision (CID/HCD Methode) fragmentiert (MS_2).

2.2.11 Analyse der LC-MS/MS Daten

Die Rohdaten wurden mithilfe der Software MaxQuant (Version 14.14) (Cox & Mann, 2008) in ein MASCOT konformes Format umgewandelt. Die MASCOT Version 2.2.02 wurde für die Datenbanksuche und Proteinidentifikation verwendet. Als Suchparameter wurde für alle MASCOT Suchen Trypsin Verdau und Carbamidomethylierung des Cysteins als feste Modifikation eingestellt sowie Oxidation des Methionin, die Acetylierung des Lysins und Serin/Threonin/Tyrosin-Phosphorylierung als variable Modifikation gewählt. Die maximal erlaubte Massenabweichung für MS und MS_2 Scans wurde jeweils mit 10ppm und 0.5 Da eingestellt. Für Peptididentifikationen wurden die *International Protein Index* (IPI, <http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html>) Banken zu Maus und Mensch eingesetzt (IPI Version 3.54 bis 3.64). Alle Banken wurden als DECOY Ziel Proteinbanken angelegt (Elias & Gygi, 2007). Eine minimale Peptidlänge von 6 Aminosäuren und das Vorhandensein von

mindestens 2 Peptiden, wovon ein Peptid als beschreibendes (unique) Peptid vorliegen muss, wurden als Qualitätsparameter für Proteinidentifikationen zu Grunde gelegt. Die Falsch-Positiv-Rate wurde auf Basis der reversen Sequenz-Treffer aus den DECOY Banken bestimmt und mit <1% festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung und Analyse der konditionalen *Sirt6* Knock Out Maus

Mostoslavsky und Mitarbeiter zeigten 2006 mit Hilfe eines konstitutiven *LacZ Knock In* im ersten Exon des *Sirt6* Genlocus, das *Sirt6* für eine normale postnatale Entwicklung notwendig ist (Mostoslavsky *et al.*, 2006). Homozygote Mäuse waren zunächst lebensfähig, starben aber alle innerhalb der ersten 4 Wochen nach der Geburt. Die Mäuse entwickelten sich in den ersten 2 Wochen weitestgehend normal, zeigten aber relativ schnell eine deutliche Reduktion in ihrer Körpergröße verglichen mit gleichaltrigen heterozygoten oder wildtypischen Geschwistertieren. Des Weiteren zeigte sich, dass homozygote Mäuse ab dem zwölften Tag nach der Geburt einen stetig sinkenden Blutzuckerspiegel aufwiesen und dieser ab dem 24. Tag nicht mehr detektiert werden konnte. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass *Sirt6* defiziente Zellen sensitiver gegenüber DNA schädigenden Substanzen sind und somit zeitiger starben oder aber sich Chromosomen Abnormitäten anhäuferten. Diese Beobachtungen belegen, dass homozygote *Sirt6*^{-/-} Mäuse daher keine Untersuchungen in adulten Tieren zulassen und somit die Notwendigkeit einer konditionell induzierbaren *Knock Out* Maus bestand. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb ein konditioneller Knock Out des *Sirt6* Locus kloniert werden, welcher es zulässt, *Sirt6* spezifisch in einzelnen Geweben bzw. in adulten Tieren zu deletieren.

3.1.1 Konstruktion des konditionellen "Gene-Targeting"-Vektor

Um den genomischen Locus von *Sirt6* gezielt zu verändern, wurden mit dem "Targeting"-Vektor zwei loxP Elemente links und rechts der Exone IV bis VI, zusammen mit dem FRT-flankierten synthetischen Gen für die Neomycinphosphotransferase (Neo-Kassette) in das Intron 6 des *Sirt6* Gens eingefügt. Zellen die den "Targeting"-Vektor in ihr Genom integriert haben, sind aufgrund der Neomycinphosphotransferase resistent gegen das Antibiotikum G418 und können somit pharmakologisch selektioniert werden. Die Flankierung von Gensegmenten mit loxP Elementen ermöglicht die Deletion von DNA-Sequenzen durch Cre vermittelte Rekombination (Sternberg *et al.*, 1986; Sauer, 1992). Die Cre vermittelte Rekombination erlaubt später die Deletion der Exone IV bis VI, wodurch ca. ein Drittel der Deacetylase-Domäne sowie die für die katalytische Aktivität notwendigen Aminosäuren entfernt werden. Die Flankierung der Neo-Kassette mit FRT Elementen ermöglicht die Entfernung des Resistenzgens durch die Flp-Rekombinase. Der fertige "Targeting"-Vektor (Abbildung 3) beinhaltet somit eine FRT-flankierte Neomycin-Kassette mit einem 7,6 kbp langem 5'-Arm und einem kurzen 2,2 kbp langen 3'-Arm, der die Analyse homologer Rekombinationsereignisse mittels Southern Hybridisierung ermöglichte.

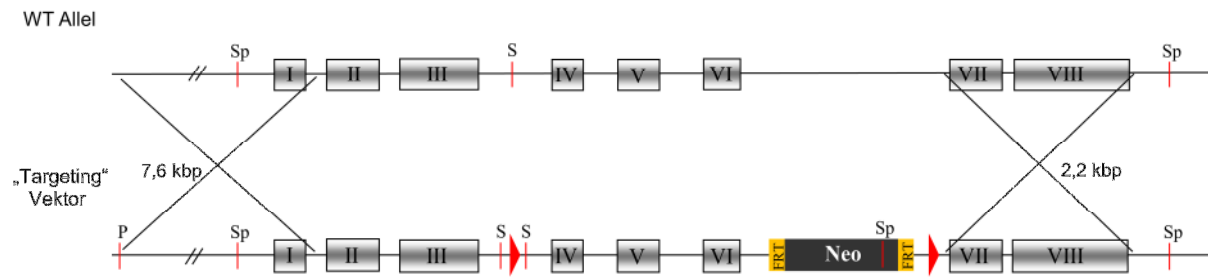


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Sirt6 Genabschnittes und dem daraus abgeleiteten "Targeting"-Vektor.

WT-Allel (oben): Der Genabschnitt ist in 5' nach 3' Orientierung dargestellt. Die acht Exone von Sirt6 sind als graue Rechtecke (I bis VIII) gekennzeichnet. "Targeting"-Vektor (unten): Zusätzlich zu den Exonen I bis VIII enthält der "Targeting"-Vektor ein FRT-flankiertes Gen für die Neomycinphosphotransferase (Neo) im 6. Intron, sowie zwei loxP Erkennungsstellen (rote Dreiecke). Wichtige Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet: P, PmeI (zur Linearisierung); S, SacI; Sp, SpeI (notwendig für die Analyse mittels Southern Hybridisierung). Die Rekombination mit dem WT-Allel erfolgt über die homologen Bereiche (mit einem X gekennzeichnet) von 7,6 kbp bzw. 2,2 kbp Länge. Ein Entfernen der Exone IV bis VI ist durch Cre vermittelte Rekombination möglich. Über die FRT Elemente ist eine Deletion der Neo-Kassette durch Flp vermittelte Rekombination möglich.

3.1.2 Homologe Rekombination des Targeting Vektors in ES-Zellen und Generierung chimärer Mäuse

Je 1×10^7 embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der männlichen Linie ES-MK-V8.1 wurden mit $25 \mu\text{g}$ PmeI linearisiertem "Targeting"-Vektor elektroporiert und je 2×10^6 ES-Zellen auf Feederzell-Platten (\varnothing 10cm) ausgesät. Durch die Gabe von G418 haltigem Selektionsmedium wurden innerhalb von 8-10 Tagen resistente ES-Zellkolonien isoliert. Im Nachfolgenden wurden jene Klone identifiziert, die den veränderten genomischen DNA-Abschnitt ("Targeting"-Vektor) aufgenommen haben. Die Identifizierung geschah durch eine Southern Blot Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde (3' Sonde), die außerhalb des "Targeting"-Vektors bindet (Abbildung 4A). Zunächst wurde die genomische DNA der ES-Klone mit SpeI verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und dann auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Als radioaktive Sonde diente ein DNA-Fragment, das zunächst mittels PCR amplifiziert und dann mit EcoRV geschnitten wurde. Das resultierende 280 bp Fragment diente dann als Sonde. Da durch die Einführung der Neo-Kassette eine zusätzliche SpeI Schnittstelle eingebracht wurde, entstehen im Falle einer homologen Rekombination zwei unterschiedliche Fragmentgrößen. Während im Wildtyp Allel ein 10,2 kbp Fragment detektiert wurde, konnte im Sirt6^{loxP/Neo} Allel ein 5,7 kbp großes Fragment nachgewiesen werden (Abbildung 4B). Diese unterschiedlichen Fragmentgrößen bestätigen die homologen Rekombinationsereignisse in Klon #358. Auf den positiven ES-Klonen der Southern Blot Hybridisierung wurde zusätzlich noch eine PCR Analyse durchgeführt, um eine erfolgreiche Rekombination im 5' Bereich vor der ersten loxP Erkennungsstelle

nachzuweisen. Hierzu wurden die Oligonukleotide SacII LoxP forA (P1) und SacII LoxP revA (P2) verwendet. Im Wildtyp sollte hier ein 242 bp langes Fragment zu sehen sein. Im Falle positiver Rekombinationsereignisse vergrößert sich dieses Fragment auf 276 bp, da in diesem DNA-Sequenzbereich die loxP Erkennungsstelle eingeführt wurde (Abbildung 4C). Auch hier konnte die erfolgte Rekombination in Klon #358 nachgewiesen werden. Für Klon #359 konnte zwar auch die Einführung der loxP Stelle mittels PCR nachgewiesen werden (Abbildung 4C), jedoch fehlt hier das entsprechende Signal durch die Southern Blot Hybridisierung (Abbildung 4B).

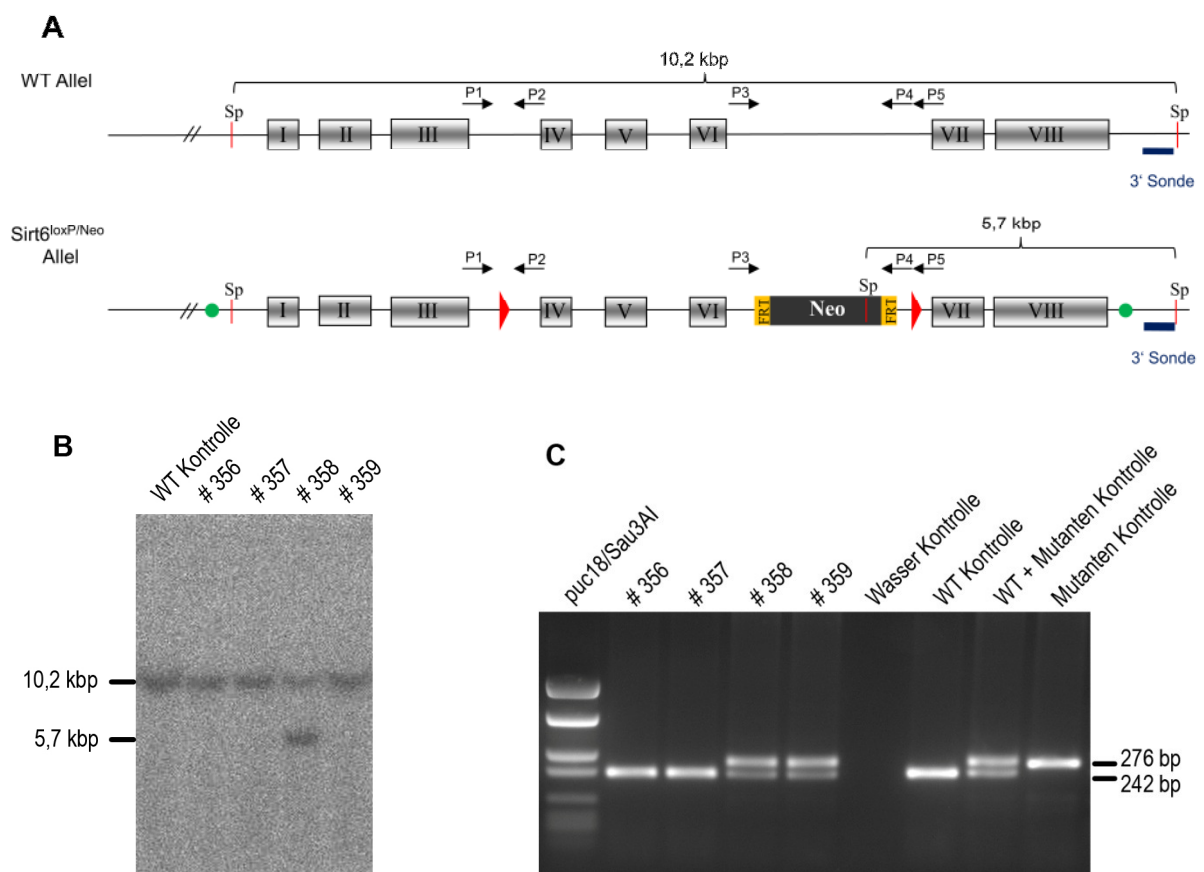


Abbildung 4: Strategie zur Identifizierung homologer Rekombinationsereignisse im Sirt6 Gen.

A) Schematische Darstellung des Wildtyp- und Sirt6^{loxP/Neo} Allels nach homologer Rekombination. Der Genabschnitt ist in 5' nach 3' Orientierung und die Enden des "Targeting"-Vektors sind als grüne Punkte dargestellt. Die für die Southern Hybridisierung genutzte 3' Sonde ist mit einem Balken markiert und die kodierenden Exone I bis VIII sind als graue Rechtecke dargestellt. Die zusätzlich durch den "Targeting"-Vektor eingeführten loxP Elemente (rote Dreiecke) sowie das FRT-flankierte Neomycinphosphotransferase-Gen (FRT/Neo/FRT) sind eingezeichnet. Die Oligonukleotide für die PCR wurden als schwarze Pfeile eingefügt (P1, SacII LoxP forA; P2, SacII LoxP revA; P3, P3 Neo for2; P4, P4 Neo rev2; P5, P4 Neo rev1) und die für die Southern Analyse relevante SpI (Sp) Restriktionsschnittstelle ist mit einem roten Strich markiert. **B)** Southern Blot Analyse ausgewählter ES-Klone nach SpI-Verdau und Hybridisierung mit der 3' Sonde. Angabe der DNA-Fragmentgrößen in Kilobasenpaaren (kbp). **C)** Agarosegel der PCR Analyse von ausgewählten ES-Klonen mit den Oligonukleotiden P1 und P2. Mit Sau3AI verdaute puc18 DNA wurde als Größenstandard verwendet und die Angabe der Fragmentgrößen erfolgte in Basenpaaren (bp).

Dies ist vermutlich auf fehlerhafte Rekombinationsereignisse zurückzuführen. Aus insgesamt 384 isolierten ES-Kolonien konnten 56 ES-Klone mittels Southern Blot Hybridisierung als positiv identifiziert werden, von denen aber nur 43 durch die anschließende PCR-Analyse bestätigt werden konnten. Für die nachfolgende Blastozysten-Injektion wurde der Klon #358 verwendet und entsprechend vorbereitet.

3.1.3 Etablierung von Mauslinien mit verändertem Sirt6 Allel

Der positive ES-Klon #358 wurde für die Injektion in Mausblastozysten eingesetzt und lieferte schon nach der ersten Injektion 15 hochchimäre Nachkommen. Eine Überprüfung der Genotypen dieser Tiere wurde durch Southern Blot und PCR Analysen gemäß den Strategien für homologe Rekombination in ES-Zellen durchgeführt (Abbildung 4). Hierbei zeigte sich, dass alle 15 Tiere das veränderte Sirt6 Allel aufwiesen und somit für die Etablierung der nachfolgend beschriebenen Mauslinien genutzt werden konnten.

3.1.3.1 Sirt6 cKO Mäuse enthalten die FRT-flankierte Neomycin-Kassette und die geflochten Exone IV bis VI

Um die Sirt6 cKO Linie aufzubauen, wurden die hochchimären Nachkommen aus der Blastozysteninjektion mit C57Bl/6 zurückgekreuzt. Daraus resultierende Jungtiere mit heterozygot verändertem Sirt6^{loxP/Neo} Allel wurden später untereinander verpaart um homozygote Nachkommen zu erhalten. Eine Überprüfung der Genotypen erfolgte entsprechend den Strategien für die homologe Rekombination in ES-Zellen (Abbildung 4A). Aus der ersten Rückkreuzung konnten zunächst 3 Würfe mit insgesamt 15 Tieren (z.B. #21737 und #21739 des ersten Wurfes) mit dem richtigen Rekombinationsereignis mittels Southern Blot und PCR Analyse nachgewiesen werden. Exemplarisch sind die Ergebnisse der Southern Hybridisierung (Abbildung 5A) sowie der PCR (Abbildung 5B) des ersten Wurfes dargestellt. Einige dieser 15 Tiere wurden dann im weiteren Verlauf ausgewählt und untereinander verpaart, um homozygote Nachkommen zu erhalten. Identifizierte homozygote Tiere wurden daraufhin selektioniert und bildeten die Ursprungstiere der Sirt6 cKO Mauslinie. Die standardisierte Genotypisierung dieser Mauslinie erfolgte ab diesem Zeitpunkt nur noch durch PCR. Weder heterozygote noch homozygote Mäuse zeigten dabei eine Beeinträchtigung in ihrer postnatalen Entwicklung und waren phänotypisch unauffällig. Zusätzlich wurde noch eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt, um die korrekte Prozessierung des kompletten Sirt6 mRNA Transkripts nachzuweisen. Speziell wurde hier die Leber zur Untersuchung herangezogen, da im späteren Verlauf Sirt6 gezielt in der Leber deletiert werden sollte. Die Amplifikation des PCR Fragments erfolgte mit Oligonukleotiden, die alle 8 Exone von Sirt6 umfassen und ein ca. 1000 bp langes Produkt bilden. Es zeigte sich dabei, dass bei allen Tieren (Wildtyp und heterozygoten Sirt6^{loxP/Neo}) das erwartete

Wildtyp-Fragment von 1000 bp Länge amplifiziert werden konnte und die Insertion der Neomycin-Kassette zumindest in heterozygoten $Sirt6^{loxP/Neo}$ Mäusen keinen Einfluss auf die korrekte Prozessierung des $Sirt6$ Transkripts ausübt (Abbildung 6).

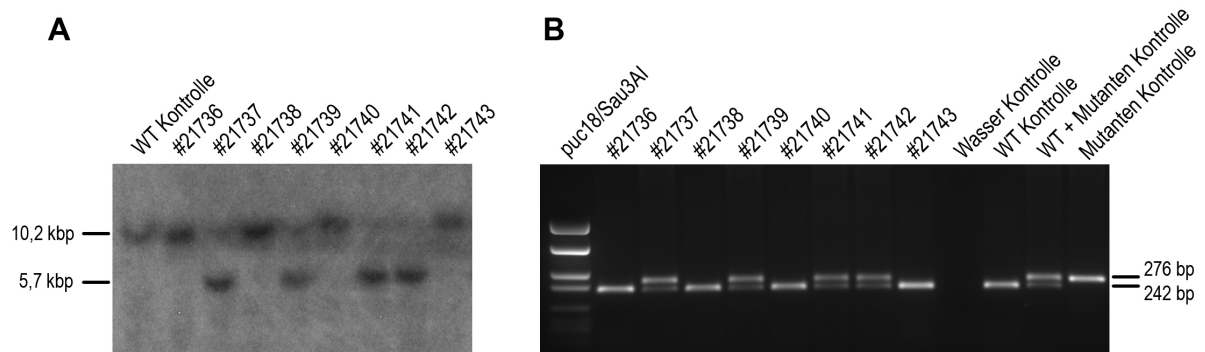


Abbildung 5: Genotypisierung der $Sirt6$ cKO Mauslinie durch Southern Blot und PCR.

A) Southern Blot Analyse nach Restriktionsverdau der genomischen DNA durch $SpeI$ und Hybridisierung mit der 3' Sonde. Für das Wildtyp Allel konnte dabei ein Fragment von 10,2 kbp und für das $Sirt6^{loxP/Neo}$ Allel ein Fragment von 5,7 kbp detektiert werden. Die DNA-Fragmentgrößen wurden in Kilobasenpaaren (kbp) angegeben. **B)** Die PCR Analyse erfolgte mit den Oligonukleotiden $SacII$ $LoxP$ forA (P1) und $SacII$ $LoxP$ revA (P2), wobei eine Wildtypbande von 242 bp und eine Mutantenbande von 276 bp generiert werden konnte. Die Bandengrößen sind in Basenpaaren (bp) angegeben. Beachte die übereinstimmenden Ergebnisse der Southern Blot und PCR Analysen.

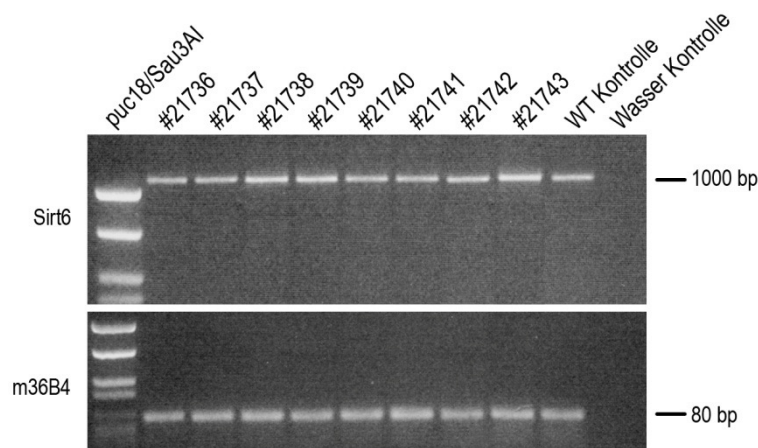


Abbildung 6: Darstellung der semi-quantitativen RT-PCR zum Nachweis korrekt prozessierter mRNA Transkripte in der Leber heterozygoter $Sirt6$ cKO Tiere.

Der Nachweis korrekt prozessierter mRNA Transkripte erfolgte nach Umschreiben in cDNA mit Oligonukleotiden, die alle 8 Exone umfassen und ein ca. 1000 bp Produkt amplifizieren. Es zeigte sich, dass auch Tiere, die heterozygot für das $Sirt6^{loxP/Neo}$ Allel sind (#21737, #21739, #21741 und #21742; vergleiche Abbildung 5) nur das Wildtyp Fragment exprimieren. Die Angabe der Fragmentgrößen erfolgte in Basenpaaren (bp). m36B4, saures ribosomales Phosphoprotein.

Auf eine Überprüfung der homozygoten Tiere wurde zu diesem Zeitpunkt verzichtet, da auch diese Tiere keine Beeinträchtigung zeigten und phänotypisch unauffällig waren. Die korrekte Prozessierung des Transkripts in homozygoten Tieren mit Sirt6^{loxP} Allelen konnte aber zu einem späteren Zeitpunkt im Zuge der Generierung der Sirt6 albumin Cre Linie nachgeholt und bestätigt werden (siehe Abbildung 13).

3.1.3.2 Deletion der Neomycin-Kassette mit Hilfe der Flp-Rekombinase zur Generierung der Sirt6 Neo Mauslinie

Parallel zur Etablierung der Sirt6 cKO Mauslinie wurden Verpaarungen mit Flp-Deleter-Mäusen durchgeführt, um die Sirt6 Neo Mauslinie zu erzeugen. Tiere dieser Linie besitzen dann zwar noch die geflochten Sirt6 Allele, die Neomycin-Kassette ist aber bereits deletiert. Da für eine Southern Blot Hybridisierung keine geeigneten Restriktionsschnittstellen gefunden werden konnten, beschränkte sich die Genotypisierung hier auf die Analyse durch PCR. Für die PCR Genotypisierung wurden die Oligonukleotide P3 Neo for2 (P3) und P4 Neo rev2 (P4) verwendet (siehe Abbildung 4A). Auf dem Wildtyp Allel führt diese Primer Kombination zur Amplifizierung eines 306 bp Fragments. Ist die Neomycin-Kassette noch auf dem Sirt6^{loxP/Neo} Allel enthalten, kann kein Produkt amplifiziert werden. Im Falle der Deletion der Neomycin-Kassette durch die Flp-Rekombinase entsteht jedoch ein Fragment, das aufgrund verbleibender Restsequenzen um ca. 68 bp größer ist als das Wildtyp-Fragment und somit ein Produkt mit einer Länge von 374 bp gebildet werden kann (Abbildung 7, oben). Zusätzlich wurden noch die PCR Analysen zum Nachweis des ersten LoxP Elementes (Abbildung 7, mitte) und der Flp-Rekombinase (Abbildung 7, unten) durchgeführt. Bereits aus der ersten Verpaarung gingen 3 Tiere hervor (#22619, #22621 und #22624; Abbildung 7), die ein korrektes Rekombinationsereignis zeigten. Einige dieser Mäuse wurden dann mit heterozygoten Mäusen aus nachfolgenden Verkreuzungen verpaart, um homozygote Tiere zu erhalten. Homozygote Mäuse dieser Linie spiegeln am ehesten die Wildtyp-Situation wieder, da sie sich jetzt nur noch in den eingeführten LoxP Elementen und minimaler verbleibender Restsequenzen unterscheiden. Auch zeigten weder die heterozygoten, noch die homozygoten Tiere irgendwelche phänotypischen Auffälligkeiten.

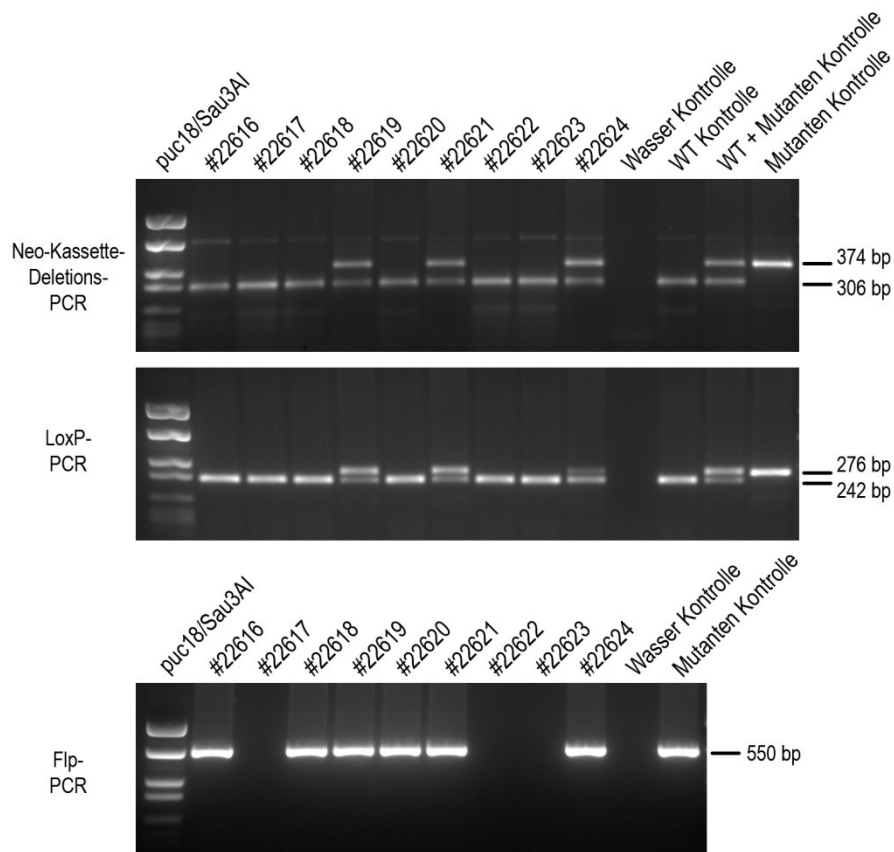


Abbildung 7: Genotypisierung der Sirt6 Neo Mauslinie durch PCR Analyse.

Die PCR Genotypisierung erfolgte mit den Primerpaaren P3 Neo for2 (P3) und P4 Neo rev2 (P4) (oben, Neo-Kassette-Deletion-PCR), SacII LoxP forA (P1) und SacII LoxP revA (P2) (mitte, LoxP-PCR) sowie Flp for und Flp rev (unten, Flp-PCR). Die Größen der entstandenen PCR Fragmente sind eingezeichnet und in Basenpaaren (bp) angegeben. Als Größenstandard wurde mit Sau3AI verdaute puc18 DNA verwendet.

3.1.3.3 Überprüfung der Funktionalität des Knock Out Konstrukts durch Cre-Rekombinase vermittelte Deletion von Sirt6 und Generierung von Mausembryofibroblasten (MEFs)

Für die Überprüfung der Funktionalität des Knock Out Konstrukts wurden heterozygote Tiere der Sirt6 cKO Linie mit einer CMV-Cre-Deleter Maus verpaart. Durch die konstitutiv exprimierte CMV-Cre-Rekombinase sollten die Exone IV bis VI deletiert und somit die Sirt6 cmvKO Linie etabliert werden. Die daraus resultierende Sirt6-Nullmutation sollte den Phänotyp der bereits beschriebenen konstitutiven Sirt6^{LacZ} Knock In Maus widerspiegeln (Mostoslavsky, 2006). Homozygote Tiere der Sirt6^{LacZ} Knock In Linie waren zunächst lebensfähig, zeigten aber eine deutliche Reduktion in ihrer Körpergröße beginnend ab der zweiten Woche nach ihrer Geburt. Zudem konnte beobachtet werden, dass keines der Tiere älter als 4 Wochen wurde. Zur Generierung der cmvKO Linie wurden heterozygote Männchen der Sirt6 cKO Linie mit CMV-Cre-Deleter Weibchen verpaart. Unter den Nachkommen des ersten Wurfes waren bereits 4 Tiere (#22681, #22682, #22683 und

#22684), die eine Deletion der Exone IV bis VI in einem Allel aufwies (Abbildung 8). Die initiale Genotypisierung erfolgte zunächst durch Southern Blot und durch die PCR Analyse. Die Southern Hybridisierung erfolgte wieder mit der 3' Sonde nach Verdau der genomischen DNA mit SpeI. Die Größe des Wildtyp Fragmentes beträgt 10,2 kbp und die des Sirt6^{loxP/Neo} Allels 5,7 kbp, wie bereits für die Sirt6 cKO Linie unter 3.1.3.1. beschrieben. Nach erfolgter Deletion der Exone IV bis VI verkürzt sich das zu erwartende Fragment und es erfolgt eine Hybridisierung bei 8,3 kbp (Abbildung 8A). Die Genotypisierung mittels PCR erfolgte durch drei verschiedene Primerpaare. Mit den Oligonukleotiden SacII LoxP forA (P1) und SacII LoxP revA (P2) kommt es auf dem Wildtyp-Allel zur Amplifizierung eines 242 bp Fragmentes und auf dem Sirt6^{loxP/Neo} Allel zu einem 276 bp Fragment. Wurden die Exone IV bis VI durch die CMV-Cre Rekombinase deletiert, entsteht kein Produkt (Abbildung 8B). Als weiterer Nachweis diente die PCR mit den Primern SacII LoxP forA (P1) und P4 Neo rev1 (P5) (Lage der Primer siehe Abbildung 4A). Diese PCR liefert nur nach erfolgter Cre-Rekombination ein Produkt mit einer Größe von 370 bp (Abbildung 8C). Die abschließende PCR mit den Primern Cre for und Cre rev liefert den Nachweis des transgenen CMV-Cre-Deleter Allels (Abbildung 8D). Durch die PCR Analysen konnten die bereits durch Southern Blot Hybridisierung gezeigten Ergebnisse bestätigt werden, so dass im weiteren Verlauf nur noch auf die Genotypisierung durch PCR zurück gegriffen wurde. Zur Überprüfung des bereits beschriebenen letalen Phänotyps homozygoter Sirt6^{LacZ} Knock In Mäuse (Mostoslavsky *et al.*, 2006) wurden die heterozygoten Sirt6 cmvKO Tiere untereinander verpaart. Wie erwartet, starben beide homozygoten Tiere des ersten Wurfes noch vor der Genotypisierung innerhalb der ersten drei Wochen nach der Geburt. Auch in weiteren Verpaarungen bestätigten sich diese Beobachtungen und zeigten, dass sich die hier generierte konditionelle Sirt6 Knock Out Maus analog zu der konstitutiven Sirt6^{LacZ} Knock In Maus verhält. Aufgrund des frühzeitigen Todes homozygoter Tiere, wurde die Sirt6 cmvKO Linie heterozygot gehalten und nur für definierte Experimente auf Homozygotie verpaart. Die Genotypisierung erfolgte hier nur noch ausschließlich auf Basis der PCR.

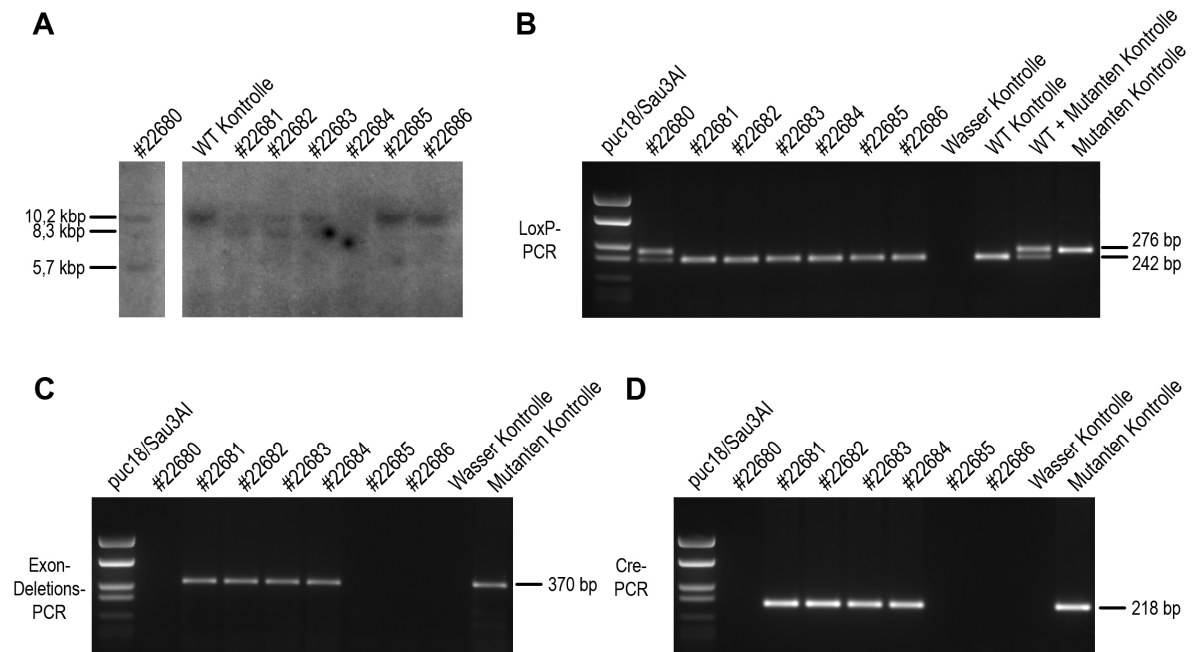


Abbildung 8: Strategie zur Analyse der Cre-Rekombination in der Sirt6 cmvKO Linie.

A) Southern Blot Analyse nach Restriktionsverdau der genomischen DNA durch SpeI und Hybridisierung mit der 3' Sonde. Die Größe des Wildtyp Fragmentes beträgt 10,2 kbp und die des Sirt6^{loxP/Neo} Allels 5,7 kbp. Nach erfolgter Deletion der Exone 4 bis 6 hybridisiert die 3' Sonde bei 8,3 kbp. **B bis D)** Agarosegelbilder der PCR Analyse. Für die Genotypisierung durch PCR wurden die Primerpaare SacII LoxP forA (P1) und SacII LoxP revA (P2) (**B**), SacII LoxP forA (P1) und P4 Neo rev1 (P5) (**C**) sowie Cre for und Cre rev (**D**) verwendet. Die Größe der zu erwartenden Wildtyp- und Mutanten-Fragmente sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

Zur Überprüfung der Deletion der Exone IV bis VI von Sirt6 in verschiedenen Geweben erfolgte die Untersuchung mittels semi-quantitativer RT-PCR auf RNA-Ebene. Dazu wurden den Tieren Gewebeproben aus Herz, Skelettmuskel, Lunge, Milz, Leber und Gehirn entnommen. Nach der Isolation der RNA und anschließender cDNA-Synthese erfolgte der Nachweis der verkürzten Sirt6 mRNA mittels PCR. Die PCR wurde mit Oligonukleotiden durchgeführt, die die gesamte mRNA von Sirt6 umfassen. Im WT kann somit ein ca. 1000 bp großes Fragment amplifiziert werden. Wurden jedoch die Exone IV bis VI deletiert, verkürzt sich das zu amplifizierende Fragment um 240 bp auf ca. 760 bp. In Abbildung 9 ist das Ergebnis der PCR dargestellt. Es zeigte sich, dass in allen hier untersuchten Geweben der Sirt6^{-/-} Maus das verkürzte Transkript nachgewiesen werden konnte, wohingegen in allen Geweben der Wildtyp Maus das korrekt prozessierte Sirt6 Transkript zu finden war. Als Ladekontrolle diente eine PCR mit Primern für den Nachweis der Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

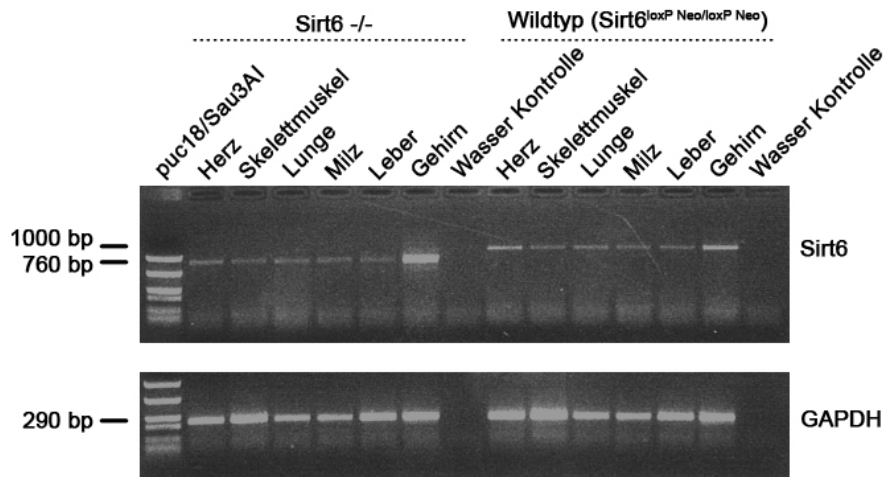


Abbildung 9: Darstellung der semi-quantitativen RT-PCR zum Nachweis verkürzter mRNA Transkripte in verschiedenen Geweben homozygoter Sirt6 Knock Out Tiere.

Die Analyse erfolgte mit einem Primerpaar, das die gesamte Länge der Sirt6 WT mRNA abdeckt. Im WT führt dies zur Amplifikation eines 1000 bp langen Fragments, das sich im KO durch die Deletion der Exone IV bis VI auf ca. 760 bp verkürzt. Durch die CMV-Cre erfolgte die Deletion in allen hier untersuchten Geweben der Sirt6^{-/-} Maus. Im Wildtyp hingegen konnte das korrekt prozessierte Transkript in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Die Angabe der Fragmentgrößen erfolgte in Basenpaaren (bp). GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Analog zu den Beobachtungen von Mostoslavsky und Mitarbeitern, konnte ein Fehlen der subkutanen Fettschicht in den homozygoten Tiere bestätigt werden (Abbildung 10). Der Vergleich von HE gefärbten Wildtyp (Abbildung 10A und A') und Knock Out (Abbildung 10B und B') Hautschnitten zeigt eindeutig ein Fehlen der Fettzellen in der Haut von Sirt6 defizienten Tieren auf (siehe Pfeile, A' und B').

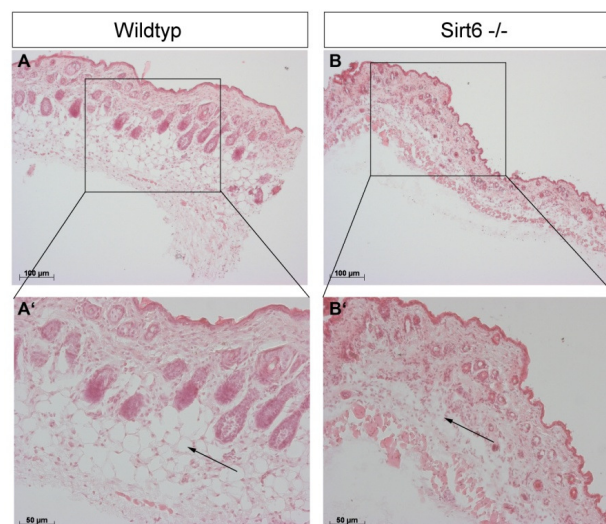


Abbildung 10: Fehlen der subkutanen Fettschicht in Sirt6 cmvKO Mäusen.

HE-Färbung auf Hautschnitten von Wildtyp und Sirt6 cmvKO Knock Out Mäusen. **A und A')** Darstellung des Wildtyps mit deutlich erkennbaren Fettzellen (Pfeil) in der Vergrößerung A'. **B und B')** Darstellung des Sirt6 Knock Out. Auch in der Vergrößerung B' sind keine Fettzellen (Bereich durch einen Pfeil markiert) zu sehen.

Mausembryofibroblasten (MEFs) sind ein hervorragendes System um initiale Experimente unabhängig von der Verfügbarkeit adulter Knock Out Mäuse durchzuführen. Da MEFs nur für einen kurzen Zeitraum passagiert werden können, empfiehlt es sich diese zusätzlich zu immortalisieren. Für die spontane Immortalisierung von MEFs wird im Allgemeinen ein von Todaro und Green (1963) etabliertes Protokoll verwendet (Todaro & Green, 1963). Hierbei werden die primären Fibroblasten alle 3 Tage in einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen pro 6 cm Kulturschale ausgesät bis diese ihr Proliferationslimit erreichen und somit das Wachstum stoppen. Aufgrund spontaner Mutationen, die häufig während der Kultivierung auftreten, entgehen einige dieser Zellen diesen Seneszenz auslösenden Mechanismen und sind zur unbegrenzten Teilung fähig. Diese Zellen sind dann immortalisiert und können im Gegensatz zu den primären MEFs auch für weiterführende und länger währende Experimente genutzt werden. Zu diesem Zweck wurden gezielt heterozygote Tiere verpaart und die Embryonen am embryonalen Tag 14,5 entnommen. Aus den Embryonen wurden dann die MEFs isoliert, durch PCR genotypisiert und anschließend kryokonserviert. Die Ergebnisse der PCR Analyse einer der Präparationen sind in Abbildung 11A-C dargestellt. Demzufolge handelt es sich bei den Embryonen #3 und #6 um homozygote Tiere, #9 ist ein Wildtyp und die restlichen Embryonen sind heterozygot. Zusätzlich zur Genotypisierung erfolgte hier der Nachweis der Deletion von Sirt6 mittels Western Blot. Durch die Western Blot Analyse konnten die Ergebnisse der PCR Genotypisierung eindeutig bestätigt werden und belegen die funktionale Deletion von Sirt6 (37 kDa) in Embryo #3 und #6 (Abbildung 11D). Nach der Deletion der Exone IV bis VI aus dem Sirt6 Transkript war es theoretisch möglich, dass ein etwa 29-30 kDa großes Protein aus den verbleibenden 5 Exonen gebildet werden konnte. In diesem Bereich war auf dem Western Blot aber keine entsprechende Bande zu erkennen. Die zusätzliche Bande (um die 60 kDa), die bei allen drei Genotypen beobachtet werden konnte, ist demnach auf eine unspezifische Kreuzreaktionen des Sirt6 Antikörpers zurückzuführen. Ausgewählte MEFs aus allen Präparationen wurden dann entsprechend dem Protokoll immortalisiert und daraus Stocks für spätere Experimente kryokonserviert.

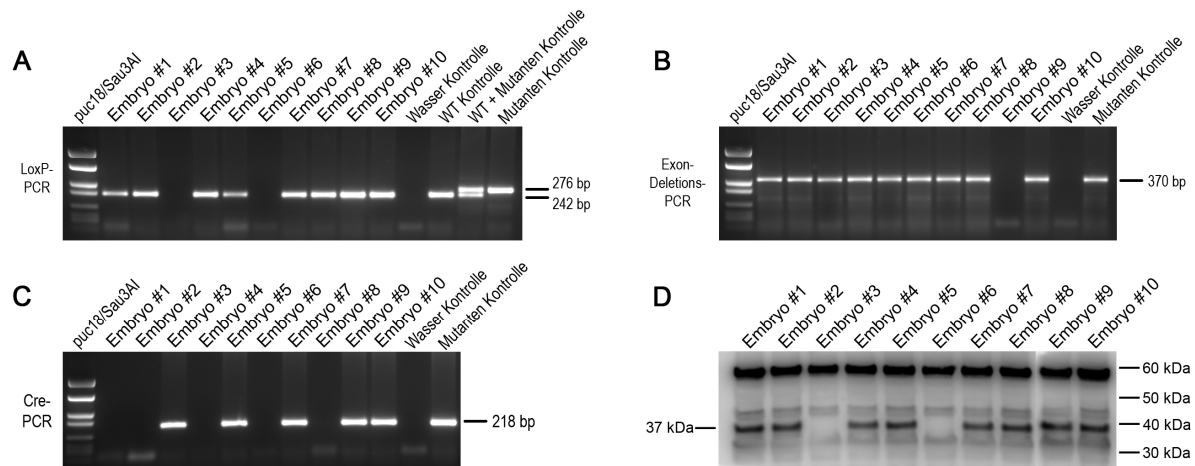


Abbildung 11: PCR und Western Blot Analyse der Sirt6 MEF Präparation.

A bis C) Agarosegelbilder der PCR Analyse. Für die Genotypisierung durch PCR wurden die Primerpaare SacII LoxP forA (P1) und SacII LoxP revA (P2) (**A**), SacII LoxP forA (P1) und P4 Neo rev1 (P5) (**B**) sowie Cre for und Cre rev (**C**) verwendet. **D)** Bild der Western Blot Analyse der präparierten Embryonen #1 bis #10. Der Nachweis von Sirt6 (37 kDa) erfolgte mit einem spezifischen Sirt6 Antikörper. Eine unspezifische Bande von ca. 60 kDa wurde ebenfalls durch diesen Antikörper detektiert. Die Angabe der Bandengröße erfolgte in Kilodalton (kDa).

3.1.4 Mäuse mit leberspezifischer Deletion von Sirt6 sind phänotypisch unauffällig

Da Sirt6 eine entscheidende Rolle in der Regulation der Glukosehomöostase zu spielen scheint, wurde in diesem Zusammenhang ein spezifischer Knock Out von Sirt6 in der Leber angestrebt. Zu diesem Zweck wurden homozygote Mäuse der Sirt6 Neo Linie mit Albumin-Cre Mäusen verpaart. Die Albumin-Cre Maus exprimiert die Cre Rekombinase unter der Kontrolle des leberspezifischen Serum Albumin Promotors. Somit ist es möglich, Sirt6 gezielt in der postnatalen Leber auszuschalten. Die Genotypisierung erfolgte hier ausschließlich mittels PCR durch den Nachweis der LoxP Erkennungsstellen und des albumin-Cre Transgens. Dabei konnte hier auf dieselben Primerkombinationen wie unter Abbildung 8 B (LoxP-PCR) und D (Cre-PCR) beschrieben, zurückgegriffen werden (zur Lage der Primer siehe Abbildung 4A). In Abbildung 12 ist exemplarisch das Ergebnis der Genotypisierung von ausgewählten Sirt6 albumin-Cre Mäusen dargestellt. Bei den Mäusen #44757, # 44761 und #44762 handelt es sich um Tiere mit homozygotem Sirt6^{loxP} Allel, die zusätzlich auch das Cre Transgen tragen. Diese Tiere werden im Fortlaufenden als Sirt6 albuCre ^{-/-} bzw. KO bezeichnet und weisen eine spezifische Deletion von Sirt6 in der Leber auf. Mäuse mit heterozygotem Sirt6^{loxP} Allel die entweder als positiv oder negativ für das Cre Transgen und Mäuse mit homozygotem Sirt6^{loxP} Allel die als negativ für das Cre Transgen genotypisiert werden konnten, wurden zu einer Gruppe zusammengefasst und im Folgenden als WT bezeichnet. Im Gegensatz zu homozygoten Tieren der Sirt6 cmvKO Linie zeigten homozygote Sirt6 albuCre KO Mäuse keinerlei Beeinträchtigungen in ihrem postnatalen Wachstum. Auch nach 3 Wochen konnte rein äußerlich kein Unterschied in ihrer

Körpergröße verglichen mit gleichaltrigen WT Mäusen, festgestellt werden. Alle Sirt6 albuCre $-/-$ Mäuse kamen über ein Lebensalter von 4 Wochen hinaus und starben nicht frühzeitig innerhalb der ersten 3 bis 4 Wochen nach der Geburt, wie die homozygoten Mäuse der Sirt6 cmvKO Linie. Die Fertilität wurde durch den leberspezifischen Knock Out von Sirt6 nicht beeinträchtigt, so dass diese Linie auch homozygot gehalten werden konnte.

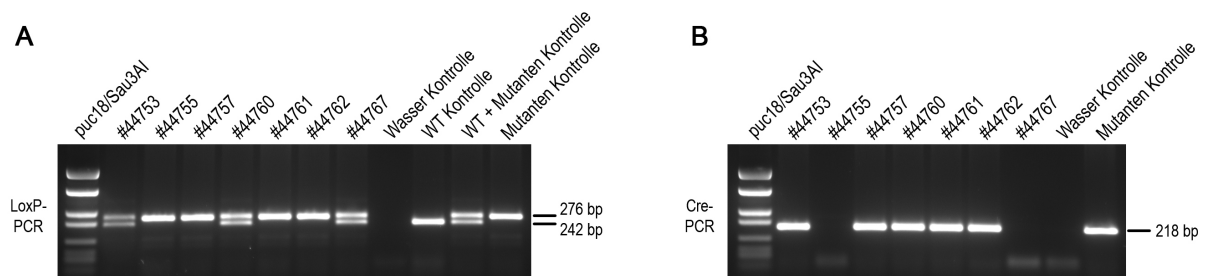


Abbildung 12: Agarosegelbild der PCR Genotypisierung der Sirt6 Albumin Cre Mäuse.

A) Nachweis der LoxP Erkennungsstelle durch PCR mit dem Primerpaar SacII LoxP forA (P1) und SacII LoxP revA (P2). **B)** Nachweis der albumin-Cre Rekombinase mittels PCR mit den Primern Cre for und Cre rev. Zu erwartende Bandengrößen sind in Basenpaaren angegeben.

Zur Überprüfung der spezifischen Deletion der Exone IV bis VI von Sirt6 in der Leber erfolgte die Untersuchung mittels semi-quantitativer RT-PCR auf RNA-Ebene. Dazu wurden den Tieren Gewebeproben aus Herz, Leber, Muskel und Lunge entnommen. Nach der Isolation der RNA und anschließender cDNA-Synthese erfolgte der Nachweis der verkürzten Sirt6 mRNA mittels PCR. Die PCR wurde mit Oligonukleotiden durchgeführt, die die gesamte mRNA von Sirt6 umfassen. Im WT kann somit ein ca. 1000 bp großes Fragment amplifiziert werden. Wurden jedoch die Exone IV bis VI deletiert, verkürzt sich das zu amplifizierende Fragment um 240 bp auf ca. 760 bp. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse einer solchen PCR dargestellt. Es zeigte sich, dass das verkürzte Sirt6 Fragment ausschließlich in der Leber zu finden ist und nicht in anderen hier untersuchten Geweben wie Muskel, Lunge oder Herz. Auch ist zu erkennen, dass heterozygote Cre positive Mäuse (+/-, Cre pos; #44753 und #44760) das verkürzte sowie auch das korrekt prozessierte mRNA Fragment exprimieren. In homozygoten Cre positiven Mäusen (#44757, #44761 und #44762) konnte hingegen fast ausschließlich das verkürzte Transkript nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle diente eine PCR mit Primern für den Nachweis des sauren ribosomalen Phosphoproteins (m36B4).

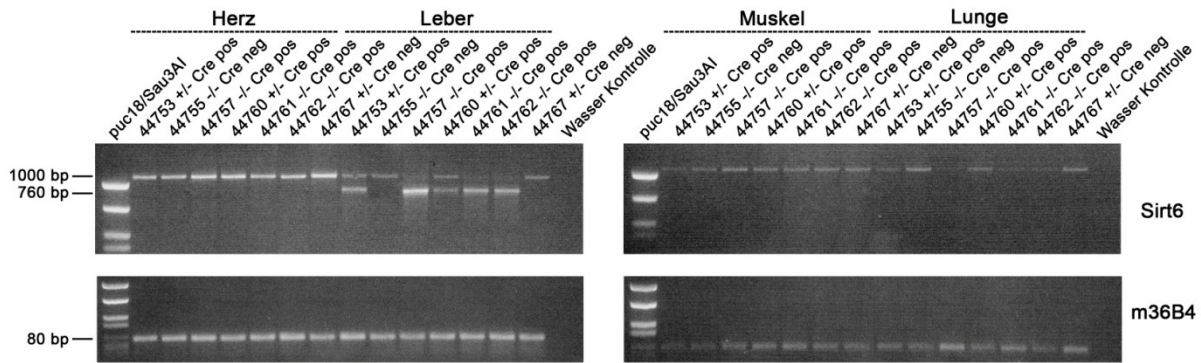


Abbildung 13: Darstellung der semi-quantitativen RT-PCR zum Nachweis verkürzter mRNA Transkripte in der Leber von Sirt6 albumin Cre Mäusen.

Die Analyse erfolgte mit einem Primerpaar, das die gesamte Länge der Sirt6 WT mRNA abdeckt. Im WT führt dies zur Amplifikation eines 1000 bp langen Fragments, das sich im KO durch die Deletion der Exone IV bis VI auf ca. 760 bp verkürzt. Durch die spezifische albumin-Cre erfolgte die Deletion jedoch nur in der Leber und nicht in anderen hier untersuchten Geweben. Die Genotypen der einzelnen Tiere sind angegeben. Die Angabe der Fragmentgrößen erfolgte in Basenpaaren (bp). m36B4, saures ribosomales Phosphoprotein.

Beim Glukosetoleranztest (GTT) wird getestet, ob ein Organismus in der Lage ist, nach Aufnahme einer definierten Glukosemenge die Blutglukosehomöostase aufrechtzuerhalten. Dazu wird die Blutglukose zu bestimmten Zeitpunkten nach der Aufnahme von Glukose gemessen.

Für die Messungen wurden 4 WT und 3 Sirt6 albuCre $-/-$ Tiere im Alter von 2,5 Monaten ausgewählt. Nach einer Futterkarenz von 16 Stunden wurde der nüchterne Blutzuckerspiegel bestimmt und anschließend Glukose zu 2g je Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal gespritzt. Dann wurde der Blutzuckerspiegel nach 15, 30, 60 und 120 Minuten gemessen. Die nüchternen Werte waren bei beiden Gruppen gleich, doch schon bei der 15 min Messung zeigten Sirt6 albuCre $-/-$ Tiere deutlich erniedrigte Blutglukosewerte. Dieser Unterschied war auch nach 30 und 60 min noch zu sehen, erreichte aber nach 120 min in beiden Gruppen die vorher bestimmten nüchternen Ausgangswerte (Abbildung 14, GTT).

Zwei Wochen nach dem GTT wurde auch der Insulintoleranztest (ITT) an den selben Tieren durchgeführt. Ebenfalls nach einer Futterkarenz von 16 Stunden und nachdem der Blutglukose-Ausgangswert bestimmt wurde, wurden den Mäusen 0,6 Units Insulin/kg Körpergewicht intraperitoneal gespritzt. Auch hier wurden Messungen nach 15, 30, 60 und 120 min durchgeführt. Schon bei der Ausgangswertbestimmung zeigten Sirt6 albuCre $-/-$ Mäuse einen deutlich erniedrigten Blutzuckerspiegel, der bis zur 60 min Messung annähernd konstant blieb. Nach 120 min konnte jedoch kein Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Abbildung 14, ITT).

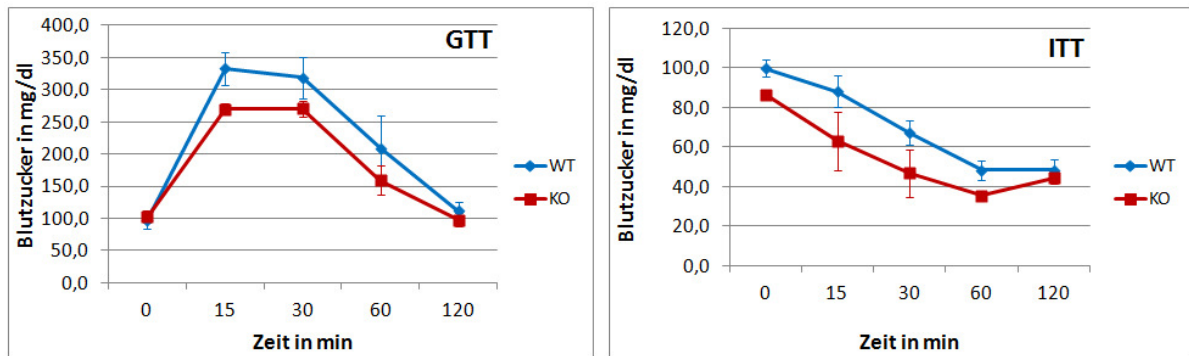


Abbildung 14: Glukosetoleranztest (GTT) und Insulintoleranztest (ITT) nach 16 stündiger Futterkarenz.

Die Messungen wurden an 4 WT und 3 Sirt6 albumin-Cre $-/-$ Tieren im Alter von 2,5 Monaten durchgeführt. **GTT**) Erniedrigte Blutglukosewerte bei Sirt6 KO Mäusen nach intraperitonealer Glukoseinjektion. Ausgangs- und Endwerte waren jedoch gleich. **ITT**) Im Durchschnitt erniedrigte Glukosespiegel nach Injektion von Insulin in Sirt6 albumin Cre KO Tieren. Jedoch kein Unterschied nach 120 min mehr feststellbar.); dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; statistische Signifikanz (Student's t-Test): nicht signifikant

Nach dem GTT und dem ITT wurde die Leber dieser Mäuse zu einer histologischen Untersuchung herangezogen. Dazu wurden kleine Gewebestückchen entnommen, fixiert und anschließend 8-10 μ m dicke Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden dann nach erfolgter HE-Färbung untersucht. In Wildtyp- und heterozygoten Sirt6 albumin Cre Knock Out Mäusen waren nur wenige eosinophile Hepatozyten erkennbar (siehe Markierung durch Pfeile, Abbildung 15A und B), wohingegen homozygote Mäuse eine deutlich höhere Anzahl an eosinophilen Hepatozyten aufwiesen (Pfeile, Abbildung 15C). Zudem fiel die Vakuolisierung in der Leber der homozygoten Tiere (Sternchen, Abbildung 15C) deutlich stärker aus als in den Wildtypen und Heterozygoten (Sternchen, Abbildung 15A und B, respektive).

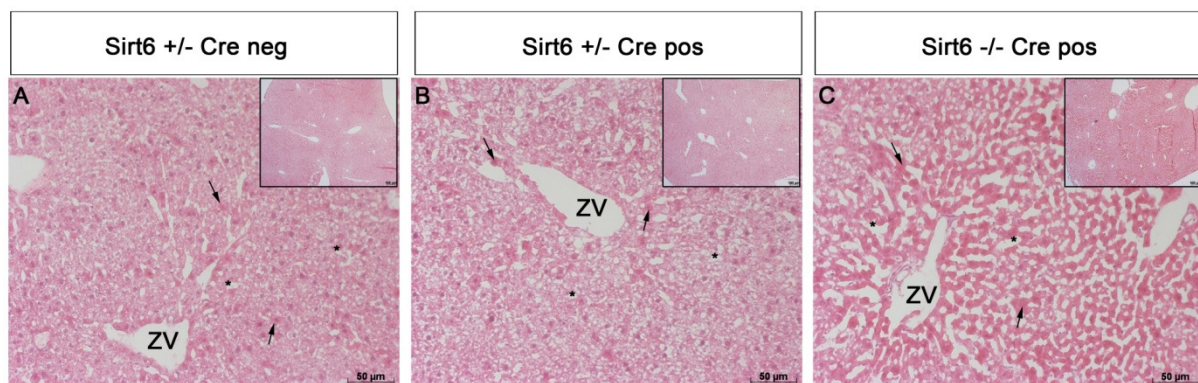


Abbildung 15: HE-Färbung auf Leberschnitten von Sirt6 Albumin Cre Mäusen.

Leberschnitte von 2,5 Monate alten Sirt6 albumin Cre Mäusen wurden durch eine HE-Färbung untersucht. **A)** Wildtyp **B)** heterozygoter Sirt6 albumin Cre Knock Out **C)** homozygoter Sirt6 albumin Cre Knock Out. In der Leber von Wildtyp und heterozygoten Tieren sind nur wenige eosinophile Hepatozyten zu erkennen (Markierung durch Pfeile, A und B) wohingegen in homozygoten Tieren sehr viele zu sehen sind (Pfeile, C). Außerdem ist eine deutlich stärkere Vakuolisierung auf den Leberschnitten der homozygoten Mäuse zu erkennen (Sternchen, C) während die Vakuolisierung in den Wildtyp (Sternchen, A) und heterozygoten Mäusen (Sternchen, B) noch sehr schwach ausgeprägt ist. ZV, zentrale Vene, n = 3 je Genotyp

3.2 Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) basiertes Screening nach potentiellen Interaktionspartnern der Sirtuine 1, 6 und 7

Zu Beginn dieser Arbeit war die Anzahl an bekannten Interaktionspartnern der Sirtuine noch sehr gering. Zwar waren für Sirt1 schon einige Kandidaten beschrieben (p53, FOXO4, E2F1, p73 und FOXO3a), jedoch nicht für Sirt6 und Sirt7. Interaktionspartner können aber einen Einblick in mögliche Funktionen der untersuchten Proteine geben und liefern oftmals Ansatzpunkte um die Beteiligung an neuen unbekanntem Signalwegen zu entschlüsseln. Aus diesem Grund sollte ein SILAC basiertes Screening nach potentiellen Interaktionspartnern durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden die offenen Leseraster (engl. open reading frame, ORF) von Sirt1, 6 und 7 in entsprechende Expressionsvektoren kloniert, die entweder mit YFP (yellow fluorescent protein)- oder CFP (cyan fluorescent protein)- "getaggt" sind. Dieser Schritt war notwendig, da zum Startzeitpunkt des Screens noch keine geeigneten Antikörper gegen Sirt6 und Sirt7 erhältlich waren, wohingegen es eine Vielzahl an (CGY)FP-Antikörpern gibt. Diese Vektoren, sowie Kontrollvektoren ohne Integrationssequenz wurden dann wechselseitig in mit schweren bzw. leichten Aminosäuren markierten HEK 293T Zellen überexprimiert. Die Markierung der Zellen bzw. deren Proteine mit schweren oder leichten Aminosäuren erlaubte später eine einfache massenspektrometrische Quantifizierung, um echte Interaktionspartner von den vielen unspezifisch bindenden Hintergrundproteinen unterscheiden zu können.

3.2.1 Klonierung der murinen Sirtuine in die pTAG(CGY)FP Expressionsvektoren

Wie schon eingangs erwähnt, waren zum Zeitpunkt des Screenings nur bedingt geeignete Antikörper gegen Sirt6 und Sirt7 erhältlich. Deshalb wurden die murinen cDNA Sequenzen der Sirtuine in Vektoren kloniert, die bereits ein CFP- oder YFP-tag enthielten. Die Klonierung erfolgte dabei im Rahmen des offenen Leserasters des jeweiligen Tag's um ein Fusionsprotein translatieren zu können. Die für die Klonierung verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 13 und die generierten Konstrukte in Tabelle 20 zu finden. Nach erfolgter Klonierung und einer Bestätigung der Richtigkeit der Vektoren durch Sequenzierung, wurden die Konstrukte noch durch Transfektion in unmarkierten HEK 293T Zellen getestet. Für alle 3 Sirtuine konnte die vorher berechnete ungefähre Größe der Fusionsproteine (CFP-Sirt1 ~140 kDa, Sirt6-YFP ~ 64 kDa, Sirt7-YFP ~ 72 kDa und YFP ~ 27 kDa) durch Western Blot mit einem anti (CGY)FP-Antikörper bestätigt werden (Abbildung 16A). Starke, unspezifische Signale im Bereich von 25 - 40 kDa sind wahrscheinlich auf trunkierte Fusionsproteine zurückzuführen, wurden aber in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Durch die Kopplung der Sirtuine an Fluoreszenzmarker konnte zudem auch die Lokalisierung der Fusionsproteine untersucht werden. Nach Überexpression in U2OS Zellen wurden diese

fixiert und deren Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Die Bilder in Abbildung 16B bestätigen die nukleäre Lokalisierung von Sirt1 und Sirt6 und die meist nukleoläre von Sirt7.

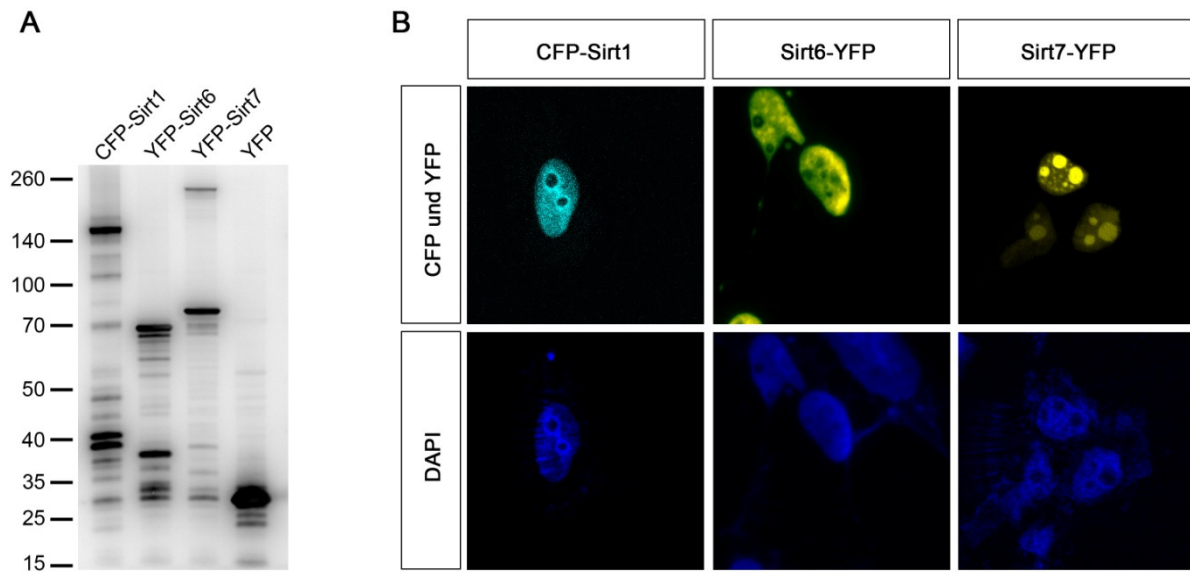


Abbildung 16: Überprüfung der Funktionalität der Sirt1, Sirt6 und Sirt7 Fusionsproteine.

A) Western Blot Analyse der Sirtuine nach Überexpression in HEK 293T Zellen. 10 μ g des entsprechenden Zelllysates wurde aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Darstellung der Sirtuin-Fusionsproteine erfolgte mittels (CGY)FP-Antikörper. Für CFP-Sirt1 sollte eine Bande bei ca. 140 kDa, für Sirt6-YFP bei \sim 64 kDa, für Sirt7-YFP bei \sim 72 kDa und für das YFP bei ca. 27 kDa detektiert werden. Bandengrößen des Markers sind in Kilodalton (kDa) angegeben. **B)** Immunofluoreszenzbilder nach Überexpression der Sirtuine in U2OS Zellen. Nukleäre Lokalisation von CFP-Sirt1 und Sirt6-YFP, Nukleoläre Lokalisation von Sirt7-YFP. Gegenfärbung der Zellkerne durch DAPI.

3.2.2 Expression der Konstrukte in SILAC markierten HEK 293T Zellen und anschließende Immunopräzipitation

Im Wesentlichen basiert die SILAC Methode auf dem metabolischen Einbau essentieller Aminosäuren in Zellkulturen. In entsprechenden Nährmedien werden essentielle Aminosäuren gegen schwere Aminosäuren ausgetauscht, deren Kohlenstoff und/oder Stickstoffatome mit stabilen Isotopen (^{13}C bzw. ^{15}N) markiert sind. Dies bedeutet für das hier verwendete Lysin-8 eine Zunahme der Molmasse von 8 Dalton und beim Arginin-10 eine Zunahme von 10 Dalton. Die HEK 293T Zellen wurden für 10 Tage mit dem schweren bzw. leichten Nährmedium gefüttert und dann mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert. Die Transfektion der Sirtuin Plasmide erfolgte dabei in den schweren markierten Zellen und die der Kontrollplasmide (leere CFP bzw. YFP Vektoren) in den leichten unmarkierten Zellen. Zur Kontrolle wurde ebenfalls das Kreuzexperiment durchgeführt, bei dem die Transfektion in den jeweils anderen Zellen erfolgte. Nach 48 stündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Immunpräzipitation (IP) mit dem (CGY)FP-Antikörper durchgeführt. Potentielle Interaktionspartner von Sirt1, Sirt6 und Sirt7 wurden auf diese Weise kopräzipitiert. Die

markierten Lysate der IP wurden dann mit den entsprechenden unmarkierten Kontrolllysaten gemischt, durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt. In Abbildung 17A ist das Ergebnis einer IP exemplarisch dargestellt. Das Gel wurde dann mit einer Maske versehen (Abbildung 17B), anhand derer die Gelstücke ausgeschnitten und für die anschließende massenspektrometrische Analyse aufbereitet wurden. Die Aufbereitung umfasste im Wesentlichen den tryptischen Verdau des repräsentativen Gelstücks mit anschließender Extraktion der verdauten Peptide aus den Gelstücken sowie deren Beladung einer C18 Säule.

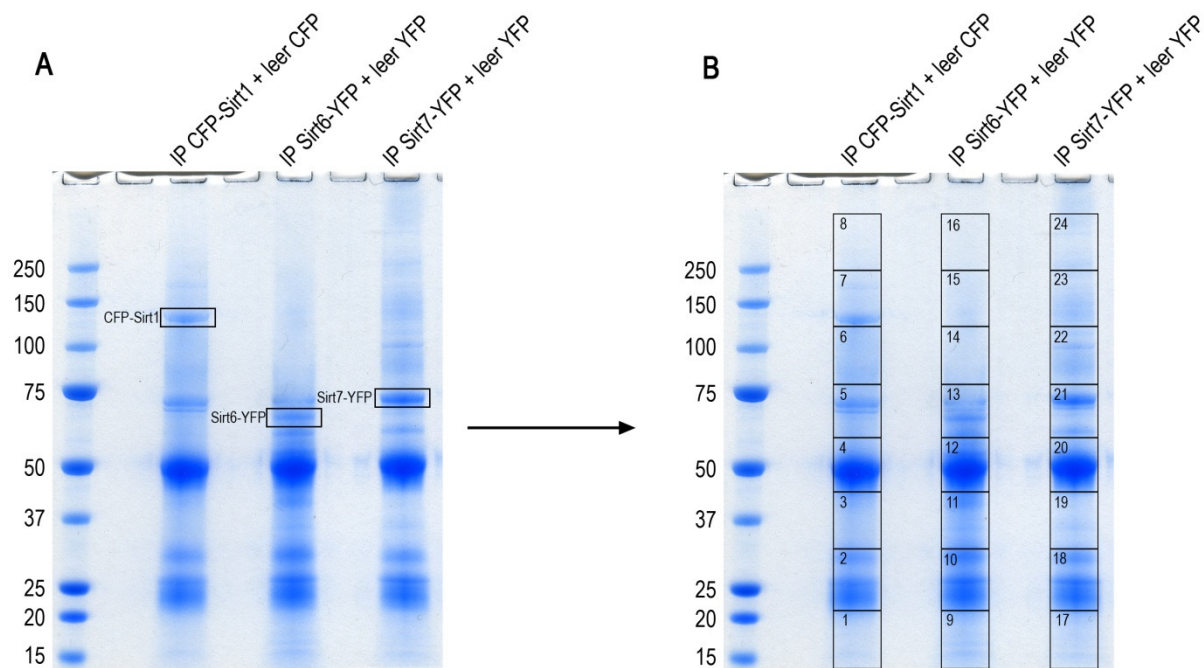


Abbildung 17: Coomassie gefärbte Gele der Sirtuin Immunpräzipitation (IP).

A) Gelbild der IP nach Auftrennung und Coomassie Färbung. Immunpräzipitiertes Sirt1, Sirt6 und Sirt7 ist entsprechend markiert. **B)** Gelbild aus A das mit einem Raster versehen wurde, anhand dessen die Gelstücke nummeriert, ausgeschnitten und für spätere massenspektrometrische Analysen aufbereitet worden sind. Die Angabe des Größenstandards erfolgte in Kilodalton (kDa).

3.2.3 Identifizierung potentieller Interaktionspartner von Sirt1, Sirt6 und Sirt7

Die Analyse der gewonnenen Peptide aus den Gelstücken der einzelnen Sirt-IP's erfolgte mittels eines Agilent 1200 nanoflow Flüssigchromatograph (LC) Systems, das über eine Nanoelektrospray Quelle mit einem LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer verbunden wurde. Mithilfe der MaxQuant Software wurden die Rohdaten in ein MASCOT konformes Format umgewandelt und durch die MASCOT Version 2.2.02 zur Datenbanksuche und Proteinidentifikation analysiert. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst und die Schnittmenge der potentiellen Interaktionspartner für Sirt1, Sirt6 und Sirt7 sortiert und ausgewertet. Insgesamt konnten 1016 Proteine identifiziert werden.

Anschließend konnten für Sirt1 247, für Sirt6 320 und für Sirt7 337 potentielle Interaktionspartner quantifiziert werden. Letztendlich entschied das Verhältnis der Intensitäten aus den quantifizierten Peptiden der Sirtuin-IP zu den quantifizierten Peptiden der Kontroll-IP (H/L Ratio) darüber, ob der gefundene Interaktionspartner auch potentiell interessant ist. Ab einem H/L Ratio von ≥ 2 wurden die Proteine zu einer genaueren Untersuchung herangezogen. Eine Auflistung der gefundenen möglichen Interaktionspartner der drei hier untersuchten Sirtuine ist im Anhang zu finden.

3.2.4 Analyse Sirt6 spezifischer Interaktionspartner

Das SILAC basierte Screening nach Interaktionspartnern für Sirt1, Sirt6 und Sirt7 lieferte interessante potentielle Bindungspartner für alle drei untersuchten Sirtuine. In dieser Arbeit wurde sich allerdings auf die genauere Analyse der Sirt6 spezifischen Interaktionspartner beschränkt. Für eine genauere Untersuchung wurden die in Tabelle 23 aufgeführten Proteine herangezogen. Ein bereits bekannter und bestätigter Interaktionspartner von Sirt6 ist Poly [ADP-ribose] Polymerase 1 (PARP1). Hier wurde gezeigt, das Sirt6 unter Stress mit PARP1 interagiert und dessen Aktivität steigert und somit DNA-Reparaturmechanismen reguliert (Mao *et al.*, 2011).

Tabelle 23: Liste der ausgewählten möglichen Interaktionspartner von Sirt6.

Auflistung jener potentieller Interaktionspartner von Sirt6, die einer genaueren Analyse unterzogen wurden.

Gen Name	Protein Name
FMR1	Fragile X mental retardation 1 protein
G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1
GFAT1	Glutamine:fructose 6 phosphate amidotransferase 1
IGF2BP2	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2
IGF2BP3	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3
PABP1	Polyadenylate-binding protein 1

Als erstes sollte mittels Co-Immunopräzipitation ein weiterer Nachweis für die Interaktion zwischen Sirt6 und den potentiellen Interaktionspartnern erbracht werden. Zu diesem Zweck wurden die offenen Leseraster einiger Kandidaten in den pcDNA 5TO Expressionsvektor kloniert. Dieser Vektor enthält unter anderem die zweifache Ausführung der "FLAG-Tag" Sequenz welche für das FLAG-Antigen codiert und vom monoklonalen FLAG M2 Antikörper erkannt wird. Durch die Klonierung in das Leseraster der FLAG Sequenz entstehen Fusionsproteine mit einem C-terminalen FLAG-Tag. Dieser Schritt war wiederum nötig, da für die hier ausgesuchten Proteine zwar Antikörper zur Detektion im Western Blot vorhanden waren, diese aber nicht für eine Immunopräzipitation geeignet sind. Die eingeführten FLAG-

Epitope erlauben somit eine Immunopräzipitation und spätere Detektion durch Western Blot Analysen. Die verschiedenen Gensequenzen wurden mit Hilfe einer PCR generiert, wobei die Primer zusätzliche Restriktionsschnittstellen für eine gerichtete Klonierung in den pcDNA 5TO Vektor enthielten. In den pcDNA 5TO Vektor wurden allerdings nur 3 der in Tabelle 23 aufgeführten Gene kloniert. Konstrukte für IGF2BP2 und IGF2BP3 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier zur Verfügung gestellt. Hier erfolgte die Klonierung in den pcDNA 3.1 (+) Vektor in das Leseraster einer einfachen FLAG Sequenz. Somit können hier Fusionsproteine mit N-terminalem FLAG-Tag hergestellt werden. Das PABP1-pTracer CMV Konstrukt wurde von Jian Fang zur Verfügung gestellt. Auch hier entsteht ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen FLAG-Tag.

Zum Nachweis der Interaktion wurden die jeweiligen Konstrukte der möglichen Bindungspartner zusammen mit dem Sirt6-YFP Konstrukt in HEK 293T Zellen überexprimiert. Nach 48 Stunden erfolgte dann die Zellyse mit anschließender Immunopräzipitation des Sirt6-YFP Fusionsproteins mit dem (CGY)FP Antikörper bzw. mit dem FLAG Antikörper über "Sephrose-Beads". Die tatsächlichen Interaktionspartner sollten auf diese Weise co-präzipitiert werden. Zur Kontrolle wurde die Co-Immunopräzipitation auch mit einem IgG-Kontroll Antikörper durchgeführt, um unspezifische Bindungen anzuzeigen. In Abbildung 18A sind die Ergebnisse der Sirt6-YFP Präzipitation und anschließender Western Blot Analyse mit dem FLAG Antikörper zu sehen. Es konnte hierbei nachgewiesen werden, dass alle hier untersuchten potentiellen Interaktionspartner in diesem experimentellen Ansatz mit Sirt6 interagieren. Es konnte aber auch festgestellt werden, dass einige der FLAG-Fusionsproteine indirekt an die Sepharose gebunden haben. Allerdings ist diese unspezifische Bindung deutlich schwächer als die spezifische über den Antikörper und die Sepharose. Zusätzlich wurde auch das Kreuzexperiment durchgeführt, indem der jeweilige mögliche Bindungspartner mittels dem FLAG Antikörper präzipitiert und danach Sirt6-YFP durch den (CGY)FP Antikörper im Western Blot dargestellt wurde (Abbildung 18B). Dazu wurden die selben Zellysate wie schon für die Sirt6-YFP Präzipitation verwendet. Auch hier bestätigten sich die Ergebnisse der Sirt6 Präzipitation, wenngleich die Intensitäten der Signale in der IP im Vergleich zu den Signalen der Sirt6 IP's etwas schwächer waren. Zudem ist zu erkennen, dass auch Sirt6-YFP indirekt an die Sepharose bindet. Allerdings sind auch hier die Intensitäten der IgG Kontroll-IP Signale deutlich schwächer als jene der spezifischen IP. Somit konnte die Interaktion von Sirt6 mit allen hier untersuchten Proteinen nachgewiesen werden.

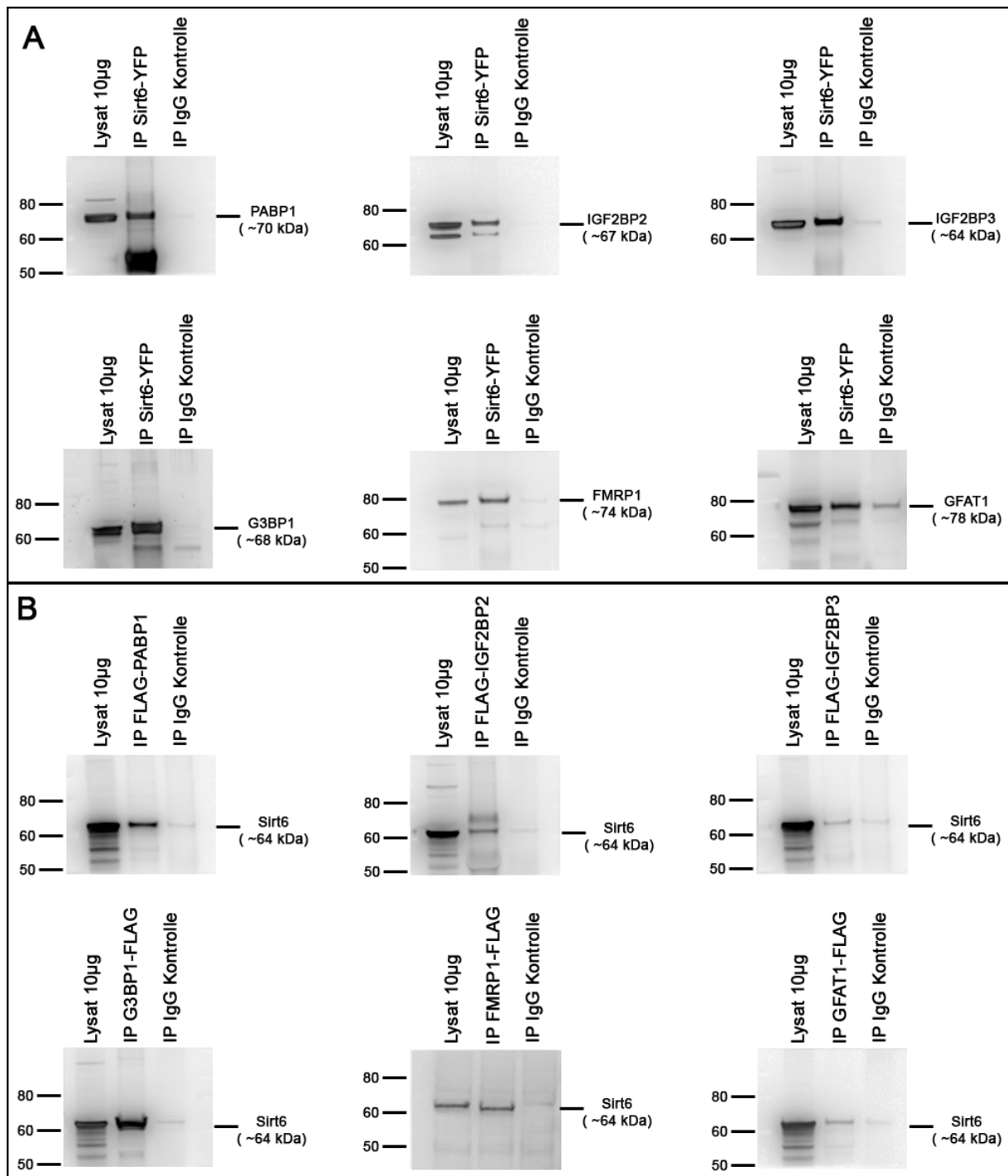


Abbildung 18: Nachweis der Interaktion von Sirt6 mit den potentiellen Bindungspartnern durch Co-Immunopräzipitation.

A) Zum Nachweis der Interaktion von Sirt6 mit den in Tabelle 23 dargestellten Proteinen wurden die FLAG-getaggten potentiellen Interaktionspartner zusammen mit YFP-getaggttem Sirt6 in HEK 293T Zellen überexprimiert. Sirt6 wurde dann mit dem (CGY)FP Antikörper und Sepharose präzipitiert. Der Nachweis von co-präzipitierten Bindungspartnern erfolgte dann nach elektrophoretischer Auftrennung und anschließendem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran durch den FLAG Antikörper. Die zu erwartenden Gewichte der Fusionsproteine sind in Klammern unter dem jeweiligen Namen abgebildet und entsprechen den im Voraus berechneten Gewichten. 10µg des Lysates dienten dem Nachweis der überexprimierten Fusionsproteine. Zur Überprüfung unspezifischer Protein-Antikörper- sowie Protein-Sepharose-Wechselwirkungen wurde zusätzlich eine Präzipitation mit einem IgG-Kontrollantikörper durchgeführt. Für alle hier untersuchten Proteine konnte eine

Interaktion mit Sirt6 nachgewiesen und bestätigt werden. **B)** Analog zu den unter A) beschriebenen Co-Präzipitationen wurden ebenfalls Präzipitationen mittels dem FLAG-Antikörper durchgeführt. Der Nachweis von co-präzipitiertem Sirt6 erfolgte dann durch den (CGY)FP Antikörper. Auch hier konnten alle Interaktionspartner bestätigt werden, obgleich die Signale in den IP's etwas schwächer ausfielen als bei den Co-IP's mit Sirt6.

3.2.4.1 Potentielle Interaktionspartner können in drei Gruppen eingeteilt werden

Viele der durch das SILAC Screening gefundenen potentiellen, sowie die bereits unter 3.2.4 bestätigten Interaktionspartner, können hinsichtlich ihrer Funktion in drei Gruppen eingeteilt werden. Abbildung 19 zeigt eine Übersicht der groben Einteilung. Die erste Gruppe bilden Proteine welche an der Regulation der mRNA Degradation, der Stabilität und der Translation beteiligt sind, wie beispielsweise FMR1, ELAVL2 und die IGF2BP's. Hinsichtlich ihrer speziellen Funktionen und Lokalisierung innerhalb der Zelle können diese Proteine dann noch einmal in zwei Gruppen separiert werden. Zum einen sind das Proteine, die charakteristische Marker für Stresskörperchen (SG, engl. stress granules) sind und zum anderen Marker für Prozessierungskörperchen (PB, engl. processing bodies).

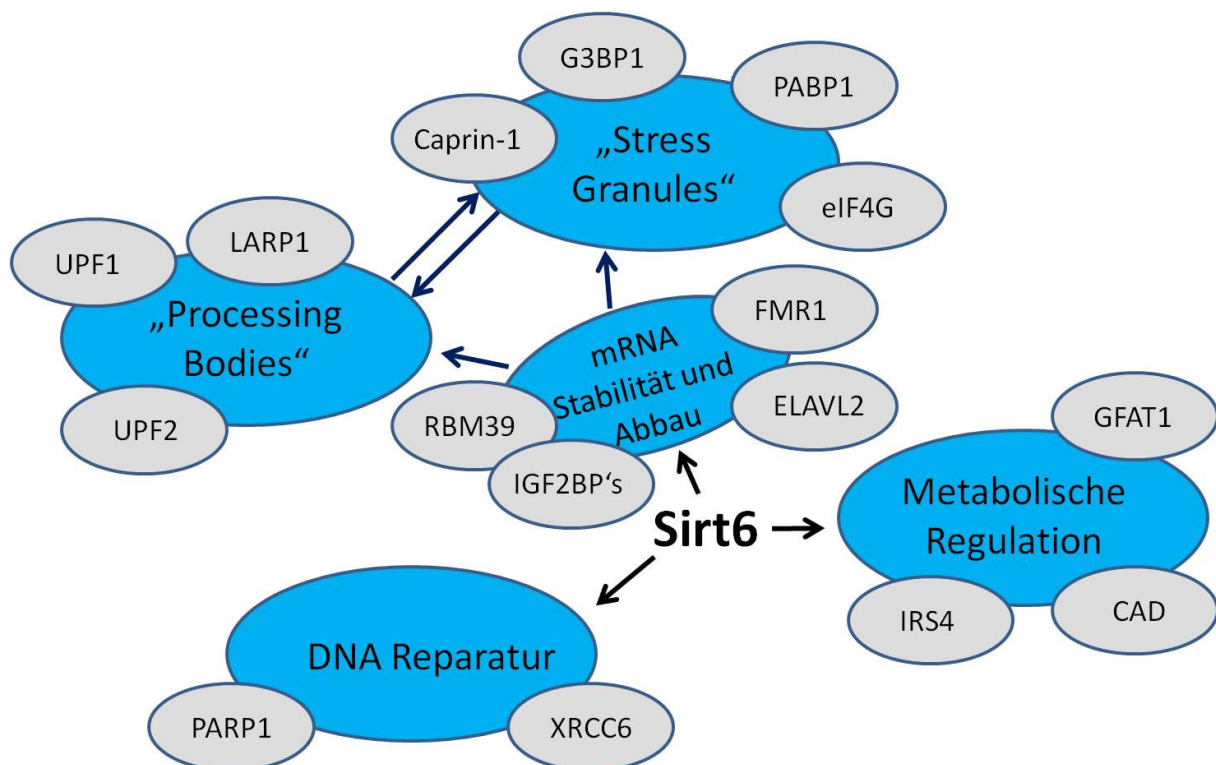


Abbildung 19: Einteilung potentieller Sirt6 Interaktionspartner in drei Gruppen.

Die potentiellen Interaktionspartner von Sirt6 können hinsichtlich ihrer Funktion grob in drei Gruppen eingeteilt werden: 1) Proteine die den mRNA Abbau und die Stabilität regulieren (RBM39, ELAVL2, FMR1 und die IGF2BP's). In Bezug auf die Zellstrukturen in denen die Proteine vorkommen, können 2 Untergruppen gebildet werden. Zu den Stresskörperchen-Proteinen zählen beispielsweise G3BP1 und PABP1 und zu den Prozessierungskörperchen-Proteinen zählen z.B. UPF1 und LARP1. 2) Proteine die an DNA Reparaturmechanismen beteiligt sind (PARP1 und XRCC6) und 3) Proteine die metabolische Prozesse regulieren (IRS4, CAD und GFAT1).

Zu den SG Markern zählen Caprin-1, G3BP1, PABP1 und eIF4G, wohingegen UPF1, UPF2 und LARP1 charakteristische Marker der PB sind. Die zweite große Gruppe bilden Proteine die an DNA Reparaturmechanismen beteiligt sind, wie beispielsweise PARP1 und XRCC6. In die dritte Gruppe fallen Proteine die metabolische Prozesse regulieren. Dazu zählen unter anderem GFAT1, CAD und IRS4.

3.2.4.2 Stress assoziierte Proteine, die den mRNA Abbau und die mRNA Stabilität regulieren

Wie bereits unter 3.2.4.1 beschrieben, können z.B. Caprin-1, G3BP1 und PABP1 hinsichtlich ihrer Funktion in die Gruppe von Proteinen eingeteilt werden, die unmittelbar an der Stressantwort beteiligt sind und den Abbau sowie die Stabilität der mRNA regulieren. Es ist bekannt, dass Zellen auf Stress mit der Bildung sogenannter Stresskörperchen (SG) und Prozessierungskörperchen (PB) reagieren. Stresskörperchen sind zytoplasmatische Strukturen in denen nicht translatierte mRNA in Protein-mRNA-Komplexen gebunden werden. Dies sind meist mRNA Moleküle die nicht für den sofortigen Abbau bestimmt sind, sondern nach Abklingen des Stresses schnell aus dem Komplex entlassen werden können und somit für eine unmittelbar startende Translation zur Verfügung stehen. Dahingegen handelt es sich bei den Prozessierungskörperchen um zytoplasmatische Strukturen welche der Anreicherung und dem Abbau nicht translatierter mRNA dienen. Die Degradation der mRNA wird durch das Vorhandensein mRNA-abbauender Proteine gewährleistet, die sich ebenfalls in diesen Komplexen befinden.

Wie schon in Abbildung 18 gezeigt, konnte eine Interaktion von Sirt6 mit G3BP1, PABP1, FMR1 und den IGF2BP2+3 nachgewiesen werden. Da es sich bei diesen Interaktionspartnern aber auch um RNA-bindende Proteine handelt, die große Komplexe bilden können, stellte sich die Frage ob die so gezeigten Interaktionen auch durch mRNA vermittelt werden. Um diese mögliche indirekte Bindung zu zeigen, wurden die Co-Immunopräzipitationen wie unter 3.2.4 wiederholt. Abweichend wurden die Ansätze hier im letzten Waschschrift aber mit RNase A behandelt, um die mRNA zu verdauen. Bei einer indirekten Bindung von Sirt6 mit dem Interaktionspartner über die mRNA geht dadurch die Bindung verloren und das Signal in der IP verschwindet oder wird schwächer. Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, zeigte eine Analyse der Co-IP von Sirt6 mit PABP1 und IGF2BP2+3 mit durchgeführter RNase A Behandlung eine deutliche Abschwächung des Signals, verglichen zur unbehandelten Co-IP. Die Co-IP's von Sirt6 und G3BP1 bzw. FMR1 mit RNase A Behandlung zeigten hingegen keine Veränderung der detektierten Signale. Es kann daher festgehalten werden, dass die Interaktion von Sirt6 mit PABP1, IGF2BP2 und IGF2BP3 abhängig von der Anwesenheit von mRNA ist.

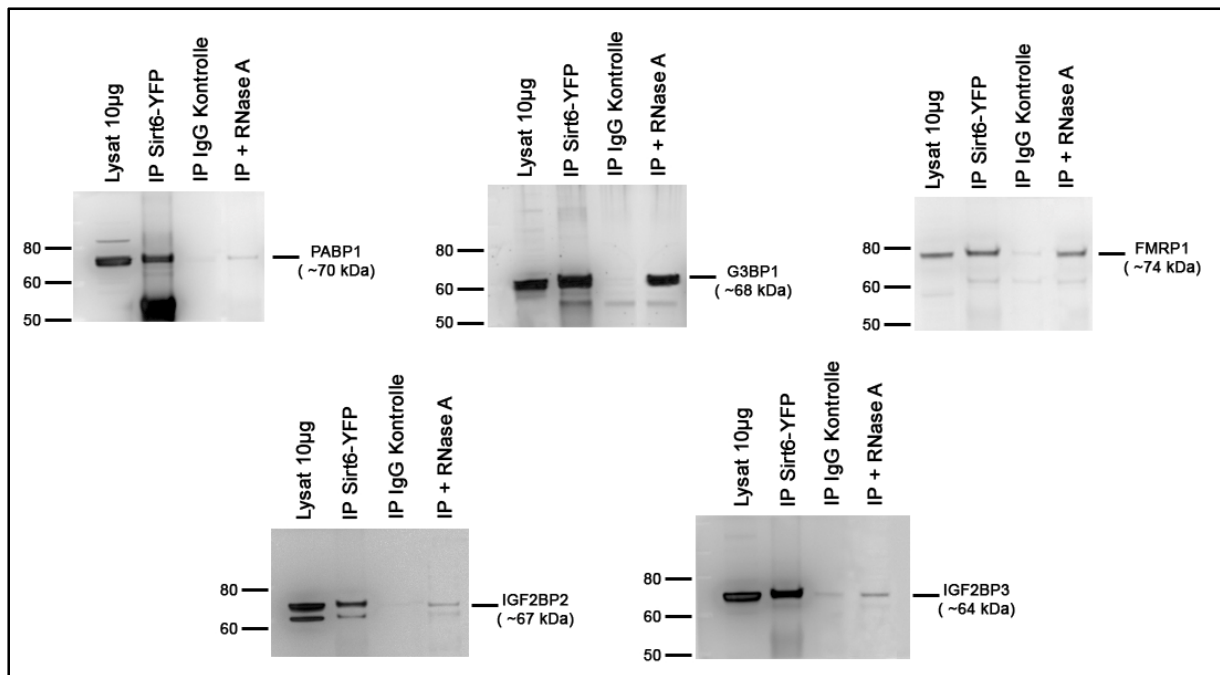


Abbildung 20: Einfluss von RNase A auf die Interaktion von Sirt6 mit den RNA bindenden Proteinen.

Zur Überprüfung einer möglichen mRNA Abhängigkeit der Sirt6 Interaktionen mit PABP1, G3BP1, FMR1 und den IGF2BP's wurden erneut Co-Immunopräzipitationen wie bereits in Abbildung 18 beschrieben, durchgeführt. Die Co-IP erfolgte hierbei aber nur in eine Richtung durch den pull-down von getaggetem Sirt6 durch den (CGY)FP Antikörper. Zusätzlich wurden die Proben im letzten Waschschrift einer 15 minütigen RNase A Behandlung unterzogen. Die Analyse der Co-IP erfolgte dann mittels Western Blot mit dem anti FLAG Antikörper, zum Nachweis der FLAG getaggeten PABP1, G3BP1, FMR1 und IGF2BP's Fusionsproteine. Es ist zu erkennen, dass PABP1 und die IGF2BP2+3 in der RNase A behandelten IP nicht mehr oder nur noch schwach detektiert werden konnten. Die Interaktion von Sirt6 mit G3BP1 und FMR1 ist hingegen nicht mRNA abhängig.

Der Umstand, dass viele der potentiellen Interaktionspartner in Stresskörperchen zu finden sind, legt die Vermutung nahe, dass Sirt6 möglicherweise auch in diesen zu finden ist und dort mit einem der Stressmarker interagiert. Zu diesem Zweck wurden U2OS Zellen mit Sirt6-YFP transfiziert und entweder keinem Stress oder Hitzestress ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen dann fixiert und gegen den SG Marker G3BP1 gefärbt. Abbildung 21 zeigt, dass Sirt6 fast ausschließlich im Nukleus zu finden ist (A-A') und nur vereinzelt eine Expression außerhalb des Nukleus detektiert werden kann (A''). Der SG Marker G3BP1 hingegen zeigt eine Anfärbung in vereinzelt Stresskörperchen (B) oder aber eine gleichmäßige schwache Anfärbung über die gesamte Zelle (B' und B''). Eine Kollokalisierung von Sirt6 und G3BP1 ist deshalb nur schwach im Zellkern zu beobachten (D' und D'').

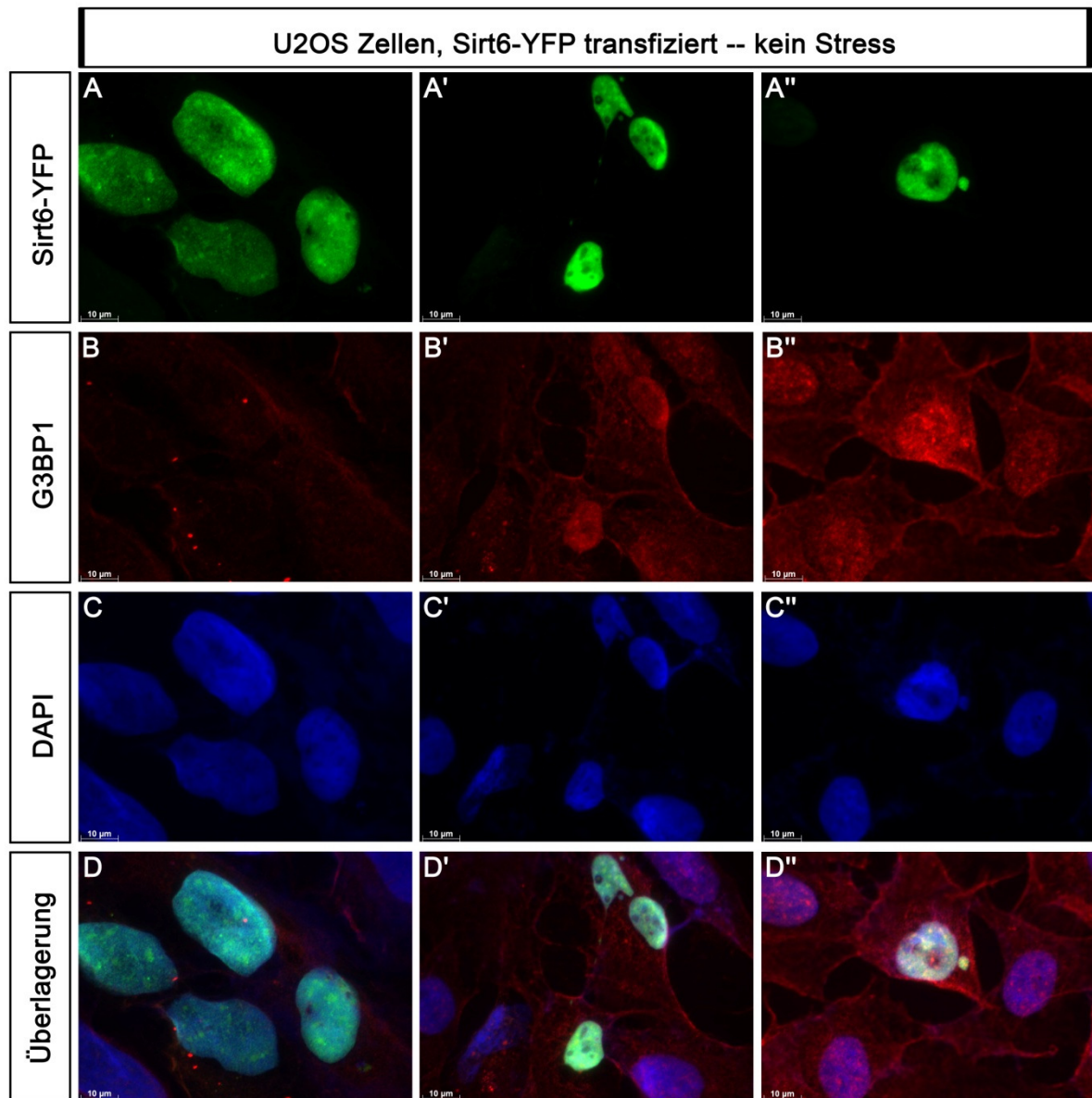


Abbildung 21: Kolokalisierung von Sirt6 und dem Stresskörperchenmarker G3BP1 in ruhenden U2OS Zellen.

Mit Sirt6-YFP transfizierte U2OS Zellen wurden fixiert und gegen G3BP1 (rot) und DAPI (blau) angefärbt. Unter diesen Bedingungen ist Sirt6 fast ausschließlich im Nukleus zu finden (A und A') und nur vereinzelt außerhalb des Nukleus (A''). Der Stressmarker G3BP1 zeigt eine gleichmäßige Verteilung über die gesamte Zelle (B' und B'') und nur vereinzelt eine konzentrierte Lokalisierung in den Stresskörperchen (B). Unter diesen Bedingungen ist eine Kolokalisierung von Sirt6 und G3BP1 somit nur im Zellkern oder zu sehen (D' und D'').

Nach der Induktion von Hitzestress, durch eine Inkubation der Zellen bei 45°C für 1 Stunde, zeigte Sirt6 immer noch eine starke Expression im Nukleus, jedoch konnte auch eine bis dahin unbekannte Anreicherung in den Stresskörperchen beobachtet werden (Abbildung 22, A-A''). Abbildung 22 zeigt auch, dass G3BP1 unter diesen Bedingungen fast ausschließlich nur noch in den SG zu finden ist und keine Anfärbung mehr im Zellkern zu beobachten ist (B-

B''). Eine Überlagerung der Sirt6 und G3BP1 Anfärbung zeigt somit die eindeutige Kolokalisierung beider Proteine in den Stresskörperchen (D-D'').

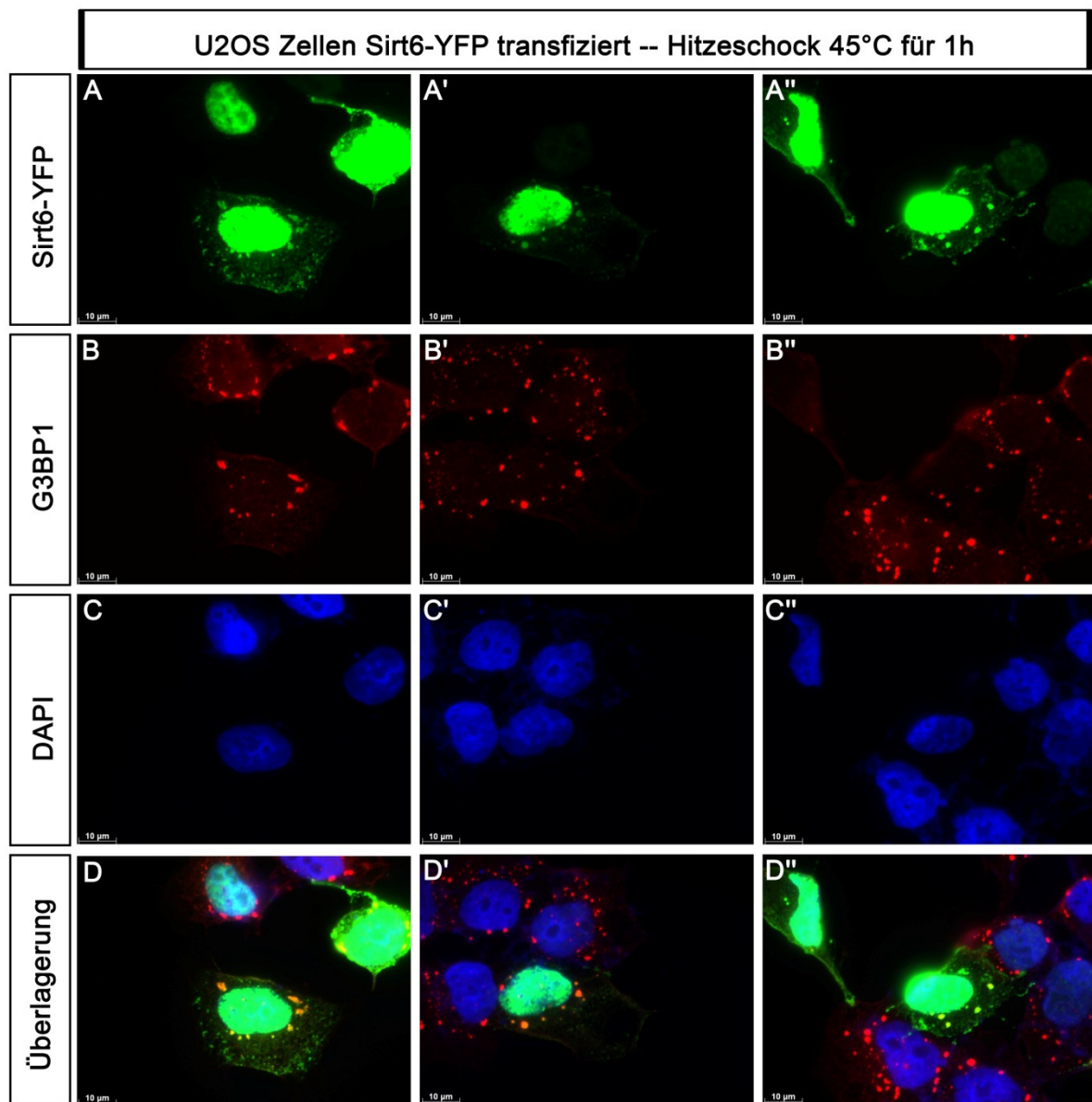


Abbildung 22: Kolokalisierung von Sirt6 und G3BP1 in Stresskörperchen nach Hitzestress.

U2OS Zellen wurden für 24 Stunden mit Sirt6-YFP transfiziert und dann 1 Stunde bei 45°C inkubiert und anschließend fixiert. Die Induktion von Hitzestress sorgte für die Bildung von Stresskörperchen, zu sehen an der G3BP1 Anfärbung (B-B''). Gleichzeitig bewirkt der Hitzestress eine Verlagerung der Sirt6 Expression außerhalb des Nukleus in den SG, wie durch die Überlagerung mit der G3BP1 Anfärbung gezeigt (D-D'').

3.2.4.3 Proteine involviert in DNA Reparaturmechanismen

Wie bereits unter 3.2.4.1 beschrieben, können PARP1 und XRCC6 in die Gruppe der Proteine eingeteilt werden, die an der Regulierung von DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind. Für PARP1 ist eine Interaktion mit Sirt6 bereits beschrieben (Mao *et al.*, 2011). Hier konnte gezeigt werden, dass unter DNA schädigenden Bedingungen Sirt6 mit PARP1

interagiert und PARP1 dann durch Sirt6 mono-ADP-ribosyliert wird. Dadurch wird PARP1 aktiviert und poly-ADP-ribosyliert andere Proteine die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Eine Sirt6 Mutante (G60A), bei der die sechzigste Aminosäure Glyzin durch Alanin ausgetauscht wurde, ist nicht in der Lage PARP1 zu ribosylieren und zu aktivieren. Somit kann der Phänotyp Sirt6 defizienter Zellen, charakterisiert durch einen fehlerhaften Basenaustausch-Reparatur-Mechanismus (BER) und genomische Instabilität, erklärt werden. In dieser Arbeit wurde aber auf eine erneute Verifizierung der Sirt6-PARP1 Interaktion verzichtet.

Auf eine Bestätigung der Sirt6 Interaktion mit XRCC6 (auch bekannt als Ku70) wurde in dieser Arbeit ebenfalls verzichtet. Allerdings zeigen XRCC6 Knock out Mäuse einen ähnlichen Phänotyp wie die Sirt6 Knock out Mäuse. Sie entwickeln sich deutlich langsamer und weisen eine ca. 50%tige Reduktion in ihrer Körpergröße auf, verglichen mit Wildtyp Geschwistertieren. Auch sind XRCC6 defiziente Zellen, ebenso wie Sirt6 Knock out Zellen, sensitiver gegenüber DNA schädigenden Substanzen (Gu *et al.*, 1997). Dieser Befund deutet an, dass auch XRCC6 möglicherweise ein echter Interaktionspartner von Sirt6 ist und sollte unbedingt näher untersucht werden.

3.2.4.4 Proteine die an der Regulation metabolischer Signalwege beteiligt sind

Wie Mostoslavsky und Mitarbeiter 2006 zeigten, spielt der Knock out von Sirt6 eine entscheidende Rolle in der Regulation der Glukosehomöostase (Mostoslavsky *et al.*, 2006). Hier konnte nachgewiesen werden, dass Sirt6 defiziente Mäuse ab dem zwölften Tag nach der Geburt einen stetig sinkenden und ab dem 24. Tag einen kaum mehr detektierbaren Blutzuckerspiegel aufweisen. In dem hier durchgeführten Interaktionspartner-Screening konnten zwei potentielle Interaktionspartner identifiziert werden, die möglicherweise eine unmittelbare Rolle in der Regulierung der Glukose-Signalwege spielen. Dies ist zum einen das Insulin-Rezeptor-Substrat 4 (IRS-4). Einige Mitglieder der IRS-Familie (IRS-1 und IRS-2) unterliegen nach erfolgtem Insulinstimulus einer rapiden Tyrosin-Phosphorylierung. Eine *in vivo* Funktion des IRS-4 ist aber bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt. In dieser Arbeit wurde auf eine Bestätigung der Interaktion von Sirt6 und IRS-4 aber bislang verzichtet.

Der zweite in diesem Screen identifizierte Bindungspartner, der ein Schlüsselenzym eines wichtigen metabolischen Signalweges darstellt, ist ein multifunktionelles Protein mit Carbamoylphosphat-Synthetase II-, Aspartat-Transcarbamoylase- und Dihydroorotase-Aktivität (kurz CAD). CAD katalysiert die ersten drei Schritte der *de novo* Synthese von Pyrimidinen, die der Bereitstellung essentieller Bestandteile der DNA-Synthese und der Proliferation dient (Chen *et al.*, 2005). Auf eine Bestätigung der Interaktion zwischen Sirt6 und CAD wurde bis jetzt ebenfalls in dieser Arbeit verzichtet.

Der dritte potentiell interessante Sirt6 Interaktionspartner, der an einer Regulation metabolischer Signalwege beteiligt ist, ist das Protein glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 1 (GFAT1). Das GFAT1 stellt das Schlüsselenzym des Hexosamin-Biosyntheseweges (HBW) dar und wird im nächsten Abschnitt genauer untersucht.

3.2.4.5 Sirt6 interagiert mit glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 1 (GFAT1) und reguliert dessen Aktivität

Der Hexosamin-Biosyntheseweg (HBW) entspringt der Glykolyse und GFAT1 katalysiert den ersten und entscheidenden Schritt, nämlich die Umwandlung von Fruktose-6-phosphat zu Glukosamin-6-phosphat. Zwar geht nur ein geringer Teil (1-3%) des Fruktose-6-phosphates in den HBW, neueste Untersuchungen zeigen aber, dass der Hexosamin-Biosyntheseweg wohl eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Diabetes spielt. Im folgenden wurde die Interaktion mit Sirt6 genauer untersucht und erste Analysen hinsichtlich einer Regulierung der Expression und Aktivität von GFAT1 durch Sirt6 angestrengt.

Da die Interaktion von Sirt6 und GFAT1, wie in Abbildung 18 gezeigt, bereits bestätigt werden konnte aber für einige Interaktionen eine RNA-Abhängigkeit bestand (Abbildung 20), sollte dies auch für GFAT1 untersucht werden. Dazu wurden erneut Sirt6-YFP und GFAT1-FLAG in HEK 293T Zellen überexprimiert und anschließend Sirt6 mittels dem anti (CGY)FP Antikörper immunopräzipitiert. Auch hier erfolgte bei einer der IP's eine Behandlung mit RNase A im letzten Waschschrift um die mRNA zu verdauen. Der Nachweis der Interaktion erfolgte durch Darstellung von GFAT1 mittels dem anti FLAG M2 Antikörper. Abbildung 23 zeigt erneut eine Bestätigung der Sirt6 Interaktion mit GFAT1 und auch in der Kontroll-IP ist ein Signal detektierbar, welches aber deutlich schwächer ist, als das der Sirt6-IP. Eine Behandlung mit RNase A hatte keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen Sirt6 und GFAT1. Die Bindung zwischen Sirt6 und GFAT1 ist somit nicht abhängig von der Anwesenheit von mRNA.

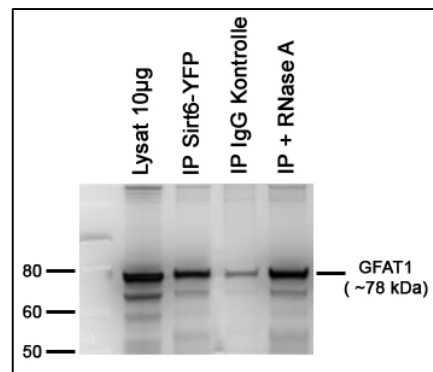


Abbildung 23: Einfluss von RNase A auf die Interaktion von Sirt6 mit GFAT1.

Analog zur Überprüfung der mRNA Abhängigkeit einiger Interaktionspartner wie in Abbildung 20 gezeigt, wurde der Einfluss von RNase A auf Interaktion von Sirt6 und GFAT1 überprüft. Auch hier erfolgte der pulldown nur in eine Richtung. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit RNase A keinen Einfluss auf Bindung von Sirt6 und GFAT1 hat und diese somit nicht abhängig von der Anwesenheit von mRNA ist. In der Kontroll-IP konnte ebenfalls GFAT1 detektiert werden, dieses Signal ist aber deutlich schwächer als das der Sirt6-IP oder der RNase A IP.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob auch GFAT1 mit Sirt6 in der Zelle kolokalisiert. Da für Sirt6 eine zytoplasmatische Lokalisierung bisher nur unter Hitzestressbedingungen zu sehen war, sollte auch hier die Expression von Sirt6 und GFAT1 unter Stressbedingungen untersucht werden. Dazu wurden Sirt6-YFP und GFAT1-FLAG in U2OS Zellen koexprimiert und dessen Expression nach Stressinduktion analysiert. Abbildung 24 zeigt, dass unter normalen Bedingungen Sirt6 im Kern lokalisiert ist (A) und GFAT1 hauptsächlich im Zytoplasma exprimiert wird (C). Zudem sind unter normalen Bedingungen nur wenige Stresskörperchen durch die Anfärbung mit dem G3BP1 Antikörper zu sehen (B). Nach der Induktion von Stress durch eine Inkubation bei 45°C für eine Stunde kommt es zu einer deutlich erhöhten Bildung von Stresskörperchen (B'). Zudem zeigt sich eine geringe Expression von Sirt6 in einzelnen Stresskörperchen (A'). Auch GFAT1 wird unter Stressbedingungen vereinzelt in den Stresskörperchen exprimiert (C') und kolokalisiert dort mit Sirt6 (E').

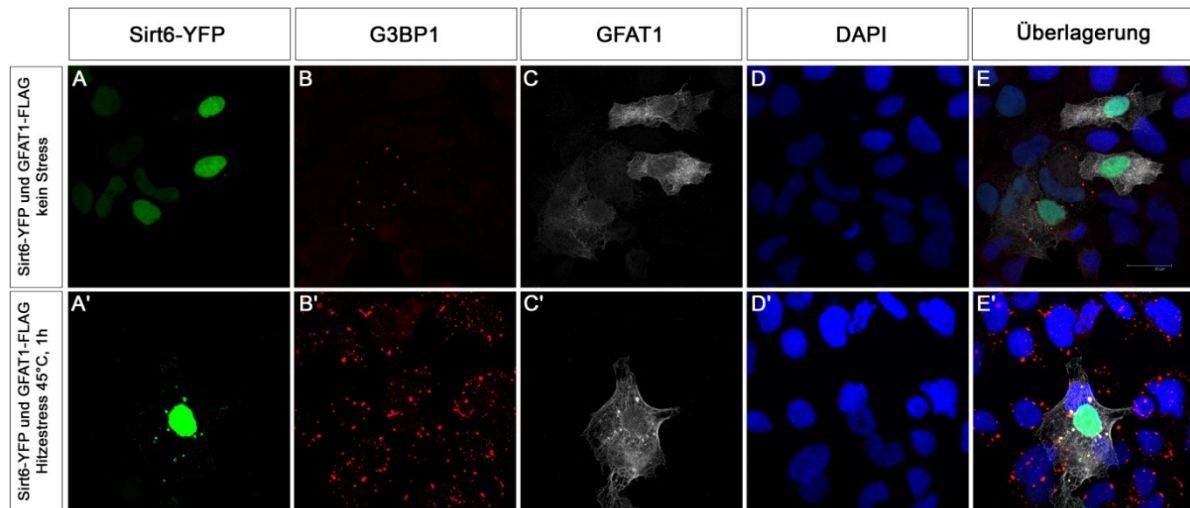


Abbildung 24: Kolokalisierung von Sirt6 und GFAT1 in Stresskörperchen.

Überexpression von Sirt6-YFP und GFAT1-FLAG in U2OS Zellen unter Normal- und Hitze stressbedingungen. Die Darstellung von Sirt6 erfolgte über den (CGY)FP Antikörper, die von GFAT1 über den FLAG M2 Antikörper und die der Stresskörperchen über den G3BP1 Antikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Keine Kolokalisierung von Sirt6 und GFAT1 unter normalen Bedingungen, sowie nur eine geringe Anzahl an kleinen Stresskörperchen sichtbar. Nach Hitze stress kommt es zur vermehrten Bildung von Stresskörperchen und eine Kolokalisierung von Sirt6 und GFAT1 in einzelnen Stresskörperchen ist nachweisbar.

Im Folgenden wurde untersucht, ob Sirt6 einen Einfluss auf den Hexosamin-Biosyntheseweg oder auf die Aktivität von GFAT1 hat. Da der Hexosamin-Biosyntheseweg in der reversiblen O-Glykosylierung von Proteinen resultiert, sollte als erstes das globale Protein-Glykosylierungslevel in Wildtyp und Sirt6 Knock Out Mäusen untersucht werden. Zunächst wurden isolierte Leberzellen adulter Sirt6 albumin Cre und Wildtyp Mäuse zur Untersuchung herangezogen. Die Leberzellen wurden aus dem Gewebe extrahiert und deren Proteinlysate mittels Western Blot analysiert. Es zeigte sich, dass das globale O-Glykosylierungslevel in der Leber von Sirt6 albumin Cre Knock Out Mäusen erhöht gegenüber dem der Wildtyp Mäuse ist (Abbildung 25).

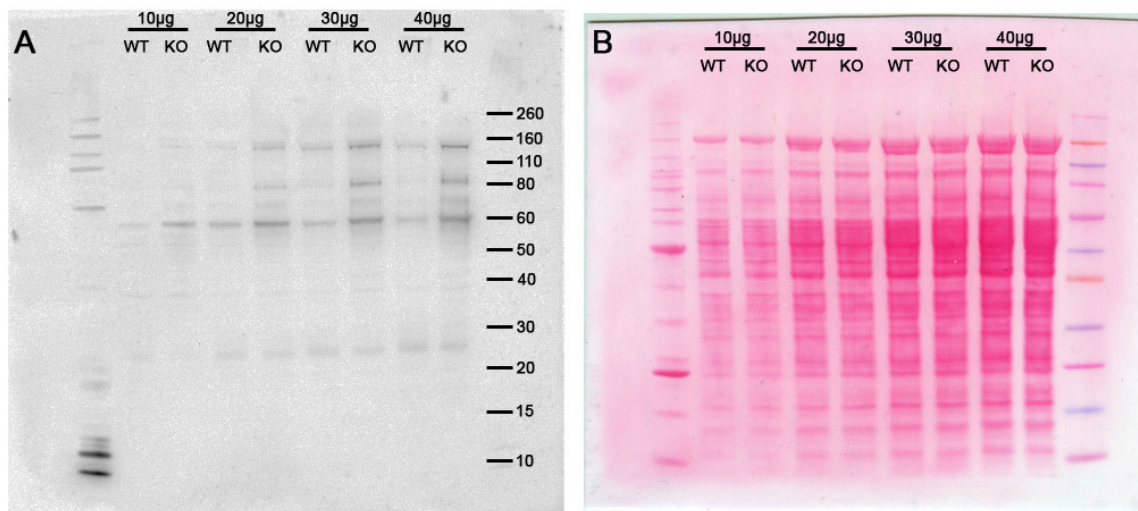


Abbildung 25: Erhöhte Protein-O-Glykosylierung in der Leber adulter Sirt6 albumin Cre Mäuse.

A) Verschiedene Mengen an Gesamtzelllysat isolierter Leberzellen von Wildtyp und Sirt6 Albumin Cre Mäusen wurden durch eine Western Blot Analyse mit dem anti β-O-linked N-Acetylglucosamine Antikörper untersucht. Es zeigte sich eine erhöhte Protein-O-Glykosylierung in den Leberzellen der Sirt6 albumin Cre Mäuse. Die Angabe des Größenstandards erfolgte in Kilodalton (kDa). **B)** Die Ponceau S gefärbte Membran diente als Ladekontrolle. n = 3 je Genotyp

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Protein-O-Glykosylierung oft auch mit einer gesteigerten Stressantwort im endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress) einhergeht (Srinivasan *et al.*, 2009; Zachara *et al.*, 2011). Jüngste Daten sprechen dafür, dass erhöhter ER-Stress auch den Prozess der Autophagie positiv beeinflusst (Kim *et al.*, 2012). Um dies zu überprüfen, sollte die Expression verschiedener ER-Stress und Autophagie Marker Gene in der Leber unter normalen Bedingungen untersucht werden. Marker Gene, dessen Expression mit erhöhtem ER-Stress einhergehen, sind unter anderem GRP78 (engl. glucose regulated protein 78) und CHOP (engl. CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein). Marker Gene die mit dem Prozess der Autophagie verbunden werden sind BECN1 (Beclin 1) und LC3B (auch bekannt als MAP1LC3B, engl. Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B). Lebergewebe von Wildtyp Mäusen und Sirt6 Albumin Cre Knock Out Mäusen wurde entnommen und mittels quantitativer PCR untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression von GRP78 in Sirt6 Albumin Cre Knock Out Tieren doppelt so hoch ist wie in Wildtyp Tieren. Die Expression von CHOP hingegen ist unverändert. Auch die Expression der Autophagie Marker Gene weist keinen Unterschied zwischen Knock Out und Wildtyp Tieren auf. Die Expression von m36B4 (saures ribosomales Phosphoprotein) diente als Referenzgen zur Normalisierung der untersuchten Genexpression.

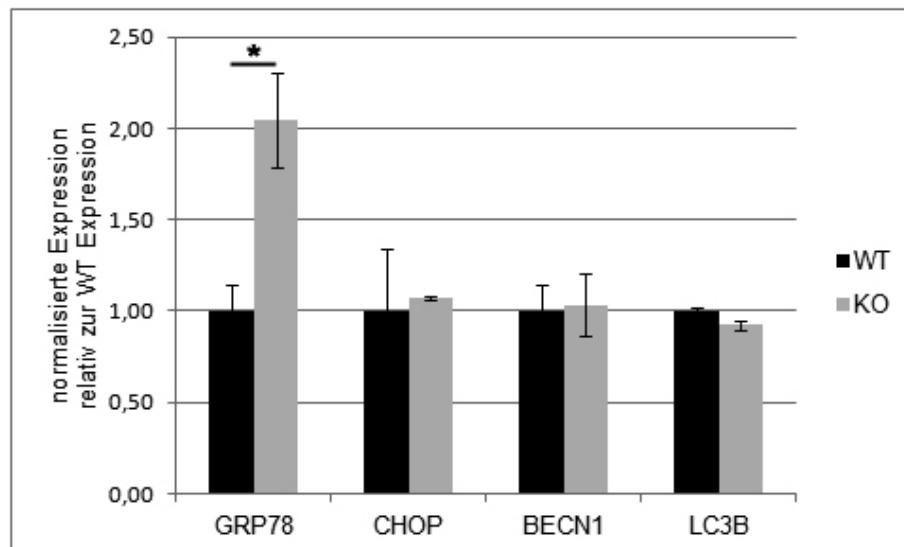


Abbildung 26: Erhöhter Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress) aber keine gesteigerte Expression von Autophagie Marker Genen unter normalen Bedingungen in der Leber von Sirt6 Albumin Cre Knock Out Mäusen.

Die Expression von ER-Stress Marker Genen (GRP78 und CHOP) und Autophagie Marker Genen (BECN1 und LC3B) wurde mittels quantitativer PCR in der Leber von Wildtyp und Sirt6 Albumin Cre Knock Out Tieren unter normalen Bedingungen (ohne zusätzliche Stressinduktion) untersucht. Die Expression von GRP78 im Knock Out ist doppelt so hoch wie in Wildtyp Tieren. Keine Veränderung der Expression konnte hingegen für CHOP, BECN1 und LC3B beobachtet werden. Die Expression wurde auf das Referenzgen m36B4 (saures ribosomales Phosphoprotein) normalisiert. GRP78, engl. glucose regulated protein 78; CHOP, CCAAT/-enhancer-binding protein homologous protein; BECN1 Beclin 1; LC3B, engl. Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (MAP1LC3B); dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; statistische Signifikanz (Student's t-Test) * $p = 0,006$; $n = 3$ je Genotyp

Da eine erhöhte Protein-O-Glykosylierung mehrere Ursachen haben kann, sollte zunächst die Expression von GFAT1 in der Leber von Wildtyp und Sirt6 albumin Cre Knock Out Mäusen analysiert werden. Möglicherweise ist die Expression von GFAT1 in den Sirt6 defizienten Mäusen erhöht, was zu einer gesteigerten HBW Aktivität führt. Leider war es nicht möglich die Expression von GFAT1 in der adulten Leber durch einen aussagekräftigen Western Blot zu belegen, da entweder die Menge an GFAT1 unter dem Detektionslimit des anti GFAT1 Antikörpers lag bzw. dieser zu viel unspezifische Signale detektierte. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Expression von GFAT1 in der embryonalen Leber stärker und dadurch vielleicht besser detektierbar ist. Allerdings ist die Aktivität der albumin Cre Rekombinase altersabhängig. Vier Wochen nach der Geburt beträgt die Effizienz der albumin Cre vermittelten Deletion ca. 50% und steigt nach 6 Wochen auf ca. 90% an (Hayhurst *et al.*, 2001). Deshalb wurde hier auf Embryonen der Sirt6 cmvKO Linie zurückgegriffen. Die gesamte Leber von Embryonen im embryonalen Stadium E14.5 wurde entnommen und in 150 μ l 1xPBS durch sonifizieren lysiert. 35 μ g des Gesamtzelllysates wurden dann mittels Western Blot analysiert. Es konnte beobachtet werden, dass die

Expression von GFAT1 in heterozygoten und homozygoten Sirt6 KO Mäusen keinen signifikanten Unterschied zur Wildtypsituation aufweist (Abbildung 27). Dies lässt vermuten, dass die Ursache für die gesteigerte Protein-O-Glykosylierung vielleicht in einer gesteigerten GFAT1 Aktivität liegt. Zu diesem Zweck sollte als nächstes die Aktivität von GFAT1 in Wildtyp und Sirt6 cmvKO Mutanten untersucht werden.

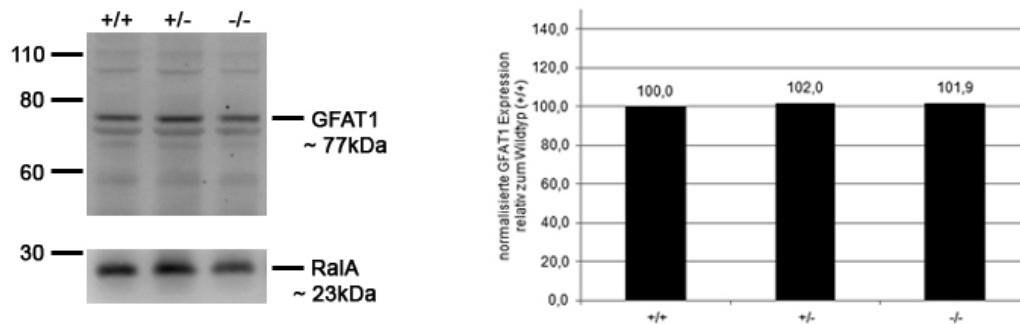


Abbildung 27: Keine Veränderung der GFAT1 Expression in embryonalem Lebergewebe.

Die Western Blot Analyse der GFAT1 Expression in der Leber von Sirt6 cmvKO Mausembryonen des embryonalen Stadiums E14.5 zeigte keine Veränderung zwischen der Wildtypsituation sowie der hetero- bzw. homozygoten Mutante. Die Darstellung von GFAT1 erfolgte durch den anti hGFAT1 Antikörper und die von RalA durch den anti RalA Antikörper. Pro Genotyp wurde die Leber von drei verschiedenen Mäusen zur Untersuchung herangezogen. Die Auswertung der Expressionslevel erfolgte mit der *Quantity One* Software. RalA (Ral GTPase) diente als Ladekontrolle.

Als Ausgangsmaterial für den GFAT1 Assay dienten die selben Leberzelllysate die schon für die Expressionsanalyse untersucht wurden. Der gesamte Assay besteht im wesentlichen darin, dass Fruktose-6-phosphat und Glutamin zusammen mit dem Zelllysate inkubiert werden und die Menge an gebildetem Glukosamin-6-phosphat in weiteren Schritten direkt durch eine Farbreaktion bestimmt wird. Die Intensität des Farbumschlages ist dabei direkt proportional zum vorher gebildeten Glukosamin-6-phosphat. Zusätzlich kann die nicht-proteinogene Aminosäure 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (DON), die als Analogon von Glutamin fungiert, genutzt werden um die Enzymaktivität von GFAT1 zu inhibieren. Die Aktivität von GFAT1 wurde dann auf die GFAT1 Expressionslevel normalisiert, welche durch einen Western Blot bestimmt wurden. Abbildung 28 zeigt, dass Sirt6 cmvKO -/- Embryonen verglichen mit der Wildtypsituation eine gesteigerte GFAT1 Aktivität aufweisen. Da homozygote Sirt6 cmvKO Mäuse nicht länger als 3-4 Wochen lebensfähig sind, kann die GFAT1 Aktivität nicht in der Leber adulter Mäuse bestimmt werden.

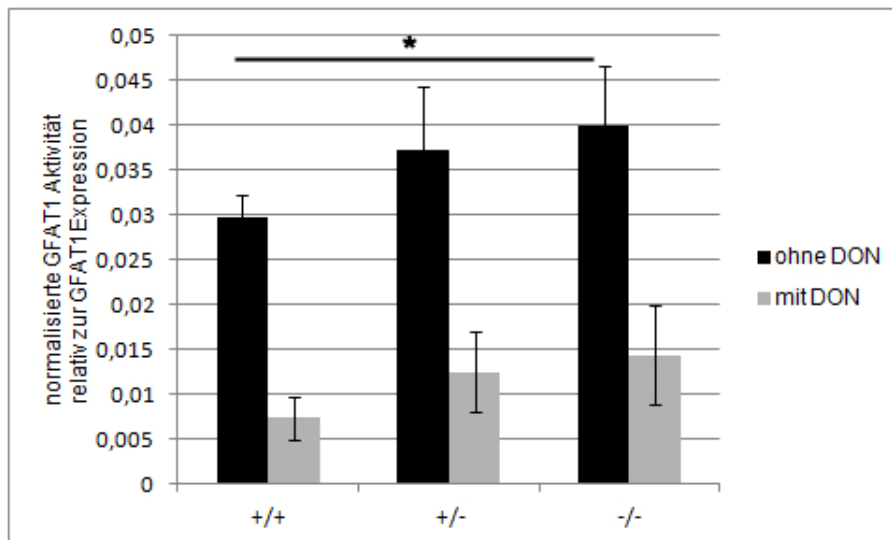


Abbildung 28: Erhöhte GFAT1 Aktivität in der Leber homozygoter Sirt6 cmvKO Embryonen.

Die Berechnung der GFAT1 Aktivität erfolgte über den Umsatz von Fruktose-6-phosphat und Glutamin zu Glukosamin-6-phosphat und Glutamat. In einer Farbumschlagsreaktion wurde dabei die Menge an gebildetem Glukosamin-6-phosphat photometrisch bestimmt, wobei die Intensität der Farbe direkt proportional zum gebildeten Glukosamin-6-phosphat ist. Eine Normalisierung der Aktivität erfolgte über die Bestimmung der GFAT1 Expressionslevel. Es zeigte sich dabei, dass durch den Verlust von Sirt6, GFAT1 eine erhöhte Aktivität aufweist. DON, 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (GFAT Inhibitor); dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; statistische Signifikanz (Student's t-Test): nicht signifikant; * $p = 0,07$; $n = 3$ je Genotyp

Um die Aktivität von GFAT1 unabhängig von der Verfügbarkeit geeigneter Mäuse und unter kontrolliert definierten Bedingungen durchführen zu können, bedarf es der Möglichkeit rekombinantes GFAT1, sowie auch Sirt6 in größeren Mengen *in vitro* zu produzieren. Für die Klonierung wurde hier der pGEX-6P-1 Vektor genutzt, um die fertigen Konstrukte dann in Bakterien überexprimieren zu können. Dieser Vektor enthält bereits die Sequenz für die Glutathion-S-Transferase (GST) gefolgt von einer Erkennungsstelle für die "PreScission"-Protease und einer multiplen Klonierungsstelle. Durch die Klonierung in das Leseraster der GST-Sequenz können somit Fusionsproteine mit einem N-terminalen GST-Tag hergestellt werden. Die Kopplung an das GST-Tag erlaubt später eine einfache Aufreinigung des Fusionsproteins über geeignete Glutathion-Säulen und mittels der "PreScission"-Protease kann das GST-Tag vom gewünschten Protein geschnitten und abgetrennt werden. Die kompletten cDNA Sequenzen von humanem GFAT1 und murinem Sirt6 wurden durch PCR amplifiziert. Die Primer für die PCR enthielten zusätzliche EcoRI und XhoI Restriktionsstellen für eine gerichtete Klonierung der Fragmente in den pGEX-6P-1 Vektor. Die Konstrukte wurden dann in *Escherichia coli* BL21 (DE3) Bakterien transformiert, selektiert und positive Klone für eine Überexpression ausgewählt. Zum Test der Expression wurden positive Klone durch Zugabe von 0,5mM IPTG zur Proteinproduktion induziert und Proben nach 0, 0,5, 1, 2 und 3 Stunden entnommen. Die Analyse des Gesamtzelllysates durch ein

Coomassie-Gel zeigte, dass beide Fusionsproteine erfolgreich und in genügender Menge in Abhängigkeit der Inkubationszeit exprimiert werden können (Abbildung 29).

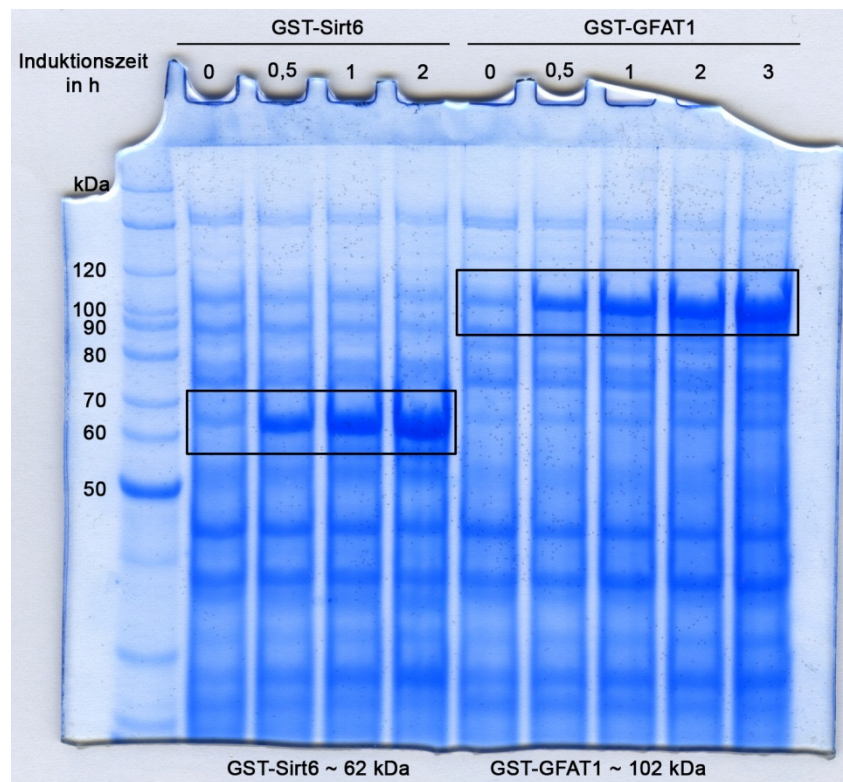


Abbildung 29: Test-Überexpression von GST-Sirt6 und GST-GFAT1.

Mit GST-Sirt6 und GST-GFAT1 transformierte *Escherichia coli* BL21 (DE3) Bakterien wurden kultiviert und die Proteinproduktion mit 0,5mM IPTG induziert. Proben wurden zum Test nach 0, 0,5, 1, 2 und 3 Stunden entnommen und die Überexpression von GST-Sirt6 und GST-GFAT1 im Gesamtlisat durch ein Coomassie-Gel untersucht. Es zeigte sich in Abhängigkeit von der Induktionszeit eine deutliche Überexpression beider Fusionsproteine mit der vorher theoretisch berechneten Größe (siehe schwarze Rahmen).

Im weiteren Verlauf der Überexpressionsexperimente zeigte sich leider, dass zwar genügend GST-Sirt6 und GST-GFAT1 produziert wird, diese Proteine aber in den Bakterien in sogenannten Einschlusskörperchen (EK) eingeschlossen werden. Nach dem Aufschluss der Zellen ist somit nur sehr wenig der Fusionsproteine in der löslichen Fraktion zu finden und die eingeschlossenen Proteine müssen aus der unlöslichen Pellet-Fraktion isoliert werden. Ein Aufschluss der EK ist meist nur unter denaturierenden Bedingungen möglich und erfordert eine anschließende Renaturierung der Fusionsproteine, da unter denaturierenden Bedingungen keine Aufreinigung über eine Glutathion-Säule möglich ist. Ein Verändern der Kulturbedingungen (verschiedene IPTG Konzentrationen sowie unterschiedliche Inkubationstemperaturen, siehe auch 2.2.9) während der Induktionszeit brachte nicht den gewünschten Erfolg und konnte die Bildung von Einschlusskörperchen nicht verhindern. Tao und Mitarbeiter stellten 2010 eine neue Methode vor, bei der das Pellet sehr effizient und

einfach in einer 10%tigen Sarkosyl-Lösung gelöst werden kann (Tao *et al.*, 2010). Ein Versuch zeigte, dass dies auch für beide GST-Fusionsproteine möglich war (Abbildung 30A, Spur 2 für Sirt6 und Abbildung 30B, Spur 2 für GFAT1). Die jeweils dritte Spur der Abbildung 30 A und B zeigt die in Sarkosyl gelösten Fraktionen, die zusätzlich noch über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden, um die Löslichkeit eventuell zu verbessern. Da auch hier die Proteine in der denaturierten Form vorliegen und somit keine Aufreinigung möglich wäre, muss die Sarkosyl-Konzentration verringert werden. Dies geschieht durch die Zugabe von Triton X-100 und CHAPS. Die Endkonzentrationen betragen dann 2% für Sarkosyl, 4% für Triton X-100 und 40 mM für CHAPS. Ein Verringern der Sarkosyl-Konzentration führte leider dazu, dass sowohl GST-Sirt6 als auch GST-GFAT1 ausfielen (Abbildung 30A, Spur 4 für Sirt6 und Abbildung 30B, Spur 4 für GFAT1; löslicher Überstand) und Aggregate bildeten, die dann erneut in der unlöslichen Fraktion zu finden sind (Abbildung 30A, Spur 5 für Sirt6 und Abbildung 30B, Spur 5 für GFAT1; unlösliche Fraktion). Sowohl die lösliche (Abbildung 30A, Spur 6 für Sirt6 und Abbildung 30B, Spur 6 für GFAT1) als auch die unlösliche Fraktion (Abbildung 30A, Spur 7 für Sirt6 und Abbildung 30B, Spur 7 für GFAT1) sind nicht für eine Aufreinigung über die Glutathion-Säule geeignet. Im Verlauf dieser Arbeit war es bisher nicht möglich, geeignete Bedingungen zu finden, die entweder die Bildung von Einschlußkörperchen während der Inkubationsphase verhindern oder die Bildung von Aggregaten während der Aufarbeitung der unlöslichen Fraktionen unterbinden. Auch andere Bakterienstämme wie beispielsweise BL21 (DE3)pLysS oder BL21 CodonPlus-RIL waren nicht geeignet um eine Bildung der Einschlußkörperchen unter den getesteten Bedingungen zu verhindern. Hier bedarf es weiterer Anstrengungen, um genügend rekombinantes GFAT1 und Sirt6 für *in vitro* Versuche zu generieren.

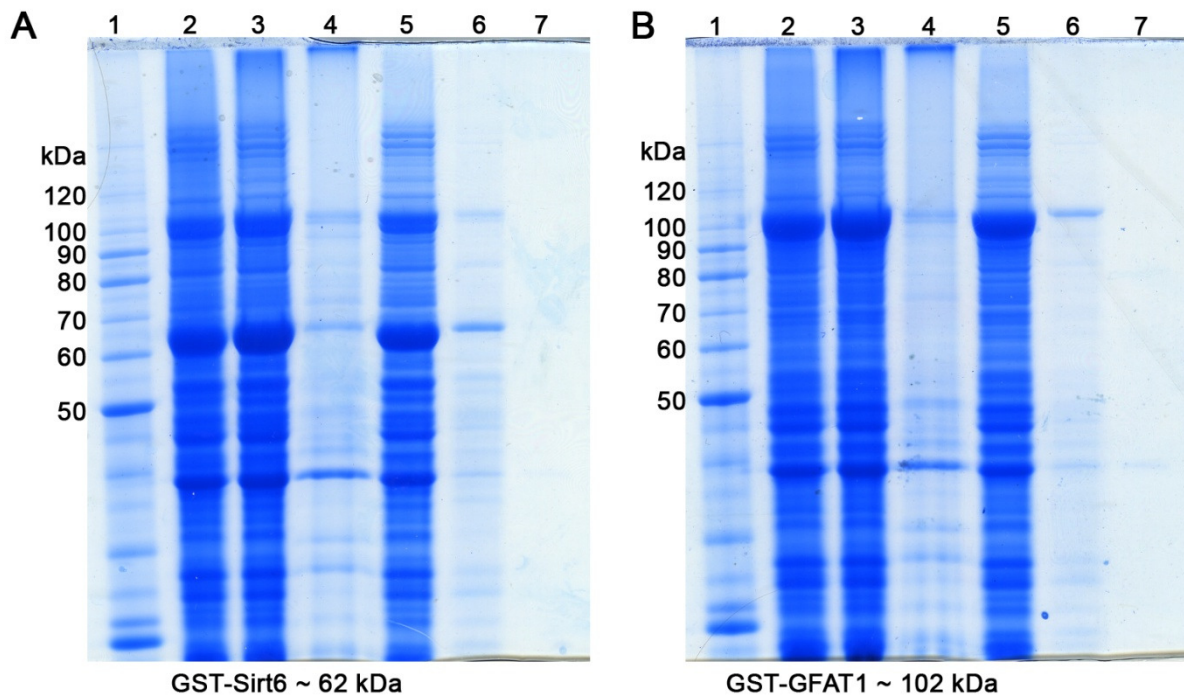


Abbildung 30: Überexprimierte GST-Sirt6 und GST-GFAT1 Fusionsproteine werden in Einschlußkörperchen eingeschlossen.

Die Bakterien reagierten auf die Sirt6 und GFAT1 Überexpression mit der Bildung von Einschlußkörperchen, die unter nativen Bedingungen nicht löslich sind. **A)** Coomassie-Gel der GST-Sirt6 Aufreinigung. Spur 1 zeigt die in Lösung gebrachte Pellet-Fraktion in 10% Sarkosyl. Spur 2, wie Spur 1 jedoch nach Inkubation bei 4°C über Nacht. Überstand (Spur 4) und Pellet Fraktion (Spur 5) nach Verringerung der Sarkosyl Konzentration auf 2% und Zugabe von 4% Triton X-100 und 40 mM CHAPS um renaturierende Bedingungen zu schaffen. GST-Sirt6 bildete daraufhin leider unlösliche Aggregate. Spur 6 = Eluat der versuchten Aufreinigung mit der Fraktion aus Spur 4. Spur 7 = Eluat nach Aufreinigung aus der Fraktion aus Spur 5. In beiden Versuchen konnte nur wenig oder kein Fusionsprotein aufgereinigt werden. **B)** Coomassie-Gel der GST-GFAT1 Aufreinigung. Beschreibung wie unter A) für Sirt6, jedoch nur für GFAT1.

3.2.4.6 Sirt6 deacetyliert GFAT1 und beeinflusst dessen Stabilität

Da die Ursache der erhöhten Protein-O-Glykosylierung nicht in einer veränderten GFAT1 Expression sondern in einer gesteigerten Aktivität von GFAT1 zu finden ist, sollte als nächstes überprüft werden, welche Rolle Sirt6 dabei spielt. Möglicherweise wird GFAT1 durch Sirt6 deacetyliert und die Aktivität dadurch negativ beeinflusst. Um dies zu untersuchen wurde GFAT1-FLAG in drei verschiedenen Kombinationen in HEK 293T Zellen überexprimiert 1) GFAT1 allein 2) GFAT1 zusammen mit Sirt6 und 3) GFAT1 zusammen mit je einer von drei Acetyltransferasen CBP, MOF oder PCAF. Dies sollte Bedingungen schaffen durch die GFAT1 deacetyliert und hyperacetyliert vorliegt. Die transfizierten Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet und GFAT1 aus dem Gesamtzelllysat immunopräzipitiert und über ein Coomassie-Gel aufgetrennt. Die entsprechenden Banden mit GFAT1 wurden dann aus dem Gel ausgeschnitten und der Acetylierungsstatus von GFAT1

massenspektrometrisch bestimmt. Zur Überprüfung der GFAT1 Expression wurde parallel zur Immunopräzipitation eine Western Blot Analyse durchgeführt. Dazu wurden gleiche Mengen an Gesamtzelllysat elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und durch eine Antikörperfärbung analysiert. Die Darstellung von GFAT1 erfolgte durch den FLAG M2 Antikörper und die von pan-Actin als Ladekontrolle durch den pan-Actin Antikörper. Abbildung 31A zeigt, dass die Überexpression von GFAT1 zusammen mit Sirt6 die Expression von GFAT1 verringert und die Überexpression von GFAT1 zusammen mit den Acetyltransferasen CBP, MOF und PCAF die Expression im Vergleich zu GFAT1 allein deutlich erhöht, wobei CBP und PCAF den stärksten Effekt zeigen. Gleiche Resultate lieferte auch die Immunopräzipitation von GFAT1 durch den FLAG M2 Antikörper. Obwohl gleiche Mengen an Antikörper für die Präzipitation eingesetzt wurden, konnte durch die Überexpression zusammen mit den Acetyltransferasen deutlich mehr GFAT1 präzipitiert werden (Abbildung 31B).

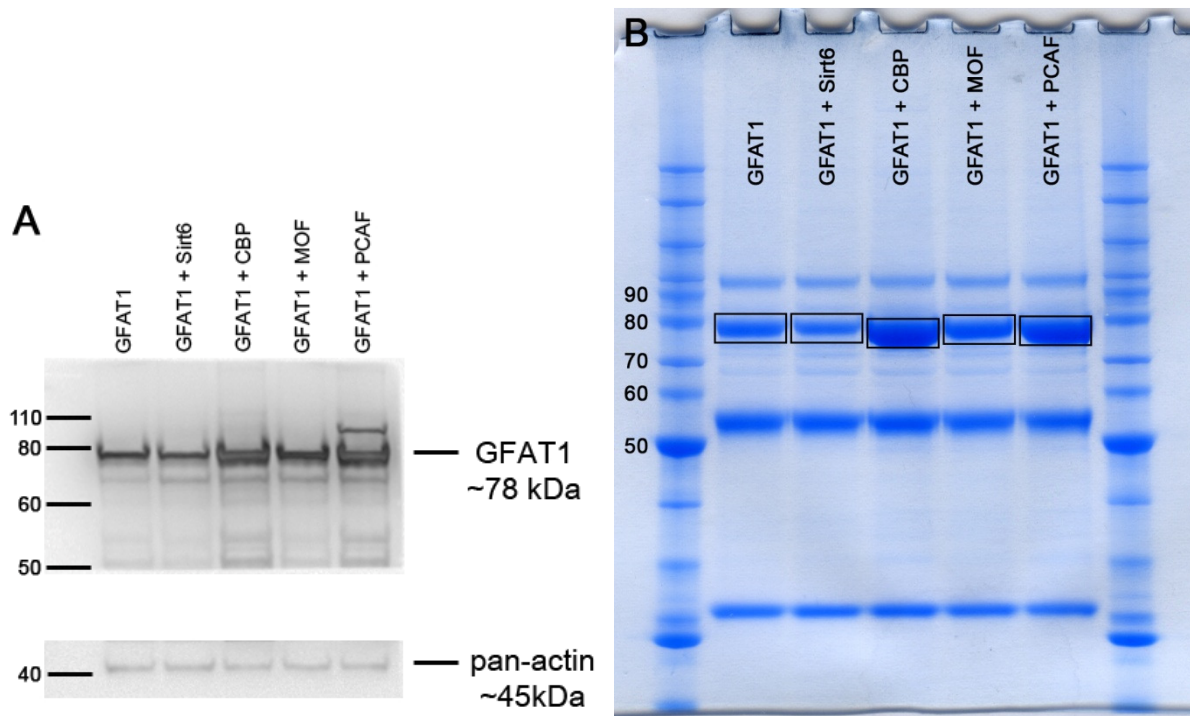


Abbildung 31: Der Acetylierungsstatus von GFAT1 beeinflusst dessen Expression in HEK 293T Zellen.

A) Western Blot Analyse zur Überprüfung der GFAT1 Expression. Die Transfektion von HEK 293T Zellen mit GFAT1 zusammen mit den Acetyltransferasen CBP, MOF oder PCAF verstärkt die GFAT1 Expression deutlich im Vergleich zur alleinigen Transfektion oder zusammen mit Sirt6. Die Darstellung von GFAT1 erfolgte durch den FLAG M2 Antikörper. Die Darstellung von pan-Actin durch den pan-Actin Antikörper dient der Ladekontrolle. **B)** Coomassie-Gel der GFAT1 Immunopräzipitation. Durch die Überexpression von GFAT1 zusammen mit den Acetyltransferasen konnte trotz gleicher Mengen an Antikörper deutlich mehr GFAT1 immunopräzipitiert werden. Die schwarzen Rechtecke im Bild markieren die Bereiche die aus dem Gel ausgeschnitten und durch eine massenspektrometrische Analyse zur Überprüfung des Acetylierungsstatus von GFAT1 untersucht wurden. Die Angabe der Größenstandards in A) und B) erfolgte in Kilodalton (kDa).

Auch eine zweimalige Wiederholung der Transfektionen erbrachte die gleichen Resultate, so dass nicht von einem Fehler während der Experimente ausgegangen werden kann. Die das präzipitierte GFAT1 Protein enthaltenden Banden (siehe markierte Bereiche, Abbildung 31B) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die Proben entsprechend für die massenspektrometrische Analyse aufbereitet und untersucht. Durch die massenspektrometrische Untersuchung konnten die in Tabelle 24 aufgeführten potentiellen Acetylierungsstellen gefunden werden. Keine dieser vier Lysine ist bisher als Acetylierungsstelle bekannt, oder weist eine andere Modifikation auf. Drei der Lysine (K67, K75 und K114) liegen in der GATase_2 Domäne von GFAT1 und eine Modifikation dieser könnte möglicherweise die Aktivität von GFAT1 beeinflussen.

Tabelle 24: Auflistung der gefundenen Acetylierungsstellen in GFAT1.

Die Positionsnummer der Lysine (K) gibt die jeweilige Position des Lysins in der GFAT1 Peptidsequenz an. Die zweite Spalte gibt an, unter welcher Transfektions-Kombination die jeweilige Acetylierungsstelle gefunden wurde. Die dritte Spalte gibt an, ob für dieses Lysin bereits eine Modifikation bekannt ist.

Position des Lysins	gefunden unter diesen Bedingungen	bekannt
K67	GFAT1+CBP, GFAT1+MOF und GFAT1+PCAF	nein
K75	GFAT1 allein, GFAT1+CBP und GFAT1+PCAF	nein
K114	GFAT1+CBP und GFAT1+PCAF	nein
K560	GFAT1+PCAF	nein

Da Lysine bekannte Ziele für Ubiquitylierungen sind, liegt möglicherweise hier die Ursache für die erhöhte Expression von GFAT1 wenn es zusammen mit den Acetyltransferasen exprimiert wird. Durch die Hyperacetylierung können die Lysine nicht mehr ubiquityliert und somit nicht für den proteasomalen Abbau markiert werden. Um vorab ausschließen zu können, dass es bei der Kotransfektion mit den verschiedenen Acetyltransferasen zu keiner unspezifischen Promotoraktivierung gekommen ist, wurde die Expression anderer Konstrukte, die auf dem gleichen Vektor bzw. dem gleichen Promotor basieren, untersucht. Für die Kotransfektionen wurden folgende Konstrukte verwendet: 1) G3BP1-FLAG im gleichen Vektor wie GFAT1, 2) FLAG-IGF2BP2, anderer Vektor aber gleicher Promotor und 3) FLAG-PABP1, anderer Vektor aber gleicher Promotor. Abbildung 32 zeigt eindeutig, dass es durch die Kotransfektion mit den drei verschiedenen Acetyltransferasen zu keiner verstärkten Expression der hier untersuchten Fusionsproteine kommt. Eine erhöhte Expression von GFAT1 durch eine unspezifische Promotoraktivierung durch die Acetyltransferasen ist daher unwahrscheinlich und die Ursache liegt eventuell doch in einer möglichen Verringerung der Ubiquitylierung durch die konkurrierende Acetylierung.

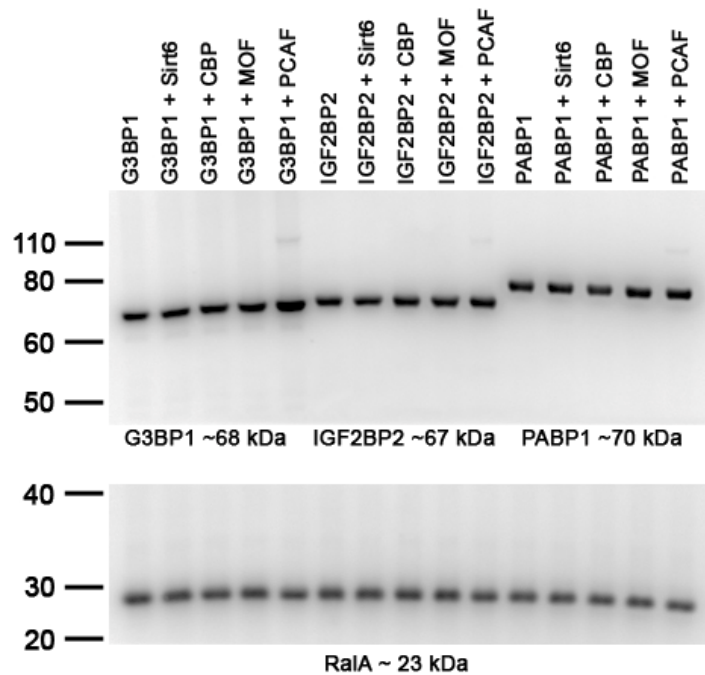


Abbildung 32: Keine unspezifische Promotoraktivierung durch die Kotransfektion mit den drei Acetyltransferasen.

Die Expressionskonstrukte für G3BP1, IGF2BP2 und PABP1 wurden allein transfiziert oder zusammen mit Sirt6 oder einer der drei Acetyltransferasen CBP, MOF und PCAF in HEK 293T Zellen kotransfiziert. Die Expressionsstärke wurde dann durch eine Western Blot Analyse untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression von G3BP1, IGF2BP2 und PABP1 in allen Situationen ähnlich ist und die Kotransfektion mit den Acetyltransferasen keine verstärkte Expression hervorruft. Die Darstellung der drei Fusionsproteine erfolgte durch den FLAG M2 Antikörper und die von RalA als Ladekontrolle durch den anti RalA Antikörper. Die jeweiligen Proteingrößen sind Kilodalton (kDa) angegeben.

Wenn GFAT1 aufgrund von fehlender Acetylierung gezielt ubiquitinyliert und dann durch das Proteasom abgebaut wird, sollte eine Blockade des Proteasoms einen raschen Abbau von GFAT1 verhindern und somit die Stabilität erhöhen. Um dies zu testen, wurde GFAT1 allein in HEK 293T Zellen überexprimiert und die Zellen anschließend mit dem Proteasom Inhibitor MG132 in verschiedenen Konzentrationen und über variierende Zeiträume behandelt. Da MG132 in DMSO gelöst wurde, diente die Behandlung der Zellen mit DMSO als Kontrolle. Eine Überexpression von GFAT1 zusammen mit CBP diente hier als Expressionskontrolle. Durch die Inhibierung des Proteasoms konnte aber zu keinem Zeitpunkt und bei keiner Konzentration des Inhibitors eine Stabilisierung der GFAT1 Proteinlevel, verglichen mit Expressionskontrolle (GFAT1 + CBP), erreicht werden (Abbildung 33).

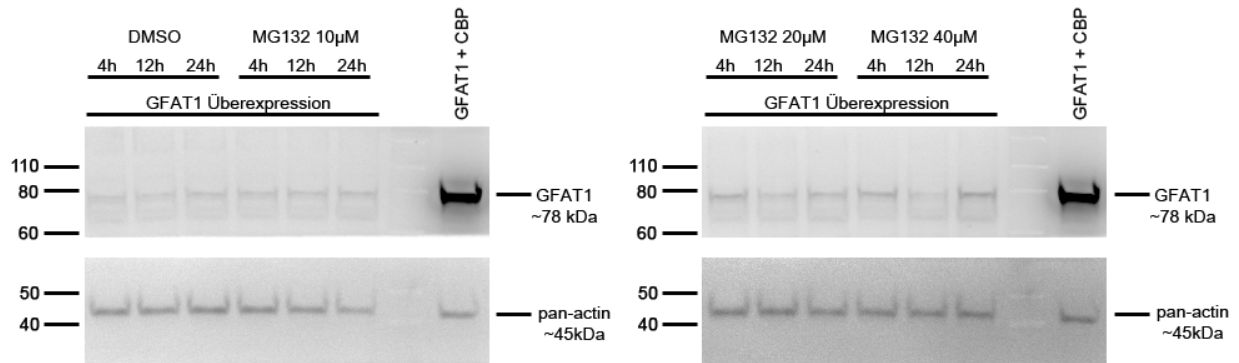


Abbildung 33: Keine erhöhten GFAT1 Proteinlevel durch Inhibition des Proteasoms.

HEK 293T Zellen wurden mit GFAT1-FLAG transfiziert und dann mit dem Proteasom Inhibitor MG132 über verschiedene Zeiträume behandelt. Die Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel von MG132, diente als Kontrolle. Die Transfektion von GFAT1-FLAG mit CBP diente als Expressionskontrolle. Es konnte bei keiner Konzentration und zu keinem Zeitpunkt eine Erhöhung der GFAT1 Proteinlevel durch die Proteasom Inhibierung beobachtet werden. Die Darstellung von pan-Actin durch den pan-Actin Antikörper diente als Ladekontrolle. Die Angabe der Größen erfolgte in kDa.

Um zu überprüfen, ob die MG132 Behandlung funktionierte, wurden die Proteinlevel eines ansonsten schnell durch das Proteasom abgebauten Proteins untersucht. Dazu wurden die selben Lysate wie in Abbildung 33 genutzt und mittels Western Blot die Proteinlevel von c-jun dargestellt. Hier zeigte sich in Abhängigkeit der MG132 Konzentration und der Zeit eine deutliche Erhöhung der c-jun Level und beweist die Funktionalität der MG132 Behandlung (Abbildung 34). Die Ursache der erhöhten GFAT1 Level durch die kombinierte Überexpression mit den Acetyltransferasen liegt somit höchstwahrscheinlich nicht in einer verminderten Ubiquitynylierung und damit einhergehendem verringerten Abbau durch das Proteasom.

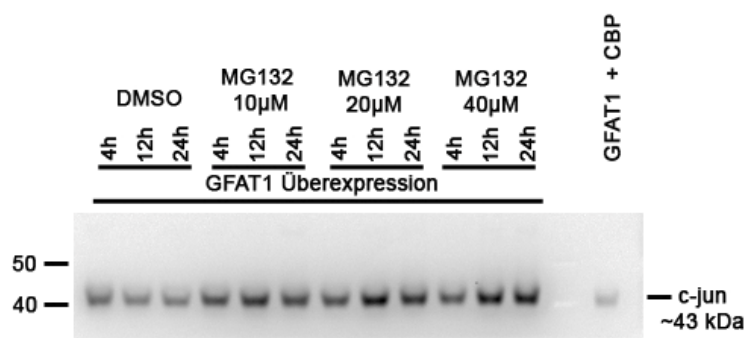


Abbildung 34: Erhöhte c-jun Proteinlevel in HEK 293T Zellen nach MG132 Behandlung.

Darstellung der c-jun Proteinlevel nach Behandlung mit dem Proteasom Inhibitor MG132. In Abhängigkeit der Inkubationszeit und der MG132 Konzentration kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der c-jun Proteinlevel.

Möglicherweise beeinflusst die Acetylierung andere Abbauprozesse und erhöht somit die Stabilität des GFAT1 Proteins. Aus diesem Grund wurden als nächstes alle Lysine, die als Acetylierungsstelle identifiziert wurden (Tabelle 24), nach und nach zu Alaninen mutiert und

die Überexpression der Mutanten danach in HEK 293T Zellen überprüft. Sollte eines dieser Lysine durch dessen Acetylierung für die erhöhten GFAT1 Proteinlevel verantwortlich sein, dann müsste durch die Mutation zu einem Alanin die Überexpression von GFAT1 zusammen mit den Acetyltransferasen jetzt ähnlich schwache Level aufweisen wie die Überexpression von GFAT1 allein. Die 4 Mutationen wurden jeweils einzeln sowie in einer Kombination aus allen zusammen in das GFAT1 Expressionskonstrukt eingebracht und dann in HEK 293T Zellen transfiziert. Die Transfektion erfolgte hier wieder einzeln, zusammen mit Sirt6 oder zusammen mit der Acetyltransferase CBP. Auf die anderen Acetyltransferasen wurde hier aus Gründen der Überschaubarkeit verzichtet. Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, änderte keine der vier Einzelmutationen (K67A, K75A, K114A und K560A), noch die Kombination aus allen vier Mutationen (K67;75;114;560A) etwas an der verstärkten Expression aus der Kombination mit der Acetyltransferase. Zum Test der Kombination aus allen vier Mutationen wurden zwei Konstrukte herangezogen (#3 und #17), die parallel generiert wurden.

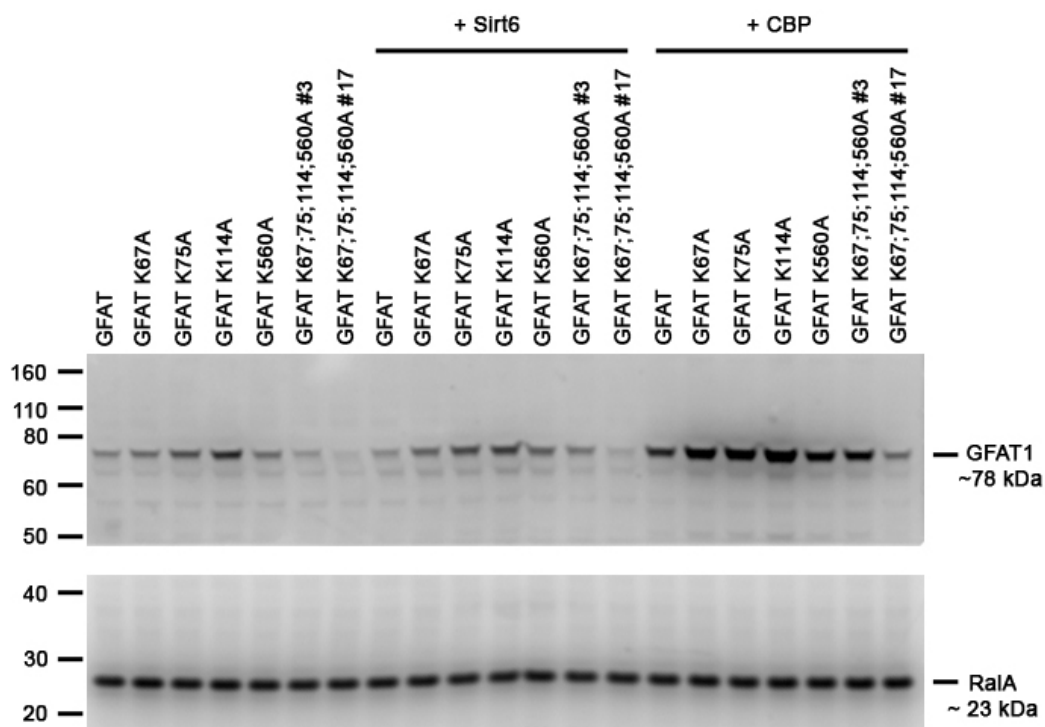


Abbildung 35: Keine Veränderung des GFAT1 Überexpressionsmusters durch Einführung verschiedener Mutationen.

GFAT1 und GFAT1 Lysin-Mutanten wurden in HEK 293T Zellen allein oder in Kombination mit Sirt6 oder mit der Acetyltransferase CBP überexprimiert. Die Ermittlung der Proteinlevel erfolgte dann mittels Western Blot Analyse. Für die vierfache Mutante wurden zwei Konstrukte genutzt, die parallel generiert wurden. Auch mit den eingeführten Lysin Mutationen erfolgte stets eine deutliche Steigerung der GFAT1 Proteinlevel durch die Kotransfektion mit CBP, wie es bei dem Wildtyp GFAT1 zu beobachten war. Der Western Blot mit RalA diente als Ladekontrolle. Die Angabe des Größenstandards erfolgte in Kilodalton (kDa).

Die sehr schwache Expression von GFAT K67;75;114;560A #3 und #17 konnte im Nachhinein durch einen Fehler bei der DNA Konzentrationsbestimmung erklärt werden. Durch eine Kontamination der DNA, wurde bei der Transfektion von falschen DNA Mengen ausgegangen, was letztendlich zu der sehr schwachen Expression führte. Nach Anpassung der DNA Mengen und wiederholter Transfektion konnten diese Fehler beseitigt werden und ähnliche Expressionslevel wie mit dem wildtypischen GFAT1 Konstrukt erzeugt werden (Abbildung 36). Eine Verringerung der Proteinlevel von GFAT1 nach kombinierter Überexpression mit den Acetyltransferasen konnte aber auch hier nicht beobachtet werden.

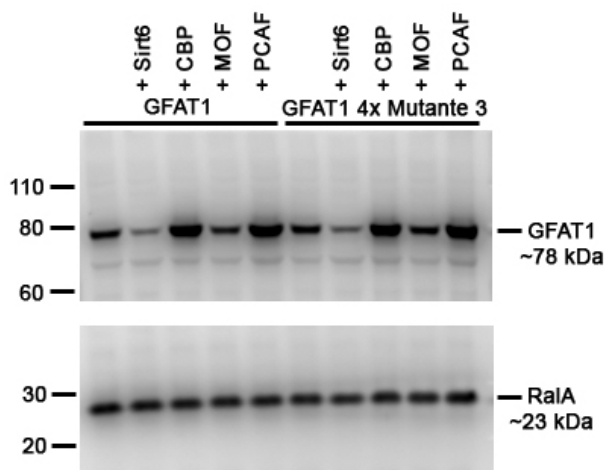


Abbildung 36: Überexpression von GFAT1 und GFAT1 Mutante #3 nach Anpassung der DNA Mengen.

Wiederholung des Experiments und der Western Blot Analyse wie unter Abbildung 35 beschrieben, jedoch nur mit der GFAT1 Mutante #3 nach Anpassung der DNA Menge für die Transfektion. Auch bei der Mutante führt die kombinierte Überexpression zusammen mit den Acetyltransferasen zu einer deutlichen Steigerung der Proteinlevel gegenüber der alleinigen Überexpression. Der Western Blot mit RalA diente als Ladekontrolle.

Da die Überexpressionsexperimente mit der GFAT1 4x Mutante und den Acetyltransferasen keine Veränderung der Proteinlevel ergaben, sollte überprüft werden, ob nicht andere Lysine durch die Acetyltransferasen acetyliert werden. Dazu wurde die GFAT1 4x Mutante allein oder zusammen mit Sirt6 oder einer der Acetyltransferasen in HEK 293T Zellen überexprimiert und GFAT1 immunopräzipitiert. Nach der Auftrennung im Coomassie Gel und Aufarbeitung der GFAT1 Peptide erfolgte die Analyse der Acetylierungsstellen durch eine massenspektrometrische Untersuchung. Tabelle 25 zeigt die zusätzlich gefundenen acetylierten Lysine nachdem vorher bestimmte Acetylierungsstellen mutiert wurden. Es zeigte sich, dass jetzt drei weitere acetylierte Lysine beobachtet werden konnten, die im ersten Screening nicht auftauchten. Eines dieser Lysine ist bereits als Ubiquitinylierungsstelle beschrieben und möglicherweise ruft eine Mutation dieses Lysins eine Änderung der Expressionslevel nach Überexpression mit den Acetyltransferasen hervor. Zudem liegen auch die Lysine K25 und K157 innerhalb der GATase_2 Domäne. Für das Lysin K327 ist in der hier untersuchten Splice-Variante von GFAT1 keine Modifikation

bekannt. Dieses Lysin entspricht in der GFAT1-L Isoform, die eine Insertion von 18 Aminosäuren kurz nach der GATase_2 aufweist, dem Lysin K345. Für das Lysin K345 in GFAT1-L ist bereits ebenfalls eine Modifikation durch Ubiquitylierung bekannt.

Tabelle 25: Auflistung der zusätzlich gefundenen Acetylierungsstellen in der GFAT1 4x Mutante.

Die Positionsnummer der Lysine (K) gibt die jeweilige Position des Lysins in der GFAT1 Peptidsequenz an. Die zweite Spalte gibt an, unter welcher Transfektions-Kombination die jeweilige Acetylierungsstelle gefunden wurde. Die dritte Spalte gibt an, ob für dieses Lysin bereits eine Modifikation bekannt ist und falls ja, welche. ub=ubiquityliert

Position des Lysins	gefunden unter diesen Bedingungen	bekannt
K25	GFAT1+PCAF	ja (ub)
K157	GFAT1 allein, GFAT1+CBP, GFAT1+MOF und GFAT1+PCAF	nein
K327	GFAT1 allein, GFAT1+CBP, GFAT1+MOF und GFAT1+PCAF	nein, bzw. ja in GFAT1-L (K345)

Aus diesem Grund wurden nun zusätzlich zu den vier Mutationen drei weitere Lysine in GFAT1 zu Alaninen mutiert und dann erneut die Überexpressionsexperimente durchgeführt. Aufgrund eines Fehlers bei der Übernahme der Position der Acetylierungsstellen aus der Tabelle wurden zunächst anstatt der Lysine K157 und K327, zwei durch dieses Screening nicht bestimmte Lysine mutiert. Dabei handelt es sich um das Lysin K48 und K56. Beide liegen in der GATase_2 Domäne von GFAT1. Für Lysin K48 ist bekannt, dass es auch ubiquityliert wird. Für Lysin K56 sind bisher keine Modifikationen bekannt. Lysin K25 hingegen wurde richtig bestimmt und auch mutiert. Aber auch hier zeigte sich keine Veränderung der Proteinlevel der GFAT1 7x Mutante (alle 7 Lysine kombiniert in einem Konstrukt mutiert) verglichen mit dem Wildtyp GFAT1 (Abbildung 37). Die Mutation von Lysin K157 und K327 soll dann im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch nachgeholt werden.

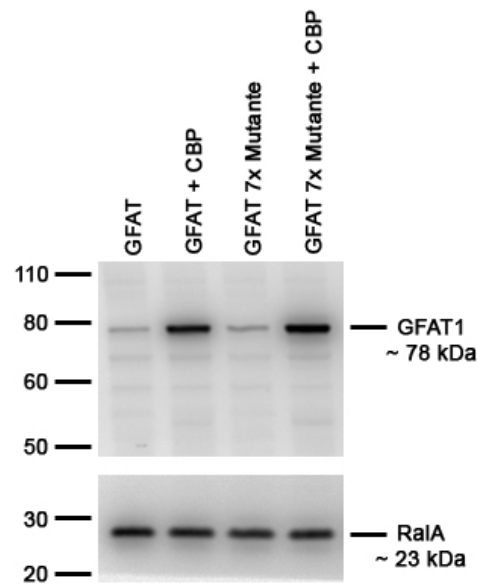


Abbildung 37: Keine Veränderung der Proteinlevel der GFAT1 7x Mutante nach kombinierter Überexpression mit der Acetyltransferase CBP.

Western Blot Analyse nach Überexpression von Wildtyp GFAT1 und der GFAT1 7x Mutante allein oder in Kombination mit CBP in HEK 293T Zellen. Die Mutation von sieben Lysinen zu Alaninen brachte keine Veränderung der GFAT1 Proteinlevel nach kombinierter Überexpression mit der Acetyltransferase CBP. Auch hier ergibt sich eine deutliche Steigerung der Proteinlevel nach Überexpression mit CBP. Die Darstellung der RalA Proteinlevel diente als Ladekontrolle.

4. Diskussion

Die Generierung von Mausmodellen, die eine zeitliche und gewebsspezifische Deletion einzelner Gene erlaubt, ist ein hervorragendes Mittel um die Funktion von Proteinen in ihrer natürlichen und geordneten Umgebung zu untersuchen. Dies ist vor allem dann interessant, wenn die Ausschaltung eines bestimmten Gens im Gesamtorganismus zu einem frühzeitigen letalen Phänotyp führt und keine weitere Untersuchung im adulten Organismus zulässt, wie es beispielsweise für Sirt6 der Fall ist. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Mauslinien generiert, die eine zeitliche und gewebsspezifische Inaktivierung von Sirt6 erlauben und somit zur Aufklärung Sirt6 spezifischer Funktionen im Organismus beitragen können.

In vitro ist es möglich, durch biochemische Untersuchungen, die Interaktionseigenschaften von Proteinen zu analysieren und daraus Rückschlüsse auf die Funktion im gesamten Organismus zu schließen. Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil dieser Arbeit ein *Stable isotope labeling with amino acids in cell culture* (SILAC) basiertes Screening nach potentiellen Interaktionspartnern der Sirtuine 1, 6 und 7 durchgeführt. Ziel war es, neue potentielle Interaktionspartner zu identifizieren und somit einen Einblick in weitere mögliche Funktionen dieser Sirtuine zu gewinnen.

4.1 Die Mauslinien Sirt6 cKO und Sirt6 Neo sind lebensfähig und erlauben die gewebsspezifische Deletion von Sirt6

Die generierten Mauslinien Sirt6 cKO sowie Sirt6 Neo ermöglichen eine zeitlich definierte und gewebsspezifische Ausschaltung von Sirt6. Dies setzt voraus, dass die genetisch veränderten Allele beider Linien vor der Deletion der Exone eine korrekte Prozessierung der mRNA sowie eine vergleichbare Proteinexpression entsprechend der Wildtypsituation aufweisen. Zunächst konnte für die heterozygoten Tiere der Sirt6 cKO Linie, die eine Modifizierung zweier Introns durch Insertion von LoxP-Elementen und dem synthetischen Gen für die Neomycinphosphotransferase (Neo-Kassette) enthalten, eine korrekte Prozessierung der mRNA Transkripte durch die semi-quantitative PCR nachgewiesen werden (Abbildung 6). Auf eine Überprüfung homozygoter Tiere wurde zu diesem Zeitpunkt der Arbeit verzichtet. Dies konnte aber im späteren Verlauf durch Generierung der Sirt6 cmvKO Linie, die aus der Sirt6 cKO Linie hervorging, nachgeholt werden. Hier konnte die korrekte Prozessierung der mRNA für homozygote Tiere nachgewiesen werden (Abbildung 9). Leider war es zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, die Proteinexpression in adulten Geweben durch einen Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen Sirt6 in den heterozygoten und homozygoten Tieren darzustellen. Vorhandene Antikörper lieferten Ergebnisse, die keine Beurteilung der Expressionslevel zuließen. Allerdings zeigten weder hetero- noch homozygote Tiere dieser Linie eine Beeinträchtigung lebenswichtiger Körperfunktionen. Auch zeigte sich keine Veränderung im Zuchtverhalten dieser Linie, so

dass von einer unveränderten Sirt6 Funktionalität ausgegangen werden konnte. Die hetero- und homozygoten Tiere der Sirt6 Neo Linie, bei der die Neo-Kassette durch Einkreuzen der Flp-Rekombinase entfernt wurde, so dass nur die LoxP-Elemente im veränderten Allel verbleiben, zeigten ebenfalls keinerlei phänotypische Auffälligkeiten oder ein verändertes Zuchtverhalten. Die Überprüfung der korrekten mRNA Prozessierung erfolgte hier erst später in der Sirt6 albumin Cre Linie, die eine spezifische Deletion von Sirt6 in den Leberzellen aufweist und aus der Sirt6 Neo Linie hervorging. Auch hier konnte eine korrekte Prozessierung nachgewiesen werden (Abbildung 13). In albumin Cre positiven Tieren, die aufgrund der homologen Rekombination entsprechende Genbereiche verloren haben, konnte erwartungsgemäß eine Verkürzung des mRNA Transkripts in der Leber gezeigt werden. In den anderen untersuchten Geweben konnte nur das dem Wildtyp entsprechende Fragment amplifiziert werden. Aus diesen Beobachtungen kann entnommen werden, dass beide Linien keinen Unterschied im Phänotyp zu Wildtyp Tieren aufweisen und somit für die konditionale Ausschaltung von Sirt6 geeignet sind.

4.2 Homozygote Tiere der Sirt6 cmvKO Linie entsprechen im Phänotyp der konstitutiven Deletion von Sirt6

Durch Verpaarung von Mäusen der Sirt6 cKO Linie mit CMV-Cre Mäusen, die die Cre-Rekombinase während der Präimplantationsphase der Embryogenese exprimieren, wurde die Sirt6 cmvKO Linie generiert. Homozygote Tiere dieser Linie sollten im Wesentlichen dem Phänotyp homozygoter Mäuse der bereits beschriebenen *Sirt6^{LacZ} Knock In* Linie entsprechen und dienten somit der Kontrolle der Funktionalität der eingeführten LoxP Erkennungsstellen. Durch die CMV-Cre vermittelte Rekombination der Exone IV bis VI sollte ein großer Teil der Deacetylase-Domäne sowie die für die katalytische Aktivität notwendigen Aminosäuren deletiert und die native Funktion von Sirt6 unterbunden werden. Heterozygote Tiere dieser Linie zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten und waren fertil und somit geeignet für Verpaarungen auf Homozygotie. Wie erwartet, wiesen homozygote Mäuse im Phänotyp Ähnlichkeiten zu den bereits beschriebenen konstitutiven *Sirt6^{LacZ} Knock In* Mäusen auf (Mostoslavsky *et al.*, 2006). Bereits nach wenigen Tagen konnte ein deutliches Defizit in der postnatalen Entwicklung dieser Tiere beobachtet werden, das sich zunächst in einer Reduzierung der Körpergröße verglichen mit den Wildtyp Geschwistertieren äußerte. Diese Unterschiede entsprachen genau den Beobachtungen, die bereits für die konstitutive Nullmutation der *Sirt6^{LacZ} Knock In* Linie gemacht wurden (Mostoslavsky *et al.*, 2006). Die meisten homozygoten Tiere starben noch vor dem Absetzen von der Mutter und keines der Tiere wurde älter als 4 Wochen. Allerdings scheint für den Zeitpunkt und die Ausprägung der Letalität der genetische Hintergrund eine entscheidende Rolle zu spielen. Xiao und Mitarbeiter zeigten, dass Sirt6 defiziente Mäuse auf einem 129SvEv Hintergrund teilweise

30, 31 und 39 Tage und vereinzelt sogar bis zu 7 Monate alt wurden, die Mehrheit aber noch vor der Vollendung der vierten Lebenswoche starb (Xiao *et al.*, 2010). Dagegen waren 40% der Knock Out Tiere auf einem gemischten 129/Black Swiss/FVB-Hintergrund nach 1 Monat noch am Leben und verstarben zu verschiedenen Zeiten innerhalb eines Jahres (Xiao *et al.*, 2010). Da viele der Mutanten relativ zeitnah nach dem Absetzen von der Mutter starben und der Blutglukosespiegel zu diesem Zeitpunkt auch rasch unter das Detektionslimit fiel, lag die Vermutung nahe, dass die Knock Out Tiere nicht in der Lage sind eigenständig zu fressen. Xiao *et al.* verabreichten daraufhin ab dem 22. Tag Trinkwasser mit 10% Glukose und konnten zeigen, dass nur noch 17% der Knock Out Tiere starben (Xiao *et al.*, 2010). Eine Überprüfung dieser Beobachtungen war bei den in dieser Arbeit generierten Tieren nicht möglich, da alle Linien auf einem C57Bl/6 Hintergrund gehalten wurden und nach Rückkreuzung noch vor dem Absetzen starben. Eine Supplementierung mit glukosehaltigem Trinkwasser war somit nicht möglich. Zusätzliche Bestätigung der erfolgreichen Unterbindung der Sirt6 Funktion lieferte die Analyse von Hautschnitten. Hier konnte ebenfalls ein Fehlen der subkutanen Fettschicht in Sirt6 Knock Out Tieren beobachtet werden (siehe Abbildung 10) und bestätigt die bereits gemachten Aussagen von Mostoslavsky *et al.* (Mostoslavsky *et al.*, 2006). Im Grunde genommen belegen die gesamten Beobachtungen, die frühe Letalität und das Fehlen der subkutanen Fettschicht, schon die Funktionalität der eingebrachten LoxP-Elemente, über die eine Deletion der flankierten Exone möglich ist und es dadurch zum Erliegen der Sirt6 Aktivität kommt.

Da die frühe Letalität der homozygoten Tiere keine weiteren Untersuchungen in adulten Geweben zulässt, sollte diese Linie für die Generierung von Mausembryofibroblasten (MEFs) genutzt werden, um vorausgehende Analysen in Zellkulturexperimenten zu ermöglichen. Da primäre MEFs nur begrenzt zur Teilung fähig sind und dann absterben, wurden immortalisierte Wildtyp und Knock Out Linien generiert. Während des Prozesses der Immortalisierung konnte kein wesentlicher Unterschied im Wachstumsverhalten der generierten Linien beobachtet werden und auch sonst war die Knock Out Linie phänotypisch nicht von der Wildtyp Linie unterscheidbar. Dies steht ein wenig im Kontrast zu den Beobachtungen die Mostoslavsky und Mitarbeiter machten. Sie konnten zeigen, dass Sirt6 defiziente MEFs im Vergleich mit Wildtyp MEF Zellen eine verzögerte Proliferation aufwiesen (Mostoslavsky *et al.*, 2006). Allerdings wurden in der hier vorliegenden Arbeit keine vergleichbaren Experimente zur Ermittlung der Proliferationsrate und zur Bestimmung der Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, durchgeführt. Zudem war die Verzögerung in der Proliferationsgeschwindigkeit der Sirt6 Knock Out MEF Zellen nur während eines kurzen Zeitraumes signifikant unterschiedlich, so dass sich die Zahl Sirt6 defizienter Zellen während der Beobachtungsphase (1-13 Tage nach der Aussaat der Zellen) immer mehr der Wildtypsituation angleich. Das ist wahrscheinlich auch der Grund, dass

während der Immortalisierung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Somit sind die in dieser Arbeit generierten Wildtyp und Sirt6 Knock Out MEF Linien nach erfolgter Immortalisierung uneingeschränkt nutzbar, um Fragestellungen der Sirt6 Deletion und deren Einfluss auf die Stressresistenz zu untersuchen. In den MEF Zellen war es möglich, die Deletion von Sirt6 nun auch durch einen Western Blot zu bestätigen (siehe Abbildung 11). Vergleichbare Ergebnisse konnten bei der Analyse postnataler Gewebe aus Sirt6 Knock Out- und Wildtyp Tieren nicht erzielt werden. Möglicherweise ist dies auf eine verstärkte Expression von Sirt6 während der Embryogenese (besonders um Tag E11.0 herum) zurückzuführen, wie sie schon durch Liszt und Mitarbeiter gezeigt werden konnte (Liszt *et al.*, 2005). Da die Deletion der Exone IV bis VI zu keiner Verschiebung des Leserasters führt und auch kein vorzeitiges Stopp generiert wird, bestand die Möglichkeit der Bildung eines verkürzten ca. 29-30 kDa großen Sirt6 Restprodukts. Allerdings war im Western Blot kein Signal auf der entsprechenden Höhe detektierbar. Vermutlich ist die Stabilität des trunkierten Sirt6 Proteins nicht gegeben, so dass ein entsprechendes Translationsprodukt nicht detektiert werden kann. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Deletion der Exone IV bis VI zu einer kompletten Unterdrückung der Proteinexpression in der Sirt6 cmvKO Linie führt und homozygote Tiere dieser Linie im Phänotyp der konstitutiven Ausschaltung von Sirt6 entsprechen.

4.3 Mäuse mit einer leberspezifischen Deletion von Sirt6 erscheinen zunächst phänotypisch unauffällig

Zur Überprüfung der Deletion der Exone IV bis VI in der Leber der heterozygoten und homozygoten Sirt6 Albumin Cre Knock Out Mäuse konnte wieder nur die Analyse durch die semi-quantitative PCR herangezogen werden. Auch hier lieferte die Analyse mittels Western Blot viele unspezifische Banden, sowohl für die Wildtyp Mäuse wie auch für die Knock Out Mäuse, so dass daraus keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Untersuchung von embryonalem Lebergewebe konnte hier auch nicht angewendet werden, da wie schon eingangs erwähnt, die vollständige Effizienz der durch die Albumin Cre vermittelten Deletion erst 4-6 Wochen nach der Geburt erreicht wird. Im embryonalen Stadium würde somit Sirt6 auch in der Leber der Knock Out Tiere detektiert werden können. Durch die semi-quantitative PCR konnte aber eindeutig eine Verkürzung des Sirt6 Transkripts, das durch die Deletion der Exone IV bis VI entsteht, in der Leber der heterozygoten und homozygoten Knock Out Mäuse nachgewiesen werden (Abbildung 13). In den anderen untersuchten Geweben wie Herz, Muskel und Lunge konnte hingegen nur das korrekt prozessierte Wildtyp Transkript amplifiziert werden und weist auf die gegebene Spezifität der albumin Cre hin. Ausgehend von diesem Ergebnis und den gemachten

Beobachtungen kann somit von einer spezifischen Ausschaltung von Sirt6 in der Leber ausgegangen werden.

Wie eingangs erwähnt, zeigen Mäuse mit einem konstitutiven Knock Out von Sirt6 gravierende Probleme bei der Regulierung der Glukosehomöostase auf (Mostoslavsky *et al.*, 2006). Ab dem zwölften Tag nach der Geburt wiesen Knock Out Tiere einen stetig sinkenden Blutglukosespiegel auf, welcher ab dem 24. Tag nicht mehr detektierbar war. Die Unfähigkeit der Sirt6 Knock Out Mäuse den Blutzuckerspiegel im physiologischen Bereich aufrecht zu erhalten, könnte die Ursache für die erhöhte Letalität dieser Tiere sein. Demzufolge stellt Sirt6 einen wichtigen Regulator der Glukosehomöostase dar. Da die Leber in maßgeblicher Weise an der Kontrolle der Glukosehomöostase beteiligt ist, sollte durch einen leberspezifischen Knock Out die Sirt6 Funktion in diesem Gewebe näher untersucht werden. Um die Linie mit einem leberspezifischen Knock Out von Sirt6 zu generieren, wurden homozygote Mäuse der Sirt6 Neo Linie mit Albumin Cre Mäusen verpaart. Sowohl heterozygote als auch homozygote Tiere wurden entsprechend der Mendelschen Regeln geboren und zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten. Die frühe Letalität der Sirt6 defizienten Mäuse (Mostoslavsky *et al.*, 2006) konnte in den homozygoten Mäusen mit der leberspezifischen Sirt6 Ausschaltung umgangen werden, da alle Mäuse die ersten 4 Wochen nach der Geburt überlebten. Zuerst wurde vermutet, dass das Überleben der ersten 4-6 Wochen auch mit der verwendeten Albumin Cre zusammenhängt, da die Effizienz der Albumin Cre vermittelten Deletion nach 4 Wochen bei ca. 50% liegt. Erst nach 6 Wochen wird eine Effizienz von ca. 90% erreicht (Hayhurst *et al.*, 2001). Da alle Mäuse älter als 8 Wochen wurden, scheint die Deletion von Sirt6 in der Leber von Mäusen der Sirt6 cmvKO Linie nicht die Hauptursache für den frühzeitigen Tod dieser Tiere zu sein. Die gleichen Beobachtungen konnten durch eine zweite Arbeitsgruppe um Kim *et al.* gemacht werden (Kim *et al.*, 2010). Da die Leber eine entscheidende Rolle bei der Bereitstellung von Glukose während Hungerphasen spielt, wurden als nächstes Glukose- und Insulintoleranztests (GTT und ITT, respektive) an den leberspezifischen Sirt6 Knock Out Mäusen durchgeführt. Zehn Wochen alte Sirt6 defiziente Tiere zeigten dabei überraschenderweise eine Tendenz zu einer verbesserten Glukoseaufnahme im GTT und zu einer gesteigerten Insulinsensitivität im ITT (Abbildung 14), auch wenn diese Beobachtungen nicht bei jedem gemessenen Zeitpunkt signifikante Unterschiede aufwiesen. Zu beachten ist auch, dass bei der Durchführung des ITT die Knock Out Tiere einen deutlich erniedrigten nüchternen Blutzuckerspiegel aufwiesen als die Wildtypen. Betrachtet man die einzelnen Messwerte nun unter diesen Voraussetzungen, sind die Unterschiede in der Glukoseaufnahme durch die Gabe von Insulin in Wildtypen und Mutanten nicht signifikant. Noch bevor Analysen an älteren Tieren durchgeführt werden konnten, veröffentlichten Kim *et al.* Ergebnisse der Analyse von 8-9 Monate alten Mäusen mit einer leberspezifischen Sirt6 Defizienz (Kim *et al.*, 2010).

Allerdings zeigten ihre Ergebnisse das Gegenteil zu den im Rahmen dieser Arbeit an jüngeren Mäusen erhobenen Befunden. Die von Kim *et al.* generierten Mutanten wiesen nun eine verschlechterte Glukoseaufnahme im GTT und eine verminderte Insulinsensitivität im ITT, verglichen mit den Wildtyp Mäusen auf. Es soll erwähnt werden, dass einige der bei Kim *et al.* veröffentlichten Messwerte ebenso keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Die durch Kim und Mitarbeiter gemachten Beobachtungen konnten im Zuge einer Kooperation durch eine andere Arbeitsgruppe für unsere Tiere bestätigt werden (unveröffentlichte Daten). Somit kann davon ausgegangen werden, dass Sirt6 bei der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase mit dem Alter eine wichtige Rolle spielt.

Trotz der offensichtlich unauffälligen physiologischen Befunde konnte bei der histologischen Untersuchung der Leberstruktur bereits bei den 10 Wochen alten Knock Out Tieren einige Veränderungen beobachtet werden. So zeigten diese Mäuse eine deutlich verstärkte Vakuolen-Bildung als die Wildtypen (Abbildung 15). Derartige Veränderungen wurden durch Kim *et al.* in den jungen Mäusen nicht dokumentiert. Jedoch zeigten 8-9 Monate alte Knock Out Tiere eine ähnlich gesteigerte Vakuolisierung (Kim *et al.*, 2010). Vergleichbare strukturelle Veränderungen der Leber in ähnlich jungen Mäusen wurden von Hayhurst *et al.* gemacht (Hayhurst *et al.*, 2001). Der dort generierte leberspezifische Knock Out von HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 alpha) zeigte bereits 45 Tage nach der Geburt ein ähnliches Schadbild der Leber. Ebenso wurde eine deutlich erhöhte Anzahl an eosinophilen Hepatozyten, wie sie auch in den Sirt6 Knock Out Mäusen zu sehen sind (Abbildung 15), dokumentiert. Die Ursache für das Auftreten von eosinophilen Strukturen oder Zellen ist noch nicht eindeutig geklärt, wird aber mit einer Schädigung der Zellen bzw. dem beginnenden Eintreten des Todes der Zelle verbunden (Sanchez *et al.*, 2007). Eine mögliche und diskutierte Ursache die zur Entstehung eosinophiler Hepatozyten führen kann, ist die Bildung freier reaktiver Sauerstoffverbindungen (engl. reactive oxygen species, ROS). Hinweise darauf lieferten Beobachtungen, die durch eine andere Arbeitsgruppe hier am Max Planck Institut gemacht werden konnten (Kostin *et al.* unveröffentlicht). Reaktive Sauerstoffverbindungen können in Stoffwechselfvorgängen während der mitochondrialen Elektronentransportkette entstehen und werden, sofern nicht übermäßig produziert, auch entsprechend durch die Zelle neutralisiert. Eine Dysregulation metabolischer Stoffwechselwege resultiert somit in der vermehrten Bildung solcher ROS. Da Sirt6 eine entscheidende Rolle bei der Regulation metabolischer Prozesse wie der Glukose- und Fetthomöostase spielt (Kanfi *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2010), wäre folglich auch eine direkte oder indirekte Beteiligung an der Entstehung freier ROS möglich, was dann letztendlich zur Schädigung der Zellen führen kann. Eine Beteiligung eines anderen Sirtuins an der Reduzierung der ROS Level konnte schon für Sirt2 gezeigt werden. Sirt2 reguliert die Expression von FOXO Zielgenen wie beispielsweise der

Mangan Superoxiddismutase, die für den Abbau entstandener Superoxide verantwortlich ist (Wang *et al.*, 2007). Aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen pathologischen Befunde in der Leber könnte über ähnliche Funktionen auch für Sirt6 spekuliert werden. Auf der anderen Seite ist Sirt6 an der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität durch die Regulation von DNA-Reparaturmechanismen wie der Basenexzisionsreparatur (BER) (Mostoslavsky *et al.*, 2006) und der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) (Mao *et al.*, 2011; McCord *et al.*, 2009) beteiligt und beseitigt somit indirekt durch ROS entstandene DNA-Schäden.

4.4 Analyse des SILAC-Interaktionsscreenings

4.4.1 Reproduzierbarkeit und Validierung der SILAC Daten

Die Identifizierung von Interaktionspartnern ist ein geeignetes Mittel, um Einblicke in mögliche Funktionen ausgesuchter Proteine zu bekommen. Durch die Einführung der Kopplung aus automatisierter nano-HPLC und hochauflösenden Massenspektrometern konnten entscheidende Fortschritte beim Herausfiltern einzelner Kandidaten aus komplexen Proteingemischen gemacht werden. Jedoch war eine Quantifizierung lange Zeit nicht möglich und konnte nur durch eine 2D-Gelelektrophorese erreicht werden. Diese Methode ist aber sehr aufwendig und zudem sehr limitierend in Bezug auf deren Sensitivität, so dass niedrig exprimierte Proteine gar nicht detektiert werden können. Erst durch die Verwendung stabiler Isotope wie ^{13}C und ^{15}N konnten gute Ergebnisse, die zu einer robusten Quantifizierung von Proteinen führten, erzielt werden (Ong & Mann, 2005). Als Methode der Wahl für die Identifizierung neuer potentieller Interaktionspartner der Sirtuine 1,6 und 7 wurde deshalb die *Stable isotope labeling with amino acids in cell culture* (SILAC) Methode gewählt. Diese Methode erwies sich bereits bei der Suche nach Interaktionspartnern des Proteins Odin als hilfreich und verhalf zur Identifikation von 18 potentiellen Bindungspartnern, von denen 8 durch Co-IP Experimente bestätigt werden konnten (Zhong *et al.*, 2011). Durch den Einbau schwerer Isotope kommt es zu einer Zunahme des Molekulargewichts der markierten Peptide und somit zu einer entsprechenden Verschiebung des Signals im Massenspektrum. Die relative Quantifizierung erfolgt dabei über den Vergleich zweier ansonsten identischer Peptide in den unmarkierten und markierten Zuständen. Bei den in dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden drei biologische Replikate berücksichtigt, die wechselseitig markiert waren (siehe 3.2.2). Als potentiell interessante Interaktionspartner wurden aber nur solche Proteine herangezogen, die in allen drei Replikaten identifiziert werden konnten und deren Verhältnis der Intensitäten aus den quantifizierten Peptiden der Sirtuin-IP zu den quantifizierten Peptiden der Kontroll-IP (H/L Ratio) ≥ 2 war. Diese Vorgehensweise nimmt in Kauf, dass einige Interaktionspartner verlustig gehen, da schon geringe Unterschiede bei der langwierigen Aufbereitung der

Peptide für die Massenspektrometrie große Auswirkungen auf die Detektierbarkeit schwach exprimierter Proteine haben kann. So kann zum Beispiel eine erhöhte Effizienz bei der Waschprozedur, die der Entfernung von Hintergrundproteinen gilt, zu einer Entfernung solcher gering exprimierter Proteine führen.

Ein zweiter Punkt, der nach der Auswahl der Methode Berücksichtigung fand, war die Wahl einer geeigneten Zelllinie. Da zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente noch keine geeigneten Antikörper gegen Sirt1, 6 und 7 existierten, wurden Expressionskonstrukte der Sirtuine verwendet. Die verwendete Zelllinie sollte deshalb einfach und reproduzierbar zu transfizieren sein. Desweiteren richtet sich die Wahl der Zelllinie natürlich auch nach der Fragestellung. Werden zum Beispiel potentielle Interaktionspartner gesucht, die mit den Sirtuinen während der Muskelentwicklung eine Rolle spielen, ist eine aus Muskelzellen abgeleitete Zelllinie die wahrscheinlich geeignetste Wahl. Da in dieser Arbeit vorerst eine eher globale und keine gewebsspezifische Fragestellung untersucht werden sollte, richtete sich die Auswahl einer geeigneten Zelllinie am ehesten nach der Handhabbarkeit und einfachen Transfektionsmöglichkeit und fiel auf die HEK 293T Zelllinie. Neben der Wahl der geeigneten Zelllinie spielt auch die Untersuchung einzelner Zellfraktionen bei der Durchführung des Screenings eine große Rolle. Da Sirt6 ein nukleär lokalisiertes Protein ist, hätte sich auch eine Fraktionierung und eine anschließende exklusive Untersuchung der nukleären Fraktion angeboten. Da bei der Aufarbeitung einzelner Fraktionen aber auch viel Material verloren geht, wurde bei der Durchführung dieses Screenings darauf verzichtet.

Die Validierung ausgesuchter potentieller Interaktionspartner erfolgte durch Co-Immunopräzipitation mit anschließender Western Blot Analyse. Aufgrund fehlender geeigneter Antikörper für die Co-IP wurden zu diesem Zweck die Sirtuine und die ausgewählten potentiellen Interaktionspartnern mit einem Expressionstag versehen und als Fusionsprotein in den HEK 293T Zellen überexprimiert. In dieser Arbeit wurden vorerst nur mögliche Interaktionspartner von Sirt6 zur Bestätigung und genaueren Analyse herangezogen. Eine Auswahl potentieller Interaktionspartner von Sirt6, die auf diese Weise bestätigt werden konnten, sind in Tabelle 23 dargestellt. Ein weiterer Aspekt, der bei der Beurteilung der Screeningergebnisse eine Rolle spielte, war die Bestätigung bereits bekannter Interaktionspartner. So konnte beispielsweise für Sirt1 DBC1 (engl. deleted in breast cancer) validiert werden, ein Negativregulator der Sirt1 Aktivität. DBC1 bildet stabile Komplexe mit Sirt1 und inhibiert die Sirt1 Aktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Kim *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). So führt die Inhibition von DBC1 zur Sirt1 vermittelten Deacetylierung von p53 und inhibiert dadurch die p53 abhängige Apoptose. Auch bereits bekannt und durch das Screening ebenfalls identifiziert, konnte ein Interaktionspartner von Sirt6 bestätigt werden, die Poly [ADP-ribose] Polymerase 1 (PARP1). PARP1 wird unter Stressbedingungen durch Sirt6 mono-ADP-ribosyliert und dadurch aktiviert. PARP1 poly-

ADP-ribosyliert im weiteren Verlauf Proteine, die an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind (Mao *et al.*, 2011). Weitere bereits bekannte Interaktionspartner der Sirtuine konnten durch dieses Screening aber nicht identifiziert werden. Möglicherweise ist dies das Resultat der gewählten Qualitätsparameter, da nur solche Proteine als potentiell interessant angenommen wurden, die auch in allen drei Replikaten identifiziert worden sind. Ein weiterer Grund ist möglicherweise das gewählte Zellsystem, so dass in einer anderen Zelllinie möglicherweise auch andere Interaktionspartner gefunden und bestätigt werden könnten. Auch bestünde die Möglichkeit das Screening unter bestimmten Stressbedingungen durchzuführen, da potentielle Bindungspartner eventuell unter normalen Bedingungen nur schwach exprimiert sind und somit nicht detektiert werden können. Wenngleich die Überexpression der Köderproteine natürlich auch eine gewisse Stresssituation darstellt und zur Identifizierung atypischer Bindungspartner führen kann. Durch die Transfektion eines leeren Vektors im Kontrollansatz sollte diese Fehlerquelle aber auf ein Minimum reduziert werden. Abschließend kann festgehalten werden, dass mittels Western Blot Analyse Sirt6 spezifischer Interaktionspartner, ein Teil der durch das SILAC-Screening identifizierten Bindungspartner validiert werden konnte (siehe Abbildung 18) und somit für die Qualität des Screenings sprechen.

4.4.2 Potentielle Bindungspartner von Sirt6 lassen sich grob in drei Kategorien einteilen

Betrachtet man die biologische Funktion der identifizierten potentiellen Interaktionspartner von Sirt6 lässt sich feststellen, dass diese grob in drei Gruppen eingeteilt werden können. Die ersten beiden Gruppen bilden Proteine, die an DNA-Reparaturmechanismen und an der Regulierung metabolischer Stoffwechselwege beteiligt sind. Die weitaus größere Gruppe wird von Proteinen gebildet, die in Prozesse die die Stabilität und den Abbau der mRNA regulieren, involviert sind. Eine Übersicht und die Einteilung in die jeweiligen Gruppen ist in Abbildung 19 dargestellt.

Das Auffinden von Bindungspartnern, die an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind, steht im Einklang mit der bereits für Sirt6 dokumentierten Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. So konnte bereits bei der ersten Beschreibung eines Sirt6 Knock Out Models eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA schädigenden Substanzen bei Sirt6 defizienten Zellen nachgewiesen werden (Mostoslavsky *et al.*, 2006). Auch offenbarte eine Karyotypisierung gravierende Störungen der genomischen Integrität und wies auf Schäden die zu Chromosomenabnormalitäten führen hin. Später konnte dann gezeigt werden, dass Sirt6 nach DNA-Schädigung die Bindung der DNA-abhängige Proteinkinase am Ort eines DNA-Doppelstrangbruches stabilisiert und somit an der Einleitung der Reparatur beteiligt ist (McCord *et al.*, 2009). Kurz darauf konnte eine Beteiligung von Sirt6 an der Reparatur von

DNA-Schäden durch eine Interaktion mit PARP1 bestätigt werden (Mao *et al.*, 2011). Sirt6 mono-ADP-ribosyliert PARP1 und beeinflusst positiv dessen Aktivität. Wie bereits erwähnt, wurde PARP1 im Rahmen des SILAC Screenings bestätigt. Dies lässt annehmen, dass andere an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine, die hier identifiziert wurden, ebenfalls biologisch signifikante mit Sirt6 interagierende Proteine repräsentieren. Dies könnte beispielsweise für XRCC6 der Fall sein. Die Analyse der XRCC6 Knock Out Mäuse zeigte, dass sich diese Tiere ähnlich wie Sirt6 defiziente Mäuse, deutlich langsamer entwickeln und eine Reduktion der Körpergröße verglichen mit gleichaltrigen Geschwistertieren aufweisen (Gu *et al.*, 1997; Ouyang *et al.*, 1997). Auch sind XRCC6 defiziente Zellen sensitiver gegenüber DNA schädigenden Substanzen. Eine Interaktion mit oder eine Aktivitätsänderung durch Sirt6 ist bislang noch nicht beschrieben, ist aber aufgrund des ähnlichen Phänotyps und Qualität des Screeningverfahrens höchst wahrscheinlich und sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Dies betrifft auch andere DNA-Reparatur Proteine, die mit einem hohen SILAC-Quotient im Screening identifiziert wurden.

Die Tatsache, dass unter den potentiellen Interaktionspartnern von Sirt6 auch einige Kandidaten zu finden sind, die an der Regulation metabolischer Prozesse beteiligt sind, kann von großer biologischer Wichtigkeit sein und ein bislang - zumindest mechanistisch - unbekannter Aspekt der Sirt6 Funktion aufgedeckt werden. Ausgehend von einigen pathologischen Veränderungen in der Sirt6 Knock Out Maus erscheint dieser Befund jedoch plausibel. So zeigen Sirt6 Knock Out Mäuse gravierende Probleme bei der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase und offenbaren Störungen des Fettmetabolismus (Kanfi *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Mostoslavsky *et al.*, 2006; Schwer *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2010). Eins der identifizierten Proteine der metabolischen Gruppe ist das IRS4. Von IRS4 ist bisher nur wenig bekannt und eine biologische Funktion nicht eindeutig beschrieben. Ein anderes Mitglied dieser Familie, IRS1 ist hingegen ausführlich untersucht und Knock Out Studien offenbaren eine Insulinresistenz defizienter Mäuse. Zudem entwickeln sich IRS1 defiziente Tiere schlechter als ihre Wildtyp Geschwister und zeigen eine deutliche Reduktion in ihrer Körpergröße (Jenkins & Storlien, 1997), eine Beobachtung die auch bei den Sirt6 Knock Out Tieren gemacht werden konnte. Eine Bestätigung der Interaktion von Sirt6 und IRS4 könnte somit helfen neue Erkenntnisse über die Funktion von IRS4 zu gewinnen und möglicherweise neue Ansätze liefern, um zu untersuchen, wie Sirt6 in die Regulierung der Glukosehomöostase oder in die Insulinsignalkette eingreift. Das zweite Kandidatenprotein das in diese Kategorie eingruppiert werden kann, ist GFAT1. GFAT1 ist das Schlüsselenzym des Hexosamin-Biosyntheseweges (HBW), einem Abzweig der Glykolyse. Ein bis drei Prozent des in der Glykolyse gebildeten Fruktose-6-Phosphats (F-6-P) wird normalerweise in den HBW eingeschleust und durch GFAT1 unter Anwesenheit von Glutamin zu Glukosamin-6-Phosphat (G-6-P) und Glutamat umgesetzt. In weiteren

Reaktionen wird G-6-P dann zu UDP-N-Acetylglucosamin umgesetzt und bildet die Grundlage für Protein-O-Glykosylierungen (O-GlcNAcylation) an spezifischen Serin/Threonin Resten. Inzwischen gibt es eine Vielzahl an Studien die zeigen, dass die Protein-O-GlcNAcylation eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proteinen spielt, und eine gesteigerte oder chronische Glykosylierung von Proteinen der Insulinsignalkaskade mit der Entstehung von Diabetes in Verbindung gebracht wird. So sind beispielsweise die Glykogensynthase (Parker *et al.*, 2004; Parker *et al.*, 2003), der Glukosetransporter GLUT4 (Buse *et al.*, 2002) und die IRS1-2 (Andreozzi *et al.*, 2004; Federici *et al.*, 2002; Patti *et al.*, 1999; Vosseller *et al.*, 2002) Ziele der Protein-O-GlcNAcylation. Möglicherweise beeinflusst Sirt6 die Aktivität von GFAT1 und ist somit an der Entstehung oder Hemmung einer Insulinresistenz beteiligt. Die eingangs erwähnten Probleme von Sirt6 defizienten Mäusen bei der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase könnten dadurch eventuell erklärt werden. Eine Analyse des Einflusses von Sirt6 auf die Aktivität von GFAT1 könnte wichtige neue Erkenntnisse bringen und wurde in dieser Arbeit erstmalig näher untersucht und in Abschnitt 4.4.4 näher erläutert.

Völlig neu und unerwartet sind hingegen die potentiellen Bindungspartner von Sirt6, die in die dritte Gruppe eingeteilt werden können (siehe auch Abbildung 19). Übergreifend sind dies Proteine die unmittelbar an der Regulation der mRNA Stabilität und dem mRNA Abbau beteiligt sind, innerhalb dieser Prozesse aber bestimmt definierte Funktionen einnehmen und in verschiedenen zytoplasmatischen Strukturen/Komplexen innerhalb der Zelle zu finden sind. So sind UPF1, UPF2 und LARP1 oft in Prozessierungskörperchen (engl. processing bodies, PB) zu finden und G3BP1, PABP1, Caprin-1 und eIF4G in Stresskörperchen (engl. stress granules, SG) lokalisiert. SG sind, wie der Name schon andeutet, Komplexe welche als Antwort auf Stresssituationen gebildet werden und mRNA Moleküle beinhalten, welche nach Abklingen des Stresses schnell wieder der Translation zugeführt werden können. PB hingegen sind häufiger in Zellen anzufinden und benötigen nicht unbedingt einer Stressinduktion. Sie beinhalten häufig mRNA Moleküle und auch Proteine die für den Abbau bestimmt sind. So enthalten sie vorwiegend deadenylierte mRNAs und Proteine, die die Deadenylierung vermitteln, wohingegen SGs polyadenylierte Transkripte und Proteine der Translations-Initiations-Komplexe enthalten (Kedersha & Anderson, 2007). Die große Anzahl an SG und PB Markerproteinen deutet an, dass Sirt6 möglicherweise in dessen Entstehung involviert ist und den mRNA Metabolismus mit reguliert. Unterstützung für diese Theorie lieferten Kwon und Mitarbeiter. Sie konnten zeigen, dass die Lysin Deacetylierung in den Prozess der SG Entstehung involviert ist (Kwon *et al.*, 2007). Interessanterweise ist die Protein-O-GlcNAcylation ebenso an der Entstehung der SGs beteiligt. Durch Co-Immunopräzipitation mit anschließender Western Blot Analyse konnte die Interaktion mit

Sirt6 für einige dieser Kandidaten (IGF2BP2, IGF2BP3, FMR1, PABP1 und G3BP1) bereits verifiziert werden (siehe Abbildung 18).

Polyadenyl-binding protein (PABP1)

Der Poly-A-Schwanz der mRNA stellt die Kontrolleinheit dar, die für die Initiation der Translation nötig ist. Veränderungen in der Länge des Poly-A-Schwanzes bestimmen die Translationseffizienz und die Degradation betroffener mRNAs. Dabei werden lange Poly-A-Schwänze mit erhöhter und kurze Poly-A-Schwänze mit einer erniedrigten Translation verbunden. Das menschliche Genom umfasst 4 PABP Gene, PABP1, PABPC3, PABPC4 und PABPC5. Alle 4 PABP Proteine besitzen in ihrer N-terminalen Region 4 RNA Erkennungssequenzen (engl. RNA recognition motifs, RRM's) über die die Bindung an den Poly-A-Schwanz vermittelt wird. Zusammen mit dem Translations-Initiations-Faktor eIF4E, der an die "Cap"-Struktur der mRNA bindet, initiiert PABP1 unter Rekrutierung anderer Faktoren die Translation der mRNA. In PABP1 konnten bereits einige Lysine als potentielle Acetylierungsstellen identifiziert werden, die gleichzeitig als Ubiquitylierungsstelle bekannt sind (Choudhary *et al.*, 2009). Möglicherweise ist hier auch die Funktion bzw. Interaktion mit Sirt6 begründet. Über die Deacetylierung durch Sirt6 könnten die Lysine frei für Ubiquitylierungs-Reaktionen und dadurch für den proteasomalen Abbau markiert werden. Sirt6 würde auf diese Weise die Translation durch Einleitung der PABP1 Degradation inhibieren. Obwohl bis jetzt für Sirt6 keine Rolle in der Proteinsynthese beschrieben ist, könnte die Interaktion mit und möglicherweise auch die Deacetylierung von PABP1 ein erster Ansatzpunkt sein und eine potentielle Funktion von Sirt6 an der Translationsregulierung aufdecken. Allerdings würde die nukleäre Lokalisation von Sirt6 auf den ersten Blick gegen eine Beteiligung an der Translationsregulierung sprechen. Auf der anderen Seite konnte für PABP1 ein Wechsel zwischen nukleärer und zytoplasmatischer Lokalisation gezeigt werden (Afonina *et al.*, 1998; Chekanova & Belostotsky, 2003). Afonina und Mitarbeiter konnten zudem beobachten, dass die zytoplasmatische Lokalisation von PABP1 eine aktive Transkription erfordert und nach der Inhibition der Transkription PABP1 vorrangig im Nukleus zu finden ist. Ein Einfluss von Sirt6 auf die Proteinsynthese bleibt somit denkbar, beschränkt sich aber womöglich auf eine Regulierung von PABP1 innerhalb des Nukleus mit anschließendem Export in das Zytoplasma. Es muss auch erwähnt werden, dass die Interaktion von Sirt6 mit PABP1 von der Anwesenheit von mRNA abhängig ist (siehe Abbildung 20). Eine Behandlung mit RNase A im letzten Waschschritt der Immunopräzipitation verhindert eine Bindung von Sirt6 und PABP1. Eine Regulierung der PABP1 Aktivität durch Sirt6 wäre somit also nur indirekt über die Bindung an das selbe mRNA Molekül möglich. Da die Co-Immunopräzipitation aber mit Gesamtzelllysat durchgeführt wurde, wäre auch denkbar, dass eine Interaktion zwischen Sirt6 und PABP1

nur im Nukleus zustande kommt, weil PABP1 dort zu finden ist. Eine zytoplasmatische Lokalisierung von Sirt6 unter normalen Bedingungen, auch bei Überexpression, konnte entweder nur sehr selten oder gar nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 16 und Abbildung 21). Co-IPs mit nukleären Extrakten könnten Aufschluss darüber geben und sind Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Ras GTP activating protein (GAP)-binding protein 1 (G3BP1)

Die Mitglieder der G3BP Proteinfamilie regulieren die Ras-Aktivität und den Zellzyklus durch Bindung an das RasGAP Protein (Guitard *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 2001). Für G3BP1 konnte bis jetzt eine phosphorylierungsabhängige RNase Aktivität (Tourriere *et al.*, 2001), eine Regulierung der Ubiquitin-Protease (USP10) (Soncini *et al.*, 2001) und eine Endoribonuklease-Aktivität in SGs (Tourriere *et al.*, 2003) beobachtet werden. G3BP defiziente Mäuse sind embryonal letal oder zeigen Störungen des postnatalen Wachstums (Zekri *et al.*, 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Endoribonuklease-Aktivität von G3BP1 für die Entstehung von SGs nach Stressinduktion essentiell ist, da die dominant negative Mutante von G3BP1 die Bildung von SGs verhindert (Tourriere *et al.*, 2003). Auch für G3BP1 konnte eine nukleäre Lokalisation, abhängig vom Phosphorylierungsstatus demonstriert werden (Tourriere *et al.*, 2001). So ist die phosphorylierungsdefiziente Serin- zu Alanin Mutante exklusiv im Zytoplasma zu finden, wohingegen die Serin- zu Glutamat Mutante im Nukleus lokalisiert ist. Dies würde zumindest eine Interaktion mit Sirt6 im Nukleus ermöglichen. Interessant ist auch die bereits beschriebene Interaktion von G3BP1 mit HDAC6, einer Klasse II Histondeacetylase, die im Zytoplasma lokalisiert ist. Kwon *et al.* konnten zeigen, dass nur dephosphoryliertes, zytoplasmatisch lokalisiertes G3BP1 in der Lage ist mit HDAC6 zu interagieren (Kwon *et al.*, 2007). Zusätzlich konnten sie belegen, dass die Deacetylasefunktion von HDAC6 für die effiziente Entstehung der SGs erforderlich ist. Welche Proteine in diesem Zusammenhang durch HDAC6 deacetyliert werden, konnte bisher nicht gezeigt werden und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Begründet auf diesen Beobachtungen wäre eine Regulation der SG-Entstehung, ausgehend von einer möglichen G3BP1 Deacetylierung durch Sirt6 im Nukleus, denkbar. Überraschenderweise zeigten jedoch Co-Lokalisierungsexperimente, dass Sirt6, überexprimiert in U2OS Zellen, nach Hitzeschock-Induktion zusammen mit G3BP1 in SGs co-lokalisiert (siehe Abbildung 22). Dies ist das erste Mal, dass eine zytoplasmatische Lokalisation von Sirt6 dokumentiert werden konnte. Eine zytoplasmatische Lokalisation von Sirt6 unter Normalbedingungen konnte nur ganz selten beobachtet werden (siehe Abbildung 21 A'') und ist möglicherweise auf einen anderen Stress, möglicherweise auch ausgelöst durch die Transfektion, zurückzuführen. Ausgehend von diesen Beobachtungen wäre es durchaus denkbar, dass anders als HDAC6, Sirt6 nicht für die Entstehung der SGs notwendig ist, aber später in

bereits gebildeten SGs andere Funktionen, möglicherweise durch Deacetylierung bestimmter Proteine, übernimmt. Auch für G3BP1 konnten bereits potentielle Acetylierungsstellen, die auch Gegenstand von Ubiquitylierungen sind, identifiziert werden (Choudhary *et al.*, 2009). Auffallend ist hier auch, dass Sirt6 auch mit der Ubiquitin Protease USP10 interagiert (siehe Anhang, Tabelle 27). USP10 ist bereits als Zielprotein von G3BP1 beschrieben und wird durch G3BP1 reguliert (Soncini *et al.*, 2001). Möglicherweise bilden diese drei Proteine einen Komplex und regulieren auf diese Weise die Translation gebundener mRNAs. Eine Überprüfung dieser Annahme wurde noch nicht durchgeführt, ist aber Gegenstand weiterführender Analysen. Die Bindung von Sirt6 und G3BP1 ist nicht durch mRNA vermittelt, wie RNase A Behandlungen während der Co-IP belegen (siehe Abbildung 20). Somit ist die direkte Interaktion beider Proteine und ein direkter Einfluss von Sirt6 auf G3BP1 denkbar.

Insulin-like growth factor 2 (IGF2) mRNA-binding protein 2,-3 (IGF2BP2 und IGF2BP3)

IGF2BP2 und 3 gehören zur Familie der mRNA-bindenden Proteine (IGF2BP1-3), die in Prozesse der RNA Lokalisierung, Stabilisierung und Translation involviert sind. Sie sind während der embryonalen Entwicklung stark exprimiert und für ein normales embryonales Wachstum essentiell (Christiansen *et al.*, 2009). IGF2BPs sind hauptsächlich im Zytoplasma anzutreffen, besitzen aber auch zwei nukleare Exportsequenzen. Diese lassen vermuten, dass IGF2BPs ihre Ziel-mRNA im Kern binden und den Export ermöglichen (Nielsen *et al.*, 2003). Im Zytoplasma bilden diese Proteine große RNP Granulae, die sich verteilt um den Nukleus anlagern und sich von SGs und PBs unterscheiden (Christiansen *et al.*, 2009; Jonson *et al.*, 2007). Sie beinhalten keine Translations-Initiations-Faktoren und keine 60S ribosomalen Untereinheiten, was daraufhin deutet, dass gebundene mRNAs noch keiner Translation unterliegen. In Co-IP Experimenten konnte gezeigt werden, dass IGF2BP2 und IGF2BP3 nur über die Anwesenheit von RNA mit Sirt6 interagieren und eine direkte Bindung eher unwahrscheinlich ist (siehe Abbildung 20). Nach neuesten genomweiten Assoziations-Analysen wurde IGF2BP2 mit der Entstehung der Typ II Diabetes (T2D) in Verbindung gebracht (Saxena *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2007). Wie aber IGF2BP2 möglicherweise in die Entstehung von T2D involviert ist, konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Weitere Untersuchungen sind hier nötig, um die Bedeutung der RNA-vermittelten Interaktion von Sirt6 und den IGF2BP aufzuklären und einer möglichen Bedeutung in der Entstehung von T2D beizukommen.

4.4.3 Überschneidung bei identifizierten Interaktionspartnern von Sirt6 und Sirt7, die in die Regulierung der Stress- und Prozessierungskörperchen involviert sind

Vergleicht man die identifizierten potentiellen Interaktionspartner von Sirt6 und Sirt7, fällt auf, dass sich eine Vielzahl der Kandidaten überschneidet (vergleiche dazu Tabelle 27 und Tabelle 28). Einige dieser Kandidaten sind: PABP1, PABP4, LARP1, UPF1, IGF2BP1, IGF2BP3, FMR1, MOV10, FXR2 und G3BP2. Der Großteil dieser Proteine ist in die Regulation der Stresskörperchen und Prozessierungskörperchen involviert. Eine Überschneidung potentieller Kandidaten mit Sirt1 ist hingegen gar nicht bzw. kaum zu beobachten. Eine Überprüfung potentieller Bindungspartner von Sirt6 und Sirt7 durch entsprechende Co-IPs wurde bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchgeführt. Von den überschneidenden Kandidaten wurden bisher nur FMR1, PABP1 und IGF2BP3 für Sirt6 durch Co-IP als Bindungspartner bestätigt. Andere mit Sirt7 überschneidende Proteine wurden auch für Sirt6 noch nicht durch Co-IP verifiziert. Eine Überschneidung potentieller Kandidaten könnte möglicherweise durch Interaktionen der Sirtuine untereinander erklärt werden. So konnten beispielsweise im Pulldown für Sirt7 vereinzelt, aber nicht in allen Replikaten, Peptide von Sirt6 detektiert werden. Peptide von Sirt7 wurden jedoch in keinem der Sirt6 Replikate identifiziert. Im Pulldown konnten für Sirt1 in einem der Replikate auch Peptide von Sirt6 detektiert werden, aber auch hier lieferte der Pulldown für Sirt6 keine Sirt1 Peptide. Dass die einzelnen Sirtuine auch untereinander interagieren und sich wechselseitig in ihrer Aktivität beeinflussen wird schon lange spekuliert. Durch Co-IP konnte Sirt7 als Bindungspartner von Sirt1 bereits bestätigt werden (Jian Fang unveröffentlichte Daten), jedoch kann über die Bedeutung dieser Interaktion bis jetzt nur spekuliert werden. Ähnliche Experimente wurden für Sirt6 und Sirt7 bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchgeführt, sollten aber auf Hinblick der überschneidenden potentiellen Bindungspartner angestrebt werden.

4.4.4 Sirt6 reguliert das Schlüsselenzym des Hexosamin-Biosyntheseweges

Das Screening nach potentiellen Interaktionspartnern von Sirt6 lieferte mit GFAT1 einen der interessantesten Kandidaten aller identifizierten Bindungspartner. Zum einen konnten in allen drei Replikaten Peptide von GFAT1 mit einem der höchsten H/L Ratio detektiert werden und zum anderen wurde GFAT1 exklusiv in Sirt6 Ansätzen und nicht in den übrigen Sirtuinen Sirt1 und Sirt7, gefunden. Beachtenswerterweise ist GFAT1 ein Protein, das wiederholt mit einer gestörten Glukosehomöostase und der Entstehung einer Insulinresistenz in Verbindung gebracht wurde, einem Phänotyp der in Sirt6 defizienten Mäusen und Tieren mit einer leberspezifischen Deletion von Sirt6 beobachtet werden konnte (Kim *et al.*, 2010; Mostoslavsky *et al.*, 2006). Die Interaktion zwischen Sirt6 und GFAT1 konnte durch Co-IP Experimente mit überexprimierten Proteinen in HEK 293T Zellen bestätigt werden (siehe

Abbildung 18). Zwar war die Bindung in der einen Richtung stärker (Abbildung 18A) als in der anderen (Abbildung 18B), was aber durch spezifische Unterschiede in beiden Ansätzen erklärt werden könnte. Zum einen könnte der FLAG-Antikörper die Zugänglichkeit einer Bindestelle behindern, wohingegen der (CGY)FP-Antikörper keine sterische Behinderung darstellt. Zum anderen spielt hier möglicherweise das Spektrum anderer Bindungspartner von Sirt6 oder GFAT1 eine Rolle. Bei einer Vielzahl von Interaktionspartnern ist die Bindung einzelner Proteine mitunter schwächer und wird von anderen verdrängt. Der Nachweis, dass die Interaktion zwischen Sirt6 und GFAT1 wahrscheinlich direkt erfolgt und nicht über die Anwesenheit von RNA vermittelt wird, wie es für einige Kandidaten der Fall war, konnte ebenfalls erbracht werden (siehe Abbildung 23). Da GFAT1 im Zytoplasma lokalisiert ist und für Sirt6 unter Stressbedingungen gezeigt werden konnte, dass es auch außerhalb des Nukleus in SGs detektiert werden kann, sollte eine mögliche Co-Lokalisation von GFAT1 und Sirt6 in den SGs überprüft werden. Auch hier konnte gezeigt werden, dass Sirt6 und GFAT1 nur unter Hitzestressbedingungen zusammen in den SG detektiert werden können (siehe Abbildung 24). Unter normalen, stressfreien Bedingungen ist Sirt6 hauptsächlich kernlokalisiert. Andere Stresssituationen wie beispielsweise Arsen- oder UV-Behandlungen bewirken hingegen keine Translokation von Sirt6 (Hüttelmaier unveröffentlichte Daten). Dies deutet an, dass Sirt6 möglicherweise an spezifischen Stressantworten beteiligt ist und hier wichtige regulatorische Funktionen übernimmt.

Als Schlüsselenzym des Hexosamin-Biosyntheseweges reguliert GFAT1 die erste und limitierende Reaktion, den Umsatz von Fruktose-6-Phosphat (F-6-P) und Glutamin zu Glukosamin-6-Phosphat und Glutamat. Das Endprodukt des HBW ist dann UDP-N-Acetylglucosamin, ein Zuckerrest der an spezifische Serin/Threonin Reste durch die O-GlcNAc Transferase (OGT) gebunden wird. Eine der Hauptfunktionen, die dem HBW zugeschrieben wird, ist dessen Bedeutung als "Ernährungssensor". Als kleiner Abzweig der Glykolyse gelangen etwa 1-3% des F-6-P in den HBW. Nach Umwandlung zu UDP-N-Acetylglucosamin wird der Zuckerrest auch auf Proteine übertragen, die in vielen Bereichen der Insulinsignalkaskade wirken und die Glukosehomöostase regulieren. So sind GLUT4 (Buse *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005), Akt (Park *et al.*, 2005), die Glykogensynthase (Parker *et al.*, 2003) und IRS1 (Park *et al.*, 2005) Zielproteine der Protein-O-Glykosylierungen. Durch die Glykosylierung kommt es zu einer verminderten, durch Insulin stimulierten IRS1 Phosphorylierung und infolgedessen einhergehenden reduzierten Akt Phosphorylierung. Durch die fehlende Akt Aktivierung kommt es weiterhin zu einer reduzierten GLUT4 Translokation in die Plasmamembran, was die Aufnahme von Glukose aus dem Blut abschwächt (Whelan *et al.*, 2010; Whelan *et al.*, 2008). Gleichzeitig reduziert die Glykosylierung auch die Aktivität der Glykogensynthase und verhindert dadurch ein Speichern der Glukose in Form von Glykogen in der Leber. Dies reduziert zusätzlich die

Aufnahme von Glukose in die Leber und trägt so zu einem hohen Blutzuckerspiegel bei. Die Protein-*O*-Glykosylierung fungiert damit als Negativregulator der Insulinsignalkaskade und sorgt unter normalen Bedingungen für eine Abschwächung der insulinstimulierten Glukoseaufnahme, wenn die Zelle gesättigt ist. Eine Fehlregulierung einzelner Reaktionsschritte oder eine chronische Aktivierung des HBW wird daher mit der Entstehung von Typ 2 Diabetes in Zusammenhang gebracht (Luo *et al.*, 2007).

Aufgrund der Interaktion von Sirt6 und GFAT1 und der beobachteten Dysregulation der Glukosehomöostase in Sirt6 Knock Out Mäusen wurde deshalb auf eine mögliche Beeinflussung der GFAT1 Aktivität durch Sirt6 spekuliert. Um erste Antworten zu erhalten, wurde zunächst das globale Protein-*O*-Glykosylierungslevel in den Hepatocyten adulter Sirt6 Albumin Cre Mäuse untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Glykosylierungslevel in den leberspezifischen Mutanten deutlich erhöht gegenüber dem der Wildtyp Tiere war (siehe Abbildung 25). Eine veränderte Aktivität anderer am HBW beteiligter Proteine kann durch diese Western Blot Analyse natürlich nicht ausgeschlossen werden. Auch war es, wie schon erwähnt, nicht möglich die Expression von GFAT1 im adulten Lebergewebe darzustellen. Als möglicher Grund könnte eine sehr geringe Expression von GFAT1 in der adulten Leber ursächlich sein. Eine erhöhte Protein-*O*-Glykosylierung aufgrund erhöhter GFAT1 Expression kann aus diesem Grund nicht ausgeschlossen werden. Die Analyse embryonalen Lebergewebes des Stadiums E14.5 hingegen lieferte auswertbare Ergebnisse und zeigte keine Veränderung der GFAT1 Expression im Vergleich Sirt6 defizienter oder entsprechender Wildtyp Mäuse der Sirt6 cmvKO KO Linie (siehe Abbildung 27). Dagegen konnte für GFAT1 in der Leber der Sirt6 Knock Out Mäuse eine erhöhte Aktivität, verglichen mit den Wildtyp Geschwistertieren gemessen werden (siehe Abbildung 28). Es bleibt aber zu Erwähnen, dass die Unterschiede zwischen den Wildtypen und den Sirt6 defizienten Tieren nicht signifikant sind (p -wert = 0,07). Die detektierte erhöhte Protein-*O*-Glykosylierung in der Leber der Sirt6 Knock Out Mäuse spricht aber für eine gesteigerte GFAT1 Aktivität. Die Analyse einer größeren Anzahl an Knock Out und Wildtyp Mäusen sollte hier für eindeutige Resultate sorgen und ist Gegenstand weiterer Arbeiten. Jedoch kann, basierend auf den bisher erzielten Ergebnissen spekuliert werden, dass Sirt6 die Aktivität von GFAT1 auf bisher unbekannte Art, möglicherweise durch Deacetylierung oder mono-ADP-Ribosylierung, negativ reguliert. Da bei der Aktivitätsbestimmung Gesamtlebergewebe verwendet wurde, kann die Aktivität anderer GFAT Isoformen oder Splicevarianten natürlich nicht vernachlässigt werden. Jedoch ist GFAT2 (75% Homologie zu GFAT1 auf Aminosäureebene) hauptsächlich im zentralen Nervensystem und dem Herzen exprimiert und in der Leber kaum detektierbar (Hu *et al.*, 2004; Oki *et al.*, 1999). GFAT1-L, eine Splicevariante von GFAT1 hingegen ist exklusiv in der gestreiften Muskulatur zu finden und in der Leber nicht detektierbar (DeHaven *et al.*, 2001; Niimi *et al.*, 2001). Somit kann eine

Verfälschung der GFAT1 Aktivitätsbestimmung durch andere GFAT-Varianten fast ausgeschlossen und auf ein Minimum reduziert werden. Ein Ausbleiben der negativen Regulierung von GFAT1 in Leber der Sirt6 Albumin Cre Knock Out Tiere könnte somit für eine chronische Aktivierung des HBW sorgen, die dann über einen längeren Zeitraum gesehen, zu der bereits angesprochenen Dämpfung insulinvermittelter Signalwege und letztendlich zur Entstehung von Diabetes beiträgt. So entwickeln beispielsweise transgene Mäuse, die GFAT in der Leber überexprimieren, im Alter eine Insulinresistenz (Veerababu *et al.*, 2000). In jungen Tieren (jünger als 12 Monate) konnten hier keine Anzeichen einer Insulinresistenz beobachtet werden. Vielmehr zeigten diese Tiere sogar erniedrigte Glukosespiegel, was für eine verbesserte Insulinsensitivität spricht, Beobachtungen wie sie auch bei den in dieser Arbeit untersuchten leberspezifischen Sirt6 Knock Out Tieren gemacht werden konnten (siehe Abbildung 14). Dies legt wiederum nahe, dass dort ein Zusammenhang zwischen Sirt6 Knock Out, gesteigerter GFAT1 Aktivität und der Entwicklung einer Insulinresistenz besteht. Es wird angenommen, dass der HBW als Ernährungssensor einer chronischen aber nicht akuten Übersättigung fungiert, eine Hypothese die durch die Beobachtungen in den Sirt6 Albumin Cre Mutanten bekräftigt wird. Im Zusammenhang mit der gesteigerten Protein-O-Glykosylierung ist auch die Erhöhung des Stresses im Endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress) zu erwähnen. Es zeigte sich, dass ER-Stress wie auch der HBW als Negativregulator des Insulinsignalweges auftritt, die Translation wichtiger Proteine beeinflusst und somit die Entstehung von Diabetes begünstigt (Balasubramanyam *et al.*, 2012; Flamment *et al.*, 2012). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die chronische Aktivierung des HBW zu einer Erhöhung des ER-Stress beiträgt (Sage *et al.*, 2010). Dabei müssen allerdings zwei Phasen des ER-Stress beachtet werden. In einer frühen Phase kommt es zur Freisetzung von Chaperonen wie beispielsweise GRP78. Diese vermitteln die Reparatur missgefalteter Proteine bei kurzzeitigem Stress (Li *et al.*, 2008). Bei länger anhaltendem Stress oder einer irreversiblen Schädigung der Zelle werden hingegen andere Proteine exprimiert. So vermittelt CHOP, die durch anhaltenden ER-Stress ausgelöste Apoptose und LC3B wie auch BECN1 sind typische Markerproteine der Autophagozytose (Oyadomari & Mori, 2004). Bei der Analyse des Lebergewebes von Sirt6 Albumin Cre Knock Out Mäusen zeigte sich eine deutliche Erhöhung der GRP78 Expressionslevel, die Expression der Apoptose- und Autophagiemarker blieb hingegen unverändert, verglichen mit Wildtyp Tieren (siehe Abbildung 26). Ob die Erhöhung der Expression von GRP78 aus der gesteigerten Aktivität des HBW resultiert, oder ob Sirt6 direkt in dessen Expression eingreift, konnte bis zu diesen Zeitpunkt nicht aufgeklärt werden. Jedoch liefert auch dieser Befund neue Hinweise darauf, dass Sirt6 über den HBW in die Entstehung von Diabetes involviert ist.

Um zu ergründen, wie Sirt6 die Aktivität von GFAT1 beeinflusst, wurde zunächst der Acetylierungsstatus von GFAT1 unter verschiedenen Bedingungen untersucht. In neueren Studien konnte beobachtet werden, dass nahezu alle Enzyme, die in die Glykolyse, die Glukoneogenese, den Zitratzyklus und den Fettsäuremetabolismus involviert sind, auch Ziel von Acetylierungen sind (Zhao *et al.*, 2010). Für einige konnte auch eine Abhängigkeit der Aktivität vom Acetylierungsstatus gezeigt werden. Die massenspektrometrische Analyse von GFAT1 zeigte, dass GFAT1 in Kombination mit Acetyltransferasen acetyliert und in Kombination mit Sirt6 deacetyliert vorlag (siehe Tabelle 24). Zudem konnte beobachtet werden, dass die Co-Transfektion von GFAT1 mit zwei der drei gewählten Acetyltransferasen (CBP und PCAF) eine deutliche Erhöhung der GFAT Proteinlevel hervorrief (siehe Abbildung 31). Zunächst wurde vermutet, dass die erhöhte Expression durch eine unspezifische Promotoraktivierung des verwendeten Plasmides bei der Transfektion durch die Acetyltransferasen hervorgerufen wurde. Diese Möglichkeit konnte aber durch entsprechende Co-Transfektionsexperimente mit anderen Konstrukten, die mit dem selben Vektor kloniert wurden, oder aber den selben Promotor besitzen, ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 32). Die nächste Annahme bestand darin, dass GFAT1 durch die Acetylierung der detektierten Lysine eventuell somit vor einer Ubiquitylierung der selbigen geschützt ist und dadurch der proteasomale Abbau verhindert wird. Die Blockade des Proteasoms durch den spezifischen Inhibitor MG132 zeigte jedoch keine Steigerung der Expression von GFAT1, wenn es nicht mit den Acetyltransferasen co-transfiziert wird (siehe Abbildung 33). Wohingegen die Analyse eines ansonsten schnell durch das Proteasom abgebauten Proteins, c-jun (Lu *et al.*, 2007; Treier *et al.*, 1994), eine deutliche Erhöhung der Proteinlevel unter den getesteten Bedingungen zeigte (siehe Abbildung 34). Eine Blockade des proteasomalen Abbaus von GFAT1 kann somit nicht eindeutig für dessen erhöhte Proteinlevel verantwortlich gemacht werden. Möglicherweise schützt die Acetylierung vor anderen bisher nicht untersuchten Abbauvorgängen, wie beispielsweise der lysosomalen Degradation und soll in noch folgenden Analysen näher untersucht werden.

Allerdings führte die Einführung einzelner, sowie die Kombination aus allen vier Lysin-zu-Alanin Mutationen der identifizierten Acetylierungsstellen nicht zum Abfall der GFAT1 Proteinlevel, wenn diese mit den Acetyltransferasen co-transfiziert wurden (siehe Abbildung 35). Es konnte allerdings schon oft gezeigt werden, dass vorher nicht acetylierbare Lysine nach der Einführung von Mutationen bekannter Acetylierungsstellen in ein neues potentiell Acetylierungsziel für Acetyltransferasen umgewandelt werden kann. Ob dies auch für GFAT1 zutrifft, wurde durch eine erneute Analyse der GFAT1 Mutante mit der Kombination aller vier Lysin-zu-Alanin Mutationen untersucht. Dabei wurden drei weitere Acetylierungsziele identifiziert, die vorher nicht detektiert werden konnten (siehe Tabelle 25). Da bei der

Übernahme der potentiellen Acetylierungsstellen ein Fehler gemacht wurde, erfolgte zunächst die Mutation eines der identifizierten Lysine, sowie zwei weiterer nicht detektierter Lysine. Auch hier ergab die Überexpression der GFAT1 7x Mutante mit den Acetyltransferasen CBP und PCAF erneut eine deutliche Erhöhung der GFAT1 Proteinlevel (siehe Abbildung 37). Ob dies jetzt an den falsch mutierten Lysinen, oder an neu gebildeten potentiellen Acetylierungszielen liegt, konnte bis zu diesem Zeitpunkt nicht aufgeklärt werden und soll in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Allerdings stellt sich auch die Frage, ob der Acetylierungsstatus von GAFT1 ursächlich mit dessen beobachteter Stabilität zusammenhängt.

Durch das Screening nach potentiellen Acetylierungsstellen sollten vorrangig Lysine identifiziert werden, die möglicherweise das Ziel einer Deacetylierung durch Sirt6 sind und so eventuell die Aktivität von GFAT1 regulieren. Um die potentiellen Acetylierungsziele auch hinsichtlich ihrer Beeinflussung der enzymatischen Aktivität zu untersuchen, wäre es hilfreich, rekombinantes GFAT1 sowie deren Mutanten herstellen zu können. Leider war es bis zu diesem Zeitpunkt nicht möglich GFAT1 in Bakterien herzustellen, da gebildetes GFAT1 Protein immer in Einschlußkörperchen eingeschlossen wurde und eine Aufreinigung bis jetzt erfolglos blieb. Auch das Austesten verschiedenster Kultivierungs- und Induktionsbedingungen konnte die Bildung der Einschlußkörperchen bisher nicht verhindern. Für eine Aufklärung der Aktivitätsregulation wäre die Herstellung von rekombinatem GFAT1 aber von großer Bedeutung, da nur so eine Aktivitätsbestimmung fernab aller Einflüsse, wie sie im Gesamtzelllysat vorkommen, erfolgen kann.

Abschließend ist festzuhalten, dass deutliche Hinweise darauf bestehen, dass Sirt6 mit GFAT1 interagiert, dessen enzymatische Aktivität kontrolliert und dadurch Einfluss auf die Regulation der Glukosehomöostase und, über einen längeren Zeitraum gesehen, Einfluss auf die Entstehung von Diabetes ausübt.

4.5 Ausblick

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Verlust von Sirt6 in der Leber zunächst keine offensichtlichen phänotypischen Auffälligkeiten hervorruft. Allerdings kommt es über einen längeren Zeitraum gesehen zu deutlichen Veränderung des Lebergewebes und zur Ausprägung einer Insulinresistenz. In einem Screening nach potentiellen Interaktionspartnern von Sirt6 konnte zudem ein Kandidat identifiziert und verifiziert werden (GFAT1), der beeinflusst durch Sirt6, erhebliche Auswirkungen auf die Entstehung der peripheren Insulinresistenz in der Leber hat. Im Lebergewebe Sirt6 defizienter Mäuse konnte eine erhöhte GFAT1 Aktivität detektiert werden, die zur Dämpfung Insulin vermittelter Signalwege führt und letztendlich für die Ausbildung der Insulinresistenz prägend ist. Jedoch konnte bis jetzt nicht gezeigt werden, wie Sirt6 die Aktivität von GFAT1 reguliert. Für Sirt6

wurden bisher Deacetylase- und mono-ADP-Ribosyltransferase Aktivitäten nachgewiesen, eine Regulation von GFAT1 auf ähnliche Weise wäre also denkbar. GFAT1 Aktivitäts-Assays mit rekombinant hergestelltem wildtypischen Sirt6, sowie Deacetylase- und mono-ADP-Ribosyltransferase defizienten Mutanten von Sirt6, wildtypischen GFAT1 und mutiertem GFAT1 sollten hier zur Aufklärung beitragen. Desweiteren sollte auch die Erhöhung des ER-Stress in der Leber der leberspezifischen Sirt6 Knock Out Tiere näher untersucht werden. Bis jetzt ist unklar, ob diese Erhöhung aus der gesteigerten Aktivität des HBW resultiert oder ob Sirt6 direkt in die Regulation der ER-Stressantwort eingreift.

Einige der identifizierten potentiellen Bindungspartner von Sirt6 wurden zwar schon durch Co-Immunopräzipitation validiert, die Hintergründe und die biologische Bedeutung der Interaktion wurde aber bis jetzt nur für GFAT1 untersucht. So könnte beispielsweise die Analyse der Expression stromabwärts gelegener Proteine aus der Signalkaskade der potentiellen Kandidaten neue Erkenntnisse liefern und zum Verständnis der Interaktionen mit Sirt6 beitragen.

Von großem Interesse ist natürlich auch die Validierung einiger Bindungspartner von Sirt1 und Sirt7. Besonders sei hier auf die überlappenden Kandidatenproteine von Sirt6 und Sirt7 hingewiesen. Da bereits über mögliche Interaktionen zwischen den einzelnen Sirtuinen spekuliert wird, könnten sich hier neue Möglichkeiten ergeben und aufzeigen in welchen Bereichen und unter welchen Bedingungen eine Interaktion ermöglicht wird.

5. Anhang

5.1 Auflistung potentieller Interaktionspartner von Sirt1, Sirt6 und Sirt7

Tabelle 26: Potentielle Interaktionspartner von Sirt1

Protein Names	Ratio H/L	Gene Names
Endosulfine alpha;Alpha-endosulfine;ARPP-19e;Putative uncharacterized protein ENSA	66,3	ENSA;RP11-54A4.10-004
Flap endonuclease 1;Flap structure-specific endonuclease 1;Maturation factor 1;DNase IV	30,4	FEN1;RAD2
Laminin subunit beta-1	20,4	LAMB1
Transcription elongation regulator 1;TATA box-binding protein-associated factor 2S;Transcription factor CA150	20,0	TCERG1;CA150;TAF2S
NAD-dependent deacetylase sirtuin-1;SIR2-like protein 1;cDNA FLJ76335, highly similar to Homo sapiens sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae), mRNA	19,0	SIRT1;SIR2L1;RP11-57G10.3-002
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56;DEAD box protein 56;ATP-dependent 61 kDa nucleolar RNA helicase;DEAD-box protein 21	16,2	DDX56;DDX21;NOH61
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52;DEAD box protein 52;ATP-dependent RNA helicase ROK1-like;Putative uncharacterized protein DDX52	15,7	DDX52;ROK1;HUSSY-19
U2-associated protein SR140;140 kDa Ser/Arg-rich domain protein	14,7	SR140;KIAA0332
Protein KIAA1967;Deleted in breast cancer gene 1 protein;p30 DBC	14,6	KIAA1967;DBC1
Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein;SR-related CTD-associated factor 6;ERPROT 213-21;cDNA FLJ51520, highly similar to Homo sapiens calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP), mRNA	14,5	CHERP;DAN26;SCAF6
E3 ubiquitin-protein ligase RAD18;Postreplication repair protein RAD18;RING finger protein 73	12,4	RAD18;RNF73
Cell division protein kinase 9;Cyclin-dependent kinase 9;Serine/threonine-protein kinase PITALRE;Cell division cycle 2-like protein kinase 4	8,6	CDK9;CDC2L4
U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1;U4/U6.U5 tri-snRNP-associated 110 kDa protein;Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 1	8,5	SART1
Nucleolar transcription factor 1;Upstream-binding factor 1;Autoantigen NOR-90;Ribosomal RNA upstream binding transcription factor	8,4	UBTF;UBF;UBF1
U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A;Serologically defined colon cancer antigen 16;Antigen NY-CO-16;Putative uncharacterized protein UTP14A	8,0	UTP14A;SDCCAG16
Nucleolar protein 14;Nucleolar complex protein 14	7,5	NOP14;C4orf9;NOL14;RES4-25
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2;cDNA FLJ53542, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like	7,4	HNRNPC;HNRPC;HNRNPCL1;HNRPCL1;LOC440563
Tuftelin-interacting protein 11;Septin and tuftelin-interacting protein 1;cDNA FLJ58206, highly similar to Tuftelin-interacting protein 11	6,8	TFIP11;STIP;HSPC006
Regulator of nonsense transcripts 3B;Nonsense mRNA reducing factor 3B;Up-frameshift suppressor 3 homolog B	6,7	UPF3B;RENT3B;UPF3X
HIV Tat-specific factor 1;cDNA FLJ60139, highly similar to Homo	6,6	HTATSF1;RP1-

sapiens HIV TAT specific factor 1 (HTATSF1), mRNA;HIV-1 Tat specific factor 1		196E23.2-002;RP1-196E23.2-003
Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1;Factor interacting with PAP;FIP1-like 1;Rearranged in hypereosinophilia;cDNA FLJ61400, highly similar to Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1	6,5	FIP1L1;FIP1;RHE
Protein MCM10 homolog;Minichromosome maintenance complex component 10;MCM10 minichromosome maintenance deficient 10 (S. cerevisiae), isoform CRA_b	6,5	MCM10;PRO2249;RP11-24J20.4-002;hCG_40780
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4;ATP-dependent helicase CHD4;Mi-2 autoantigen 218 kDa protein;Mi2-beta;Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5;ATP-dependent helicase CHD5	5,5	CHD4;CHD5;KIAA0444
Importin subunit alpha-2;Karyopherin subunit alpha-2;SRP1-alpha;RAG cohort protein 1;Karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	5,4	KPNA2;RCH1;SRP1
Signal recognition particle 14 kDa protein;18 kDa Alu RNA-binding protein	4,6	SRP14
Nuclear migration protein nudC;Nuclear distribution protein C homolog;Putative uncharacterized protein NUDC;NPD011	4,5	NUDC;NPD011
Cyclin-T1	3,9	CCNT1
Histone deacetylase 1;Histone deacetylase 2	3,1	HDAC1;RPD3L1;HDAC2;RP4-811H24.2-010
Transcription intermediary factor 1-beta;Tripartite motif-containing protein 28;Nuclear corepressor KAP-1;KRAB-associated protein 1;KRAB-interacting protein 1;RING finger protein 96	2,7	TRIM28;KAP1;RNF96;TI F1B
40S ribosomal protein S2;S4;LLRep3 protein;Putative uncharacterized protein ENSP00000351543	2,4	RPS2;RPS4
cDNA FLJ54303, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1	2,4	
Heat shock 70 kDa protein 1;HSP70.1;HSP70-1/HSP70-2;cDNA FLJ54370, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1;cDNA FLJ54407, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1	2,3	HSPA1A;HSPA1;HSPA1 B;DAAP-21F2.8-002;DADB-333F21.4-002

Tabelle 27: Potentielle Interaktionspartner von Sirt6

Protein Names	Ratio H/L	Gene Names
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1;G3BP-1;ATP-dependent DNA helicase VIII;HDH-VIII;GAP SH3 domain-binding protein 1;CDNA FLJ26493 fis, clone KDN06317, highly similar to Ras-GTPase-activating protein binding protein 1	45,7	G3BP1;G3BP
Laminin subunit beta-1	28,9	LAMB1
Mono-ADP-ribosyltransferase sirtuin-6;SIR2-like protein 6	24,8	SIRT6;SIR2L6
Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1;Glutamine:fructose 6 phosphate amidotransferase 1;D-fructose-6-phosphate amidotransferase 1;Hexosephosphate aminotransferase 1	20,1	GFPT1;GFAT;GFPT
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10;Ubiquitin thioesterase 10;Ubiquitin-specific-processing protease 10;Deubiquitinating enzyme 10	19,2	USP10;KIAA0190
Caprin-1;Cytoplasmic activation- and proliferation-associated protein 1;GPI-anchored membrane protein 1;GPI-anchored protein p137;p137GPI;Cell cycle-associated protein 1;Membrane component chromosome 11 surface marker 1;cDNA FLJ57278	16,0	CAPRIN1;GPIAP1;GPIP 137;M11S1
Fragile X mental retardation 1 protein	14,5	FMR1
T-complex protein 1 subunit eta;CCT-eta;HIV-1 Nef-interacting protein;cDNA FLJ54832, highly similar to T-complex protein 1 subunit eta;Putative uncharacterized protein CCT7	12,1	CCT7;CCTH;NIP7-1

Polyadenylate-binding protein 1;cDNA FLJ37875 fis, clone BRSSN2018771, highly similar to Poly(A)-binding protein 1;cDNA FLJ59219, highly similar to Poly(A)-binding protein 1	11,3	PABPC1;PAB1;PABP1;PABPC2;PABPC3;PABP3;PABPL3
YTH domain family protein 2;High-glucose-regulated protein 8;CLL-associated antigen KW-14;Renal carcinoma antigen NY-REN-2	11,2	YTHDF2;HGRG8
T-complex protein 1 subunit theta;CCT-theta;Renal carcinoma antigen NY-REN-15	10,9	CCT8;CCTQ;KIAA0002
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3;IGF-II mRNA-binding protein 3;KH domain-containing protein overexpressed in cancer;VICKZ family member 3	10,4	IGF2BP3;IMP3;KOC1;VICKZ3
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1;IGF-II mRNA-binding protein 1;Coding region determinant-binding protein;VICKZ family member 1;Zip code-binding protein 1	10,3	IGF2BP1;CRDBP;VICKZ1;ZBP1
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	9,5	FXR2;FMR1L2
Eukaryotic initiation factor 4A-III;Eukaryotic translation initiation factor 4A isoform 3;ATP-dependent RNA helicase eIF4A-3;ATP-dependent RNA helicase DDX48;DEAD box protein 48	9,2	EIF4A3;DDX48;KIAA0111
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2;G3BP-2;GAP SH3 domain-binding protein 2	8,9	G3BP2;KIAA0660
PABPC4 protein;Polyadenylate-binding protein 4;Inducible poly(A)-binding protein;Activated-platelet protein 1;Poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 (Inducible form);Poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 (Inducible form), isoform CRA_e	8,2	PABPC4;APP1;PABP4;RP11-69E11.6-003;hCG_2031827
La-related protein 1;La ribonucleoprotein domain family member 1	7,6	LARP1;KIAA0731;LARP
Regulator of nonsense transcripts 1;ATP-dependent helicase RENT1;Nonsense mRNA reducing factor 1;Up-frameshift suppressor 1 homolog	7,6	UPF1;KIAA0221;RENT1
Regulator of nonsense transcripts 2;Nonsense mRNA reducing factor 2;Up-frameshift suppressor 2 homolog	7,4	UPF2;KIAA1408;RENT2
ELAV (Embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B);ELAV-like protein 2;Hu-antigen B;ELAV-like neuronal protein 1;Nervous system-specific RNA-binding protein Hel-N1	7,1	ELAVL2;RP11-315I14.4-004;HUB;ELAVL4;RP11-567C20.1-005
BAT2 domain-containing protein 1;HBxAg transactivated protein 2;cDNA FLJ50056, highly similar to Homo sapiens BAT2 domain containing 1 (BAT2D1), mRNA	6,9	BAT2D1;KIAA1096;XTP2
Ataxin-2-like protein;Ataxin-2 domain protein;Ataxin-2-related protein;cDNA FLJ77026, highly similar to Homo sapiens ataxin 2-like (ATXN2L), transcript variant E, mRNA	6,7	ATXN2L;A2D;A2LG;A2LP;A2RP
RNA-binding protein 39;RNA-binding motif protein 39;RNA-binding region-containing protein 2;Hepatocellular carcinoma protein 1;Splicing factor HCC1;RNA binding motif protein 39	6,3	RBM39;HCC1;RNPC2;RP11-353C18.2-035;DKFZp686A11192
T-complex protein 1 subunit beta;CCT-beta	6,3	CCT2;99D8.1;CCTB
T-complex protein 1, delta subunit;T-complex protein 1 subunit delta;CCT-delta;Stimulator of TAR RNA-binding;Putative uncharacterized protein CCT4	6,2	CCT4;CCTD;SRB
T-complex protein 1 subunit zeta;CCT-zeta;CCT-zeta-1;Tcp20;HTR3;Acute morphine dependence-related protein 2;Putative uncharacterized protein CCT6A	6,1	CCT6A;CCT6;CCTZ
Putative helicase MOV-10;Moloney leukemia virus 10 protein;cDNA FLJ32791 fis, clone TESTI2002365, highly similar to helicase MOV-10 (EC 3.6.1.-);cDNA FLJ13235 fis, clone OVARC1000304	6,0	MOV10;KIAA1631;RP11-426L16.2-003;hCG_38463
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30;DEAH box protein 30	5,8	DHX30;DDX30;KIAA0890
Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2;FMRP-interacting protein 2;82 kDa FMRP-interacting protein;Cell proliferation-inducing gene 1 protein	5,6	NUFIP2;KIAA1321;PIG1
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1;ATP-dependent DNA	5,1	XRCC6;G22P1

helicase II 70 kDa subunit;Lupus Ku autoantigen protein p70;70 kDa subunit of Ku antigen;Thyroid-lupus autoantigen;CTC box-binding factor 75 kDa subunit;DNA repair protein XRCC6;X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6		
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q;Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein;Glycine- and tyrosine-rich RNA-binding protein;GRY-RBP;NS1-associated protein 1	5,0	SYNCRIP;HNRPQ;NSAP 1
Transcriptional activator protein Pur-alpha;Purine-rich single-stranded DNA-binding protein alpha	4,8	PURA;PUR1
Non-POU domain-containing octamer-binding protein;54 kDa nuclear RNA- and DNA-binding protein;p54(nrb);55 kDa nuclear protein;NMT55;DNA-binding p52/p100 complex, 52 kDa subunit	4,8	NONO;NRB54
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L;cDNA FLJ75895, highly similar to Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (HNRPL), transcript variant 2, mRNA;Putative uncharacterized protein HNRNPL	4,7	HNRNPL;HNRPL;P/OKcl .14
DnaJ homolog subfamily A member 1;Heat shock 40 kDa protein 4;DnaJ protein homolog 2;HDJ-2;HSJ-2;HSDJ	4,6	DNAJA1;DNAJ2;HDJ2;HSJ2;HSPF4
Nucleolar RNA helicase 2;Nucleolar RNA helicase II;Nucleolar RNA helicase Gu;RH II/Gu;Gu-alpha;DEAD box protein 21	4,4	DDX21
Splicing factor, proline- and glutamine-rich;Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor;DNA-binding p52/p100 complex, 100 kDa subunit;100 kDa DNA-pairing protein	4,4	SFPQ;PSF
Splicing factor, arginine/serine-rich 9;Pre-mRNA-splicing factor SRp30C;cDNA FLJ56571, highly similar to Splicing factor, arginine/serine-rich 9	4,4	SFRS9;SRP30C
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6;DEAD box protein 6;ATP-dependent RNA helicase p54;Oncogene RCK	4,3	DDX6;HLR2;RCK
Bcl-2-associated transcription factor 1	4,3	BCLAF1;BTF;KIAA0164
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1;p220;EIF4G1 protein	4,3	EIF4G1;EIF4F;EIF4G;EIF4GI
ELAV-like protein 1;Hu-antigen R	4,2	ELAVL1;HUR
CAD protein;Glutamine-dependent carbamoyl-phosphate synthase;Aspartate carbamoyltransferase;Dihydroorotase;Putative uncharacterized protein CAD	4,1	CAD
Thyroid hormone receptor-associated protein 3;Thyroid hormone receptor-associated protein complex 150 kDa component	4,0	THRAP3;TRAP150
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5;DEAD box protein 5;RNA helicase p68;cDNA FLJ59339, highly similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 (EC 3.6.1.-)	3,9	DDX5;G17P1;HELRL;HLR1
Nuclease-sensitive element-binding protein 1;Y-box-binding protein 1;Y-box transcription factor;YB-1;CCAAT-binding transcription factor I subunit A;Enhancer factor I subunit A	3,8	YBX1;NSEP1;YB1;YBX2;CSDA3;MSY2
Uncharacterized protein C17orf85;Protein ELG	3,7	C17orf85
SAFB protein;Scaffold attachment factor B;Scaffold attachment factor B1;SAB-B1;SAF-B;HSP27 estrogen response element-TATA box-binding protein	3,7	SAFB;HAP;HET;SAFB1
Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A;Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA-dependent activator;Protein activator of the interferon-induced protein kinase;PKR-associated protein X;PKR-associating protein X	3,5	PRKRA;PACT;RAX;HSD14;HSD-14
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G;RNA-binding motif protein, X chromosome;Glycoprotein p43;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G, N-terminally processed	3,5	RBMX;HNRPG;RBMXP1;CCBL2;DKFZp547N1117;RBMXL1
T-complex protein 1 subunit alpha;CCT-alpha	3,4	CCT1;CCTA;TCP1
ATP-dependent RNA helicase A;Nuclear DNA helicase II;DEAH box protein 9	3,4	DHX9;DDX9;LKP;NDH2

Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A;Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10;eIF-3-theta;eIF3 p167;eIF3 p180;eIF3 p185	3,3	EIF3A;EIF3S10;KIAA0139
Histone H4	3,3	HIST1H4A;H4/A;H4FA;HIST1H4B;H4/I;H4FI;HIST1H4C
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	3,2	HNRNPM;HNRPM;NAGR1
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17;DEAD box protein 17;RNA-dependent helicase p72;DEAD box protein p72;DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	3,1	DDX17;RP3-434P1.4-009;RP3-434P1.4-005
Protein LSM12 homolog	3,1	LSM12
Histone H3.1;H3/a;H3/b;H3/c;H3/d;H3/f;H3/h;H3/i;H3/j;H3/k;H3/l;Histone H3.3;Histone H3.1t;H3/g;Histone H3.2;H3/m;H3/o;Histone H3-like;Histone H3	3,1	HIST1H3A;H3FA;HIST1H3B;H3FL;HIST1H3C;H3FC;HIST1H3D
Splicing factor, arginine/serine-rich 7;Splicing factor 9G8;Putative uncharacterized protein SFRS7;Splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa, isoform CRA_a;cDNA FLJ60677	3,1	SFRS7
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K;Transformation up-regulated nuclear protein;cDNA FLJ54552, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K;cDNA FLJ39066 fis, clone NT2RP7014743	3,0	HNRNPK;HNRPK;RP11-575L7.1-005;RP11-575L7.1-001
RNA-binding protein 14;RNA-binding motif protein 14;RRM-containing coactivator activator/modulator;Synaptotagmin-interacting protein;Paraspeckle protein 2	3,0	RBM14;SIP
60S ribosomal protein L23a;Putative uncharacterized protein RPL23A;Ribosomal protein L23a, isoform CRA_a	3,0	RPL23A
Histone H1.2;Histone H1d;Histone H1.3;Histone H1c;Histone H1.4;Histone H1b	3,0	HIST1H1C;H1F2;HIST1H1D;H1F3;HIST1H1E;H1F4
Interleukin enhancer-binding factor 3;Nuclear factor of activated T-cells 90 kDa;Double-stranded RNA-binding protein 76;Translational control protein 80;Nuclear factor associated with dsRNA	2,9	ILF3;DRBF;MPHOSPH4;NF90
Histone H2B type 1-N;H2B.d;H2B/d;Histone H2B;Histone H2B type 1-K;HIRA-interacting protein 1;Histone H2B type 1-H;H2B.j;H2B/j;Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;H2B.a/g/h/k/l;H2B.1 A	2,9	HIST1H2BN;H2BFD;HIST1H2BK;H2BFT;HIRIP1;HIST1H2BH
HNRPR protein;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R;cDNA FLJ53358, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	2,9	HNRPR;HNRNPR;RP5-1057J7.2-002;hCG_38907
Putative uncharacterized protein EIF3CL;Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C;Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8;eIF3 p110;cDNA FLJ53378	2,9	EIF3CL;EIF3C;EIF3S8
Putative uncharacterized protein MATR3;Matrin-3	2,8	MATR3;KIAA0723
A-kinase anchor protein 8-like;Neighbor of A-kinase-anchoring protein 95;Homologous to AKAP95 protein;Helicase A-binding protein 95;cDNA FLJ58398, highly similar to A-kinase anchor protein 8	2,8	AKAP8L;NAKAP95;HRIHFB2018
Protein mago nashi homolog;Mago-nashi homolog, proliferation-associated (Drosophila);cDNA FLJ55283, moderately similar to Protein mago nashi homolog;Mago-nashi homolog	2,7	MAGOH;RP5-1024G6.4-002;hCG_33396
Interleukin enhancer-binding factor 2;Nuclear factor of activated T-cells 45 kDa;Interleukin enhancer binding factor 2 variant	2,7	ILF2;NF45;PRO3063
Insulin receptor substrate 4;160 kDa phosphotyrosine protein;PY160	2,6	IRS4
Myb-binding protein 1A	2,6	MYBBP1A;P160
40S ribosomal protein S9;Putative uncharacterized protein	2,5	RPS9

RPS9;Ribosomal protein S9, isoform CRA_c;RPS9 protein		
Nuclear cap-binding protein subunit 2;20 kDa nuclear cap-binding protein;NCBP 20 kDa subunit;NCBP-interacting protein 1;Cell proliferation-inducing gene 55 protein;cDNA FLJ35897 fis	2,5	NCBP2;CBP20;PIG55;hCG_40296;DKFZp686G18222
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1;Helix-destabilizing protein;Single-strand RNA-binding protein;Putative heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like protein 3	2,4	HNRNPA1;HNRPA1;HNRPA1L3;HNRNPA1L2;HNRNPA1L
40S ribosomal protein S7;Putative uncharacterized protein ENSP00000352132;Putative uncharacterized protein RPS7	2,4	RPS7
40S ribosomal protein S24	2,4	RPS24;DKFZp686N1586
40S ribosomal protein S6;Phosphoprotein NP33;Ribosomal protein S6;Ribosomal protein S6, isoform CRA_a	2,3	RPS6;OK/SW-cl.2;RP11-513M16.6-002;hCG_1741512
40S ribosomal protein S3a	2,3	RPS3A;MFTL
40S ribosomal protein S23	2,3	RPS23
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1;26S proteasome regulatory subunit RPN2;26S proteasome regulatory subunit S1;26S proteasome subunit p112	2,3	PSMD1
60S ribosomal protein L24;Ribosomal protein L30	2,2	RPL24
KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1;p21 Ras GTPase-activating protein-associated p62;GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62	2,2	KHDRBS1;SAM68;hCG_41606
BAG family molecular chaperone regulator 2;Bcl-2-associated athanogene 2	2,2	BAG2
14-3-3 protein epsilon;cDNA FLJ60092, highly similar to 14-3-3 protein epsilon (14-3-3E);cDNA FLJ51975, moderately similar to 14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	2,1	YWHAE
ATP-dependent RNA helicase DDX1;DEAD box protein 1;DEAD box protein retinoblastoma	2,1	DDX1
Poly [ADP-ribose] polymerase 1;ADPRT;NAD(+) ADP-ribosyltransferase 1;Poly[ADP-ribose] synthetase 1	2,1	PARP1;ADPRT;PPOL
40S ribosomal protein S8;Ribosomal protein S8	2,1	RPS8;OK/SW-cl.83;RP11-269F19.3-003
40S ribosomal protein S26;Putative 40S ribosomal protein S26-like 1;HCG1745083;Putative uncharacterized protein RPS26;Similar to 40S ribosomal protein S26;Ribosomal protein S26	2,1	RPS26;RPS26P11;RPS26L1;LOC285938;hCG_1745083;tcag7.125
60S ribosomal protein L26;Putative uncharacterized protein RPL26	2,0	RPL26

Tabelle 28: Potentielle Interaktionspartner von Sirt7

Protein Names	Ratio H/L	Gene Names
NAD-dependent deacetylase sirtuin-7;SIR2-like protein 7	20,8	SIRT7;SIR2L7
Histone H1.2;Histone H1d;Histone H1.3;Histone H1c;Histone H1.4;Histone H1b	12,8	HIST1H1C;H1F2;HIST1H1D;H1F3;HIST1H1E;H1F4
60S ribosomal protein L3;HIV-1 TAR RNA-binding protein B;Putative uncharacterized protein RPL3;RPL3 protein;Ribosomal protein L3, isoform CRA_b	11,7	RPL3;OK/SW-cl.32;hCG_2015191
60S ribosomal protein L35;Similar to 60S ribosomal protein L35	11,6	RPL35;LOC154880;tcag7.829
60S ribosomal protein L6;TAX-responsive enhancer element-binding protein 107;Neoplasm-related protein C140	11,5	RPL6;TXREB1
60S ribosomal protein L4;L1;cDNA FLJ50996, highly similar to 60S ribosomal protein L4;cDNA FLJ50994, moderately similar to 60S	10,8	RPL4;RPL1

ribosomal protein L4		
60S ribosomal protein L7a;Surfeit locus protein 3;PLA-X polypeptide;Putative uncharacterized protein ENSP00000372524;Ribosomal protein L7a	10,1	RPL7A;SURF-3;SURF3;RP11-244N20.10-004
Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2	9,9	YTHDC2
60S acidic ribosomal protein P0;L10E;RPLP0 protein;cDNA FLJ51469, highly similar to 60S acidic ribosomal protein P0;60S acidic ribosomal protein P0-like	9,7	RPLP0
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	9,2	FXR2;FMR1L2
60S ribosomal protein L18;Ribosomal protein L18	8,9	RPL18
60S ribosomal protein L5	8,7	RPL5;MSTP030
60S ribosomal protein L37a	8,6	RPL37A
Fragile X mental retardation 1 protein	8,5	FMR1
Nucleophosmin;Nucleolar phosphoprotein B23;Numatrin;Nucleolar protein NO38;Nucleophosmin (Nucleolar phosphoprotein B23, numatrin);Nucleophosmin/B23.2	8,2	NPM1;NPM
Multiple myeloma tumor-associated protein 2	8,1	MMTAG2;C1orf35
60S ribosomal protein L15;Ribosomal protein L15	8,0	RPL15;EC45;TCBAP0781;RP11-511D14.1-001
Putative uncharacterized protein NOP2;Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2;Nucleolar protein 2 homolog;Nucleolar protein 1;Proliferating-cell nucleolar antigen p120	7,9	NOP2;NOL1
Nucleolin;Protein C23;cDNA FLJ10452 fis, clone NT2RP1000966, highly similar to NUCLEOLIN;Nucleolin, isoform CRA_c;cDNA FLJ45706 fis, clone FEBRA2028457	7,6	NCL;hCG_33980
Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B;RRP1-like protein B	7,3	RRP1B;KIAA0179
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41;DEAD box protein 41;DEAD box protein abstrakt homolog	7,2	DDX41;ABS
DNA topoisomerase 1;DNA topoisomerase I	7,2	TOP1
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30;DEAH box protein 30	7,2	DHX30;DDX30;KIAA0890
40S ribosomal protein S9;Putative uncharacterized protein RPS9;Ribosomal protein S9, isoform CRA_c;RPS9 protein	6,9	RPS9
Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1	6,4	GRWD1;GRWD;KIAA1942;WDR28
60S ribosomal protein L21;Ribosomal protein L21 variant	6,4	RPL21
Putative uncharacterized protein RPL7;60S ribosomal protein L7;Putative uncharacterized protein RPL7P23;Putative uncharacterized protein ENSP00000260536	6,2	RPL7;RPL7P23;WUGSC:H_RG054D04.1
Nucleolar RNA helicase 2;Nucleolar RNA helicase II;Nucleolar RNA helicase Gu;RH II/Gu;Gu-alpha;DEAD box protein 21	6,1	DDX21
60S ribosomal protein L32	6,1	RPL32;PP9932
RNA-binding protein 4;RNA-binding motif protein 4;RNA-binding motif protein 4a;Lark homolog;RNA-binding protein 4B;RNA-binding motif protein 4B;RNA-binding protein 30	6,1	RBM4;RBM4A;RBM4B;RBM30
60S ribosomal protein L14;CAG-ISL 7;Putative uncharacterized protein RPL14P1;RPL14 protein	5,9	RPL14;RPL14P1
60S ribosomal protein L23a;Putative uncharacterized protein RPL23A;Ribosomal protein L23a, isoform CRA_a	5,8	RPL23A
60S ribosomal protein L10a;CSA-19;Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 6;HCG1787790;Putative uncharacterized protein ENSP00000344077	5,8	RPL10A;NEDD6

Cell division cycle 5-like protein;Pombe cdc5-related protein;cDNA FLJ51295, highly similar to Cell division cycle 5-like protein	5,8	CDC5L;KIAA0432;PCDC5RP
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1;IGF-II mRNA-binding protein 1;Coding region determinant-binding protein;VICKZ family member 1;Zip code-binding protein 1	5,7	IGF2BP1;CRDBP;VICKZ1;ZBP1
Ribosomal protein L10;60S ribosomal protein L10;Protein QM;Tumor suppressor QM;Laminin receptor homolog;60S ribosomal protein L10-like	5,7	RPL10;XX-FW83563B9.1-011;DXS648E;QM;RPL10L
60S ribosomal protein L18a;cDNA FLJ51501, highly similar to 60S ribosomal protein L18a;cDNA FLJ51502, highly similar to 60S ribosomal protein L18a;HCG1641703	5,6	RPL18A;RPL18AP4
60S ribosomal protein L13a;23 kDa highly basic protein;Novel protein similar to ribosomal protein L13a RPL13A;RPL13A protein	5,5	RPL13A;RP11-365K22.1-001
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3;IGF-II mRNA-binding protein 3;KH domain-containing protein overexpressed in cancer;VICKZ family member 3	5,5	IGF2BP3;IMP3;KOC1;VICKZ3
Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1;cDNA FLJ57073, highly similar to Double-stranded RNA-binding protein Staufenhomolog 1;Staufen protein T4 variant	5,4	STAU1;STAU;RP3-470L14.2-007;RP3-470L14.2-006
40S ribosomal protein S8;Ribosomal protein S8	5,1	RPS8;OK/SW-cl.83;RP11-269F19.3-003
60S ribosomal protein L34	5,1	RPL34
60S ribosomal protein L8;cDNA FLJ53750, highly similar to 60S ribosomal protein L8	5,1	RPL8
60S ribosomal protein L27	5,0	RPL27
40S ribosomal protein S3a	5,0	RPS3A;MFTL
Putative uncharacterized protein RPL30;60S ribosomal protein L30	4,9	RPL30
ATP-dependent RNA helicase A;Nuclear DNA helicase II;DEAH box protein 9	4,9	DHX9;DDX9;LKP;NDH2
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	4,8	HNRNPM;HNRPM;NAGR1
60S ribosomal protein L13;Breast basic conserved protein 1	4,8	RPL13;BBC1;OK/SW-cl.46
60S ribosomal protein L36a;60S ribosomal protein L44;Cell migration-inducing gene 6 protein;Ribosomal protein L36a	4,8	RPL36A;RPL44;MIG6;RP1-164F3.1-004
Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1;Zinc finger CCCH domain-containing protein 2;Zinc finger antiviral protein	4,8	ZC3HAV1;ZC3HDC2;PRO1677
Exosome component 10;Polymyositis/scleroderma autoantigen 2;Autoantigen PM/Scl 2;Polymyositis/scleroderma autoantigen 100 kDa	4,7	EXOSC10;PMSCL;PMSCL2
p180/ribosome receptor;Ribosome-binding protein 1;Ribosome receptor protein;180 kDa ribosome receptor homolog;ES/130-related protein	4,7	RRBP1;KIAA1398
60S ribosomal protein L12	4,6	RPL12
Guanine nucleotide-binding protein-like 3;Nucleolar GTP-binding protein 3;Nucleostemin;E2-induced gene 3 protein;Novel nucleolar protein 47	4,6	GNL3;E2IG3;NS
Myb-binding protein 1A	4,6	MYBBP1A;P160
60S ribosomal protein L24;Ribosomal protein L30	4,6	RPL24
60S acidic ribosomal protein P2;Renal carcinoma antigen NY-REN-44	4,3	RPLP2;D11S2243E;RPP2
Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1;Modulator of non-genomic activity of estrogen receptor;Transcription factor	4,3	PELP1;HMX3;MNAR

HMX3;Putative uncharacterized protein PELP1		
60S ribosomal protein L35a;Cell growth-inhibiting gene 33 protein	4,3	RPL35A;GIG33
60S ribosomal protein L9;Putative uncharacterized protein	4,3	RPL9;OK/SW-cl.103;RPL9P7;RPL9P8;RPL9P9
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2;G3BP-2;GAP SH3 domain-binding protein 2	4,2	G3BP2;KIAA0660
5'-3' exoribonuclease 2;DHM1-like protein	4,1	XRN2
NF-kappa-B-repressing factor;Transcription factor NRF;ITBA4 protein	4,0	NKRF;ITBA4;NRF
Putative helicase MOV-10;Moloney leukemia virus 10 protein;cDNA FLJ32791 fis, clone TESTI2002365, highly similar to helicase MOV-10 (EC 3.6.1.-);cDNA FLJ13235 fis, clone OVARC1000304, highly similar to PROTEIN MOV-10	4,0	MOV10;KIAA1631;RP11-426L16.2-003;hCG_38463
60S ribosomal protein L36	4,0	RPL36
rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin;34 kDa nucleolar scleroderma antigen	4,0	FBL;FIB1;FLRN
Thyroid hormone receptor-associated protein 3;Thyroid hormone receptor-associated protein complex 150 kDa component	4,0	THRAP3;TRAP150
Interleukin enhancer-binding factor 3;Nuclear factor of activated T-cells 90 kDa;Double-stranded RNA-binding protein 76;Translational control protein 80	3,9	ILF3;DRBF;MPHOSPH4;NF90
28S ribosomal protein S22, mitochondrial;MRP-S22;Mitochondrial ribosomal protein S22 variant	3,9	MRPS22;C3orf5;RPMS22;GK002
cDNA FLJ56382, highly similar to WD repeat protein 6;WD repeat-containing protein 6;cDNA FLJ56107, highly similar to WD repeat protein 6	3,9	WDR6
Bcl-2-associated transcription factor 1	3,8	BCLAF1;BTF;KIAA0164
60S ribosomal protein L26;Putative uncharacterized protein RPL26	3,7	RPL26
Splicing factor, arginine/serine-rich 6;Pre-mRNA-splicing factor SRP55;Arginine/serine-rich splicing factor 6 variant	3,7	SFRS6;SRP55
Polyadenylate-binding protein 1;cDNA FLJ37875 fis, clone BRSSN2018771, highly similar to Poly(A)-binding protein 1;cDNA FLJ59219, highly similar to Poly(A)-binding protein 1	3,6	PABPC1;PAB1;PABP1;PABPC2;PABPC3;PABP3;PABPL3
Regulator of nonsense transcripts 1;ATP-dependent helicase RENT1;Nonsense mRNA reducing factor 1;Up-frameshift suppressor 1 homolog	3,6	UPF1;KIAA0221;RENT1
PABPC4 protein;Polyadenylate-binding protein 4;Inducible poly(A)-binding protein;Activated-platelet protein 1;Poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 (Inducible form)	3,5	PABPC4;APP1;PABP4;RP11-69E11.6-003;hCG_2031827
40S ribosomal protein S24	3,4	RPS24;DKFZp686N1586
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17;DEAD box protein 17;RNA-dependent helicase p72;DEAD box protein p72;DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	3,4	DDX17;RP3-434P1.4-009;RP3-434P1.4-005
La-related protein 1;La ribonucleoprotein domain family member 1	3,4	LARP1;KIAA0731;LARP
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5;DEAD box protein 5;RNA helicase p68;cDNA FLJ59339, highly similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 (EC 3.6.1.-)	3,3	DDX5;G17P1;HELRL;HLR1
Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15;DEAH box protein 15;ATP-dependent RNA helicase #46	3,3	DHX15;DBP1;DDX15
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q;Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein;Glycine- and tyrosine-rich RNA-binding protein;GRY-RBP;NS1-associated protein 1	3,3	SYNCRIP;HNRPQ;NSAP1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2;Scaffold-attachment factor A2	3,2	HNRNPUL2;HNRPUL2

60S ribosomal protein L11; CLL-associated antigen KW-12; Ribosomal protein L11	3,0	RPL11; RP11-223J15.3-005; RP11-223J15.3-004
60S ribosomal protein L31; RPL31 protein	3,0	RPL31
RNA-binding protein 39; RNA-binding motif protein 39; RNA-binding region-containing protein 2; Hepatocellular carcinoma protein 1; Splicing factor HCC1	3,0	RBM39; HCC1; RNPC2; RP11-353C18.2-035; DKFZp686A11192
RNA-binding protein 14; RNA-binding motif protein 14; RRM-containing coactivator activator/modulator; Synaptotagmin-interacting protein; Paraspeckle protein 2	2,6	RBM14; SIP
HNRPR protein; Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R; cDNA FLJ53358, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	2,5	HNRPR; HNRNPR; RP5-1057J7.2-002; hCG_38907
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1; Cleavage and polyadenylation specificity factor 160 kDa subunit	2,3	CPSF1; CPSF160
ATP-dependent RNA helicase DDX3X; DEAD box protein 3, X-chromosomal; Helicase-like protein 2; DEAD box, X isoform; cDNA FLJ60675	2,3	DDX3X; DBX; DDX3; DDX3Y; DBY

5.2 Abkürzungsverzeichnis

A	<u>A</u> denin
ADP	<u>A</u> denosin <u>d</u> iphosphat
albuCre	Albumin Cre
BAC	engl. <u>b</u> acterial <u>a</u> rtificial <u>c</u> hromosom
BER	<u>B</u> asen <u>e</u> xzisions <u>r</u> eparatur
bp	Basenpaare (engl. <u>b</u> ase <u>p</u> airs)
BSA	engl. <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
cDNA	engl. <u>c</u> omplementäre <u>D</u> N <u>A</u>
<i>C. elegans</i>	<u>C</u> aenorhabditis <u>e</u> legans
CFP	engl. <u>c</u> yan <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
CHAPS	engl. (3-[(3- <u>C</u> holamidopropyl)-dimethylammonio]-propan- <u>s</u> ulfonat)
Co-IP	<u>C</u> o- <u>I</u> mmunopräzipitation
C	<u>C</u> ytosin
DAPI	engl. 4',6- <u>d</u> iamidino-2-phenyl <u>i</u> ndole
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulf <u>o</u> xid
DNA/DNS	<u>D</u> esoxyribonukleinsäure
DON	engl. 6- <u>D</u> iazo-5- <u>o</u> xo-L- <u>n</u> orleucin; GFAT Inhibitor
DSB	<u>D</u> oppelstrang <u>b</u> ru <u>ch</u>
DTA	Diphtherietoxin A
DTT	<u>D</u> ithiothreit <u>o</u> l
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetra <u>e</u> ssigsäure
<i>E. coli</i>	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
EK	<u>E</u> inschlusskörperchen (engl. inclusion bodies)
engl.	englisch
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
ES-Zellen	<u>e</u> mbrionale <u>S</u> tammzellen
FCS	engl. foetal calf serum
F-6-P	<u>F</u> ruktose- <u>6</u> - <u>P</u> hosphat
g	Gramm
G	<u>G</u> uanin
G-6-P	<u>G</u> lukosamin- <u>6</u> - <u>P</u> hosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTT	<u>G</u> lukose <u>t</u> oleranz <u>t</u> est
h	Stunde

HBS	engl. <u>H</u> EPES <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
HBW	<u>H</u> exosamin- <u>B</u> iosyntheseweg
HDAC	<u>H</u> istone <u>a</u> cetylase
HE	<u>H</u> ematoxylin- <u>E</u> osin
H/L Ratio	engl. heavy/light ratio
HPLC	engl. <u>H</u> igh- <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography
IP	<u>I</u> mmunopräzipitation
IPTG	<u>I</u> sopropyl β -D-1- <u>t</u> hiogalactopyranoside
ITT	<u>I</u> nsulin <u>t</u> oleranztest
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kit	Box mit allen Komponenten für eine bestimmte Reaktion
KO	Knock Out
Kx	Lysin an der x Position in der Aminosäuresequenz
KxA	Lysin zu Alanin Mutation an der x Position in der Aminosäuresequenz
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (engl. <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography- <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry/ <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry)
LDS	<u>L</u> ithium <u>d</u> odecylsulfat
M	molar
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl. <u>m</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite)
MEF	<u>M</u> ausem <u>b</u> ryof <u>i</u> broblasten
min	Minuten
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPI	<u>M</u> ax <u>P</u> lanck <u>I</u> nstitut
mRNA	engl. <u>m</u> essenger RNA
NAD ⁺	engl. <u>N</u> icotinamide <u>A</u> denine <u>D</u> inucleotide
neg	negativ
Neo	Neomycin
ng	Nanogramm
OD ₆₀₀	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen (engl. <u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame)
PB	Prozessierungskörperchen (engl. <u>p</u> rocessing <u>b</u> odies)
PBS	engl. <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PFA	<u>P</u> ara <u>f</u> ormaldehyd
PGK	<u>P</u> hosphoglyzerat <u>k</u> inase
pmol	Pikomol
pos	positiv
Q-PCR	<u>q</u> uantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase PCR
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<u>S</u> accharomyces <u>c</u> erevisiae
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <u>S</u> odium <u>d</u> odecylsulfate)
SG	Stresskörperchen (engl. <u>s</u> tress <u>g</u> ranules)
SILAC	engl. <u>S</u> table <u>i</u> sotope <u>l</u> abeling with <u>a</u> mino acids in <u>c</u> ell culture
T	<u>T</u> hymine
TBST	engl. <u>T</u> ris <u>B</u> uffered <u>S</u> aline <u>T</u> ween 20
T2D	Typ II Diabetes
UDP	<u>U</u> ridin <u>d</u> iphosphat

UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
YFP	engl. yellow fluorescent protein

5.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der durch die Sirtuine katalysierten enzymatischen Reaktionen.	2
Abbildung 2: Übersicht über die Lokalisation und die Aktivität der 7 humanen Sirtuine.	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Sirt6 Genabschnittes und dem daraus abgeleiteten "Targeting"-Vektor.	43
Abbildung 4: Strategie zur Identifizierung homologer Rekombinationsereignisse im Sirt6 Gen.	44
Abbildung 5: Genotypisierung der Sirt6 cKO Mauslinie durch Southern Blot und PCR.	46
Abbildung 6: Darstellung der semi-quantitativen RT-PCR zum Nachweis korrekt prozessierter mRNA Transkripte in der Leber heterozygoter Sirt6 cKO Tiere.	46
Abbildung 7: Genotypisierung der Sirt6 Neo Mauslinie durch PCR Analyse.	48
Abbildung 8: Strategie zur Analyse der Cre-Rekombination in der Sirt6 cmvKO Linie.	50
Abbildung 9: Darstellung der semi-quantitativen RT-PCR zum Nachweis verkürzter mRNA Transkripte in verschiedenen Geweben homozygoter Sirt6 Knock Out Tiere.	51
Abbildung 10: Fehlen der subkutanen Fettschicht in Sirt6 cmvKO Mäusen.	51
Abbildung 11: PCR und Western Blot Analyse der Sirt6 MEF Präparation.	53
Abbildung 12: Agarosegelbild der PCR Genotypisierung der Sirt6 Albumin Cre Mäuse.	54
Abbildung 13: Darstellung der semi-quantitativen RT-PCR zum Nachweis verkürzter mRNA Transkripte in der Leber von Sirt6 albumin Cre Mäusen.	55
Abbildung 14: Glukosetoleranztest (GTT) und Insulintoleranztest (ITT) nach 16 stündiger Futterkarenz.	56
Abbildung 15: HE-Färbung auf Leberschnitten von Sirt6 Albumin Cre Mäusen.	56
Abbildung 16: Überprüfung der Funktionalität der Sirt1, Sirt6 und Sirt7 Fusionsproteine.	58
Abbildung 17: Coomassie gefärbte Gele der Sirtuin Immunpräzipitation (IP).	59
Abbildung 18: Nachweis der Interaktion von Sirt6 mit den potentiellen Bindungspartnern durch Co-Immunopräzipitation.	62
Abbildung 19: Einteilung potentieller Sirt6 Interaktionspartner in drei Gruppen.	63
Abbildung 20: Einfluss von RNase A auf die Interaktion von Sirt6 mit den RNA bindenden Proteinen.	65

Abbildung 21: Kollokalisierung von Sirt6 und dem Stresskörperchenmarker G3BP1 in ruhenden U2OS Zellen.	66
Abbildung 22: Kollokalisierung von Sirt6 und G3BP1 in Stresskörperchen nach Hitzestress.	67
Abbildung 23: Einfluss von RNase A auf die Interaktion von Sirt6 mit GFAT1.	70
Abbildung 24: Kollokalisierung von Sirt6 und GFAT1 in Stresskörperchen.	71
Abbildung 25: Erhöhte Protein-O-Glykosylierung in der Leber adulter Sirt6 albumin Cre Mäuse.	72
Abbildung 26: Erhöhter Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress) aber keine gesteigerte Expression von Autophagie Marker Genen unter normalen Bedingungen in der Leber von Sirt6 Albumin Cre Knock Out Mäusen.	73
Abbildung 27: Keine Veränderung der GFAT1 Expression in embryonalem Lebergewebe.	74
Abbildung 28: Erhöhte GFAT1 Aktivität in der Leber homozygoter Sirt6 cmvKO Embryonen.	75
Abbildung 29: Test-Überexpression von GST-Sirt6 und GST-GFAT1.	76
Abbildung 30: Überexprimierte GST-Sirt6 und GST-GFAT1 Fusionsproteine werden in Einschlußkörperchen eingeschlossen.	78
Abbildung 31: Der Acetylierungsstatus von GFAT1 beeinflusst dessen Expression in HEK 293T Zellen.	79
Abbildung 32: Keine unspezifische Promotoraktivierung durch die Kotransfektion mit den drei Acetyltransferasen.	81
Abbildung 33: Keine erhöhten GFAT1 Proteinlevel durch Inhibition des Proteasoms.	82
Abbildung 34: Erhöhte c-jun Proteinlevel in HEK 293T Zellen nach MG132 Behandlung.	82
Abbildung 35: Keine Veränderung des GFAT1 Überexpressionsmusters durch Einführung verschiedener Mutationen.	83
Abbildung 36: Überexpression von GFAT1 und GFAT1 Mutante #3 nach Anpassung der DNA Mengen.	84
Abbildung 37: Keine Veränderung der Proteinlevel der GFAT1 7x Mutante nach kombinierter Überexpression mit der Acetyltransferase CBP.	86

5.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.	17
Tabelle 2: Puffer und Lösungen.	18
Tabelle 3: Verwendete Enzyme.	18
Tabelle 4: Verwendete Kits.	19
Tabelle 5: Erwähnenswerte Geräte.	19

Tabelle 6: Medien für die Zellkultur	19
Tabelle 7: Liste der verwendeten Primärantikörper	19
Tabelle 8: Liste der verwendeten Sekundärantikörper	20
Tabelle 9: Liste verwendeter Bakterienstämme	20
Tabelle 10: Verwendete Zelllinien	20
Tabelle 11: Verwendete Probe für die Southern Blot Genotypisierung.....	21
Tabelle 12: Liste der für die Konstruktion des "Targeting"-Vektors verwendeten Oligonukleotide	21
Tabelle 13: Liste der Oligonukleotide für die Generierung der Überexpressionskonstrukte...	21
Tabelle 14: Liste der Oligonukleotide für die Mutagenese von GFAT1.....	22
Tabelle 15: Liste der Oligonukleotide für die Genotypisierung durch PCR	22
Tabelle 16: Verwendete Oligonukleotide für die Generierung der Southern Probe	23
Tabelle 17: Liste der Oligonukleotide für die semi-quantitative RT-PCR	23
Tabelle 18: Liste der Oligonukleotide für die Klonierungskontrollen	23
Tabelle 19: Liste verwendeter Vektoren.....	24
Tabelle 20: Liste verwendeter Überexpressionskonstrukte	24
Tabelle 21: Verwendete Mauslinien	25
Tabelle 22: Liste genutzter Software.....	26
Tabelle 23: Liste der ausgewählten möglichen Interaktionspartner von Sirt6.	60
Tabelle 24: Auflistung der gefundenen Acetylierungsstellen in GFAT1	80
Tabelle 25: Auflistung der zusätzlich gefundenen Acetylierungsstellen in der GFAT1 4x Mutante	85
Tabelle 26: Potentielle Interaktionspartner von Sirt1	108
Tabelle 27: Potentielle Interaktionspartner von Sirt6.....	109
Tabelle 28: Potentielle Interaktionspartner von Sirt7	113

5.5 Danksagung

In erster Linie danke ich Prof. Dr. Dr. Thomas Braun für die Vergabe des Promotionsthemas und die aufgebrachte Geduld während der Erstellung meiner Doktorarbeit. Besonderer Dank gilt natürlich meiner Forschungsgruppenleiterin Prof. Dr. Eva Bober für die geleistete Unterstützung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit seitens der Justus-Liebig-Universität Gießen bedanken.

Spezieller Dank geht an Dr. Stefan Günther, Dr. Thomas Schmid und Dr. Thilo Borchardt, die mir immer mit Rat und Tat zu Seite standen und stets ein offenes Ohr für mich hatten. Ebenfalls erwähnen möchte ich hier Dr. André Schneider, Dr. Marcus Krüger und Dr. Johnny Kim, für deren wertvolle Hinweise und Ratschläge.

Bedanken möchte ich mich auch bei Susanne, Moni, Katja K., Kerstin, Sonja, Marianne, Sylvia, Ellen und Katja B. für deren Hilfe bei vielerlei experimentellen Arbeiten. Nicht zu vergessen sind natürlich all die Kollegen, die stets für ein freundliches Umfeld sorgten und die Arbeit am Institut sehr angenehm machten: Alessandro, Piera, Danni, Nadine, Matthew, Alex, Jian, Kathi, Michael, Megan und viele viele mehr.

Der größte Dank gilt natürlich meinen Eltern und der restlichen Familie, die mich stets in jeglicher Lage unterstützten, förderten, motivierend begleiteten und für einen starken Rückhalt sorgten. Nicht zuletzt möchte ich mich besonders bei Nicole bedanken, die mir jetzt schon so lang die Treue hält, mich mit all meinen Macken akzeptiert und unterstützt wo sie kann.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

6. Literaturverzeichnis

- Adler, A. S., S. Sinha, T. L. Kawahara, J. Y. Zhang, E. Segal and H. Y. Chang (2007). "Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity." *Genes Dev* **21**(24): 3244-3257.
- Afonina, E., R. Stauber and G. N. Pavlakis (1998). "The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm." *J Biol Chem* **273**(21): 13015-13021.
- Alcendor, R. R., S. Gao, P. Zhai, D. Zablocki, E. Holle, X. Yu, B. Tian, T. Wagner, S. F. Vatner and J. Sadoshima (2007). "Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart." *Circ Res* **100**(10): 1512-1521.
- Andreozzi, F., C. D'Alessandris, M. Federici, E. Laratta, S. Del Guerra, S. Del Prato, P. Marchetti, R. Lauro, F. Perticone and G. Sesti (2004). "Activation of the hexosamine pathway leads to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser612 and impairs the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin insulin biosynthetic pathway in RIN pancreatic beta-cells." *Endocrinology* **145**(6): 2845-2857.
- Aparicio, O. M., B. L. Billington and D. E. Gottschling (1991). "Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*." *Cell* **66**(6): 1279-1287.
- Balasubramanyam, M., L. P. Singh and S. Rangasamy (2012). "Molecular intricacies and the role of ER stress in diabetes." *Exp Diabetes Res* **2012**: 958169.
- Baohua, Y. and L. Li (2012). "Effects of SIRT6 silencing on collagen metabolism in human dermal fibroblasts." *Cell Biol Int* **36**(1): 105-108.
- Blander, G. and L. Guarente (2004). "The Sir2 family of protein deacetylases." *Annu Rev Biochem* **73**: 417-435.
- Blüher, M., B. B. Kahn and C. R. Kahn (2003). "Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue." *Science* **299**(5606): 572-574.
- Bordone, L., D. Cohen, A. Robinson, M. C. Motta, E. van Veen, A. Czopik, A. D. Steele, H. Crowe, S. Marmor, J. Luo, W. Gu and L. Guarente (2007). "SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction." *Aging Cell* **6**(6): 759-767.
- Bordone, L., M. C. Motta, F. Picard, A. Robinson, U. S. Jhala, J. Apfeld, T. McDonagh, M. Lemieux, M. McBurney, A. Szilvasi, E. J. Easlson, S. J. Lin and L. Guarente (2006). "Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells." *PLoS Biol* **4**(2): e31.
- Braunstein, M., A. B. Rose, S. G. Holmes, C. D. Allis and J. R. Broach (1993). "Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation." *Genes Dev* **7**(4): 592-604.
- Brunet, A., L. B. Sweeney, J. F. Sturgill, K. F. Chua, P. L. Greer, Y. Lin, H. Tran, S. E. Ross, R. Mostoslavsky, H. Y. Cohen, L. S. Hu, H. L. Cheng, M. P. Jedrychowski, S. P. Gygi, D. A. Sinclair, F. W. Alt and M. E. Greenberg (2004). "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase." *Science* **303**(5666): 2011-2015.
- Burnett, C., S. Valentini, F. Cabreiro, M. Goss, M. Somogyvari, M. D. Piper, M. Hodginott, G. L. Sutphin, V. Leko, J. J. McElwee, R. P. Vazquez-Manrique, A. M. Orfila, D. Ackerman, C. Au, G. Vinti, M. Riesen, K. Howard, C. Neri, A. Bedalov, M. Kaerberlein, C. Soti, L. Partridge and D. Gems (2011). "Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*." *Nature* **477**(7365): 482-485.
- Buse, M. G., K. A. Robinson, B. A. Marshall, R. C. Hresko and M. M. Mueckler (2002). "Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(2): E241-250.
- Chan, C. B., M. C. Saleh, V. Koshkin and M. B. Wheeler (2004). "Uncoupling protein 2 and islet function." *Diabetes* **53 Suppl 1**: S136-142.
- Chekanova, J. A. and D. A. Belostotsky (2003). "Evidence that poly(A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export." *RNA* **9**(12): 1476-1490.
- Chen, D., J. Bruno, E. Easlson, S. J. Lin, H. L. Cheng, F. W. Alt and L. Guarente (2008). "Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction." *Genes Dev* **22**(13): 1753-1757.
- Chen, D., A. D. Steele, S. Lindquist and L. Guarente (2005). "Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1." *Science* **310**(5754): 1641.
- Chen, K. F., Y. Y. Lai, H. S. Sun and S. J. Tsai (2005). "Transcriptional repression of human cad gene by hypoxia inducible factor-1alpha." *Nucleic Acids Res* **33**(16): 5190-5198.

- Choudhary, C., C. Kumar, F. Gnad, M. L. Nielsen, M. Rehman, T. C. Walther, J. V. Olsen and M. Mann (2009). "Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions." *Science* **325**(5942): 834-840.
- Christiansen, J., A. M. Kolte, T. O. Hansen and F. C. Nielsen (2009). "IGF2 mRNA-binding protein 2: biological function and putative role in type 2 diabetes." *J Mol Endocrinol* **43**(5): 187-195.
- Cohen, H. Y., C. Miller, K. J. Bitterman, N. R. Wall, B. Hekking, B. Kessler, K. T. Howitz, M. Gorospe, R. de Cabo and D. A. Sinclair (2004). "Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase." *Science* **305**(5682): 390-392.
- Cox, J. and M. Mann (2008). "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification." *Nat Biotechnol* **26**(12): 1367-1372.
- DeHaven, J. E., K. A. Robinson, B. A. Nelson and M. G. Buse (2001). "A novel variant of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-1 (GFAT1) mRNA is selectively expressed in striated muscle." *Diabetes* **50**(11): 2419-2424.
- Denu, J. M. (2003). "Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases." *Trends Biochem Sci* **28**(1): 41-48.
- Dowell, P., T. C. Otto, S. Adi and M. D. Lane (2003). "Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways." *J Biol Chem* **278**(46): 45485-45491.
- Du, J., 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 and H. Lin (2011). "Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase." *Science* **334**(6057): 806-809.
- El-Domyati, M., S. Attia, F. Saleh, D. Brown, D. E. Birk, F. Gasparro, H. Ahmad and J. Uitto (2002). "Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin." *Exp Dermatol* **11**(5): 398-405.
- Elias, J. E. and S. P. Gygi (2007). "Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry." *Nat Methods* **4**(3): 207-214.
- Federici, M., R. Menghini, A. Mauriello, M. L. Hribal, F. Ferrelli, D. Lauro, P. Sbraccia, L. G. Spagnoli, G. Sesti and R. Lauro (2002). "Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells." *Circulation* **106**(4): 466-472.
- Flamment, M., E. Hajdich, P. Ferre and F. Fougere (2012). "New insights into ER stress-induced insulin resistance." *Trends Endocrinol Metab* **23**(8): 381-390.
- Flier, J. S. (2004). "Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic." *Cell* **116**(2): 337-350.
- Frescas, D., L. Valenti and D. Accili (2005). "Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes." *J Biol Chem* **280**(21): 20589-20595.
- Frye, R. A. (1999). "Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity." *Biochem Biophys Res Commun* **260**(1): 273-279.
- Frye, R. A. (2000). "Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins." *Biochem Biophys Res Commun* **273**(2): 793-798.
- Gisselsson, D., T. Jonson, A. Petersen, B. Strombeck, P. Dal Cin, M. Hoglund, F. Mitelman, F. Mertens and N. Mandahl (2001). "Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12683-12688.
- Gottlieb, S. and R. E. Esposito (1989). "A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA." *Cell* **56**(5): 771-776.
- Gu, Y., S. Jin, Y. Gao, D. T. Weaver and F. W. Alt (1997). "Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15): 8076-8081.
- Guarente, L. (2000). "Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging." *Genes Dev* **14**(9): 1021-1026.
- Guitard, E., F. Parker, R. Millon, J. Abecassis and B. Tocque (2001). "G3BP is overexpressed in human tumors and promotes S phase entry." *Cancer Lett* **162**(2): 213-221.
- Haigis, M. C. and L. P. Guarente (2006). "Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction." *Genes Dev* **20**(21): 2913-2921.
- Haigis, M. C., R. Mostoslavsky, K. M. Haigis, K. Fahie, D. C. Christodoulou, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, M. Karow, G. Blander, C. Wolberger, T. A. Prolla, R.

- Weindruch, F. W. Alt and L. Guarente (2006). "SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells." *Cell* **126**(5): 941-954.
- Hallows, W. C., S. Lee and J. M. Denu (2006). "Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10230-10235.
- Hayhurst, G. P., Y. H. Lee, G. Lambert, J. M. Ward and F. J. Gonzalez (2001). "Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis." *Mol Cell Biol* **21**(4): 1393-1403.
- Hernick, M. and C. A. Fierke (2005). "Zinc hydrolases: the mechanisms of zinc-dependent deacetylases." *Arch Biochem Biophys* **433**(1): 71-84.
- Hoffmann, A. and D. Baltimore (2006). "Circuitry of nuclear factor kappaB signaling." *Immunol Rev* **210**: 171-186.
- Hu, C. J., S. Iyer, A. Sataur, K. L. Covello, L. A. Chodosh and M. C. Simon (2006). "Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells." *Mol Cell Biol* **26**(9): 3514-3526.
- Hu, Y., L. Riesland, A. J. Paterson and J. E. Kudlow (2004). "Phosphorylation of mouse glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFAT2) by cAMP-dependent protein kinase increases the enzyme activity." *J Biol Chem* **279**(29): 29988-29993.
- Imai, S., C. M. Armstrong, M. Kaeberlein and L. Guarente (2000). "Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase." *Nature* **403**(6771): 795-800.
- Ivy, J. M., J. B. Hicks and A. J. Klar (1985). "Map positions of yeast genes SIR1, SIR3 and SIR4." *Genetics* **111**(4): 735-744.
- Jenkins, A. B. and L. H. Storlien (1997). "Insulin resistance and hyperinsulinaemia in insulin receptor substrate-1 knockout mice." *Diabetologia* **40**(9): 1113-1114.
- Jiang, J. C., E. Jaruga, M. V. Repnevskaya and S. M. Jazwinski (2000). "An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast." *FASEB J* **14**(14): 2135-2137.
- Jing, E., S. Gesta and C. R. Kahn (2007). "SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation." *Cell Metab* **6**(2): 105-114.
- Jonson, L., J. Vikesaa, A. Krogh, L. K. Nielsen, T. Hansen, R. Borup, A. H. Johnsen, J. Christiansen and F. C. Nielsen (2007). "Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules." *Mol Cell Proteomics* **6**(5): 798-811.
- Kaeberlein, M., M. McVey and L. Guarente (1999). "The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms." *Genes Dev* **13**(19): 2570-2580.
- Kaeberlein, M., R. W. Powers, 3rd, K. K. Steffen, E. A. Westman, D. Hu, N. Dang, E. O. Kerr, K. T. Kirkland, S. Fields and B. K. Kennedy (2005). "Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients." *Science* **310**(5751): 1193-1196.
- Kaidi, A., B. T. Weinert, C. Choudhary and S. P. Jackson (2010). "Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation." *Science* **329**(5997): 1348-1353.
- Kanfi, Y., S. Naiman, G. Amir, V. Peshti, G. Zinman, L. Nahum, Z. Bar-Joseph and H. Y. Cohen (2012). "The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice." *Nature* **483**(7388): 218-221.
- Kanfi, Y., V. Peshti, R. Gil, S. Naiman, L. Nahum, E. Levin, N. Kronfeld-Schor and H. Y. Cohen (2010). "SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity." *Aging Cell* **9**(2): 162-173.
- Kanfi, Y., R. Shalman, V. Peshti, S. N. Pilosof, Y. M. Gozlan, K. J. Pearson, B. Lerrer, D. Moazed, J. C. Marine, R. de Cabo and H. Y. Cohen (2008). "Regulation of SIRT6 protein levels by nutrient availability." *FEBS Lett* **582**(5): 543-548.
- Kawahara, T. L., E. Michishita, A. S. Adler, M. Damian, E. Berber, M. Lin, R. A. McCord, K. C. Ongaigui, L. D. Boxer, H. Y. Chang and K. F. Chua (2009). "SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span." *Cell* **136**(1): 62-74.
- Kedersha, N. and P. Anderson (2007). "Mammalian stress granules and processing bodies." *Methods Enzymol* **431**: 61-81.
- Kellendonk, C., C. Opherck, K. Anlag, G. Schutz and F. Tronche (2000). "Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase." *Genesis* **26**(2): 151-153.
- Kemper, J. K., Z. Xiao, B. Ponugoti, J. Miao, S. Fang, D. Kanamaluru, S. Tsang, S. Y. Wu, C. M. Chiang and T. D. Veenstra (2009). "FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states." *Cell Metab* **10**(5): 392-404.
- Kennedy, B. K., N. R. Austriaco, Jr., J. Zhang and L. Guarente (1995). "Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*." *Cell* **80**(3): 485-496.

- Kennedy, D., J. French, E. Guitard, K. Ru, B. Tocque and J. Mattick (2001). "Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies." *J Cell Biochem* **84**(1): 173-187.
- Kim, H. S., C. Xiao, R. H. Wang, T. Lahusen, X. Xu, A. Vassilopoulos, G. Vazquez-Ortiz, W. I. Jeong, O. Park, S. H. Ki, B. Gao and C. X. Deng (2010). "Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis." *Cell Metab* **12**(3): 224-236.
- Kim, J. E., J. Chen and Z. Lou (2008). "DBC1 is a negative regulator of SIRT1." *Nature* **451**(7178): 583-586.
- Kim, K. M., T. K. Yu, H. H. Chu, H. S. Park, K. Y. Jang, W. S. Moon, M. J. Kang, D. G. Lee, M. H. Kim, J. H. Lee and M. J. Chung (2012). "Expression of ER stress and autophagy-related molecules in human non-small cell lung cancer and premalignant lesions." *Int J Cancer* **131**(4): E362-370.
- Klar, A. J., S. Fogel and K. Macleod (1979). "MAR1-a Regulator of the HMa and HMalphal Loci in SACCHAROMYCES CEREVISIAE." *Genetics* **93**(1): 37-50.
- Koubova, J. and L. Guarente (2003). "How does calorie restriction work?" *Genes Dev* **17**(3): 313-321.
- Kwon, S., Y. Zhang and P. Matthias (2007). "The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response." *Genes Dev* **21**(24): 3381-3394.
- Lakowski, B. and S. Hekimi (1998). "The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 13091-13096.
- Landry, J., J. T. Slama and R. Sternglanz (2000). "Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins." *Biochem Biophys Res Commun* **278**(3): 685-690.
- Landry, J., A. Sutton, S. T. Tafrov, R. C. Heller, J. Stebbins, L. Pillus and R. Sternglanz (2000). "The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 5807-5811.
- Lemieux, M. E., X. Yang, K. Jardine, X. He, K. X. Jacobsen, W. A. Staines, M. E. Harper and M. W. McBurney (2005). "The Sirt1 deacetylase modulates the insulin-like growth factor signaling pathway in mammals." *Mech Ageing Dev* **126**(10): 1097-1105.
- Li, J., M. Ni, B. Lee, E. Barron, D. R. Hinton and A. S. Lee (2008). "The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells." *Cell Death Differ* **15**(9): 1460-1471.
- Li, Y., S. Xu, A. Giles, K. Nakamura, J. W. Lee, X. Hou, G. Donmez, J. Li, Z. Luo, K. Walsh, L. Guarente and M. Zang (2011). "Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver." *FASEB J* **25**(5): 1664-1679.
- Lim, J. H., Y. M. Lee, Y. S. Chun, J. Chen, J. E. Kim and J. W. Park (2010). "Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha." *Mol Cell* **38**(6): 864-878.
- Lin, S. J., P. A. Defossez and L. Guarente (2000). "Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* **289**(5487): 2126-2128.
- Lin, S. J., E. Ford, M. Haigis, G. Liszt and L. Guarente (2004). "Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH." *Genes Dev* **18**(1): 12-16.
- Liszt, G., E. Ford, M. Kurtev and L. Guarente (2005). "Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase." *J Biol Chem* **280**(22): 21313-21320.
- Liu, P., N. A. Jenkins and N. G. Copeland (2003). "A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations." *Genome Res* **13**(3): 476-484.
- Liu, T. F., V. T. Vachharajani, B. K. Yoza and C. E. McCall (2012). "NAD+-dependent Sirtuin 1 and 6 Proteins Coordinate a Switch from Glucose to Fatty Acid Oxidation during the Acute Inflammatory Response." *J Biol Chem* **287**(31): 25758-25769.
- Liu, Y., R. Dentin, D. Chen, S. Hedrick, K. Ravnkjaer, S. Schenk, J. Milne, D. J. Meyers, P. Cole, J. Yates, 3rd, J. Olefsky, L. Guarente and M. Montminy (2008). "A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange." *Nature* **456**(7219): 269-273.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Lu, C., D. Chen, Z. Zhang, F. Fang, Y. Wu, L. Luo and Z. Yin (2007). "Heat Shock Protein 90 regulates the stability of c-Jun in HEK293 Cells." *Mol Cells* **24**(2): 210-214.
- Lum, J. J., T. Bui, M. Gruber, J. D. Gordan, R. J. DeBerardinis, K. L. Covello, M. C. Simon and C. B. Thompson (2007). "The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis." *Genes Dev* **21**(9): 1037-1049.

- Luo, B., G. J. Parker, R. C. Cooksey, Y. Soesanto, M. Evans, D. Jones and D. A. McClain (2007). "Chronic hexosamine flux stimulates fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in adipocytes." *J Biol Chem* **282**(10): 7172-7180.
- Mair, W., P. Goymer, S. D. Pletcher and L. Partridge (2003). "Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*." *Science* **301**(5640): 1731-1733.
- Mao, Z., C. Hine, X. Tian, M. Van Meter, M. Au, A. Vaidya, A. Seluanov and V. Gorbunova (2011). "SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1." *Science* **332**(6036): 1443-1446.
- McCord, R. A., E. Michishita, T. Hong, E. Berber, L. D. Boxer, R. Kusumoto, S. Guan, X. Shi, O. Gozani, A. L. Burlingame, V. A. Bohr and K. F. Chua (2009). "SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair." *Aging (Albany NY)* **1**(1): 109-121.
- Meeker, A. K., J. L. Hicks, C. A. Iacobuzio-Donahue, E. A. Montgomery, W. H. Westra, T. Y. Chan, B. M. Ronnett and A. M. De Marzo (2004). "Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis." *Clin Cancer Res* **10**(10): 3317-3326.
- Meeker, A. K., J. L. Hicks, E. A. Platz, G. E. March, C. J. Bennett, M. J. Delannoy and A. M. De Marzo (2002). "Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis." *Cancer Res* **62**(22): 6405-6409.
- Michan, S. and D. Sinclair (2007). "Sirtuins in mammals: insights into their biological function." *Biochem J* **404**(1): 1-13.
- Michishita, E., R. A. McCord, E. Berber, M. Kioi, H. Padilla-Nash, M. Damian, P. Cheung, R. Kusumoto, T. L. Kawahara, J. C. Barrett, H. Y. Chang, V. A. Bohr, T. Ried, O. Gozani and K. F. Chua (2008). "SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin." *Nature* **452**(7186): 492-496.
- Michishita, E., R. A. McCord, L. D. Boxer, M. F. Barber, T. Hong, O. Gozani and K. F. Chua (2009). "Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6." *Cell Cycle* **8**(16): 2664-2666.
- Michishita, E., J. Y. Park, J. M. Burneskis, J. C. Barrett and I. Horikawa (2005). "Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins." *Mol Biol Cell* **16**(10): 4623-4635.
- Mostoslavsky, R., K. F. Chua, D. B. Lombard, W. W. Pang, M. R. Fischer, L. Gellon, P. Liu, G. Mostoslavsky, S. Franco, M. M. Murphy, K. D. Mills, P. Patel, J. T. Hsu, A. L. Hong, E. Ford, H. L. Cheng, C. Kennedy, N. Nunez, R. Bronson, D. Frendewey, W. Auerbach, D. Valenzuela, M. Karow, M. O. Hottiger, S. Hursting, J. C. Barrett, L. Guarente, R. Mulligan, B. Demple, G. D. Yancopoulos and F. W. Alt (2006). "Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6." *Cell* **124**(2): 315-329.
- Moynihan, K. A., A. A. Grimm, M. M. Plueger, E. Bernal-Mizrachi, E. Ford, C. Cras-Meneur, M. A. Permutt and S. Imai (2005). "Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice." *Cell Metab* **2**(2): 105-117.
- Multani, A. S. and S. Chang (2007). "WRN at telomeres: implications for aging and cancer." *J Cell Sci* **120**(Pt 5): 713-721.
- Nagy, A., J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly and J. C. Roder (1993). "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8424-8428.
- Nakagawa, T., D. J. Lomb, M. C. Haigis and L. Guarente (2009). "SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle." *Cell* **137**(3): 560-570.
- Nielsen, J., S. K. Adolph, E. Rajpert-De Meyts, J. Lykke-Andersen, G. Koch, J. Christiansen and F. C. Nielsen (2003). "Nuclear transit of human zipcode-binding protein IMP1." *Biochem J* **376**(Pt 2): 383-391.
- Niimi, M., T. Ogawara, T. Yamashita, Y. Yamamoto, A. Ueyama, T. Kambe, T. Okamoto, T. Ban, H. Tamanoi, K. Ozaki, T. Fujiwara, H. Fukui, E. I. Takahashi, H. Kyushiki and A. Tanigami (2001). "Identification of GFAT1-L, a novel splice variant of human glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT1) that is expressed abundantly in skeletal muscle." *J Hum Genet* **46**(10): 566-571.
- Niwa, H., K. Yamamura and J. Miyazaki (1991). "Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector." *Gene* **108**(2): 193-199.
- North, B. J., B. L. Marshall, M. T. Borra, J. M. Denu and E. Verdin (2003). "The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase." *Mol Cell* **11**(2): 437-444.
- North, B. J. and D. A. Sinclair (2007). "Sirtuins: a conserved key unlocking AceCS activity." *Trends Biochem Sci* **32**(1): 1-4.

- Oki, T., K. Yamazaki, J. Kuromitsu, M. Okada and I. Tanaka (1999). "cDNA cloning and mapping of a novel subtype of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT2) in human and mouse." *Genomics* **57**(2): 227-234.
- Ong, S. E. and M. Mann (2005). "Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative." *Nat Chem Biol* **1**(5): 252-262.
- Ouyang, H., A. Nussenzweig, A. Kurimasa, V. C. Soares, X. Li, C. Cordon-Cardo, W. Li, N. Cheong, M. Nussenzweig, G. Iliakis, D. J. Chen and G. C. Li (1997). "Ku70 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination In vivo." *J Exp Med* **186**(6): 921-929.
- Oyadomari, S. and M. Mori (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." *Cell Death Differ* **11**(4): 381-389.
- Papandreou, I., R. A. Cairns, L. Fontana, A. L. Lim and N. C. Denko (2006). "HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption." *Cell Metab* **3**(3): 187-197.
- Park, S. Y., J. Ryu and W. Lee (2005). "O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes." *Exp Mol Med* **37**(3): 220-229.
- Parker, G., R. Taylor, D. Jones and D. McClain (2004). "Hyperglycemia and inhibition of glycogen synthase in streptozotocin-treated mice: role of O-linked N-acetylglucosamine." *J Biol Chem* **279**(20): 20636-20642.
- Parker, G. J., K. C. Lund, R. P. Taylor and D. A. McClain (2003). "Insulin resistance of glycogen synthase mediated by o-linked N-acetylglucosamine." *J Biol Chem* **278**(12): 10022-10027.
- Patti, M. E., A. Virkamaki, E. J. Landaker, C. R. Kahn and H. Yki-Jarvinen (1999). "Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle." *Diabetes* **48**(8): 1562-1571.
- Picard, F., M. Kurtev, N. Chung, A. Topark-Ngarm, T. Senawong, R. Machado De Oliveira, M. Leid, M. W. McBurney and L. Guarente (2004). "Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma." *Nature* **429**(6993): 771-776.
- Purushotham, A., T. T. Schug, Q. Xu, S. Surapureddi, X. Guo and X. Li (2009). "Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation." *Cell Metab* **9**(4): 327-338.
- Qiao, L. and J. Shao (2006). "SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex." *J Biol Chem* **281**(52): 39915-39924.
- Rajendran, R., R. Garva, M. Krstic-Demonacos and C. Demonacos (2011). "Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription." *J Biomed Biotechnol* **2011**: 368276.
- Robert, L., J. Labat-Robert and A. M. Robert (2009). "Physiology of skin aging." *Pathol Biol (Paris)* **57**(4): 336-341.
- Rodgers, J. T., C. Lerin, W. Haas, S. P. Gygi, B. M. Spiegelman and P. Puigserver (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." *Nature* **434**(7029): 113-118.
- Rodgers, J. T. and P. Puigserver (2007). "Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(31): 12861-12866.
- Rodriguez, C. I., F. Buchholz, J. Galloway, R. Sequerra, J. Kasper, R. Ayala, A. F. Stewart and S. M. Dymecki (2000). "High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP." *Nat Genet* **25**(2): 139-140.
- Rogina, B., S. L. Helfand and S. Frankel (2002). "Longevity regulation by Drosophila Rpd3 deacetylase and caloric restriction." *Science* **298**(5599): 1745.
- Sage, A. T., L. A. Walter, Y. Shi, M. I. Khan, H. Kaneto, A. Capretta and G. H. Werstuck (2010). "Hexosamine biosynthesis pathway flux promotes endoplasmic reticulum stress, lipid accumulation, and inflammatory gene expression in hepatic cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**(3): E499-511.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-491.
- Sanchez, O., M. Viladrich, I. Ramirez and M. Soley (2007). "Liver injury after an aggressive encounter in male mice." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**(5): R1908-1916.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Sauer, B. and N. Henderson (1988). "Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(14): 5166-5170.

- Saxena, R., B. F. Voight, V. Lyssenko, N. P. Burtt, P. I. de Bakker, H. Chen, J. J. Roix, S. Kathiresan, J. N. Hirschhorn, M. J. Daly, T. E. Hughes, L. Groop, D. Altshuler, P. Almgren, J. C. Florez, J. Meyer, K. Ardlie, K. Bengtsson Bostrom, B. Isomaa, G. Lettre, U. Lindblad, H. N. Lyon, O. Melander, C. Newton-Cheh, P. Nilsson, M. Orho-Melander, L. Rastam, E. K. Speliotes, M. R. Taskinen, T. Tuomi, C. Guiducci, A. Berglund, J. Carlson, L. Gianniny, R. Hackett, L. Hall, J. Holmkvist, E. Laurila, M. Sjogren, M. Sterner, A. Surti, M. Svensson, R. Tewhey, B. Blumenstiel, M. Parkin, M. Defelice, R. Barry, W. Brodeur, J. Camarata, N. Chia, M. Fava, J. Gibbons, B. Handsaker, C. Healy, K. Nguyen, C. Gates, C. Sougnez, D. Gage, M. Nizzari, S. B. Gabriel, G. W. Chirn, Q. Ma, H. Parikh, D. Richardson, D. Ricke and S. Purcell (2007). "Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels." *Science* **316**(5829): 1331-1336.
- Schwenk, F., U. Baron and K. Rajewsky (1995). "A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells." *Nucleic Acids Res* **23**(24): 5080-5081.
- Schwer, B., B. Schumacher, D. B. Lombard, C. Xiao, M. V. Kurtev, J. Gao, J. I. Schneider, H. Chai, R. T. Bronson, L. H. Tsai, C. X. Deng and F. W. Alt (2010). "Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(50): 21790-21794.
- Scott, L. J., K. L. Mohlke, L. L. Bonnycastle, C. J. Willer, Y. Li, W. L. Duren, M. R. Erdos, H. M. Stringham, P. S. Chines, A. U. Jackson, L. Prokunina-Olsson, C. J. Ding, A. J. Swift, N. Narisu, T. Hu, R. Pruim, R. Xiao, X. Y. Li, K. N. Conneely, N. L. Riebow, A. G. Sprau, M. Tong, P. P. White, K. N. Hetrick, M. W. Barnhart, C. W. Bark, J. L. Goldstein, L. Watkins, F. Xiang, J. Saramies, T. A. Buchanan, R. M. Watanabe, T. T. Valle, L. Kinnunen, G. R. Abecasis, E. W. Pugh, K. F. Doheny, R. N. Bergman, J. Tuomilehto, F. S. Collins and M. Boehnke (2007). "A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants." *Science* **316**(5829): 1341-1345.
- Shi, T., F. Wang, E. Stieren and Q. Tong (2005). "SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes." *J Biol Chem* **280**(14): 13560-13567.
- Sinclair, D. A. and L. Guarente (1997). "Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast." *Cell* **91**(7): 1033-1042.
- Smith, J. S., C. B. Brachmann, I. Celic, M. A. Kenna, S. Muhammad, V. J. Starai, J. L. Avalos, J. C. Escalante-Semerena, C. Grubmeyer, C. Wolberger and J. D. Boeke (2000). "A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6658-6663.
- Sommer, M., N. Poliak, S. Upadhyay, E. Ratovitski, B. D. Nelkin, L. A. Donehower and D. Sidransky (2006). "DeltaNp63alpha overexpression induces downregulation of Sirt1 and an accelerated aging phenotype in the mouse." *Cell Cycle* **5**(17): 2005-2011.
- Soncini, C., I. Berdo and G. Draetta (2001). "Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) is a modulator of USP10, a novel human ubiquitin specific protease." *Oncogene* **20**(29): 3869-3879.
- Srinivasan, V., U. Tatu, V. Mohan and M. Balasubramanyam (2009). "Molecular convergence of hexosamine biosynthetic pathway and ER stress leading to insulin resistance in L6 skeletal muscle cells." *Mol Cell Biochem* **328**(1-2): 217-224.
- Sternberg, N. and D. Hamilton (1981). "Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites." *J Mol Biol* **150**(4): 467-486.
- Tanner, K. G., J. Landry, R. Sternglanz and J. M. Denu (2000). "Silent information regulator 2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14178-14182.
- Tanno, M., J. Sakamoto, T. Miura, K. Shimamoto and Y. Horio (2007). "Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1." *J Biol Chem* **282**(9): 6823-6832.
- Tanny, J. C., G. J. Dowd, J. Huang, H. Hilz and D. Moazed (1999). "An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing." *Cell* **99**(7): 735-745.
- Tao, H., W. Liu, B. N. Simmons, H. K. Harris, T. C. Cox and M. A. Massiah (2010). "Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS." *Biotechniques* **48**(1): 61-64.
- Thomsen, D. R., R. M. Stenberg, W. F. Goins and M. F. Stinski (1984). "Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(3): 659-663.
- Tissenbaum, H. A. and L. Guarente (2001). "Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **410**(6825): 227-230.

- Todaro, G. J. and H. Green (1963). "Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines." *J Cell Biol* **17**: 299-313.
- Tourriere, H., K. Chebli, L. Zekri, B. Courselaud, J. M. Blanchard, E. Bertrand and J. Tazi (2003). "The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules." *J Cell Biol* **160**(6): 823-831.
- Tourriere, H., I. E. Gallouzi, K. Chebli, J. P. Capony, J. Mouaikel, P. van der Geer and J. Tazi (2001). "RasGAP-associated endoribonuclease G3BP: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization." *Mol Cell Biol* **21**(22): 7747-7760.
- Treier, M., L. M. Staszewski and D. Bohmann (1994). "Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain." *Cell* **78**(5): 787-798.
- Vakhrusheva, O., C. Smolka, P. Gajawada, S. Kostin, T. Boettger, T. Kubin, T. Braun and E. Bober (2008). "Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice." *Circ Res* **102**(6): 703-710.
- Vaziri, H., S. K. Dessain, E. Ng Eaton, S. I. Imai, R. A. Frye, T. K. Pandita, L. Guarente and R. A. Weinberg (2001). "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase." *Cell* **107**(2): 149-159.
- Veerababu, G., J. Tang, R. T. Hoffman, M. C. Daniels, L. F. Hebert, Jr., E. D. Crook, R. C. Cooksey and D. A. McClain (2000). "Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in the liver of transgenic mice results in enhanced glycogen storage, hyperlipidemia, obesity, and impaired glucose tolerance." *Diabetes* **49**(12): 2070-2078.
- Vosseller, K., L. Wells, M. D. Lane and G. W. Hart (2002). "Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(8): 5313-5318.
- Wang, C., L. Chen, X. Hou, Z. Li, N. Kabra, Y. Ma, S. Nemoto, T. Finkel, W. Gu, W. D. Cress and J. Chen (2006). "Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage." *Nat Cell Biol* **8**(9): 1025-1031.
- Wang, F., M. Nguyen, F. X. Qin and Q. Tong (2007). "SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction." *Aging Cell* **6**(4): 505-514.
- Wang, F. and Q. Tong (2009). "SIRT2 suppresses adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with PPARgamma." *Mol Biol Cell* **20**(3): 801-808.
- Wang, R. H., C. Li and C. X. Deng (2010). "Liver steatosis and increased ChREBP expression in mice carrying a liver specific SIRT1 null mutation under a normal feeding condition." *Int J Biol Sci* **6**(7): 682-690.
- Wang, Y., S. W. Oh, B. Deplancke, J. Luo, A. J. Walhout and H. A. Tissenbaum (2006). "C. elegans 14-3-3 proteins regulate life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO." *Mech Ageing Dev* **127**(9): 741-747.
- Wang, Y. and H. A. Tissenbaum (2006). "Overlapping and distinct functions for a Caenorhabditis elegans SIR2 and DAF-16/FOXO." *Mech Ageing Dev* **127**(1): 48-56.
- Weindruch, R. (1996). "The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates." *Toxicol Pathol* **24**(6): 742-745.
- Weindruch, R., R. L. Walford, S. Fligiel and D. Guthrie (1986). "The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake." *J Nutr* **116**(4): 641-654.
- Whelan, S. A., W. B. Dias, L. Thiruneelakantapillai, M. D. Lane and G. W. Hart (2010). "Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* **285**(8): 5204-5211.
- Whelan, S. A., M. D. Lane and G. W. Hart (2008). "Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling." *J Biol Chem* **283**(31): 21411-21417.
- Xiao, C., H. S. Kim, T. Lahusen, R. H. Wang, X. Xu, O. Gavrilova, W. Jou, D. Gius and C. X. Deng (2010). "SIRT6 deficiency results in severe hypoglycemia by enhancing both basal and insulin-stimulated glucose uptake in mice." *J Biol Chem* **285**(47): 36776-36784.
- Yang, B., B. M. Zwaans, M. Eckersdorff and D. B. Lombard (2009). "The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac in vivo to promote genomic stability." *Cell Cycle* **8**(16): 2662-2663.
- Yang, Y., H. Cimen, M. J. Han, T. Shi, J. H. Deng, H. Koc, O. M. Palacios, L. Montier, Y. Bai, Q. Tong and E. C. Koc (2010). "NAD⁺-dependent deacetylase SIRT3 regulates mitochondrial protein synthesis by deacetylation of the ribosomal protein MRPL10." *J Biol Chem* **285**(10): 7417-7429.
- Yoshida, K., T. Shimizugawa, M. Ono and H. Furukawa (2002). "Angiopietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase." *J Lipid Res* **43**(11): 1770-1772.

- Zachara, N. E., H. Molina, K. Y. Wong, A. Pandey and G. W. Hart (2011). "The dynamic stress-induced "O-GlcNAc-ome" highlights functions for O-GlcNAc in regulating DNA damage/repair and other cellular pathways." *Amino Acids* **40**(3): 793-808.
- Zekri, L., K. Chebli, H. Tourriere, F. C. Nielsen, T. V. Hansen, A. Rami and J. Tazi (2005). "Control of fetal growth and neonatal survival by the RasGAP-associated endoribonuclease G3BP." *Mol Cell Biol* **25**(19): 8703-8716.
- Zhao, S., 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 and K. L. Guan (2010). "Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation." *Science* **327**(5968): 1000-1004.
- Zhao, W., J. P. Kruse, Y. Tang, S. Y. Jung, J. Qin and W. Gu (2008). "Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1." *Nature* **451**(7178): 587-590.
- Zhong, J., R. Chaerkady, K. Kandasamy, M. Gucek, R. N. Cole and A. Pandey (2011). "The interactome of a PTB domain-containing adapter protein, Odin, revealed by SILAC." *J Proteomics* **74**(3): 294-303.
- Zhong, L., A. D'Urso, D. Toiber, C. Sebastian, R. E. Henry, D. D. Vadysirisack, A. Guimaraes, B. Marinelli, J. D. Wikstrom, T. Nir, C. B. Clish, B. Vaitheesvaran, O. Iliopoulos, I. Kurland, Y. Dor, R. Weissleder, O. S. Shirihai, L. W. Ellisen, J. M. Espinosa and R. Mostoslavsky (2010). "The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha." *Cell* **140**(2): 280-293.