

Regulation von "Silent mating type information regulation 2 homolog Type" 1 (SIRT1) durch die nach DNA-Schaden induzierte Kinase "Homeodomain-interaction kinase" (HIPK2)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich für Chemie, Pharmazie und Naturwissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Elisa Conrad

geboren in Konstanz

Heidelberg, 2012

Dekan:

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
I Zusammenfassung.....	1
II Abstract.....	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Die DNA-Schadensantwort.....	4
1.1.1 DNA-Reparaturmechanismen.....	4
1.1.2 Signaltransduktion und Regulation des programmierten Zelltods.....	6
1.2 Die DNA-schadensinduzierte Kinase HIPK2.....	7
1.2.1 Regulation von HIPK2.....	8
1.2.2 HIPK2 Aktivierung durch DNA-Schadensinduktion.....	9
1.2.3 HIPK2 in der Rolle eines Tumorsuppressors.....	10
1.3 Der Tumorsuppressor p53.....	11
1.3.1 Posttranslationale Modifikation von p53 und deren Auswirkungen.....	12
1.4 Die Klasse III Histondeacetylase SIRT1.....	14
1.4.1 Regulation von SIRT1.....	15
1.4.2 Die Rolle von SIRT1 in metabolischen Kontext.....	18
1.4.3 SIRT1 ist an der DNA-Reparatur beteiligt.....	19
1.4.4 Die Kontroverse: Ist SIRT1 ein Tumorsuppressor oder -promotor?.....	21
2 Zielsetzung der Arbeit.....	23
3 Ergebnisse.....	24
3.1 SIRT1 ist Signalempfänger von HIPK2.....	24
3.1.1 SIRT1 wird von HIPK2 <i>in vitro</i> phosphoryliert.....	24
3.1.2 SIRT1 wird an Serin 27 und Serin 682 von HIPK2 <i>in vitro</i> phosphoryliert.....	25
3.1.3 Validierung der phospho-spezifischen Antikörper gegen SIRT1.....	27
3.2 Die Bindung von SIRT1 und HIPK2 wird durch DNA-Schaden verstärkt.....	30
3.2.1 Die Bindung von SIRT1 und HIPK2 wird durch Adriamycin moduliert.....	30
3.2.2 Charakterisierung der Bindungsdomänen von SIRT1 und HIPK2.....	32
3.3 Regulation der Phosphorylierung durch DNA-Schaden.....	36
3.3.1 Adriamycinbehandlung moduliert die Phosphorylierung von SIRT1.....	36
3.3.2 HIPK2 RNA-Interferenz beeinflusst SIRT1 Proteinmengen.....	38
3.3.3 SIRT1 Proteinlevel sind in <i>Hipk2</i> ^{-/-} MEF reduziert.....	40
3.3.4 Die Phosphorylierung an S27 und S682 hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von SIRT1.....	42
3.4 Untersuchung der SIRT1 Proteinstabilität.....	43

3.4.1	Verfolgung der SIRT1-Neusynthese mittels Cycloheximid-Behandlung.....	43
3.4.2	SIRT1 wird in U2OS Zellen weder proteasomal noch lysosomal degradiert	44
3.4.3	HIPK2 ist an der transkriptionellen Regulation von SIRT1 beteiligt.....	46
3.5	Regulation der SIRT1 Phosphorylierung durch PML	47
3.5.1	SIRT1 und HIPK2 ko-lokalisieren in PML-Kernkörpern.....	47
3.5.2	PML-IV Ko-Expression verstärkt die SIRT1 Phosphorylierung an S682	48
3.5.3	PML Depletion beeinflusst SIRT1, HIPK2 und p53 Proteinlevel	50
3.6	Phosphorylierung von SIRT1 reduziert die Deacetylaseaktivität.....	51
3.6.1	Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 682 reduziert die SIRT1 Aktivität.....	51
3.6.2	SIRT1 Phosphorylierung verstärkt p53 Transaktivierung.....	54
3.6.3	Rekonstitution von U2OS Zellen mit SIRT1 und Mutanten	56
3.6.4	Der SIRT1 Aktivitätsverlust nach Phosphorylierung ist kein direkter Effekt.....	58
3.7	Die SIRT1 Aktivität unterliegt einer Phospho-SUMO-1-Schaltung	59
3.7.1	Die Bindung von SIRT1 und HIPK2 ist nicht durch SUMOylierung vermittelt ...	60
3.7.2	Die Phosphorylierung an S682 vermindert die SUMOylierung von SIRT1	61
3.7.3	SUMOylierung von SIRT1 reduziert die Phosphorylierung an S682	63
3.8	Der Aktivator AROS bindet DNA-schadensabhängig an SIRT1.....	64
3.8.1	Die DBC1 Bindung an SIRT1 wird durch Adriamycin nicht beeinflusst	64
3.8.2	Die Bindung von AROS an SIRT1 ist nach DNA-Schaden verringert	66
3.9	HIPK2 phosphoryliert die SIRT1 Modulatoren AROS und DBC1	68
4	Diskussion.....	71
4.1	SIRT1 wird von HIPK2 DNA-schadensabhängig phosphoryliert	72
4.2	DNA-Schaden verstärkt die Bindung von SIRT1 und HIPK2	75
4.3	HIPK2 reguliert SIRT1	77
4.3.1	HIPK2 ist in die transkriptionelle Regulation von SIRT1 involviert.....	77
4.3.2	SIRT1 wird nach Phosphorylierung an S682 durch HIPK2 inaktiviert	79
4.3.3	HIPK2-vermittelte SIRT1 Phosphorylierung an S682 erfolgt in PML-Kernkörpern	81
4.3.4	SIRT1 Phosphorylierung an S27 und S682 beeinflusst nicht dessen subzelluläre Lokalisation	82
4.4	SIRT1 Phosphorylierung an S682 steigert die p53 Transaktivierung	83
4.5	Die SIRT1 Regulation erfolgt durch einen zellulären Mediator.....	84
4.5.1	SIRT1 unterliegt einer reversen Phospho-SUMO-1-Schaltung	85
4.5.2	SIRT1 bindet phosphorylierungsabhängig den Ko-Aktivator AROS.....	86
4.6	Modell zur Apoptoseregulation durch HIPK2	89
4.7	Relevanz und Ausblick	91
5	Material und Methoden.....	93
5.1	Material	93

5.1.1	Geräte und Spezialmaterialien	93
5.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Antibiotika	95
5.1.3	Kits.....	97
5.1.4	Protein- und DNA-Marker	97
5.1.5	Puffer	98
5.1.6	Medien	103
5.1.7	Enzyme	104
5.1.8	Synthetische Oligonukleotide	104
5.1.9	Kommerziell hergestellte cDNA	106
5.1.10	Expressionsplasmide	107
5.1.11	Bakterienstämme	109
5.1.12	Eukaryotische Zelllinien.....	109
5.1.13	Antikörper.....	110
5.2	Methoden	112
5.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	112
5.2.2	Molekularbiologische Methoden	113
5.2.3	Zellbiologische Methoden.....	118
5.2.4	Proteinbiochemische Methoden	123
6	Literaturverzeichnis	130
7	Anhang.....	144
7.1	Ergänzende Ergebnisse zur HIPK2-vermittelten AROS Regulation.....	144
7.1.1	AROS bindet HIPK2.....	144
7.1.2	AROS ist ein instabiles Protein.....	145
7.2	Auflistung von Zusammenarbeiten	146
	Danksagung	147

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mirkoliter
µM	Mikromolar
A	Ampère
ABC	"ATP-binding cassette"
AID	Autoinhibitorische Domäne
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AML	Akute myeloide Leukämie
Amp	Ampicillin
AMPK	"AMP-activated protein kinase"
AP	Apurinische und apyrimidinische Läsionen
APE-1	"Apurinic/apyrimidinic endonuclease-1"
APS	Ammoniumperoxysulfat
AROS	"Active regulator of SIRT1"
As	Aminosäure(n)
ATCC	"American Type Culture Collection"
ATM	"Ataxia telangiectasia mutated"
ATP	Adenin-5'-Triphosphat
ATR	"ATM und Rad3 related"
BAX, <i>Bax</i>	"Bcl2 associated X Protein", <i>Gen</i>
bp	Basenpaare
BRCA1	"Breast cancer 1"
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
cAMP	zyclisches Adenosin-5'-Monophosphat
CBP	"CREB binding protein"
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (engl. "cyclin-dependent kinase")
CDS	Kodierende Sequenz (engl. "coding sequence")
CHK	"Checkpoint kinase"
CHX	Cycloheximid
CIP	Intestinale Phosphatase aus Kalb (engl. "calf intestinal phosphatase")
CtBP	"C-Terminal binding protein"
CtIP	"CtBP interacting protein"
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>

Da	Dalton
DBC1	"Deleted in breast cancer 1"
dd	doppelt destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. "desoxyribonucleic acid")
DNA BD	DNA-Bindungsdomäne
DNA-PK	DNA Proteinkinase
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ESA	"Essential for SIRT1 activity"
et. al.	et alteri
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAM	6- Carboxyfluorescein
FITC	Fluorescein
FKS	Fötales Kälberserum
Flag	Synthetische Peptidsequenz
FOXO	"Forkhead transcription factor"
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	"Green fluorescent protein"
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Human influenza hemagglutinin
HDAC	"Histone deacetylase"
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIC1	"Hypermethylated in Cancer 1"
HIF	"Hypoxia inducible factor"
HIPK2	"Homeodomain-interacting protein kinase 2"
His	Synthetische Peptidsequenz
HMGA	"High mobility group A1"
HR	"Homologous rekombination"
ID	Interaktionsdomäne
IKK	"Inhibitor of κ B kinase"

<i>in vitro</i>	(lat.) "im Glas"
<i>in vivo</i>	(lat.) "im Organismus"
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IR	Ionisierende Strahlung (engl. "ionizing irradiation")
JNK	"c-JUN N-terminal kinase"
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kd	"knock down"
kDa	Kilodalton
knock down	(engl.) Depletion eines Proteins
knock out	(engl.) Löschen eines Gens
ko	"knock out"
KR	Kalorienrestriktion (engl. "calorie restriction")
l	Liter
LB	"Luria Broth", Luria-Bertani Medium
LOH	Verlust der Heterozygie (engl. "loss of heterozygy")
M	molar
MDM2	"Murine double minute 2"
MDR	"Multi drug resistance"
MDR1	"Multidrug resistant 1"
MEF	Mausembryofibroblasten
MGB	"Dihydrocyclopyrroloindiol Tripeptid Minor Groove Binder"
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MRE11	"Meiotic recombination protein-11"
MRN	MRE11/Rad50/NBS1 Komplex
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. "messenger ribonucleic acid")
n	Anzahl durchgeführter Experimente
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
NAM	Nicotinamid
NBS1	"Nijmengen breackage syndrome"
NEDD	"Neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated"
NEM	N-Ethylmalemid
NEMO	"Inhibitor of κ B kinase" Untereinheit γ
NER	Nukleotidexzisionsreparatur

NES	Nukleäre Exportsequenz
ng	Nanogramm
NHEJ	"Non homologous endjoining"
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NP40	Nonident P40
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzniveau
p21	"Cyclin dependent kinase inhibitor 1A"
p300	"Histone acetyltransferase" p300
p53	"Cellular tumor antigen" p53
PAR	Poly-ADP-Ribose
PARP	"Poly-ADP-Ribose Polymerase"
PBS	"Phosphate buffered saline"
PcG	"Polycomb group"
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. "polymerase chain reaction")
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PGC-1 α	"Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator" 1 α
PIKK	"Phosphol-inositide 3 kinase like kinase"
Pipes	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
PKA	Proteinkinase A
PML	"Promyelotic leukemia protein"
PUMA, <i>Puma</i>	"p53 upregulated modulator of apoptosis", <i>Gen</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure (engl. "ribonucleic acid")
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. "reactive oxygen species")
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. "revolutions per minute")
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S19BP	"Ribosomal protein S19-binding protein 1"
SDS	Sodiumdocecylphosphat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
sek	Sekunde
SENP1	"Sentrin-specific protease" 1

Siah	"Seven in absentia"
SIM	SUMO-Interaktionsmotif (engl. "SUMO-interacting motif")
SIR	"Silent information regulator", katalytische Domäne
Sir2	"Silent information regulator" 2
siRNA	"small interfering RNA"
SIRT1	"Silent mating type information regulation 2 homologue Type" 1
SUMO	"Small ubiquitin-like modifier"
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TBS	"Tris-buffered saline"
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA Puffer
TOPBP1	"Topoisomerase-binding protein-1"
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyoxymethylenether
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
USP22	"Ubiquitin-specific peptidase"
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (engl. "volume per volume")
V5	Synthetische Peptidsequenz
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. "weight per volume")
WB	Western Blot
WRN	"Werner helicase"
WSB	"WD40-repeat/SOCS box protein"
wt	wildtyp
xg	x-fache Erdbeschleunigung [m/s^2]
XPA	"DNA repair protein complementing XP-A"
XRCC1	"X-ray cross-complementing-1"
z.B.	zum Beispiel
λ	Lambda
Ψ	Psi, entspricht variabler Aminosäure

Aminosäuren wurden anhand des Ein- und Dreibuchstabencodes abgekürzt.

I Zusammenfassung

"Silent mating type information regulation 2 Type" 1 (SIRT1), das humane Homolog der NAD⁺-abhängigen Histondeacetylase Sir2 aus Hefe, besitzt Schlüsselfunktionen in der Regulation des Metabolismus, der Zellalterung und Apoptose. Letztere wird vor allem durch die Deacetylierung von p53 an Lys382 und der dadurch verringerten Transkription proapoptotischer Zielgene vermittelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die SIRT1 Regulation im Zusammenhang mit der DNA-Schadensantwort untersucht.

In der Apoptoseregulation übernimmt die Serin/Threonin-Kinase "Homeodomain interacting protein kinase" 2 (HIPK2) eine zentrale Rolle und daher wurde die SIRT1 Modifikation und Regulation durch HIPK2 betrachtet. Durch Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53 an Ser46 aktiviert HIPK2 das Zielprotein und induziert die Transkription proapoptotischer Zielgene von p53. Es wurde beschrieben, dass HIPK2 nach DNA-Schädigung über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Acetylierung von p53 potenzieren kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass SIRT1 von HIPK2 *in vitro* und in Zellen an Serin 27 und 682 phosphoryliert wird. Weiterhin ist die Interaktion von SIRT1 mit HIPK2 sowie die SIRT1 Phosphorylierung an Serin 682 durch DNA-schädigende Adriamycinbehandlung erhöht. Es gibt Hinweise, dass HIPK2 die Expression von SIRT1 reguliert, da HIPK2 RNA-Interferenz zur Erniedrigung der SIRT1 Protein- und mRNA-Mengen führt.

Ein weiterer interessanter Aspekt liegt in der Beobachtung, dass Ko-Expression von PML-IV, welches SIRT1 sowie HIPK2 in PML-Kernkörper rekrutiert, die SIRT1 Phosphorylierung an Serin 682 verstärkt. Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 682 interferiert wiederum mit der SUMO-1 Modifikation, welche für die Lokalisation in PML-Kernkörpern wichtig ist.

Bemerkenswerterweise reduziert die DNA-schadensinduzierte SIRT1 Phosphorylierung die Bindung des SIRT1 Ko-Aktivators AROS, beeinflusst aber nicht diejenige des Inhibitors DBC1. Dies führt zur Reduktion der enzymatischen Aktivität von SIRT1 und der darauffolgenden weniger effizienten Deacetylierung des Zielproteins p53.

Durch die von mir in der vorliegenden Promotionsarbeit erzielten Ergebnisse konnte ein neuer molekularer Mechanismus entschlüsselt werden, welcher die durch HIPK2 modulierte Acetylierung von p53 und die daran anschließende Induktion der Apoptose beschreibt.

HIPK2-vermittelte SIRT1 Phosphorylierung resultiert in einer verminderten Deacetylasefunktion von SIRT1 und führt so zu einer verstärkten acetylierungsinduzierten Expression proapoptotischer p53 Zielgene.

II Abstract

"Silent mating type information regulation 2 Type" 1 (SIRT1), the mammalian homologue of the yeast NAD⁺-dependent histone deacetylase Sir2, is a key regulator of metabolism, aging and apoptosis. The latter function appears to be regulated via deacetylation of p53 at Lys382 thereby decreasing p53's apoptotic target gene expression. In the present thesis the SIRT1 regulation has been investigated in the context of the DNA-damage response.

"Homeodomain interacting protein kinase" 2 (HIPK2) is a serine/threonine kinase and plays an important role in the DNA damage response by regulating p53 mediated apoptosis. Following DNA damage Siah-1 becomes phosphorylated by ATM which leads to complex disruption and stabilisation of HIPK2 and subsequent activation of p53 by phosphorylation at Ser46.

Published data indicate that HIPK2 potentiates p53 acetylation upon DNA damage through a currently unknown mechanism.

In the present thesis I could show that SIRT1 is phosphorylated by HIPK2 *in vitro* and in intact cells at serine 27 and 682. Furthermore, the interaction of SIRT1 and HIPK2 as well as the SIRT1 phosphorylation at serin 682 is stimulated by DNA damage induced by Adriamycin treatment. HIPK2 seems to be crucial for SIRT1 expression, since HIPK2 knock down leads to SIRT1 protein and mRNA depletion.

Overexpression of PML-IV, which recruits SIRT1 along with HIPK2 to PML nuclear bodies, enhances the SIRT1 phosphorylation at Ser682. Phosphorylation of SIRT1 at Ser682 interferes with SIRT1 SUMOylation, which is an important signal for the localisation of proteins in PML nuclear bodies. On the other hand, SUMOylated SIRT1 cannot be phosphorylated by HIPK2.

Remarkably, DNA-damage induced SIRT1 phosphorylation by HIPK2 modulates the interaction with the SIRT1 co-activator AROS, but not the interaction with its inhibitor DBC1. Since the phosphorylation abrogates the interaction of SIRT1 with its co-activator AROS, a functional consequence of this phosphorylation is the reduced enzymatic activity of SIRT1. Thereby, the SIRT1 target p53 is not efficiently deacetylated anymore. This might result in increased transcription of p53 target genes and apoptosis induction.

Taken together, here I provide the evidence of a new molecular mechanism by which HIPK2 potentiates p53 acetylation. SIRT1 phosphorylation by HIPK2 negatively regulates the SIRT1 deacetylase function and leads to acetylation-induced expression of p53 proapoptotic target genes.

1 Einleitung

"Gesundheit und ein langes Leben", sind seit jeher ein Bestreben des Menschen. Vor ungefähr 30 Jahren wurde in Hefe das Protein, "Silent information regulator 2" (Sir2), entdeckt, welches diesen Wunsch zu vermitteln vermag (Ivy et al., 1985; Ivy et al., 1986). Sir2 trägt durch die genetische Stilllegung des HM Locus und der damit verbundenen Repression von Paarungsfaktoren, die zur Alterung und Infertilität von Hefe führen, zur Langlebigkeit von *S. cerevisiae* bei (Kaeberlein et al., 1999).

Das Protein ist über viele Spezies hinweg konserviert und an zellulären Vorgängen wie beispielsweise der Zellzyklusregulation und Zellalterung beteiligt (Brachmann et al., 1995).

"Silent mating type information regulation 2 Type" 1 (SIRT1), das humane Homolog von Sir2, ist in mannigfaltige zelluläre Prozesse eingebunden und verknüpft metabolische und apoptotische Signalwege sowie die Kontrolle der genomischen Integrität und epigenetischen Veränderungen (Brooks und Gu, 2009). Neue Untersuchungen und Charakterisierungen von Tumorgeweben weisen allerdings darauf hin, dass SIRT1 nicht nur benefizielle Auswirkungen auf den Organismus haben kann, sondern auch Eigenschaften eines Tumorpromotors aufweist. SIRT1 ist in der Lage, Mutationen und Stilllegung von Genen zu induzieren sowie auch die seneszenz- und zelltodinduzierenden Effekte des Tumorsuppressors p53 zu revertieren (Saunders und Verdin, 2007; Liu et al., 2009).

Aufgrund der Beteiligung bei verschiedenen zellulären Prozessen ist SIRT1 eines der meist untersuchten Proteine, dennoch ist die Regulation von SIRT1 durch posttranslationale Modifikationen nur wenig erforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die posttranslationale Modifikation von SIRT1 im Zusammenhang der Regulation der DNA-Schadensantwort untersucht.

Die proapoptotische Kinase "Homeodomain-interacting protein kinase" 2 (HIPK2) phosphoryliert p53 und kann dadurch die Acetylierung von p53 steigern. Dies erfolgt durch einen bislang unbekanntem Mechanismus.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass durch HIPK2-vermittelte SIRT1 Phosphorylierung der beschriebene Effekt, dass HIPK2 die Acetylierung des Tumorsuppressors p53 verstärkt, erklärt werden kann.

1.1 Die DNA-Schadensantwort

Die Aufrechterhaltung der zellularen Homöostase und die zuverlässige Instandhaltung des Genoms sind essentielle Voraussetzungen für eine fehlerfreie DNA Replikation und für sämtliche nachfolgende physiologische Prozesse (Barnes und Lindahl, 2004).

Die DNA ist einer Reihe schädigender Substanzen ausgesetzt, wie zum Beispiel endogener reaktiver Sauerstoff- (ROS) und Nitritspezies. Darüber hinaus entstehen durch spontane Hydrolyse von Basen nach nicht-enzymatischer Methylierung oder Misspaarungen apurinische und apyrimidinische (AP) Läsionen (Lindahl, 1993; Kawanishi und Hiraku, 2006). Weiterhin wirken Genotoxine aus der Umwelt, wie zum Beispiel UV- und ionisierende Strahlung (IR), schädigend auf die DNA.

Die Therapie von Tumorerkrankungen mittels Zytostatika nutzt deren DNA-schädigenden Effekt, um die Apoptoseantwort in malignen Zellen zu steigern.

Zur Erhaltung der genomischen Integrität haben Zellen mehrere, an die Art des erzeugten Schadens angepasste, Reparaturmechanismen entwickelt (Doll und Peto, 1981; Ward, 1988; Lindahl und Barnes, 2000; Wogan et al., 2004; Jackson und Bartek, 2009; Ciccia und Elledge, 2010).

1.1.1 DNA-Reparaturmechanismen

Läsionen der DNA können in Form von AP-Stellen, Einzel - und Doppelstrangbrüchen entstehen. Bei AP-Stellen handelt es sich um die Hydrolyse von Basen, die für die Reparatur kontrolliert zu Einzelstrangbrüchen prozessiert werden (Lindahl, 1993). DNA-Einzelstrangbrüche charakterisiert der Einschnitt eines DNA-Strang, der in einer 3'-freien Hydroxylgruppe und einem 5'-Deoxyribose-5-Phosphat resultiert (Christmann et al., 2003). Bei DNA-Doppelstrangbrüchen liegt an beiden DNA-Strängen eine Läsion vor (Lee et al., 1998; Rich et al., 2000).

Die DNA-Einzelstrangreparatur wird in die Basenexzisionsreparatur (BER) und die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) unterteilt. Abnormale Basen, wie Methylguanine und oxidative Basenmodifikationen, werden durch die BER entfernt. Durch die NER werden Nukleotidstücke mit einer Länge von bis zu 30 Basenpaaren mit Helix-störenden Läsionen, wie zum Beispiel Pyrimidinphotoaddukten, eliminiert (Christmann et al., 2003).

Transkriptionsgekoppelte DNA-Schäden werden über den "ATM and Rad3-related" (ATR)-Reparaturweg weitergeleitet und eliminiert. Nach Prozessierung des Strangbruchs durch "CtBP-interacting protein" (CtIP) und Stabilisierung der resultierenden einzelsträngigen DNA durch "Replication protein A" (RPA) bindet der Komplex bestehend aus ATR und dessen Ko-Faktor "ATR-interacting protein" (ATRIP). Dies zieht die Rekrutierung weiterer Faktoren, wie Rad17, dem Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1)-Komplex sowie "Topoisomerase-binding protein-1"

(TOPBP1) nach sich. TOPBP1 besitzt eine ATR Aktivierungssequenz. ATR aktiviert mit Hilfe des Adaptorproteines Claspin "Checkpoint kinase" 1 (CHK1) und initiiert dadurch Zellzyklus- und Replikationsarrest (Bartek et al., 2004; Cimprich und Cortez, 2008; You und Bailis, 2010). Wesentlich schädlicher als DNA-Einzelstrang- sind DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), da sie die genomische Integrität durch Deletion von Genen weit mehr gefährden können (Lee et al., 1998; Rich et al., 2000; Khanna und Jackson, 2001).

Das Vorliegen von Doppelstrangbrüchen aktiviert die ATR-verwandte Kinase "Ataxia telangiectasia-mutated" (ATM) und deren Signalkaskade (siehe 1.1.2). Wie auch ATR ist ATM ein Mitglied der Familie der "Phospho-inositide 3 kinase like kinase" (PIKK) (Shiloh, 2003; Matsuoka et al., 2007).

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen wird wie auch die Einzelstrangbruchreparatur durch Poly(ADP)-Ribosylierung eingeleitet (Haince et al., 2007; Hassa und Hottiger, 2008). Nach Detektion der DNA-Läsion überträgt die "Poly(ADP-ribose) polymerase" 1 (PARP1) ADP-Reste von NAD⁺ auf Zielproteine wie die Histone H1 und H2B sowie PARP1 selbst (Shall und de Murcia, 2000). Das ausgedehnte negativgeladene "Poly-ADP-Ribose" (PAR) Netzwerk bildet eine Plattform zur Anlagerung der verschiedenen Reparaturkomplexe (D'Amours et al., 1999).

Das Assemblieren des zur Detektion von DSB notwendigen "Meiotic recombination protein-11" (MRE11)/Rad50/"Nijmegen breackage syndrome 1" (NBS1) (MRN) Komplexes sowie die Rekrutierung von ATM selbst geschieht abhängig von PAR (Haince et al., 2008).

Zum einen ruft PARylierung eine Änderung der Chromatinstruktur hervor, zum anderen wird die Chromatinstruktur durch ATM-, ATR- bzw. "DNA-Protein kinase" (DNA-PK)-vermittelte Phosphorylierung von Histon H2AX an Serin (S) 139 (γ -H2AX) gelockert. Der Phosphorylierung schließt sich γ -H2AX Ubiquitynylierung und Acetylierung an, was die Dissoziation von γ -H2AX von der geschädigten DNA-Stelle hervorruft, und somit die Chromatinstruktur für das Anlagern der Reparaturmaschinerie zugänglich macht (Rogakou et al., 1998; Rogakou et al., 1999; Burma et al., 2001; Burdak-Rothkamm et al., 2006; An et al., 2010; Ikura et al., 2007; Cook et al., 2009; Xiao et al., 2009).

Doppelstrangbrüche werden entweder durch "Non homologous endjoining" (NHEJ) in jeder Zellzyklusphase oder durch "Homologous recombination" (HR) in der Synthese- oder G2-Phase des Zellzyklus repariert. Beim NHEJ werden die DNA-Enden über die DNA-Bindungsproteine Ku70/Ku80 und DNA-PK stabilisiert und durch den XRCC4-Ligase 4 Komplex ligiert. Diese Form der DNA-Reparatur ist schnell aber fehlerhaft, da es zur Deletion von Nukleotiden und somit zu Mutationen kommen kann (Hoeijmakers, 2001; Ciccica und Elledge, 2010). Die HR ist im Vergleich hierzu ein fehlerfreier Reparaturzweig, der durch den MRN Komplex eingeleitet und über "Breast cancer 1" (BRCA1) und die RAD51-54 Proteine prozessiert wird (Stracker et al., 2002; Ciccica und Elledge, 2010).

1.1.2 Signaltransduktion und Regulation des programmierten Zelltods

Im Folgenden wird die durch Doppelstrangbrüche induzierte Signalkaskade detailliert beschrieben. Das um den Doppelstrangbruch ausgebildete negativ geladene PAR Netzwerk ermöglicht die Anlagerung des MRN Komplexes an die geschädigte DNA (vergleicht 1.1.1).

Die Signaltransduktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wird durch die Bindung von ATM an den MRN Komplex eingeleitet. ATM aktiviert sich in Gegenwart von DNA durch Autophosphorylierung an den Serinen 1981, 367 und 1893 selbst (Bakkenist und Kastan, 2003; Lee und Paull, 2004; Falck et al., 2005; Lee und Paull, 2005; Kozlov et al., 2006).

Histon H3 ist ebenfalls in die DNA-Schadensantwort Signalkette integriert. Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 9 (3MeK9 H3) führt zur ATM Acetylierung durch Tip60, woraufhin die Kinase vollständig aktiviert wird (Sun et al., 2009). Nach erfolgreicher Reparatur des Doppelstrangbruchs wird Histon H3 durch die Acetyltransferase Rtt9 an Lysin (K) 56 acetyliert, was den Einbau von Histon H3 in den reparierten DNA-Abschnitt fördert (Chen et al., 2008).

Die ATM-abhängige Phosphorylierung des Faktors NBS1, einer Einheit des MRN Komplexes, an S343 führt wiederum zur Phosphorylierung und Aktivierung von CHK2 (Gatei et al., 2000; Lee et al., 2003). CHK2 Aktivierung durch ATM benötigt einen Schwellenwert an vorliegenden Doppelstrangbrüchen. Liegt die Anzahl an DSB bei ≤ 19 ist eine effektive DNA-Reparatur gewährleistet. Geht die Anzahl an DSB darüber hinaus, werden zelltodinduzierende (proapoptotische) Signale durch ATM- und CHK2-abhängige Phosphorylierung und Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 an S15 (ATM) und S20 (CHK2) eingeleitet (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998; Hirao et al., 2000; Buscemi et al., 2004). Die tumorsuppressive Wirkung von p53 resultiert überwiegend aus der Transkription von Zielgenen, die DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose vermitteln (Riley et al., 2008 und siehe 1.3).

Ein weiterer durch ATM regulierter Signalweg ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF- κ B. Dies geschieht über den Mediator "Inhibitor of κ B kinase" (IKK)-Untereinheit γ (NEMO), welcher DNA-schadensabhängig in den Zellkern migriert und dort von ATM phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von NEMO zieht dessen Ubiquitylierung nach sich, welche die Relokalisation von NEMO ins Zytoplasma fördert (Huang et al., 2000; Li et al., 2001; Huang et al., 2003). Dort assoziiert NEMO mit IKK- α und - β , die durch Phosphorylierungsprozesse den Transkriptionsfaktor NF- κ B freisetzen (Bottero et al., 2001; Huang et al., 2002). Die transkriptionelle Regulation von NF- κ B unterliegt wiederum Acetylierungsprozessen. Die Acetyltransferasen CBP/p300 steigern die Expression von antiapoptotischen NF- κ B Zielgenen, wohingegen Deacetylierung durch Histondeacetylasen (HDAC) die proapoptotische Genexpression vorantreibt (Campbell et al., 2004; Chen und Greene, 2004; Ho et al., 2005). Bei einer hohen Anzahl an vorliegenden DSB erfolgt eine zweite

Aktivierungswelle von NF- κ B, welche durch den "Tumor necrosis factor α " (TNF- α) induziert wird. Daraufhin erfolgt "c-Jun NH₂-terminal interacting kinase" 3 (JNK3)-vermittelte Sekretion von Interleukin-8 und Caspase-8-vermittelter Zelltod (Biton und Ashkenazi, 2011). Auf diese Weise könnten Zellen ihre unmittelbare Umgebung verändern und dazu beitragen, apoptotische Zellen zu entfernen (Varfolomeev et al., 2005; Waugh und Wilson, 2008).

1.2 Die DNA-schadensinduzierte Kinase HIPK2

Irreparabler DNA-Schaden führt zu programmiertem Zelltod. Um Apoptose über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten zu können, sind in die DNA-Schadensantwort nacheinander geschaltete Amplifikationsmechanismen integriert. "Homeodomain-interacting protein kinase" 2 (HIPK2) ist eine solche Kinase, die durch Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 die proapoptotische Antwort zu späten Zeitpunkten nach der Schadensinduktion aufrechterhält (Hofmann et al., 2002; Gresko et al., 2006; Dauth et al., 2007).

HIPK2 ist das am besten charakterisierte Mitglied der als transkriptionelle Ko-Repressoren beschriebenen, evolutionär konservierten Familie der Serin/Threonin Kinasen. Die Proteinfamilie der "Homeodomain-interacting protein" Kinasen umfasst 4 Mitglieder (HIPK1 bis HIPK4) und ist eine Unterfamilie der "Dual-specific tyrosine-phosphorylated and regulated kinase" (DYRK). HIPK1 bis HIPK3 besitzen eine strukturelle Homologie von über 90%. Anhand von *Hipk1* bzw. *Hipk2* "knock out" (ko) Mäusen konnte gezeigt werden, dass beide Proteine redundant sind. Der Doppel-"knock out" der *Hipk1*- und *Hipk2* Gene ist aufgrund schwerer Entwicklungsdefekte, wie unter anderem Exencephalie, zwischen E9.5 bis E12.5 letal. Weiterhin existiert eine entfernt verwandte HIPK4, deren Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Kim et al., 1998; Hofmann et al., 2000; Isono et al., 2006; Arai et al., 2007).

Der strukturelle Aufbau von HIPK2 ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Die zwischen den Spezies konservierte Kinasedomäne der HIPKs befindet sich wie für HIPK2 gezeigt im N-terminalen Bereich des Proteins. Die Interaktionsdomäne der Homeoproteine (HID) liegt im Zentrum von HIPK2 (Kim et al., 1998). Drei über die Länge des Proteins verteilte nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) vermitteln die nukleäre Lokalisation von HIPK2. Über das C-terminal gelegene "Speckle retention signal" (SRS), wie auch über das darin enthaltene "SUMO-interacting motif" (SIM), assoziiert HIPK2 mit verschiedenen nukleären Substrukturen, wie zum Beispiel den "Promyelotic leukemia protein" (PLM)-Kernkörpern (Kim et al., 1999; D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Möller et al., 2003; de la Vega et al., 2011; Sung et al., 2011). Weiterhin wird über diese Domäne die Interaktion mit den transkriptionellen Repressorproteinen der "Polycomb group" (PcG) vermittelt (Roscic et al., 2006). Am C-Terminus befindet sich eine autoinhibitorische Domäne (AID). Diese kann

durch Caspase-6 an den Aspartaten (D) 916 und 977 abgespalten werden, woraus eine hyperaktive HIPK2-Trunkation hervorgeht (Gresko et al., 2006).

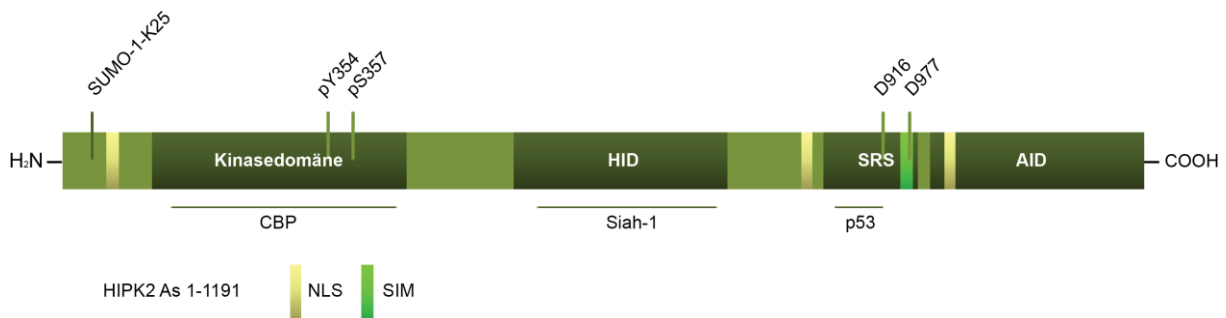


Abbildung 1: Schematische Darstellung der HIPK2 Primärsequenz und ausgewählte Interaktoren.

HIPK2 ist ein 1191 Aminosäuren umspannendes Protein (ca. 140 kDa). Die hochkonservierte Kinasedomäne befindet sich im N-terminalen Bereich. Die zentrale "Homeoprotein interaction domain" (HID) vermittelt die Bindung an Homeoproteine und das C-terminal gelegene "Speck retention signal" (SRS) die Verankerung in nukleäre Substrukturen. Die am C-Terminus befindliche autoinhibitorische Domäne (AID) kann durch Caspase-6 an Aspartat (D) 916 und 977 prozessiert werden. Einige ausgewählte Bindungspartner von HIPK2 sind angezeigt (CBP, Siah-1, p53). Die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) hält HIPK2 im Zellkern und das SUMO-Interaktionsmotiv (SIM) vermittelt die Bindung SUMO-modifizierter Proteine. Modifizierte Reste von HIPK2 sind hervorgehoben (p: phosphoryliert, SUMO: SUMOyliert).

1.2.1 Regulation von HIPK2

Als proapoptotische Kinase kann HIPK2 die zelluläre Homöostase stören. Daher ist eine strenge Regulation von HIPK2 eine wichtige Voraussetzung, um die effektive Regulation der Apoptose zu gewährleisten.

In ungestressten Zellen erfolgt die Regulation der HIPK2 Proteinmengen durch proteasomale Degradation. Verschiedene Ubiquitin E3-Ligasen "Murine double minute" 2 (MDM2), "WD40-repeat/SOCS box protein" (WSB-1) sowie "Seven in absentia" 1 und 2 (Siah-1, -2) fügen Polyubiquitinreste an HIPK2 an und führen HIPK2 somit der Degradation durch das 26S-Proteasom zu (Rinaldo et al., 2007; Choi et al., 2008; Winter et al., 2008; Calzado et al., 2009 und für Siah-1 in Abbildung 1 veranschaulicht).

Die strikte Kontrolle der HIPK2 Proteinlevel ist wichtig, da die Kinase durch Dimerisierung und Autophosphorylierung an Tyrosin (Y) 354 und Serin (S) 357 der Kinasedomäne eine Veränderung der Substratbindung hervorruft, die zur Aktivierung von HIPK2 führt (Saul et al., 2012).

Kürzlich wurde HIPK2 als transkriptioneller Ko-Aktivator beschrieben. "Small ubiquitin-like modifier-1" (SUMO-1) Modifikation von HIPK2 vermittelt die Komplexbildung mit HDAC3, was HIPK2 in einem hypoacetylierten Zustand hält. Bei einer steigenden intrazellulären Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) liegt HIPK2 nicht mehr SUMOyliert vor und

verbleibt an multiplen Lysinen acetyliert. Dies erhöht das Überleben der Zellen durch HIPK2-vermittelte Expression ROS-detoxifizierender Gene (de la Vega et al., 2012).

1.2.2 HIPK2 Aktivierung durch DNA-Schadensinduktion

Letale DNA-Schädigung durch UV- und ionisierende Strahlung sowie Behandlung mit Zytostatika, wie Adriamycin und Cisplatin, führt zu HIPK2 Stabilisierung. ATM und ATR-abhängige Phosphorylierung von Siah-1 an Serin 19 löst HIPK2 aus dem Komplex mit der E3-Ligase. Die Komplexauflösung entzieht HIPK2 der proteasomalen Degradation und führt zur HIPK2 Stabilisierung (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Di Stefano et al., 2004; Gresko et al., 2006; Dauth et al., 2007; Choi et al., 2008; Winter et al., 2008). Ein weiterer Mechanismus der Regulation der HIPK2 Stabilität ist die Bindung von Zyxin an Siah-1, wodurch die für die Siah-1 Aktivität wichtige Dimerisierung unterbunden wird (Polekhina et al., 2002; Matsuzawa et al., 2003; Crone et al., 2011).

HIPK2 wird erst zu einem späten Zeitpunkt im Verlauf der DNA-Schadensantwort stabilisiert. Dies ermöglicht die vorangehende Reparatur subletaler DNA-Schäden. Die Aktivierung der Kinase resultiert in der Induktion von p53-abhängiger und p53-unabhängiger Apoptose (Hofmann et al., 2002; Gresko et al., 2006; Dauth et al., 2007).

Der p53-abhängige Apoptoseweg wird durch Rekrutierung von HIPK2, "CREB binding protein" (CBP) und p53 in PML-Kernkörper initiiert (Hofmann et al., 2002; Möller et al., 2003; Hofmann et al., 2005; Sung et al., 2011).

HIPK2-abhängige Phosphorylierung von p53 an S46 führt zur Auflösung des p53-MDM2-Komplexes und somit zu p53 Stabilisierung (Stefano et al., 2004). Die p53 S46 Phosphorylierung verstärkt die CBP/p300-vermittelte Acetylierung von p53 an Lysin (K) 382 (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Aikawa et al., 2006; Sakamoto et al., 2010).

Darüber hinaus gibt es weitere Kinasen, die p53 an Serin 46 phosphorylieren, wie "AMP-activated protein kinase" (AMPK), p38 und DYRK2, und somit p53-vermittelte Apoptose einleiten können (Taira et al., 2007; Okoshi et al., 2008; Perfettini et al., 2005).

Die Regulation der Acetylierung von p53 an K382 erfolgt jedoch ausschließlich nach Phosphorylierung durch HIPK2 und ist notwendig, um die Expression verschiedener proapoptotischer Zielgene, wie zum Beispiel *Bax*, *Noxa*, *Puma* und *53AIP1*, einzuleiten (Puca et al., 2009).

Weiterhin vermittelt HIPK2 nach DNA-Schadensinduktion durch UV-Strahlung die "C-Terminal binding protein" (CtBP)-abhängige Apoptose. Phosphorylierung an Serin 422 des transkriptionellen Ko-Repressors CtBP veranlasst dessen proteasomale Degradation und somit die Expression proapoptotischer Gene. In *CtBP*-defizienten Mäusen wurde eine erhöhte Expression von *Bax* und *Noxa* detektiert (Grooteclaes et al., 2003; Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2005).

Die Modifikation von HIPK2 mit SUMO-1 erhöht die Proteinstabilität und die Assoziation mit PML-Kernkörpern. Dort wird HIPK2-abhängig die JNK1-vermittelte Apoptose eingeleitet (Hofmann et al., 2003; Gresko et al., 2005; Hofmann et al., 2005; Sung et al., 2011). Neben der HIPK2-induzierten JNK1-vermittelten Apoptose kann JNK1 über CtBP-Phosphorylierung und darauffolgender Degradation von CtBP ebenfalls p53-unabhängig die proapoptotische Antwort induzieren (Hofmann et al., 2003; Wang et al., 2006).

1.2.3 HIPK2 in der Rolle eines Tumorsuppressors

In Tumoren kann HIPK2 auf verschiedenen Wegen, wie zum Beispiel durch Mislokalisierung, Verlust der Heterozygie (LOH) und proteasomalen Abbau, inaktiviert werden.

Bei Patienten, die an "Akuter myeloider Leukämie" (AML) oder dem "myeloplasitischen Syndrom" (MDS) leiden, wurden Punktmutationen in der für HIPK2 kodierenden Sequenz gefunden, die eine aberrante Lokalisation von HIPK2 hervorrufen und die proapoptotische Wirkung unterbinden (Li et al., 2007).

In Brusttumoren liegt ebenfalls eine Mislokalisierung von HIPK2 vor, da HIPK2 durch "High mobility group A1" (HMGA1) ins Zytoplasma rekrutiert wird. Dort kann HIPK2 seiner Wirkung als Suppressor von Vimentin nicht nachkommen. Die Suppression von Vimentin verhindert die Invasion von Brustkrebszellen (Pierantoni et al., 2007; Nodale et al., 2012).

Weiterhin konnte in einem Zweistufen-Karzinogenesemodell gezeigt werden, dass die Deletion eines oder beider *Hipk2* Allele, Mäuse bezüglich der Hautkrebsentwicklung stark sensitiviert (Wei et al., 2007). Vor kurzem wurde berichtet, dass die proapoptotische Antwort von HIPK2 durch das in die UV-induzierte Hautkarzinogenese involviert HPV23 E6 Protein unterdrückt wird. HPV23 E6 verhindert die Interaktion von p53 mit HIPK2 und somit dessen Aktivierung (Scheffner et al., 1993; Muschik et al., 2011). Auf diese Weise könnte HIPK2 in die Entstehung von Hautkrebs involviert sein.

Des Weiteren wurde in Thymus-assoziierten, bestrahlungsinduzierten Lymphomen der Verlust der Heterozygotie (LOH) am HIPK2 Locus beschrieben (Mao et al., 2012). Darüber hinaus gehen Krebserkrankungen der Schilddrüse mit LOH eines HIPK2 Allels einher (Lavra et al., 2011). Der Verlust von HIPK2 durch proteasomalen Abbau wurde im Zentrum solider Tumore beobachtet. Die dort herrschenden hypoxischen Bedingungen führen zur "Hypoxia inducible factor" 1 (HIF1)- und Siah-vermittelter HIPK2 Degradation (Calzado et al., 2009; Moehlenbrink et al., 2010; Nardinocchi et al., 2011).

Neben einer defekten Apoptoseregulation in Tumoren, ist ein weiterer Aspekt der Krebsentstehung eine aberrante Zytokinese. Durch fehlerhafte Zellteilung werden Chromosomensätze unvollständig weitergegeben und dies kann zur Entstehung von Tumoren beitragen. Es wurde gezeigt, dass HIPK2 Histon H2B am "Midbody" an Serin 14

phosphoryliert und dadurch Zytokinesedefekte, wie unter anderem Tetraploidisierung, verhindert (Glotzer, 2005; Rinaldo et al., 2012).

Es gibt verschiedene Hinweise, die auf eine wichtige Rolle von HIPK2 in der Tumorsuppression, als haploinsuffizienter Tumorsuppressor, hindeuten. Dies kann sowohl in der HIPK2-vermittelten Apoptoseregulation als auch in der Rolle von HIPK2 als transkriptioneller Repressor begründet sein.

1.3 Der Tumorsuppressor p53

Die Tumorentstehung und -entwicklung beruht in mehr als 50% der Fälle auf einer eingeschränkten oder fehlenden Funktion des Tumorsuppressors p53. Dies kann direkt aus Mutationen im *TP53* Gen, oder durch Fehlregulation der durch p53 regulierten Gene herrühren (Hollstein et al., 1994; Whibley et al., 2009). Daher wurden verschiedene Therapiestrategien im Mausmodell und in klinischen Studien evaluiert und diskutiert. Sie beruhen in der Regel darauf, funktionelles wildtyp p53 mit gentherapeutischen Mitteln selektiv in p53-defiziente Tumore einzuführen oder vorliegendes inaktives p53 durch Wirkstoffe ("small molecules") zu seiner Funktion zurückzuerhelfen. Diese Wirkstoffe, wie zum Beispiel RITA oder Nutlin-3a, beeinflussen die Assoziation von p53 mit der E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 und verhindern somit die proteasomale Degradation von p53 (Issaeva et al., 2004; Vassilev et al., 2004; Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007; Huang et al., 2009).

p53 besitzt eine N-terminale, hydrophobe Transaktivierungsdomäne (TAD), die mit der Transkriptionsmaschinerie wechselwirkt (Kussie et al., 1996). Es folgt die zentrale DNA-Bindungsdomäne, die über ein Zn^{2+} -Ion an die DNA bindet (Cho et al., 1994). Daran schließt die Tetramerisierungsdomäne (Tet) an. Tetramerisierung ist für die Bindung von p53 an die DNA essentiell, welche durch NAD^+ -abhängige p53-Konformationsänderung reduziert werden kann (Kern et al., 1991; Jeffrey et al., 1995; McLure et al., 2004; Itahana et al., 2009). Der C-Terminus von p53 besteht vornehmlich aus basischen Aminosäuren (As) und kann durch intramolekulare Faltung mit der DNA-Bindungsdomäne interagieren (Hupp und Lane, 1994; Lee et al., 1995; Selivanova et al., 1998). Die beschriebenen Motive von p53 sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel DNA-Schaden, vermittelt durch UV- oder ionisierende Strahlung, durch Chemotherapeutika und Onkogene, wie Ras, aktivieren p53. Dies hat Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose durch Transkription der entsprechenden Zielgene zur Folge (Vogelstein et al., 2000; Vousden und Lu, 2002 und siehe Abbildung 2).

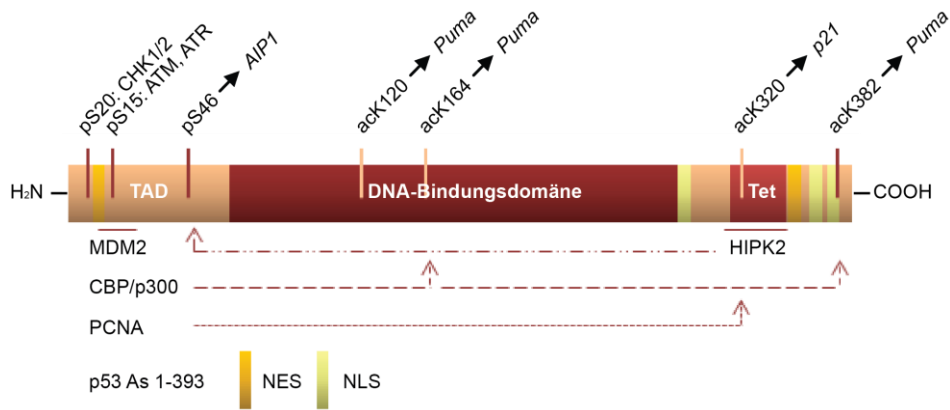


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Primärstruktur von p53 und dessen Modifikationen.

p53 ist ein 393 Aminosäuren umfassendes Protein (53 kDa). N-terminal befindet sich die Transaktivierungsdomäne (TAD), zentral liegt die DNA-Bindungsdomäne und am C-Terminus die Tetramerisierungsdomäne (Tet). Durch nukleäre Ex- und Importsignale (NES und NLS) kann p53 zwischen Zellkern und Zytoplasma migrieren. Die Interaktionsdomänen mit Bindungspartnern sind durch Balken angezeigt. Die Modifikationen der Aminosäuren (ac: acetyliert, p: phosphoryliert) sowie die Effektoren und Auswirkungen (durch solide Pfeile gekennzeichnet) sind jeweils hervorgehoben.

p53 verfügt über nukleäre Import- (NLS) und Exportsignale (NES). Als Transkriptionsfaktor lokalisiert p53 hauptsächlich im Zellkern, allerdings kann p53 auch ins Zytoplasma migrieren. Zytoplasmatisches p53 wird von antiapoptotischen Proteinen der Bcl2-Familie komplexiert. Die Assoziation von PUMA, dem Genprodukt des p53 Zielgens *Puma*, mit dem Komplex der Bcl2-Proteine entlässt p53 daraus. Daraufhin bindet und permeabilisiert p53 die äußere Mitochondrienmembran, wodurch proapoptotische Proteine, wie BAX, aus den Mitochondrien freigesetzt werden (Vousden und Woude, 2000; Moll et al., 2006; Kroemer et al., 2007).

1.3.1 Posttranslationale Modifikation von p53 und deren Auswirkungen

Aufgrund der fatalen Auswirkungen auf das Zellschicksal, ist die Aktivierung von p53 streng reguliert. Dies geschieht durch vielfältige posttranslationale Modifikationen.

MDM2 bindet an den N-Terminus von p53 und vermittelt die Polyubiquitylierung der C-terminalen Lysine. Dies ist das Signal für die proteasomale Degradation von p53 (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). MDM2 kann neben Polyubiquitylierung auch Monoubiquitylierung, SUMOylierung und "Neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated" (NEDD)-ylierung vermitteln. Monoubiquitylierung ist das Signal, woraufhin p53 seine subzelluläre Lokalisation ändert und in das Zytoplasma migriert. Das Anfügen eines SUMO-Restes bewirkt ein verändertes Transkriptionsprofil sowie die Rekrutierung in nukleäre Substrukturen, wie zum Beispiel PML-Kernkörper. NEDDylierung an K320 wiederum hemmt die transkriptionelle Aktivität von p53, da dies die PCNA-vermittelte p53

aktivierende Phosphorylierung an K320 verhindert (Fogal et al., 2000; Pearson et al., 2000; Lai et al., 2001; Li et al., 2003; Xirodimas et al., 2004; Abida et al., 2007; Hock und Vousden, 2010). Zahlreiche weitere E3- und E4-Ubiquitin-Ligasen destabilisieren p53 durch Polyubiquitinylierung am C-Terminus (Brooks und Gu, 2011).

Nach DNA-Schädigung wird der MDM2-p53 Komplex durch Phosphorylierung von MDM2 (Maya et al., 2001; Goldberg et al., 2002) sowie Phosphorylierung N-terminal gelegenen Reste von p53 aufgebrochen. Phosphorylierung von p53 wird an S15 durch ATM und ATR, an S20 durch CHK1 und CHK2, und weiterhin an Threonin (T) 81 durch JNK, vermittelt. Dies führt zur Stabilisierung und Aktivierung von p53 (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998; Chehab et al., 2000; Hirao et al., 2000; Shieh et al., 2000; Buschmann et al., 2001).

Die Phosphorylierung von p53 bewirkt wiederum die Acetylierung von sechs C-terminalen Lysinen (K370/K372/K373/K381/K382/K386) durch CBP/p300 sowie von K120 durch Tip60/hMOF. Acetylierung des C-Terminus ändert die Bindungseigenschaften von p53 und erhöht dessen Affinität zu DNA (Gu und Roeder, 1997; Gu et al., 1997; Ito et al., 2001; Li et al., 2002; Feng et al., 2005; Krummel et al., 2005 und Abbildung 2).

Subletaler, reparabler DNA-Schaden induziert die PCNA-vermittelte Acetylierung und E4F1-vermittelte Ubiquitinylierung an Lysin 320 von p53. Dies führt zu Zellzyklusarrest aufgrund erhöhter p21-Expression (siehe Abbildung 2). Außerdem fördert Phosphorylierung durch c-Abl die Tetramerisierung und Assoziation von p53 an den p21-Promotor (Liu et al., 1999; Wei et al., 2005; Chao et al., 2006; Le Cam et al., 2006).

Irreparabler DNA-Schaden induziert die p53 Phosphorylierung an S46 (pS46) durch HIPK2. Dies stimuliert die Bindung von p53 an die "Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase" 1 (Pin1), was eine Konformationsänderung von p53 hervorruft. Damit ist die verstärkte Rekrutierung der Histonacetyltransferasen CBP und p300 und die Acetylierung des C-terminalen K382 von p53 verbunden. Das proapoptotische Potential von p53 wird durch CBP/p300-induzierte Acetylierung von K164 in der DNA-Bindungsdomäne gesteigert (Oda et al., 2000; Hofmann et al., 2002; Zacchi et al., 2002; Zheng et al., 2002; Mantovani et al., 2007; Tang et al., 2008).

Die Expression proapoptotischer p53 Zielgene wird weiterhin durch p53-Interaktoren, wie ASPP1 und ASPP2 sowie NF- κ B, unter anderem durch Wechselwirkung mit der DNA-Bindungsdomäne von p53 gesteigert (Ryan et al., 2000; Samuels-Lev et al., 2001; Bergamaschi et al., 2004; Schumm et al., 2006; Aylon und Oren, 2007; Huang et al., 2007).

Apoptose wird unter anderem durch die Expression von *Bax*, *Noxa*, *Puma* und *53AIP1* induziert. Monoubiquitin-vermittelte p53 Translokation in das Zytoplasma und die Interaktion von p53 mit BAX induzieren den Zusammenbruch der Mitochondrien und die Freisetzung von Cytochrom C (Li et al., 2003; Moll et al., 2006; Kroemer et al., 2007; Green und Kroemer, 2009). Ein weiterer regulatorischer Zweig von p53 hinsichtlich der

Tumorsuppression ist die Initiierung von Seneszenz. Der dauerhafte Zellzyklusarrest wird nach DNA-Schaden durch Onkogene und Telomerdefekte über p53-abhängige p21-Expression vermittelt und verhindert somit das Fortschreiten von Tumorerkrankungen (Brown et al., 1997; Brooks und Gu, 2010).

1.4 Die Klasse III Histondeacetylase SIRT1

Sirtuine sind von Prokaryoten bis zum Menschen konservierte Klasse III NAD⁺-abhängige Histondeacetylasen (Tanny et al., 1999; Frye, 1999; Landry et al., 2000; Imai et al., 2000).

Bekannt wurde das Gründungsmitglied der Proteinfamilie, "Silent information regulator 2" (Sir2) aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), durch seine lebensverlängernde Wirkung auf den Organismus. Deacetylierung der Lysine (ack) 9, ack14 und ack56 von Histon H3 sowie ack16 in Histon H4 ruft die genetische Stilllegung des HM Locus und die damit verbundene Repression von Paarungsfaktoren, die zur Alterung und Infertilität von Hefe beitragen, hervor (Imai et al., 2000; Ivy et al., 1986; Kaeberlein et al., 1999; Värvi et al., 2010). Seitdem wurden Anstrengungen unternommen, die positiven Auswirkungen der Sirtuine in höheren Organismen zu bestätigen.

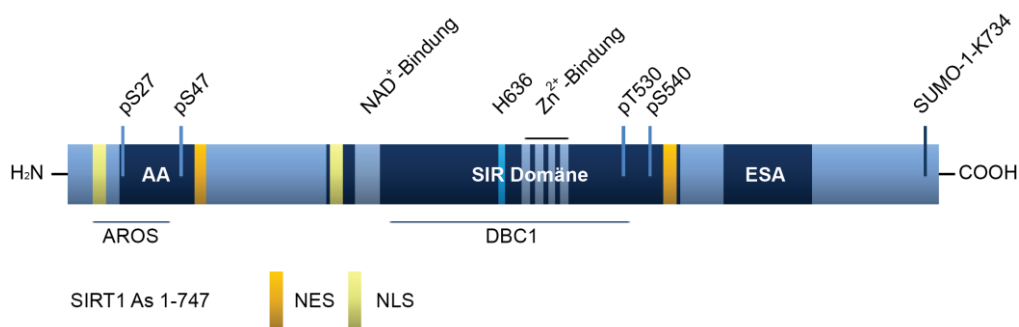


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Primärstruktur von SIRT1 und dessen Modulatoren.

SIRT1 ist ein 747 Aminosäuren großes Protein (ca. 130 kDa) mit der zentralen SIR Domäne, die das reaktive Zentrum (H636) sowie Zink (Zn²⁺) und NAD⁺ Bindestellen aufweist. Die C-terminale "Essential for SIRT1 Activity" (ESA) Domäne kann durch Konformationsänderung mit der SIR Domäne wechselwirken und die SIRT1 Aktivität beeinflussen. Am N-Terminus befindet sich eine Alanin-reiche (AA) Aminosäurefolge. Bindungsstellen der SIRT1 Modulatoren sind durch Balken dargestellt. Die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) vermittelt die vornehmlich nukleäre Lokalisation. SIRT1 besitzt auch Exportsignale (NES) und kann im Zytoplasma vorliegen. Modifizierte Reste von SIRT1 sind hervorgehoben (p: phosphoryliert, SUMO: SUMOyliert). Die genannten Motive wurden zum Teil *in silico* mit "Expasy" (www.expasy.org/tools) ermittelt.

Es existieren sieben humane Homologe zu Sir2, SIRT1 bis SIRT7, mit unterschiedlicher Lokalisation und Funktion in der Zelle (Frye, 1999; Frye, 2000).

Das humane SIRT1 ist am engsten mit *S. cerevisiae* Sir2 verwandt und ebenfalls ein größtenteils nukleär lokalisiertes Protein (Michishita et al., 2005; Michan und Sinclair, 2007;

Tanno et al., 2007). Abbildung 3 beschreibt die Primärstruktur von SIRT1 sowie die Bindung von SIRT1 Modulatoren und wichtige Modifikationen von Aminosäureresten.

Wie das Homolog der Hefe, deacetyliert auch SIRT1 Histone. Es ist bekannt, dass SIRT1 Histon H1 an acK26, Histon H3 an acK9 sowie Histon H4 an acK16 deacetyliert und dadurch die Bildung von fakultativem Heterochromatin vermittelt. Dies geht mit der Stilllegung der Transkription einher. Die Deacetylierung von Histon H3 an acK56 konkurriert mit der Rekrutierung von Histon H3 an die DNA nach abgeschlossener Doppelstrangbruch-Reparatur (Vaquero et al., 2004; Chen et al., 2008; Das et al., 2009).

Darüber hinaus ist SIRT1 an verschiedensten zellulären Signalwegen, von der zellulären Stressantwort und DNA-Schadensreparatur, über metabolische Prozesse bis hin zur Zellalterung, beteiligt (Blander und Guarente, 2004; Kwon und Ott, 2008; Liu et al., 2009; Brooks und Gu, 2009). Weiterhin scheint SIRT1 auch in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle zu spielen, da *Sirt1* "knock-out" (ko, *Sirt1*^{-/-}) Mäuse das Embryonalstadium (E9.5 bis E14.5) nicht überleben (Cheng et al., 2003; Ford et al., 2005; Wang et al., 2008).

1.4.1 Regulation von SIRT1

Als NAD⁺-abhängige Deacetylase setzt SIRT1 ein acetyliertes Substrat am reaktiven Histidinrest, H636, der SIR Domäne mit Hilfe eines Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)-Moleküls zum deacetylierten Produkt, Nicotinamid (NAM) und O-acetyl-ADP-Ribose um. Daher kann eine Hemmung der enzymatischen Aktivität von SIRT1 zum einen durch eine negative Metabolismusrate, die sich in einer niedrigen [NAD⁺/NADH]-Bilanz widerspiegelt, oder zum anderen durch Produkthemmung durch NAM hervorgerufen werden (Tanny et al., 1999; Landry et al., 2000; Tanner et al., 2000 und vergleiche Abbildung 3). Die "Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase" (NAMPT) erhöht nach oxidativem Stress die intrazellulären NAD⁺ Level und damit auch die SIRT1 Aktivität. In verschiedenen Tumoren ist sowohl NAMPT als auch SIRT1 Expression gesteigert (Revollo et al., 2004; Yang und Sauve, 2006; van der Veer et al., 2007; Wang et al., 2011). PARP wiederum konkurriert nach DNA-Schadensinduktion mit SIRT1 um NAD⁺. PARP produziert ebenfalls NAM und kann somit die SIRT1 Aktivität inhibieren (Zhang, 2003).

Unter physiologischen Bedingungen wird SIRT1 proteasomal degradiert. Nach genotoxischem Stress führt Deubiquitylierung durch die "Ubiquitin-specific peptidase" 22 (USP22) zur Stabilisierung von SIRT1. Dies verringert die p53-abhängige DNA-Schadensantwort. *Usp22*^{-/-} Mäuse weisen eine erhöhte Apoptoserate auf, die durch erhöhte SIRT1 Proteinmengen hervorgerufen wird (Lin et al., 2012). Die proapoptotische Zellantwort wird durch SIRT1 beeinflusst. SIRT1 deacetyliert p53 an K382 und senkt dadurch dessen transaktivierendes Potential und die Expression von proapoptotischen p53 Zielgenen (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001; Cheng et al., 2003).

Eine alternative Spleißvariante von SIRT1 in Mensch und Maus, SIRT1- Δ Exon8 (95 kDa), verfügt nur über minimale Deacetylaseaktivität, weist aber eine im Vergleich zum Volllängeprotein stark erhöhte Stresssensitivität auf. SIRT1- Δ Exon8 reguliert p53 durch Deacetylierung an K382 und wird selbst in einer negativen Rückkopplung auf transkriptioneller Ebene durch p53 kontrolliert. Dies könnte auf eine Verteilung der SIRT1-vermittelten, stressinduzierten, p53 Deacetylierung auf unterschiedliche Spleißvarianten hindeuten (Lynch et al., 2010).

1.4.1.1 Transkriptionelle Regulation von SIRT1 und Prozessierung der SIRT1 mRNA

Die Integration von SIRT1 in vielfältige zelluläre Regulationswege, die auch gegenläufig agieren, erfordert eine strikte Regulation der SIRT1 Proteinmengen. Dies erfolgt zu einem großen Teil durch transkriptionelle Regulationsmechanismen.

SIRT1 wird nach DNA-Schädigung durch Etoposid von E2F1 auf transkriptioneller Ebene positiv reguliert und verhindert Apoptose. Etoposid hemmt, wie Adriamycin, die Topoisomerase II und induziert DNA-Strangbrüche (Fleming et al., 1989). Die Transkriptionsfaktoren der E2F Familie sind wichtig für die Zellproliferation sowie Apoptoseinduktion, da sie unter anderem die Expression proapoptotischer Gene regulieren. SIRT1 wiederum bildet eine negative Rückkopplung und bindet als transkriptioneller Ko-Repressor an E2F1 am *Sirt1*-Promotor (Nahle et al., 2002; Wang et al., 2006).

Der transkriptionelle Ko-Repressor "Hypermethylated in cancer 1" (HIC1) bildet einen transkriptionellen Repressorkomplex mit SIRT1 und bindet an den *Sirt1*-Promotor. Ein weiterer transkriptioneller Ko-Repressor, CtBP, bindet NADH-abhängig an HIC1 und verknüpft die transkriptionelle Regulation von SIRT1 mit dem Glucosemetabolismus. Verringerte Glycolyse oder Inhibition der Glycolyse mittels 2-Deoxyglucose führt zu erniedrigten NADH-Spiegeln und somit zu einer reduzierten Bindung von CtBP an HIC1. Infolgedessen dissoziiert der Komplex vom *Sirt1*-Promotor und SIRT1 kann transkribiert werden (Chen et al., 2005; Zhang et al., 2007).

Weiterhin wird die SIRT1 Expression durch den Transkriptionsfaktor c-Myc gesteigert. In einer positiven Rückkopplung deacetyliert SIRT1 c-Myc an K323 und initiiert damit dessen proteasomalen Abbau durch verstärkte Polyubiquitinylierung an K48. Dadurch wird die SIRT1 Expression weiter erhöht. Durch Mutationen im *c-Myc* Gen wird c-Myc in Tumoren, wie zum Beispiel in Burkitt Lymphomen, konstitutiv exprimiert. Daher ist c-Myc ein Protoonkogen. Somit kann SIRT1 das transformierende Potential von c-Myc und auch die Tumorentstehung reduzieren (Komuro et al., 1988; Askew et al., 1991; Yuan et al., 2009).

Desweiteren reprimiert der Tumorsuppressor p53 die SIRT1 Expression in FOXO3a-abhängiger Weise. Unter Kalorienrestriktion (KR) migriert der Transkriptionsfaktor FOXO3a in den Zellkern, wo er p53 bindet und die SIRT1 Expression induziert. SIRT1 wiederum senkt

durch Deacetylierung von FOXO und p53 deren proapoptisches Potential, nicht aber die Induktion von Zellzyklusarrest nach DNA-Schaden (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001; Brunet et al., 2004; Motta et al., 2004; Nemoto et al., 2004).

SIRT1 wird nicht nur auf transkriptioneller, sondern auch auf translationaler Ebene reguliert. Das RNA-Bindeprotein HuR bindet die 3'-untranslatierte Region der SIRT1 mRNA und stabilisiert diese. Nach oxidativem Stress wird HuR von der Zellzykluskinase CHK2 phosphoryliert, woraufhin die SIRT1 mRNA aus dem Komplex mit HuR entlassen und abgebaut wird. Demnach reguliert HuR SIRT1 auf translationaler Ebene und wirkt auf diese Weise an der Apoptoseregulation mit (Abdelmohsen et al., 2007).

Eine strenge Regulation der SIRT1 Transkription und Translation durch Effektoren unterschiedlicher Signalwege sowie deren Rückkopplungsmechanismen ist hinsichtlich der verschiedenen SIRT1 Effekte wichtig.

1.4.1.2 Regulation von SIRT1 durch Phosphorylierung

Neben der transkriptionellen Regulation von SIRT1 spielt posttranslationale Modifikation eine wichtige Rolle in der SIRT1 Aktivitätsregulation. Dennoch sind bisher nur wenige Modifikationen von SIRT1 und deren Auswirkungen bekannt. Es wurde berichtet, dass CDK1/CyclinB-induzierte SIRT1 Phosphorylierung an T530 und S540 in embryonalen Stammzellen die Passage der G2/M-Phase des Zellzyklus erleichtert, da diese Phosphorylierungen die Aktivität von SIRT1 herabsetzen (Sasaki et al., 2008).

Modifikationen von SIRT1 durch JNK1 an S27, S47 und T530 nach oxidativem Stress erhöhen die nukleäre Lokalisation von SIRT1 sowie dessen enzymatische Aktivität gegenüber Histon H3, nicht aber gegenüber p53 (Nasrin et al., 2009). Phosphorylierung von SIRT1 an S47 durch JNK2 erhöht die SIRT1 Proteinstabilität unabhängig von p53, während die Phosphorylierung an S27 durch JNK2 p53-abhängig erfolgt (Ford et al., 2008). Die antiapoptotische Wirkung von SIRT1 nach Etoposidbehandlung bezüglich der Deacetylierung von p53 wird durch DYRK1A- und DYRK3-vermittelte Phosphorylierung an T522 verstärkt (Guo et al., 2010).

Posttranslationale Modifikation von SIRT1 durch Phosphorylierung steigert zum einen die Proteinstabilität, und moduliert zum anderen die enzymatische SIRT1 Deacetylaseaktivität.

1.4.1.3 Regulation von SIRT1 durch SUMOylierung

Neben der SIRT1 Regulation durch Phosphorylierung wurde eine regulatorische SUMO-Modifikation von SIRT1 beschrieben. SUMOylierung von SIRT1 an Lysin (K) 734 ruft unter normalen Bedingungen eine gesteigerte Deacetylaseaktivität hervor. Nach genotoxischem Stress, wie UV-Strahlung oder oxidativem Stress, wird die SUMO-Modifikation durch die

"Sentrin-specific protease" 1 (SEN1) abgespalten und SIRT1 verbleibt in einem weniger aktiven Zustand, was die proapoptotische Zellantwort fördert (Yang et al., 2007).

SUMOylierung konkurriert mit Ubiquitylierung und Acetylierung, wie unter 1.3 am Beispiel von MDM2 beschrieben wurde. Proteinphosphorylierung auf der anderen Seite kann SUMOylierung sowohl begünstigen als auch negativ beeinflussen. Phosphorylierung des Motifs ψ KxExxSP begünstigt die SUMO-Modifikation, während Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten SUMOylierung verhindert, was eine seltene, reverse Phospho-SUMO-Schaltung darstellt. Es gibt nur wenige Berichte über reverse Phospho-SUMO-Schaltung, wie zum Beispiel für NF κ B (Desterro et al., 1998; Bossis und Melchior, 2006). Derzeit ist nicht bekannt, ob die SIRT1 SUMOylierung in Abhängigkeit einer solchen Phosphomodifikation erfolgt.

1.4.1.4 Modulation der SIRT1 Deacetylasefunktion

Weiterhin kann die SIRT1 Aktivität durch die Bindung von Modulatoren reguliert werden.

Ein solcher intrinsischer Inhibitor der SIRT1 Aktivität ist "Deleted in breast cancer 1" (DBC1). DBC1 bindet das aktive Zentrum von SIRT1, die SIR Domäne (vergleiche Abbildung 3), und reduziert somit dessen Deacetylaseaktivität. Nach DNA-Schadensinduktion durch Etoposid und oxidativen Stress wird DBC1 ATM-abhängig an T454 phosphoryliert, worauf DBC1 an SIRT1 bindet und somit p53- und FOXO3-abhängige Apoptose einleitet (Kim et al., 2008; Zhao et al., 2008; Yuan et al., 2012). DBC1 konkurriert kompetitiv mit der "Essential for SIRT1 activity" (ESA) Domäne von SIRT1, die sich im C-terminalen Bereich (Aminosäuren (As) 631-655, siehe Abbildung 3) befindet. Die ESA Domäne ist in der Lage durch eine Konformationsänderung intramolekular an die SIR Domäne zu binden, wodurch die enzymatische Aktivität von SIRT1 gesteigert wird (Kang et al., 2011). Ein weiterer Bericht beschreibt, dass beide N- und C-terminalen Bereiche, ausgehend von der SIR Domäne, die SIRT1 Deacetylaseaktivität steigern (Pan et al., 2012).

Als zellulärer Aktivator von SIRT1 fungiert "Ribosomal protein S19-binding protein 1" (S19BP1), oder auch "Active regulator of SIRT1" (AROS) genannt. AROS ist ein nukleoläres Protein, das an das "Ribosomale Protein S19" (RSP19) bindet (Maeda et al., 2006). Weiterhin ist bekannt, dass AROS mit dem N-terminalen Bereich von SIRT1 interagiert (vergleiche Abbildung 3) und dadurch die Deacetylaseaktivität von SIRT1 verstärkt. Nach Etoposidbehandlung ist eine verstärkte p53-Deacetylierung durch Bindung von AROS an SIRT1 zu beobachten, wodurch p53-vermittelte Apoptose verhindert wird (Kim et al., 2007).

1.4.2 Die Rolle von SIRT1 in metabolischen Kontext

Für *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass Kalorienrestriktion (KR) SIRT1-abhängig die Lebensspanne verlängern kann (Anderson et al., 2003; Kaeberlein et al., 2004). Durch

Wirkstoffe, wie Resveratrol, konnten die Effekte einer verringerten Kalorienzufuhr vorgetäuscht werden. Resveratrol wirkt aktivierend auf Sir2, was zur Verlängerung des Lebenszyklus in Hefen führt (Howitz et al., 2003). In neusten Untersuchungen zur Lebensverlängerung bei Rhesusaffen konnte die positive Wirkung der KR nicht beobachtet werden, wohl aber konnte im Vergleich zu einer weiteren Studie gezeigt werden, dass die Qualität der Nahrung sowie der genetische Hintergrund eine essentielle Rolle in der Regulation des Lebenszyklusses von Primaten spielen (Colman et al., 2009; Mattison et al., 2012). In Nagetieren hingegen konnten die benefizellen Wirkungen der KR nachgewiesen werden. *Sirt1*-transgene und Resveratrol behandelte Mäuse weisen einen Phänotyp ähnlich der KR auf, der hauptsächlich auf einer gesteigerten Aktivität von AMPK und "Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator" 1 α (PGC-1 α) beruht (Bordone et al., 2007; Baur et al., 2006; Pfluger et al., 2008).

AMPK Aktivierung kann entweder über Proteinkinase A (PKA) durch Phosphorylierung an S434 (Gerhart-Hines et al., 2011) oder über Calciumionenfreisetzung (Ca^{2+}) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum erfolgen. Beide Wege werden über zyklisches AMP (cAMP) moduliert.

Die Ca^{2+} -abhängige AMPK-Aktivierung kann durch Resveratrol stimuliert werden, da es sich um einen Phosphodiesterase 4 (PDE4)-Hemmer handelt und somit cAMP nicht zu AMP umgewandelt werden kann (Park et al., 2012). AMPK-Aktivität erhöht den zellulären NAD^+ -Spiegel und aktiviert somit SIRT1 (Canto et al., 2009). In *Ampk*^{-/-} Mäusen konnte der beschriebene Effekt von Resveratrol nicht beobachtet werden (Um et al., 2010).

Die beobachtete Wirkung von Resveratrol, oder auch der PKA-abhängigen SIRT1 Aktivierung, beruht auf einer gesteigerten mitochondrialen Funktion. Dies wird durch Deacetylierung multipler Lysine von PGC-1 α durch SIRT1 eingeleitet. Daraufhin initiiert PGC-1 α die Transkription mitochondrialer Proteine, die unter anderem den Fettstoffwechsel, die Thermogenese sowie die Sauerstoffbilanz steigern und die Glucosetoleranz erhöhen (Lagouge et al., 2006; Rodgers et al., 2005; Price et al., 2012; Banks et al., 2008; Hallows et al., 2006).

1.4.3 SIRT1 ist an der DNA-Reparatur beteiligt

SIRT1 vermittelt nicht nur die Heterochromatinbildung sondern ist auch an verschiedenen Mechanismen der DNA-Reparatur beteiligt (Uhl et al., 2010).

SIRT1 wird schadensabhängig zu Läsionen an der DNA rekrutiert. Allerdings wird kontrovers diskutiert, inwiefern SIRT1 das Genom intakt hält, da SIRT1 dies durch Steigerung der Mutationsrate unterbindet. Weiterhin begünstigt SIRT1 durch Induktion von Hypermethylierung die Stilllegung von Promotorregionen, woraus ein verändertes

Genexpressionsmuster resultiert (Oberdoerffer, Michan et al. (2008); Wang, Yuan et al. (2012); Pruitt et al., 2006; O'Hagan et al., 2008).

Im Hinblick auf die DNA-Schadensantwort reduziert SIRT1 die Acetyltransferaseaktivität von Tip60 durch dessen Deacetylierung. Damit kann SIRT1 die Einleitung der DNA-Schadensantwort und der HR unterdrücken (Yamagata und Kitabayashi, 2009).

Nach DNA-Schadensinduktion durch alkylierenden und oxidativen Stress wird SIRT1 wiederum ATM- und γ -H2AX-abhängig an die Reparaturfoci der geschädigten DNA rekrutiert. Dort deacetyliert es die regulatorische Untereinheit NBS1 des DNA-Schadenssensor-Komplexes MRN. Die Deacetylierung ist die Voraussetzung für die Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung von NBS durch ATM. Dadurch kann eine effiziente HR eingeleitet werden (Yuan et al., 2007; Oberdoerffer et al., 2008).

In *Sirt1*^{-/-} und heterozygoten Mäusen ist dies aufgrund einer reduzierten Anzahl von DNA-Schadensreparaturfoci nicht mehr gewährleistet. Des Weiteren wurden im *Sirt1*^{-/-} Mausmodell schlecht kondensierte, verkürzte und aberante Chromosomen gefunden, was mit einem veränderten Muster an Histonmodifikationen einhergeht. Dies steht in Zusammenhang damit, dass SIRT1 sowohl in die Telomerreparatur als auch in die globale HR, die Centrosomen und die Chromosomenarme repariert, involviert ist (Wang et al., 2008). In der Rad51-unabhängigen HR, dem "Single-strand annealing (SSA) DSB repair pathway", steigert SIRT1 durch Deacetylierung die Aktivität der "Werner helicase" (WRN) (Li et al., 2008; Palacios et al., 2010; Uhl et al., 2010).

Darüber hinaus ist SIRT1 am NHEJ Reparaturweg durch die Regulation des Faktors Ku70 beteiligt. Hypoacetylierung von nukleärem Ku70 steigert dessen DNA-Reparatureffizienz. Ku70 lokalisiert ebenfalls im Zytoplasma, wo Ku70 in deacetyliertem Zustand an BAX bindet und somit die BAX-vermittelte Apoptose verhindert (Sawada et al., 2003; Cohen et al., 2004; Cohen et al., 2004; Jeong et al., 2007; Tanno et al., 2007).

SIRT1 ist zusätzlich in Prozesse der Einzelstrangreparatur involviert. "Apurinic/apyrimidinic endonuclease-1" (APE-1), ein Enzym des Basenexzisions-Reparaturzweigs, das 5'-freie AP-Läsionen und 3'- α , β -ungesättigte Aldehyde aus dem DNA-Strang entfernt, wird von SIRT1 nach oxidativem und alkylierendem Stress an den Lysinen 6 und 7 deacetyliert. Dies verstärkt die Bindung von APE-1 an das Gerüstprotein "X-ray cross-complementing-1" (XRCC1) und steigert dadurch dessen Endonukleaseaktivität (Fortini und Dogliotti, 2007; Yamamori et al., 2010). Des Weiteren ist SIRT1 durch die Deacetylierung von "DNA repair protein complementing XP-A" (XPA) in die NER involviert. XPA ist ein unverzichtbarer Mediator, da er mit verschiedenen Effektoren interagiert und dazu beiträgt die Reparaturmaschinerie am Ort des Schadens zu plazieren. SIRT1 interagiert mit XPA und deacetyliert die Lysine 63 und 67 nach UV-Strahlung. Deacetyliertes XPA besitzt eine

höhere Affinität zu seinem Interaktionspartner "Replication protein A" 32 (RPA32) (Fan und Luo, 2010).

1.4.4 Die Kontroverse: Ist SIRT1 ein Tumorsuppressor oder -promotor?

In Brust- und Kolorektalkarzinomen sowie in p53-defizienten Tumoren, fungiert SIRT1 als Tumorpromotor. Dies beruht auf einer durch Verlust oder Inaktivierung transkriptioneller Repressoren gesteigerten SIRT1 Expression und einer verringerten p53-abhängigen Apoptoseinduktion. Dies erfolgt durch SIRT1-vermittelte Deacetylierung von p53 an Lysin 382 und der daraus folgenden verhinderten Expression proapoptotischer p53 Zielgene. Die Reduktion der p53 Aktivität führt unter anderem zu einer verringerten Expression des Tumorsuppressors p19^{ARF}, was die Tumorprogression veranlasst. Darüber hinaus vermittelt SIRT1 durch Deacetylierung des Lysins 397 die Lokalisation von p53 im Zytoplasma. Dadurch wird die proapoptotische Zellantwort durch SIRT1 weiterhin unterbunden (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001; Cheng et al., 2003; Chu et al., 2005; Saunders und Verdin, 2007; Han et al., 2008).

Patienten mit AML weisen eine erhöhte SIRT1 Expression auf. Dies kann darauf beruhen, dass bei AML durch Translokationen verschiedene Fusionsgene entstehen, wie unter anderem PML-PAR α (t15;17), die ein verändertes transaktivierendes Potential aufweisen. Bisher wurde bei AML Patienten die HDAC-vermittelte p53 Deacetylierung in nukleären Substrukturen aus PML-PAR α wildtyp PML gefunden. Da SIRT1 in gesunden Geweben mit p53 in PML-Kernkörpern lokalisiert, könnte SIRT1 auch in AML durch Assoziation mit PML-PAR α p53 deaktivieren und die Expression proapoptotischer Zielgene reprimieren (Lowenberg et al., 1999; Langley et al., 2002; Insinga et al., 2004; Bradbury et al., 2005; Campagna et al., 2011).

In Mammakarzinomen ist die Expression des SIRT1 Inhibitors DBC1 erniedrigt, was eine erhöhte SIRT1 Aktivität und verringerte p53-induzierte Apoptose zur Folge hat. Auf der anderen Seite ist die DBC1 Expression in machen Tumoren hochreguliert und dies korreliert mit der SIRT1 Expression. Der Verlust der Balance zwischen DBC1 und SIRT1 geht mit einer schlechten klinischen Prognose einher (Kim et al., 2008; Zhao et al., 2008; Kim et al., 2009; Hiraike et al., 2010; Sung et al., 2010).

Weiterhin begünstigt SIRT1 die Tumorpromotion durch Deacetylierung der "Endothelial nitric oxid synthase" (eNos). Dies erhöht die intrazelluläre Stickstoffmonoxid (NO) Konzentration und steigert die Vaskularisation. "Forkhead transcription factor" 1 (FOXO1) hemmt auf transkriptioneller Ebene die Gefäßentwicklung. Daher ist SIRT1 durch Inaktivierung von FOXO1 in die Angiogenese involviert (Furuyama et al., 2004; Potente et al., 2005; Yang et al., 2005; Mattagajasingh et al., 2007; Potente et al., 2007).

In Tumoren mit erhöhter SIRT1 Expression und Aktivität ist die Inhibition der Deacetylasefunktion von SIRT1 durch kleine Wirkstoffmoleküle ("small molecules"), wie Sirtinol, Cambinol und Molekülen von der Gruppe der "Tenovine" (z.B. Tenovin-6) vielversprechend. Dadurch kann in Tumoren mit vorliegendem wildtyp p53 dessen Aktivität und somit die Apoptoseinduktion gesteigert werden. Im Mausmodell konnte dieser Effekt durch Cambinol erfolgreich gezeigt werden (Heltweg et al., 2006; Lain et al., 2008).

In BRCA1-assoziierten Brusttumoren fungiert SIRT1 hingegen als Tumorsuppressor. BRCA1 bindet an den SIRT1 Promotor und induziert die SIRT1 Expression. SIRT1 wiederum vermittelt durch Histon H3 Deacetylierung Herterochromatinbildung am Survivin Promotor. Dies führt zur SIRT1-abhängig Survivin Repression, wodurch es zur Apoptoseinduktion kommt. (Wang et al., 2008).

Auch in Kolorektalkarzinome wirkt SIRT1 tumorsuppressiv. In über 90% der Fälle liegt die konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalwegs, der über den transkriptionellen Ko-Aktivator β -Catenin Zellwachstum und Karzinogenese induziert (Logan und Nusse, 2004). SIRT1-vermittelte Deacetylierung von β -Catenin verhindert dessen Translokation in den Zellkern und somit die Expression der Zielgene (Firestein et al., 2008).

Des Weiteren induziert SIRT1 Aktivierung durch Deacetylierung des Transkriptionsfaktors NF κ B TNF- α -induzierten Apoptose (Yeung et al., 2004 und vergleiche 1.1.2). Bei diesen Tumoren, in denen SIRT1 Aktivität eine tumorsuppressive Wirkung hat, ist eine Behandlung mit Resveratrol indiziert, wodurch verbleibendens SIRT1 aktiviert wird.

SIRT1 kann somit sowohl als Tumorsuppressor als auch als Tumorpromotor fungieren und durch die geeignete Stimulation der Deacetylaseaktivität kann die SIRT1 Modulation durch entsprechende Wirkstoffe unterstützend zur Chemotherapie eingesetzt werden (Saunders und Verdin, 2007).

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Initiation und der reibungslose Ablauf der DNA-Schadensantwort ist ein essentielles Ereignis für die Homöostase von Zellen. Eine Fehlregulation innerhalb dieser Signalkaskade stellt eine der Hauptursachen von Tumorerkrankungen dar. Daher ist es von großem Interesse, die involvierten Faktoren und die zugrundeliegenden Mechanismen genauer zu charakterisieren und zu verstehen.

Vor diesem Hintergrund ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Funktion der proapoptischen Serin/Threonin-Kinase HIPK2 in Bezug auf die Regulation der Histondeacetylase SIRT1 zu untersuchen.

HIPK2 spielt eine wichtige Rolle in der p53-induzierten Apoptoseregulation. In ungestressten Zellen bildet die E3-Ubiquitin-Ligase Siah-1 einen Komplex mit HIPK2 und führt HIPK2 der proteasomalen Degradation zu. In Folge von DNA-Schaden wird Siah-1 von ATM an S19 phosphoryliert, worauf sich der Komplex auflöst und HIPK2 stabilisiert wird. Durch Phosphorylierung an S46 aktiviert HIPK2 das Zielprotein p53. Es wurde beschrieben, dass HIPK2 nach DNA-Schädigung über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Acetylierung von p53 an K382 steigern kann. Dadurch wird die Einleitung von Apoptose gefördert.

Die Klasse III Histondeacetylase SIRT1 hat Schlüsselfunktionen in der Regulation des Metabolismus, der Zellalterung sowie Apoptose. Letzteres scheint zum Teil durch die Deacetylierung von p53 an K382 und der dadurch erniedrigten Transkription proapoptischer Zielgene vermittelt zu sein.

Es wurde bereits beschrieben, dass die Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 27 und 47 und T530 zum einen zur Stabilisierung des Proteins führt und zum anderen dessen enzymatische Deacetylaseaktivität moduliert. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass SIRT1 *in vitro* von HIPK2 an S27 und S682 phosphoryliert wird.

Ziel dieser Arbeit war es den molekularen Mechanismus der Apoptoseinduktion durch HIPK2 zu entschlüsseln, und zu untersuchen, ob die SIRT1 Aktivität durch HIPK2 moduliert wird. Dies ist naheliegend, da beide Proteine den Zielrest K382 von p53 modifizieren, was zu gegensätzlichen zellulären Ereignissen führt.

3 Ergebnisse

SIRT1 und HIPK2 teilen sich gemeinsame Zielproteine, wie beispielsweise den Tumorsuppressor p53 (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass SIRT1 und HIPK2 sowie p53 in PML-Kernkörpern lokalisieren und dort posttranslational modifiziert werden. Durch diese Modifikationen kann HIPK2 p53-abhängige Apoptose einleiten. SIRT1 wiederum steuert der proapoptotischen Wirkung von HIPK2 durch Deacetylierung von p53 entgegen (Hofmann et al., 2002; Langley et al., 2002; Möller et al., 2003; Campagna et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde die Fragestellung untersucht, inwiefern HIPK2 durch Phosphorylierung von SIRT1 dessen Aktivität moduliert und welche Auswirkungen dies auf die proapoptotische Antwort der Zelle hat.

3.1 SIRT1 ist Signalempfänger von HIPK2

Es konnte gezeigt werden, dass SIRT1 an den Resten der Aminosäuren Serin (S) 27 (S27) und Serin 682 (S682) von HIPK2 phosphoryliert wird. Diese Daten wurden Labor intern anhand von *in vitro* Kinasereaktionen erhoben. Mit Hilfe von GST-SIRT1 Deletionsmutanten konnte die Phosphorylierung von SIRT1 durch HIPK2 an S27 (GST-SIRT1 Aminosäuren (As) 1-47) und anhand von murinem His-SIRT1 diejenige an S682 gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Erkenntnisse bildeten den Ausgangspunkt meiner Untersuchungen.

3.1.1 SIRT1 wird von HIPK2 *in vitro* phosphoryliert

In der vorliegenden Arbeit konnte die Phosphorylierung von SIRT1 durch HIPK2 bestätigt werden. Um zu zeigen, dass es sich um eine direkte Phosphorylierung handelt, wurde eine *in vitro* Kinasereaktion durchgeführt. Dazu wurden rekombinantes humanes GST-SIRT1, GST-p53 und GST sowie His-HIPK2 und die kinase-defiziente His-HIPK2 K221A Mutante aus *E. coli* BL21 pLysS gereinigt und für die Kinasereaktion eingesetzt.

Durch die Kinasereaktion wird radioaktivmarkiertes Phosphat (^{32}P) in Zielproteine inkorporiert und das resultierende Signal gibt Aufschluss über die Effizienz der Kinaseaktivität von His-HIPK2 bezüglich des eingesetzten Substrates.

GST-SIRT1 wird durch wildtyp His-HIPK2 phosphoryliert (Abbildung 4 a, Spur 1 des Autoradiogramms), wohingegen die kinase-defiziente Mutante His-HIPK2 K221A, als Negativkontrolle, es erwartungsgemäß nicht vermag, GST-SIRT1 zu phosphorylieren (Abbildung 4 a, Spur 2). Als Positivkontrolle wurde GST-p53, ein bekanntes Zielprotein von HIPK2 genutzt. Wildtyp His-HIPK2 phosphoryliert GST-p53, während die His-HIPK2 K221A Mutante keine Anreicherung von radioaktivem Phosphat in GST-p53 bewirkt (Abbildung 4 b, Spur 3 und 4).

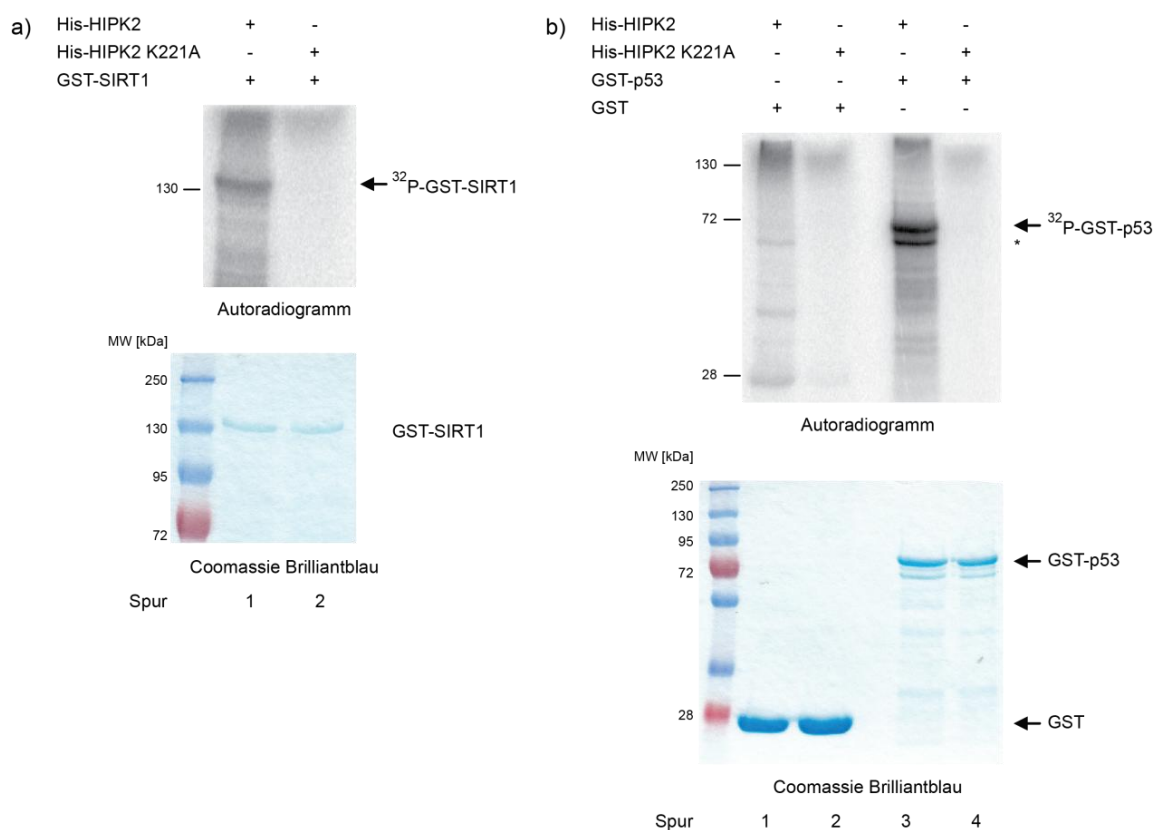


Abbildung 4: HIPK2 phosphoryliert SIRT1 *in vitro*.

In vitro Kinasereaktion: His- und GST-Proteine wurden aus *E. coli* BL21 pLysS gereinigt und vom Sepharose-Substrat eluiert. Als Ladungskontrolle diente die Coomassie Brilliantblau Färbung des SDS-Gels. * = unspezifisches Signal a) Kontrollen zur Kinasereaktion: Als Negativkontrolle wurde GST eingesetzt, welches weder von His-HIPK2 noch von His-HIPK2 K221A phosphoryliert wird. Die Positivkontrolle GST-p53 wird von His-HIPK2 aber nicht von der kinase-defizienten His-HIPK2 K221A phosphoryliert. b) GST-SIRT1 wird *in vitro* von His-HIPK2 phosphoryliert, nicht aber von der kinase-defizienten His-HIPK2 K221A.

Eine weitere Negativkontrolle in diesem Versuch ist GST. Da in Abbildung 4 b in Spur 1 und 2 keine Signale zu sehen sind, kann ausgeschlossen werden, dass GST phosphoryliert wird. Die eingesetzten Proteinmengen wurden anhand der Coomassie Brilliantblau Färbung des SDS-Gels überprüft.

Dieses Ergebnis zeigt, dass GST-SIRT1 *in vitro* direkt durch His-HIPK2 phosphoryliert wird.

3.1.2 SIRT1 wird an Serin 27 und Serin 682 von HIPK2 *in vitro* phosphoryliert

Um die Erkenntnisse bezüglich der SIRT1 Phosphorylierung an S27 und S682 durch HIPK2 zu validieren, wurden für die folgende Kinasereaktion GST-SIRT1 Mutanten eingesetzt, deren Serine (S) zu Alanin (A) mutiert wurden. Aufgrund der Mutation ist eine Phosphorylierung an dieser Stelle im Protein nicht mehr möglich, da Alanin eine gegenüber Phosphorylierung inerte Aminosäure ist. Die hier eingesetzten, rekombinant gewonnenen GST-SIRT1 Mutanten tragen Mutationen an S27→A (S27A), S682→A (S682A) und S27,

S682→2xA (S27A,S682A). Des Weiteren wurde eine trunkierte HIPK2-Mutante, GST-HIPK2 1-553, eingesetzt, um die Phosphorylierung von GST-SIRT1 besser detektieren zu können. His-HIPK2 migriert wie GST-SIRT1 auf der Höhe von 130 kDa. GST-HIPK2 1-553 enthält die Aminosäuren 1-553 und ist somit kleiner als das wildtyp Protein und in der Gelelektrophorese auf einer Höhe von 95 kDa zu beobachten. Das SIRT1-Phosphosignal (^{32}P -GST-SIRT1) wird somit nicht durch das Autophosphorylierungssignal, ^{32}P -GST-HIPK2 1-553, beeinträchtigt. Abbildung 5 a veranschaulicht anhand einer schematischen Darstellung der Proteine die Phosphorylierungsstellen S27 und S682 von SIRT1 sowie die HIPK2 Trunktionsmutante GST-HIPK2 1-553.

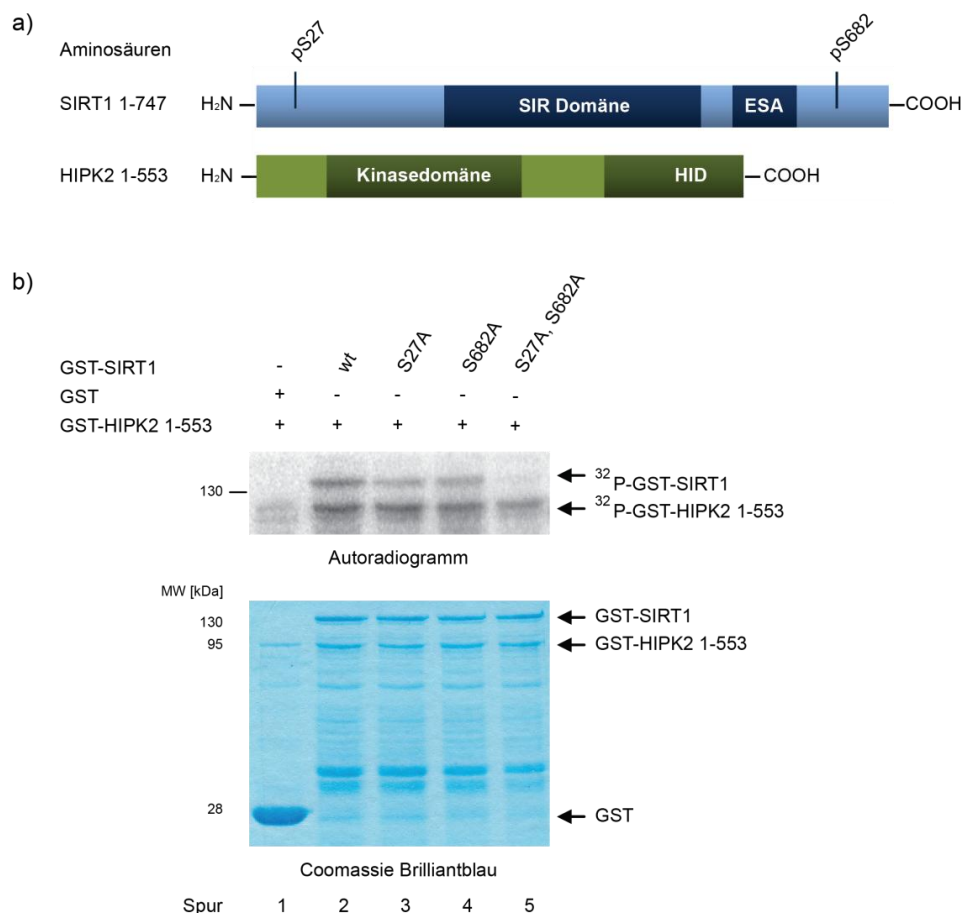


Abbildung 5: HIPK2 phosphoryliert SIRT1 *in vitro* an den Serinen 27 und 682.

a) Ein schematischer Überblick über GST-SIRT1 und GST-HIPK2 1-553. In GST-SIRT1 sind die Serine hervorgehoben, an welchen GST-SIRT1 durch GST-HIPK21-153 *in vitro* phosphoryliert wird. b) *In vitro* Kinasereaktion: Die verwendeten rekombinanten GST-Proteine wurden aus *E. coli* BL21 pLysS gereinigt und GST-SIRT1 Proteine vom Sepharose-Substrat eluiert. Die Kartierung der SIRT1 Phosphorylierung erfolgte im Kontext des Proteins in voller Länge. Die Negativkontrolle GST wird von GST-HIPK2 1-553 nicht phosphoryliert. Als Ladungskontrolle diente die Coomassie Brilliantblau Färbung des SDS-Gels.

Wie in Abbildung 5 b im Autoradiogramm zu sehen ist, wird GST-SIRT1 von GST-HIPK2 1-553 phosphoryliert, wohingegen das Signal des inkorporierten radioaktiven Phosphats (^{32}P)

in die GST-SIRT1 S27A und GST-SIRT1 S682A Punktmutanten geringer ist. Die Doppelmutante, GST-SIRT1 S27A, S682A, weist keine Inkorporation von ^{32}P -Phosphat auf. Als Negativkontrolle diente GST und als Ladungskontrolle die Coomassie Brilliantblau Färbung des SDS-Gels.

Dies bestätigt die Labor internen Ergebnisse und zeigt, dass SIRT1 auch als vollständiges Protein an den Serinen 27 und 682 *in vitro* von HIPK2 phosphoryliert wird.

3.1.3 Validierung der phospho-spezifischen Antikörper gegen SIRT1

Gegen die identifizierte Phosphorylierungsstelle S27 in SIRT1 (SIRT1 pS27) ist ein kommerzieller Antikörper (anti-SIRT1 pS27) erhältlich. Ein spezifischer Antikörper gegen das phosphorylierte Serin 682 (pS682) von SIRT1 wurde durch die Firma Pineda Antikörper-Service (siehe Tabelle 22) produziert. Für die Antikörperproduktion wurden zwei Kaninchen erfolgreich immunisiert und die Antikörperspezifität zunächst *in vitro* getestet.

Dazu wurde rekombinantes GST-SIRT1 aus *E. coli* BL21 pLysS gereinigt und eine Kinasereaktion mit rekombinant gereinigter His-HIPK2 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde GST-SIRT1 alleine eingesetzt.

Wie Abbildung 6 a zeigt, konnten phosphospezifische Antikörper gegen SIRT1 hergestellt werden. In der ersten Spur, in welcher die Negativkontrolle aufgetragen wurden, wurde kein Signal für phosphoryliertes SIRT1 detektiert. Die Inkubation von GST-SIRT1 mit kinaseaktiver His-HIPK2 hingegen resultiert in einem detektierbaren Signal für phosphoryliertes SIRT1 pS682. Abbildung 6 a repräsentiert exemplarisch das Signal der Immundetektion durch den Antikörper von Kaninchen 1 (T1). Die Immunreaktion des Antikörpers aus Kaninchen 3 (T3) weist ein identisches Ergebnis auf (Daten nicht gezeigt). Demnach ist der Antikörper gegen SIRT1 pS682 für *in vitro* Anwendungen phospho-spezifisch. In den folgenden Experimenten wurde der Antikörper anti-SIRT1 pS682 T1 hinsichtlich der Proteindetektion und Spezifität getestet und danach für die weiteren Fragestellungen eingesetzt.

Weiterhin wurde die Spezifität beider phospho-spezifischer Antikörper, anti-SIRT1 pS27 und anti-SIRT1 pS682, in Bezug auf ektopisch exprimiertes Flag-SIRT1 und Flag-SIRT1 Punktmutanten getestet. Diese sollten in Überexpressionsexperimenten genutzt werden.

Hierfür wurden Flag-SIRT1 Expressionsplasmide, wie in Abbildung 6 b gezeigt, in HEK293T Zellen exprimiert. Beide phospho-spezifischen Antikörper, anti-SIRT1 pS27 und anti-SIRT1 pS682 T1, erkennen die entsprechenden SIRT1 S27A- sowie S682A- Punktmutanten nicht. Dies ist ein Zeichen für die Spezifität der Antikörper, was ihre Anwendung in Überexpressionsexperimenten ermöglicht.

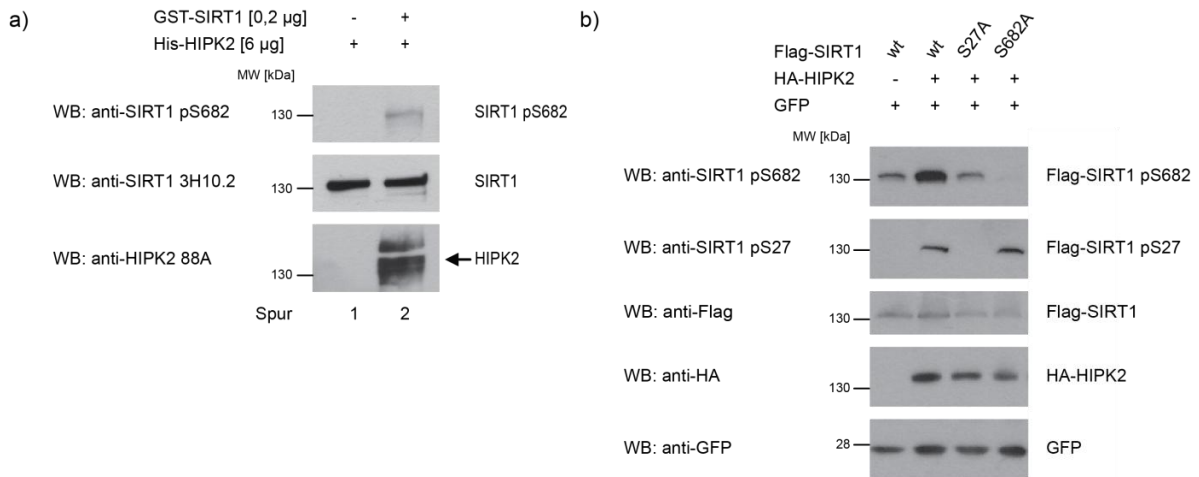


Abbildung 6: Validierung des phospho-spezifischen Antikörpers anti-SIRT1 pS682 *in vitro*.

a) *In vitro* Kinasereaktion: His- und GST-Proteine wurden aus *E. coli* BL21 pLysS gereinigt und vom Sepharose-Substrat eluiert. Für die Kinasereaktion wurden je 0,2 µg GST-SIRT1 und 6 µg His-HIPK2 eingesetzt und mittels Immundetektion analysiert. Anti-SIRT1 pS682 ist ein polyklonaler Antikörper, isoliert aus Kaninchen. T1: Kaninchen 1. b) Validierung der phospho-spezifischen Antikörper anti-SIRT1 pS27 (kommerziell) und pS682 bezüglich ihrer Spezifität zu Flag-SIRT1 und den phospho-defizienten Flag-SIRT1 Punktmutanten (je 0,25 µg) nach Expression zusammen mit HA-HIPK2 (12 µg) in HEK293T Zellen. Je 10% des Gesamtlysats wurden mittels Immunreaktion analysiert. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde GFP (0,2 µg) herangezogen.

Im Folgenden wurde die Phosphorylierung von SIRT1 durch HIPK2 an Serin 27 und Serin 682 durch Überexpression der Proteine im Zellkontext validiert. Hierfür wurden die phospho-spezifischen Antikörper anti-SIRT1 pS27 bzw. pS682 genutzt.

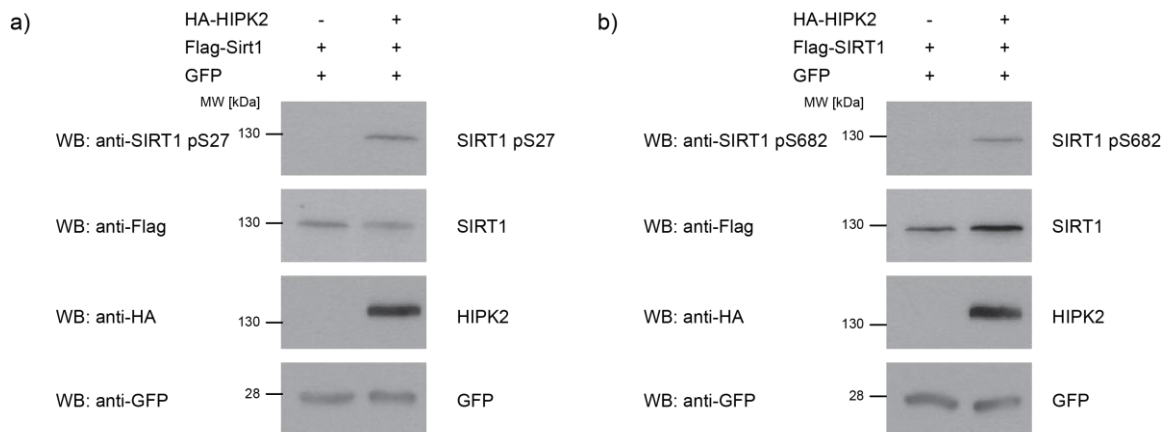


Abbildung 7: SIRT1 wird von HIPK2 phosphoryliert.

Transiente Expression von Flag-SIRT1 (0,25 µg) und HA-HIPK2 (12 µg) in HEK293T Zellen. Es wurden 10% des Lysats per Immundetektion analysiert. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz diente GFP (0,2 µg). In Anwesenheit von HA-HIPK2 wird Flag-SIRT1 an Serin 27 (a) und an Serin 682 (b) phosphoryliert. Dies erfolgt nicht in Abwesenheit von HA-HIPK2.

Flag-SIRT1 wurde alleine und zusammen mit HA-HIPK2 in HEK293T Zellen exprimiert und die SIRT1 Phosphorylierung per Immundetektion analysiert.

In Abbildung 7 a und 7 b, jeweils in der zweiten Spur, ist ein Signal nach Detektion mit den phospho-spezifischen Antikörpern zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass Flag-SIRT1 in Anwesenheit von HA-HIPK2 sowohl an Serin 27 (Abbildung 7 a) als auch an Serin 682 (Abbildung 7 b) phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung erfolgt nicht in Abwesenheit von HA-HIPK2. Zur Expressionskontrolle wurde ein GFP-Plasmid ko-transfiziert.

Des Weiteren wurde untersucht, ob der phosphospezifische SIRT1 pS682 Antikörper für endogene Anwendungen verwendbar ist. SIRT1 wurde in U2OS Zellen mittels lentiviraler Transduktion von SIRT1 spezifischer shRNA (shSIRT1) depletiert. Zur Kontrolle wurden U2OS Zellen mit einer gegen Luciferase gerichteten shRNA (shLuci) transduziert. Die "knock down"-Effizienz wurde anhand der Reduktion der SIRT1 Proteinmengen durch shSIRT1 im Vergleich zu shLuci transduzierten U2OS Zellen per Immundetektion überprüft.

In Abbildung 8 ist zu sehen, dass sich das Signal des phospho-spezifischen anti-SIRT1 pS682 Antikörper entsprechend dem Signal verhält, welches durch den SIRT1-Antikörper detektiert wurde. Die Depletion von SIRT1 mit shSIRT1 in U2OS Zellen führt zu einem Signalverlust für SIRT1 pS682 T1, verglichen mit der shLuci Kontrolle. Daraus kann gefolgert werden, dass der Antikörper anti-SIRT1 pS682 auch für die endogene Proteindetektion geeignet ist.

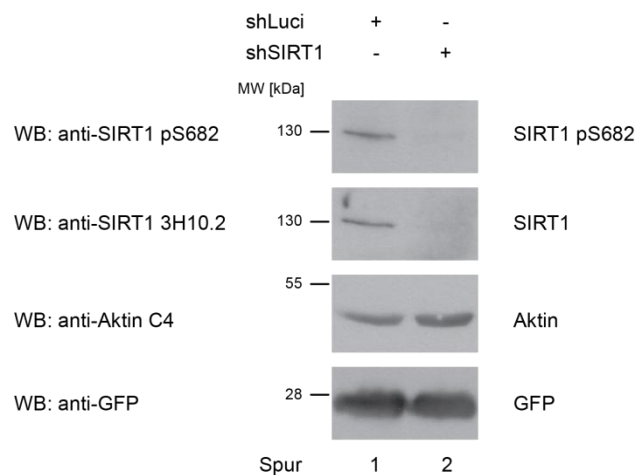


Abbildung 8: Validierung des phospho-spezifischen Antikörpers anti-SIRT1 pS682 *in vivo*.

Lentiviraler "knock-down" von SIRT1 in U2OS Zellen. 100 µg Gesamtzelllysate wurden mittels Immunreaktion analysiert. Aktin wurde als Ladungskontrolle genutzt und die GFP-Expression diente als Signal für die Effizienz der lentiviralen Transduktion.

3.2 Die Bindung von SIRT1 und HIPK2 wird durch DNA-Schaden verstärkt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass SIRT1 von HIPK2 *in vitro* sowie in Zellen an den Serinen 27 und 682 phosphoryliert wird, wurde der Fragestellung nachgegangen, ob und unter welchen Bedingungen SIRT1 an HIPK2 bindet. Weiterhin wurde nach den Proteinabschnitten gesucht, welche die Interaktion beider Proteine vermitteln.

3.2.1 Die Bindung von SIRT1 und HIPK2 wird durch Adriamycin moduliert

Im vorhergehenden Kapitel wurde beschrieben, dass SIRT1 durch HIPK2 *in vitro* und in Zellen phosphoryliert wird. Dies impliziert, dass beide Proteine miteinander interagieren. Die HIPK2 Kinaseaktivität kann durch DNA-schädigende Agenzien beeinflusst werden, da HIPK2 eine schadensinduzierte Kinase ist. Daher wurde die Bindung von SIRT1 an HIPK2 auch im Kontext von DNA-Schadensinduktion durch Adriamycin untersucht. Adriamycin ist ein Anthracyclin Antibiotikum, das die Topoisomerase II hemmt und somit DNA-Doppelstrangbrüche induziert.

Nach Expression von GFP-SIRT1 und Flag-HIPK2 (Abbildung 9 a) oder Flag-SIRT1 und GFP-HIPK2 (Abbildung 9 b) in HEK293T Zellen wurde die Hälfte der Proben mit Adriamycin behandelt. 24h nach der Behandlung wurden die Flag-Fusionsproteine mittels eines Substrat-gekoppelten Antikörpers (anti-Flag M2 Agarose) gegen das Flag-Epitop präzipitiert und die Ko-Präzipitation des jeweiligen GFP-Fusionsproteins per Immunreaktion analysiert.

Jeweils in Spur 2 von Abbildung 9 a und 9 b ist ein schwaches Signal in der Immundetektion für ko-präzipitiertes GFP-SIRT1, bzw. GFP-HIPK2 erkennbar. Die Bindung von SIRT1 an HIPK2 in ungestressten Zellen ist schwach, was jedoch für eine Kinase-Substrat Interaktion nicht untypisch ist. Nach Applikation von Adriamycin hingegen wird die Interaktion verstärkt, was durch die Zunahme der Signalintensität für GFP-SIRT1, bzw. GFP-HIPK2 (Abbildung 9 a und 9 b, jeweils in Spur 4) ersichtlich ist. Die Zunahme des Signals für ko-präzipitiertes GFP-SIRT1, bzw. GFP-HIPK2 wurde densitometrisch bestimmt und durch Adriamycinbehandlung eine jeweils 4-fach gesteigerte Bindung von SIRT1 an HIPK2 ermittelt ($\frac{[\text{GFP-Protein, ko-präzipitiert}]}{[\text{Flag-Protein, präzipitiert}]}$).

Zur Kontrolle wurden 10% des Gesamtzelllysats in der Immunreaktion analysiert. Als Negativkontrolle diente die Überprüfung der Bindung von GFP-SIRT1 bzw. GFP-HIPK2 an das Substrat (anti-Flag M2 Agarose). Da in den Spuren 1 und 3 der Abbildungen 9 a und 9 b keine Signale für GFP-SIRT1, bzw. GFP-HIPK2 erkennbar sind, binden SIRT1 und HIPK2 jeweils spezifisch aneinander.

Nach ektopischer Expression von SIRT1 und HIPK2 konnte eine durch Applikation von Adriamycin gesteigerte Bindung beider Proteine festgestellt werden.

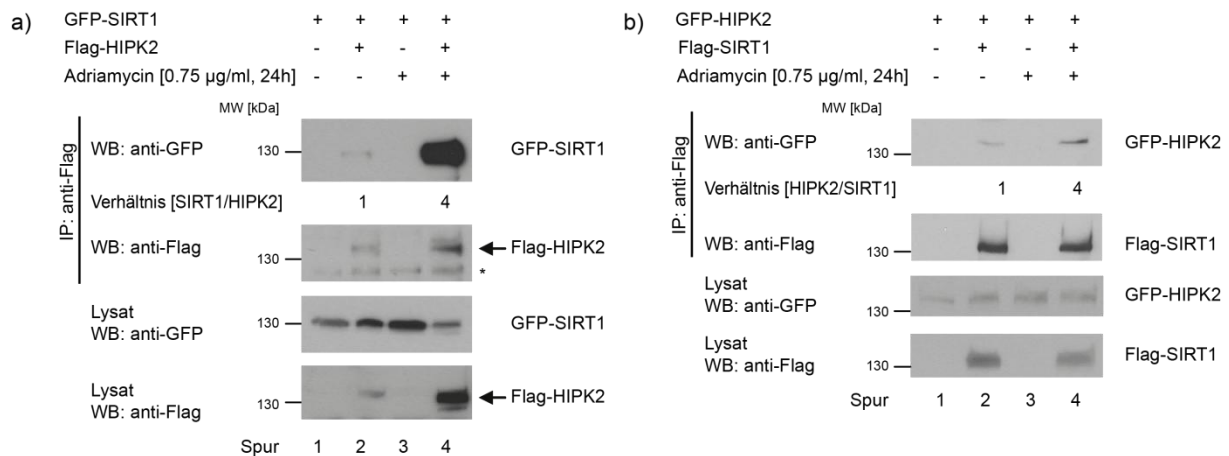


Abbildung 9: Die Bindung zwischen SIRT1 und HIPK2 wird durch DNA-Schaden verstärkt.

Ko-Immunopräzipitationsexperiment in HEK293T Zellen. Die densitometrische Quantifizierung der ko-präzipitierten Proteinmengen erfolgte mittels ImageJ Software. Als Ladungskontrolle wurden 10% des Zelllysats analysiert und für die Spezifität diente als Kontrolle jeweils die Inkubation des GFP-Proteins an anti-Flag M2 Agarose. * = unspezifisches Signal. a) GFP-SIRT1 (0,25 µg) wurde alleine oder mit Flag-HIPK2 (10 µg) exprimiert und die Hälfte der Proben mit Adriamycin (0,75 µg/ml, 24h) behandelt. Flag-HIPK2 wurde mittels anti-Flag M2 Agarose präzipitiert und ko-präzipitiertes GFP-SIRT1 in der Immunreaktion analysiert. b) Flag-SIRT1 (0,25 µg) und GFP-HIPK2 (12 µg) wurden ohne und nach Applikation von Adriamycin (0,75 µg/ml, 24h) mittels anti-Flag M2 Agarose präzipitiert und die Ko-Präzipitation von GFP-HIPK2 durch Immundetektion ermittelt.

Im nächsten Schritt wurde die endogene Interaktion von SIRT1 und HIPK2 nach DNA-Schadensinduktion untersucht. Hierzu wurden U2OS Zellen mit Adriamycin behandelt und einer Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen HIPK2 (anti-HIPK2 C1 und C3, 1:1) unterzogen. Die Ko-Präzipitation von SIRT1 wurde anschließend in der Immundetektion analysiert.

Ohne Applikation von DNA-Schaden konnte SIRT1 nur schwach mit HIPK2 ko-präzipitiert werden (Abbildung 10, Spur 3). Nach Applikation von Adriamycin wurde eine bessere Bindung von SIRT1 an HIPK2 durch eine erhöhte Signalintensität des SIRT1 Antikörpers nachgewiesen (Abbildung 10, Spur 6). Als Kontrolle wurden 10% des Lysats per Immunreaktion untersucht und als Negativkontrolle diente ein polyklonaler anti-GFP Antikörper. Wie bereits nach ektopischer Expression beider Proteine beobachtet wurde, ist die Ko-Immunopräzipitation von endogenem SIRT1 mit HIPK2 ebenfalls durch DNA-Schaden moduliert.

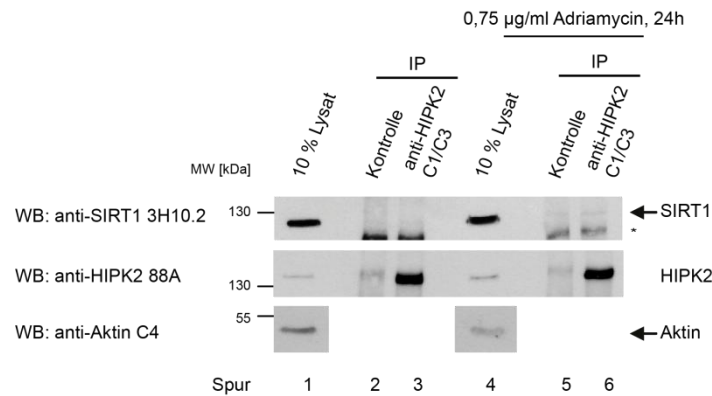


Abbildung 10: SIRT1 bindet HIPK2 nach DNA-Schaden.

Immunpräzipitation von endogener HIPK2 mit einem Antikörpergemisch aus anti-HIPK2 C1 und C3 (1:1) aus U2OS Zellen nach vorangegangener Adriamycinbehandlung (0,75 µg/ml, 24h). Als Kontrolle wurde ein GFP-Antikörper mit dem Zelllysat inkubiert. Als Ladungskontrollen wurden 10% des Gesamtlysats analysiert und Aktin geprüft. * = unspezifisches Signal.

3.2.2 Charakterisierung der Bindungsdomänen von SIRT1 und HIPK2

Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde, ist die Interaktion von SIRT1 und HIPK2 durch DNA-Schaden stimulierbar. Im Folgenden wurde ermittelt, ob es sich um eine direkte Bindung beider Proteine handelt und welche Bindungsdomänen die Interaktion vermitteln. Die Identifizierung der Bindungsdomänen kann Aufschluss darüber geben, ob posttranslationale Modifikationen oder Ko-Faktoren in die Interaktion involviert sind. Die Charakterisierung der Bindung erfolgte durch *in vitro*- und Überexpressionsstudien.

3.2.2.1 HIPK2 bindet an die SIR Domäne von SIRT1

Zunächst sollte geklärt werden, ob SIRT1 und HIPK2 direkt aneinander binden. Dazu wurde die Bindung von HIPK2 an SIRT1 *in vitro* validiert. Dies erfolgte durch ein *in vitro* Präzipitationsexperiment, wozu aus *E. coli* BL21 pLysS gereinigtes rekombinantes GST-SIRT1 und *in vitro* translatierte, durch Inkorporation von ³⁵S-Schwefel radioaktiv markierte Kinase-defiziente ³⁵S-Flag-HIPK2 K221A eingesetzt wurden.

³⁵S-Flag-HIPK2 K221A wurde mit GST-SIRT1 ko-präzipitiert, nicht aber durch die Negativkontrolle GST, wie das Autoradiogramm in Abbildung 11 a zeigt. Zur Kontrolle wurde 1% des eingesetzten *in vitro*-Translatats analysiert. Anhand dessen ist auszumachen, dass ca. 5% der zur Ko-Präzipitation eingesetzten ³⁵S-Flag-HIPK2 K221A an GST-SIRT1 binden. Die eingesetzten Mengen an GST-Protein wurden mittels Coomassie Brilliantblau Färbung des SDS-Gels geprüft (Abbildung 11a).

Nachdem eine direkte Bindung von HIPK2 an SIRT1 gezeigt werden konnte, wurde nach der bindungsvermittelnden Domäne in SIRT1 gesucht. Dazu wurden die rekombinanten GST-Proteine, GST-SIR Domäne sowie die Deletionsmutanten, GST-SIRT1 1-507 und GST-SIRT1 232-747, zusammen mit radioaktiv markierter ³⁵S-Flag-HIPK2 in einem *in vitro*

Präzipitationsexperiment eingesetzt. Die GST-SIRT1 Deletionsmutanten sind in Abbildung 11 c in einer schematischen Darstellung veranschaulicht.

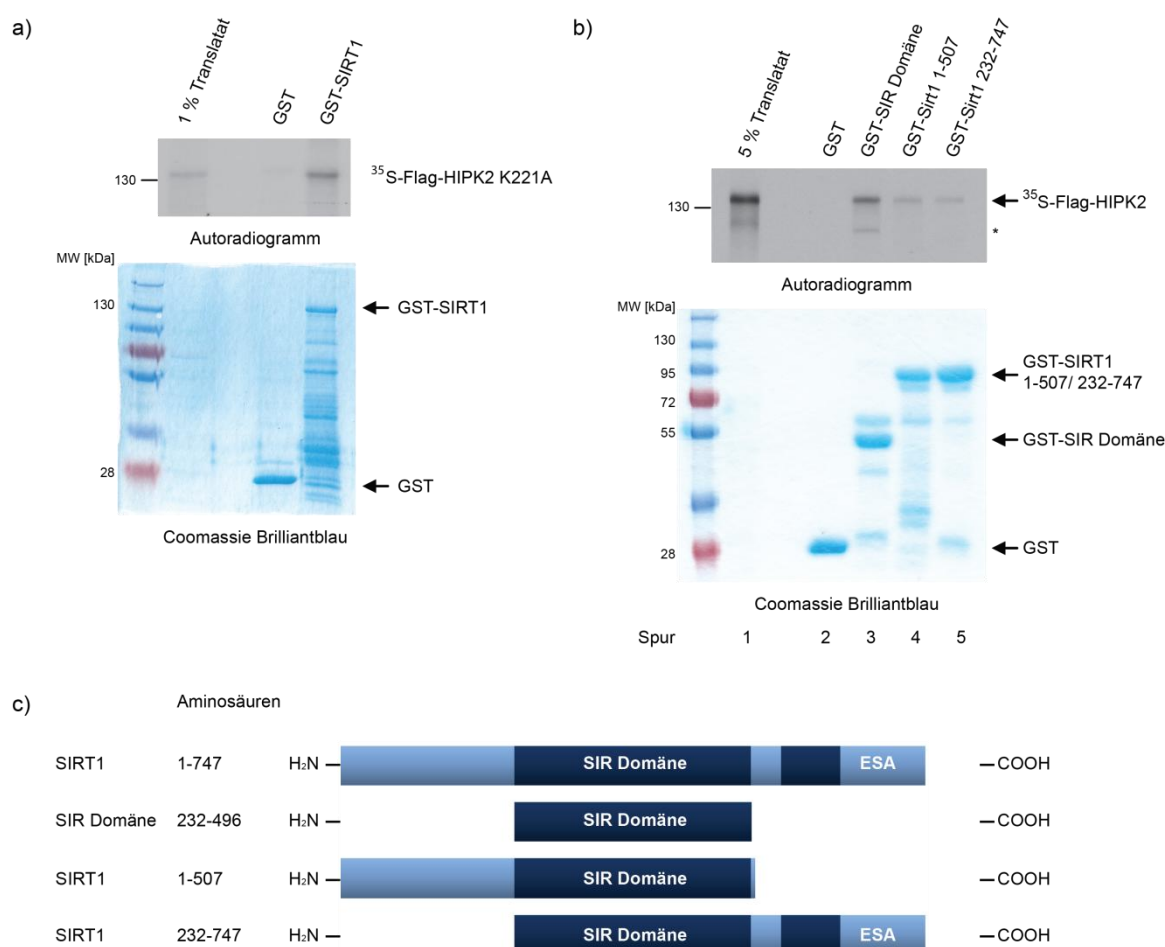


Abbildung 11: Charakterisierung der Bindung von HIPK2 an SIRT1 *in vitro*.

In vitro Präzipitationsversuche: GST-SIRT1 und GST-SIRT1 Trunkationen wurden aus *E.coli* BL21 pLysS gereinigt und mit *in vitro* translatierter, radioaktiv markierter ³⁵S-Flag-HIPK2 oder ³⁵S-Flag-HIPK2 K221A inkubiert. Als Ladungskontrolle diente die Coomassie Brilliantblau Färbung des SDS-Gels. * = unspezifisches Signal. a) Charakterisierung der Bindung von GST-SIRT1 und ³⁵S-Flag-HIPK2 K221A. GST wurde als Negativkontrolle herangezogen. Zur Kontrolle wurden 1% des eingesetzten Translatats analysiert. b) Charakterisierung der Domäne von SIRT1, welche die Bindung von ³⁵S-Flag-HIPK2 vermittelt. Es wurden GST-SIRT1 1-507 und GST-SIRT1 232-747, GST-SIR Domäne sowie GST, als Negativkontrolle, und 5% des eingesetzten Lysats untersucht. c) Schematische Veranschaulichung der GST-SIRT1 Deletionsmutanten.

Das Autoradiogramm in Abbildung 11 b zeigt ein stärkeres Signal für durch die GST-SIR Domäne ko-präzipitierte ³⁵S-Flag-HIPK2 verglichen mit den Signalen der Ko-Präzipitation von ³⁵S-Flag-HIPK2 durch GST-SIRT1 1-507 und GST-SIRT1 232-747. Es wurden 5% des *in vitro*-Translatats zur Kontrolle eingesetzt. Im Vergleich dazu binden etwa 3% des eingesetzten Translatats an die GST-SIR Domäne. Die Proteinmengen der eingesetzten GST-Proteine wurden mittels Coomassie Brilliantblau Färbung kontrolliert (Abbildung 11b).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die SIR Domäne die Bindung von HIPK2 an SIRT1 vermittelt, während die Anwesenheit des N- bzw. C-terminalen Bereichs von SIRT1 die Interaktion vermindert.

3.2.2.2 SIRT1 interagiert mit dem N-Terminus von HIPK2

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zwischen SIRT1 und HIPK2 wurden Experimente mit umgekehrten Rahmenbedingungen durchgeführt, um so die Bindung von SIRT1 an HIPK2 zu untersuchen.

Die Bindung von SIRT1 an HIPK2 wurde zum Teil in Zellen analysiert, da die gereinigte GST-HIPK2 sowie die Deletionsmutante GST-HIPK2 551-1191 nicht stabil sind. Daher wurden die Deletionsmutanten Flag-HIPK2 1-553 und Flag-HIPK2 551-1191 zusammen mit GFP-SIRT1 in HEK293T Zellen exprimiert und die Hälfte der Proben für 24h mit Adriamycin behandelt. Die Flag-Fusionsproteine wurden mittels Antikörper gegen das Flag-Epitop präzipitiert und die Ko-Präzipitation von GFP-SIRT1 in der Immunfärbung analysiert. In Spur 2 und 5 der Abbildung 12 a ist ein Signal für ko-präzipitiertes GFP-SIRT1 zu erkennen, welches nach Applikation von Adriamycin verstärkt wird. Um eine unspezifische Bindung von GFP-SIRT1 auszuschließen, wurde dessen Bindungsaffinität gegenüber Flag M2 Agarose untersucht (Abbildung 12 a, Spur 1 und 4). Zur Kontrolle wurden 10% des zur IP eingesetzten Lysats analysiert.

Die Immunpräzipitation ergab, dass eine Bindung von GFP-SIRT1 sowohl ohne als auch nach Applikation von Adriamycin ausschließlich an Flag-HIPK2 1-553 erfolgt, nicht aber an Flag-HIPK2 551-1191. Adriamycinbehandlung verstärkt die Interaktion von GFP-SIRT1 und Flag-HIPK2 1-553 (Spur 5). Die Flag-HIPK2 Deletionsmutanten sind in Abbildung 12 c schematisch dargestellt. Dieses Experiment deutet darauf hin, dass der N-terminale Bereich von HIPK2 die Bindung von SIRT1 vermittelt. Die Kinasedomäne von HIPK2 befindet sich am N-Terminus des Proteins und vermittelt die Phosphorylierung von SIRT1.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die Bindung von SIRT1 an die Kinasedomäne oder an den Proteinabschnitt, der das SUMO-1 modifizierbare Lysin (K) 25 enthält, erfolgt.

Die Bindung von SIRT1 am N-Terminus von HIPK2 wurde durch einen *in vitro* Präzipitationsversuch kartiert. Dazu wurden rekombinante, aus *E. coli* BL21 pLysS gereinigte, GST-HIPK2 Trunkationsmutanten (Abbildung 12 b) zusammen mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem ³⁵S-Flag-SIRT1 eingesetzt. Zur Veranschaulichung dienen die schematischen Darstellungen der GST-HIPK2 Trunkationsmutanten (vergleiche Abbildung 12 c). Die GST-HIPK2 Trunkationsmutanten wurden mittels Gluthation-Sepharose präzipitiert und als Ladungskontrolle die eingesetzten GST-Fusionsproteine mit kolloidalem Coomassie Brilliantblau gefärbt (Abbildung 12 b).

Das Autoradiogramm in Abbildung 12 b zeigt, dass ^{35}S -Flag-SIRT1 an beide N-terminalen Trunkationen, GST-HIPK2 1-188 und GST-HIPK2 189-520, bindet aber nicht an den zentralen Abschnitt GST-HIPK2 521-800 (vergleiche Abbildung 12 c). Die Bindung ist schwach, da im Vergleich zur Kontrolle, die 5% des eingesetzten Translatats enthält, nur etwa 1% des zur Präzipitation eingesetzten Translatats von ^{35}S -Flag-SIRT1 an GST-HIPK2 1-188 und circa 1,5% an GST-HIPK2 189-120, welches die Kinasedomäne enthält, binden. Die im diesem Abschnitt beschriebenden Experimente deuten darauf hin, dass die Bindung von SIRT1 an HIPK2 über die N-terminale Kinasedomäne von HIPK2 vermittelt wird.

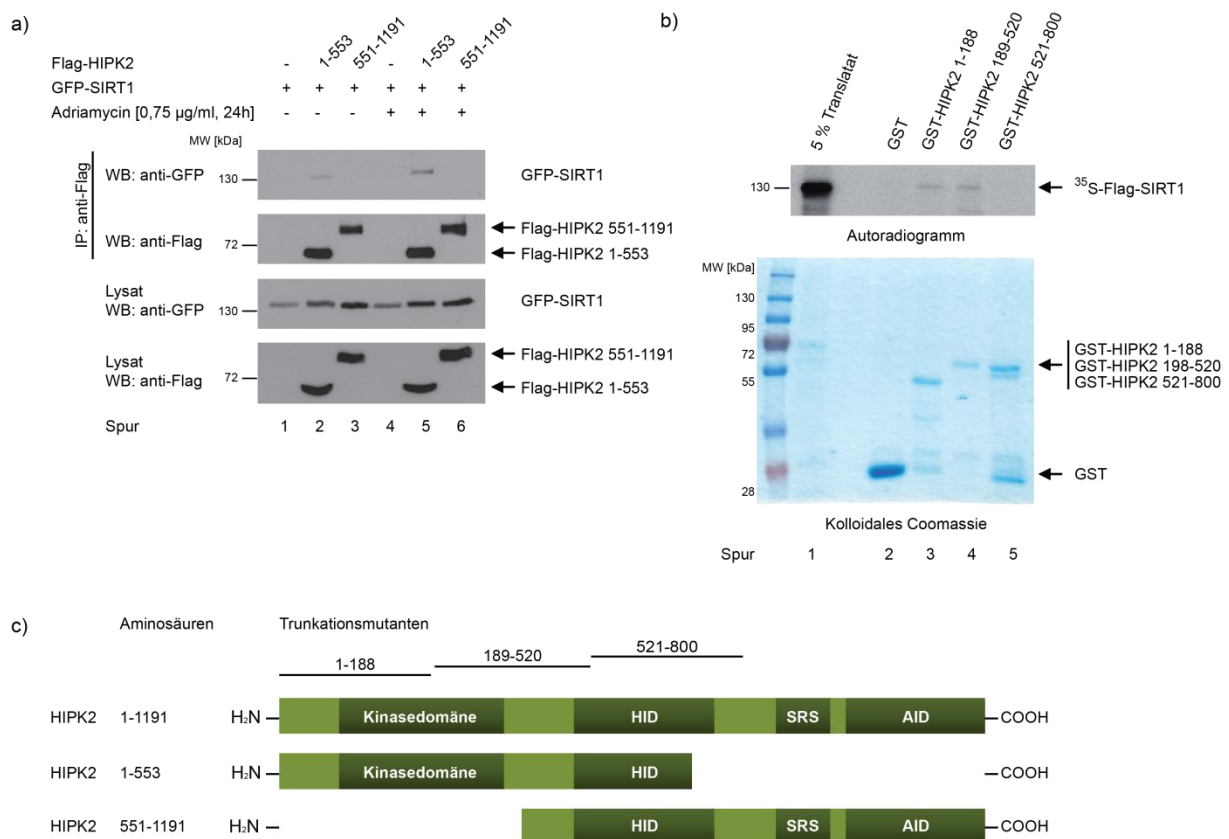


Abbildung 12: Charakterisierung der Bindung von SIRT1 an HIPK2 *in vitro*.

a) GFP-SIRT1 (0,25 µg) und die Trunktionsmutanten Flag-HIPK2 1-553 (5 µg) und Flag-HIPK2 551-1191 (10 µg) wurden in HEK293T Zellen exprimiert und ohne und nach Adriamycinbehandlung (0,75 µg/ml, 24h) mittels Flag M2-Agarose präzipitiert. Zur Kontrolle wurden 10% des eingesetzten Lysats analysiert. b) *In vitro* Präzipitationsversuch: GST-HIPK2 Trunktationen wurden aus *E.coli* BL21 pLysS gereinigt und mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem ^{35}S -Flag-SIRT1 inkubiert. Als Ladungskontrolle diente die kolloidale Coomassie Brilliantblau Färbung des SDS-Gels und als Kontrolle wurden 5% des *in vitro*-Translatats untersucht. Als Negativkontrolle diente GST. c) Schematische Darstellung der HIPK2 Deletions- und Trunktionsmutanten.

3.3 Regulation der Phosphorylierung durch DNA-Schaden

Da eine durch DNA-Schaden modulierbare Interaktion von SIRT1 und HIPK2 beobachtet wurde, stellte sich die Frage, ob auch die durch HIPK2-vermittelte Phosphorylierung von SIRT1 durch DNA-schadensabhängig reguliert wird.

3.3.1 Adriamycinbehandlung moduliert die Phosphorylierung von SIRT1

Nachdem in Abschnitt 3.1.3 gezeigt werden konnte, dass die SIRT1 Phosphorylierung in intakten Zellen erfolgt, sollte der Stimulus für eine Änderung der endogenen Phosphorylierung von SIRT1 untersucht werden. Neben verschiedenen Agenzien, die zu HIPK2 Stabilisierung und Aktivierung führen, wurde das Zytostatikum Adriamycin in die Studie einbezogen.

Zuerst wurde durch eine Konzentrationsreihe (0-1,5 µg/ml, vergleiche Abbildung 13 a und 13 b) die Konzentration von Adriamycin ermittelt, die zur HIPK2 Stabilisierung sowie zur SIRT1 Phosphorylierung in U2OS Zellen führt.

Die Signalintensität für phosphoryliertes SIRT1 in der Immundetektion mit den Antikörpern anti-SIRT1 pS27 (Abbildung 13 a) und anti-SIRT1 pS682 (Abbildung 13 b) nimmt mit steigender Adriamycinkonzentration zu und fällt bei höherer Konzentration als 1,0 µg/ml Adriamycin wieder ab. Dies korreliert mit der Stabilisierung der HIPK2 Proteinmengen. Die SIRT1 Gesamtproteinmengen (pan-SIRT1) selbst werden, wie in Abbildung 13 zu sehen ist, dosisabhängig reguliert. Das Signal für SIRT1 in der Immundetektion steigt bis zur Konzentration von 0,5 µg/ml Adriamycin an. Bei einer Adriamycinkonzentration von 0,75 µg/ml ist die Intensität des Signals von SIRT1 vergleichbar mit demjenigen von unbehandelten U2OS Zellen. Bei einer Konzentration von 0,75 µg/ml ist weiterhin eine Zunahme des SIRT1 pS682 Signals gegenüber des Signals unbehandelter Zellen zu erkennen (vergleiche Abbildung 13 b). Die Intensität des Signals für SIRT1 pS27 verhält sich hingegen bei allen Adriamycinkonzentrationen entsprechend des detektierten Signals für pan-SIRT1 (Abbildung 13 a).

Die Induktion der DNA-Schadensantwort durch Adriamycin wurde zum einen durch HIPK2 Stabilisierung überprüft, und zum andern anhand der Acetylierung des HIPK2 Signalempfängers p53 (p53 acK373/382) sowie dessen Stabilisierung verfolgt (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002). Als endogene Ladungskontrolle diente Aktin.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 27 konstitutiv und nicht durch DNA-Schaden modulierbar zu sein scheint, wohingegen die Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 682 durch Adriamycin induzierbar ist. Daher wurde eine Adriamycinkonzentration von 0,75 µg/ml für die nachfolgenden endogenen Untersuchungen gewählt.

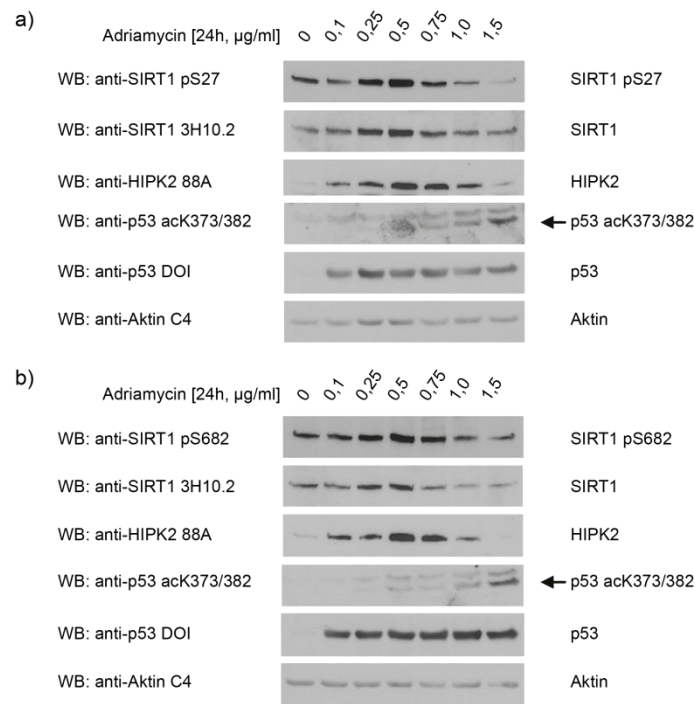


Abbildung 13: Dosisfindung zur Induktion der SIRT1 Phosphorylierung.

U2OS Zellen wurden mit den angegebenen Adriamycinkonzentrationen für einen Zeitraum von 24h behandelt. 100 µg des Zelllysats wurden per Immundetektion analysiert. Zur Kontrolle der DNA-Schadensinduktion wurde die Acetylierung von p53 an acK373/382 sowie dessen Stabilisierung herangezogen. Als Ladungskontrolle wurde Aktin genutzt. a) Adriamycin Konzentrationreihe zur Stimulierung der Phosphorylierung von SIRT1 an S27. b) Adriamycin Konzentrationreihe zur Stimulierung der Phosphorylierung von SIRT1 an S682.

Weiterhin wurde der zeitliche Verlauf der SIRT1 Phosphorylierung nach DNA-Schadensinduktion durch Adriamycin untersucht. Dazu wurden U2OS Zellen über einen Zeitraum von 0h, 6h und 24h mit Adriamycin behandelt und anschließend mittels Immundetektion analysiert.

Abbildung 14 a zeigt, dass die Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 27 über die Zeit der Behandlung mit Adriamycin unverändert bleiben. In Abbildung 14 b ist hingegen zu erkennen, dass die Intensität des Signals für SIRT1 pS682 mit der Zeit der Adriamycinbehandlung ansteigt. Dies erfolgt parallel zur Stabilisierung der HIPK2 Proteinmengen. Die Intensitäten der pan-SIRT1 Signale (Abbildung 14 a und 14 b) bleiben durch die Adriamycinbehandlung über die Zeit unbeeinflusst. Als interne Ladungskontrolle diente Aktin. Die Induktion der DNA-Schadensantwort wurde in diesem Experiment zum einen durch HIPK2 Aktivierung und nachfolgende p53 Phosphorylierung an Serin 46 (p53 pS46), welche 24h nach Adriamycinbehandlung sichtbar wird, überprüft. Zum andern wurde auch die p53 Acetylierung an den Lysin 373 und 382 sowie dessen Stabilisierung kontrolliert. Darüber hinaus wurde die PARP Prozessierung verfolgt. 24h nach Behandlung mit Adriamycin ist ein zusätzliches Signal auf der Höhe von 95 kDa neben dem Haupt-PARP-Signal bei 130 kDa zuerkennen. Dies zeigt Caspase-abhängig prozessiertes PARP

an, woran die vollständige Aktivierung der DNA-Schadensantwort ausgemacht werden kann (Chipuk et al., 2005; Kuwana et al., 2005).

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Experimenten geschlossen werden, dass die Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 682 in der späten Phase der DNA-Schadensantwort stimuliert wird. Dies erfolgt entsprechend der Stabilisierung und Aktivierung von HIPK2, was, wie auch die SIRT1 Phosphorylierung an Serin 682, durch Adriamycinbehandlung (0,75 µg/ml) nach 24h am deutlichsten auszumachen ist.

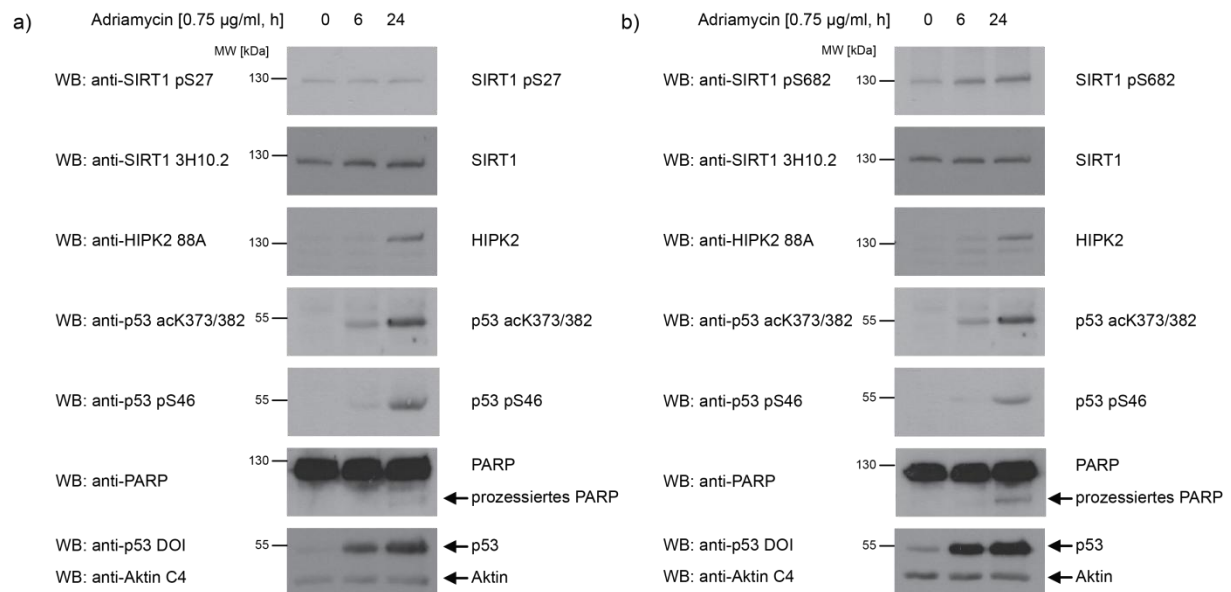


Abbildung 14: Modulation der SIRT1 Phosphorylierung nach Adriamycinbehandlung in einer Zeitreihe.

U2OS Zellen wurden mit 0,75 µg/ml Adriamycin für den angegebenen Zeitraum behandelt und 100 µg Zelllysat im Anschluss mittels Immunreaktion analysiert. Um die Induktion der DNA-Schadensantwort zu prüfen wurde die Acetylierung (p53 acK373/382) und Phosphorylierung (p53 pS46) sowie die Stabilisierung von p53 geprüft. Prozessierung von PARP zeigt eine vollständige Aktivierung der Kaskade der DNA-Schadensantwort an. Als interne Ladungskontrolle diente Aktin. a) Detektion der SIRT1 pS27 Signale nach Adriamycinbehandlung (0,75 µg/ml Adriamycin). b) Analyse der Phosphorylierung von SIRT1 an S682 über die Zeit nach Behandlung mit 0,75 µg/ml Adriamycin.

3.3.2 HIPK2 RNA-Interferenz beeinflusst SIRT1 Proteinmengen

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die SIRT1 Phosphorylierung an S682 mit der Stabilisierung der HIPK2 Proteinmengen nach der Induktion der DNA-Schadensantwort einhergeht. Mittels RNA-Interferenz (RNAi) sollte validiert werden, ob die SIRT1 Phosphorylierung nach DNA-Schaden direkt durch HIPK2 vermittelt wird.

Dazu wurde HIPK2 in U2OS Zellen mittels RNA-Interferenz depletiert und die Effizienz des HIPK2 "knock downs" per Immunreaktion verifiziert. Die SIRT1 S682 Phosphorylierung sowie die HIPK2 Stabilisierung wurde durch Applikation von Adriamycin induziert.

Wie in Abbildung 15 a zu sehen ist, reduzieren beide verwendeten stealth siRNAs die HIPK2 Proteinmengen. Im Vergleich zu stealth siHIPK2 47 ist die stealth siHIPK2 97 etwas effizienter in der Depletion von HIPK2. In der Kontrolle kann die DNA-schadensabhängige Stabilisierung der HIPK2 Proteinmengen beobachtet werden. Gleichzeitig ist die Induktion der SIRT1 Phosphorylierung an S682 in Gegenwart von Adriamycin und in Abhängigkeit von der Zeit in der Kontrolle zu erkennen.

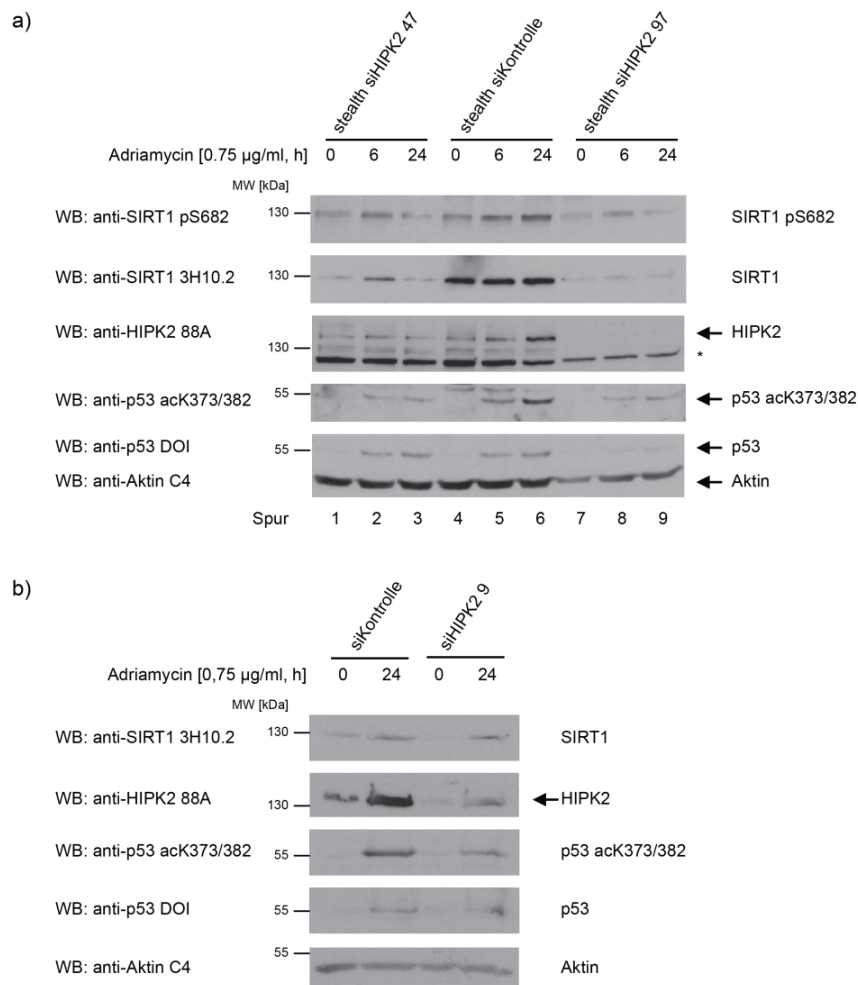


Abbildung 15: HIPK2 RNA-Interferenz reduziert die SIRT1 Proteinmengen.

HIPK2 RNA-Interferenz (RNAi) in U2OS Zellen mit stealth siHIPK2 47 und 97 (je 5 µM) sowie siHIPK2 9 (5 µM). DNA-Schaden wurde mit Adriamycin (0,75 µg/ml) über die angegebenen Zeiträume induziert. Die Einleitung von Apoptose wurde mittels Acetylierung und Stabilisierung von p53 geprüft und als Ladungskontrolle diente Aktin. a) Beide stealth siHIPK2 reduzieren die HIPK2 Proteinmengen und unterbinden dessen Stabilisierung nach DNA-Schaden. * = unspezifisches Signal. b) HIPK2 "kock-down" mittels siHIPK 9. Die RNAi reduziert die HIPK2 Proteinmengen sowie die HIPK2 Stabilisierung nach DNA-Schaden.

Durch HIPK2 RNAi sind die Signale von SIRT1 pS682 nach Adriamycinapplikation im Vergleich zur Kontrolle herabgesetzt. Die Reduktion der SIRT1 pS682 Mengen korreliert mit

der Depletion der pan-SIRT1 Proteinmengen nach HIPK2 RNAi (vergleiche Abbildung 15 a, Spur 1-3 und 7-9). Als Ladungskontrolle diente Aktin.

Die Induktion der DNA-Schadensantwort durch Adriamycin wurde anhand der Acetylierung (p53 acK373/382) und Stabilisierung von p53 verfolgt. Die Induktion der Kaskade ist durch HIPK2 Depletion fehlerhaft, was anhand der Reduktion der p53 Acetylierung und der verminderten p53 Stabilisierung ersichtlich ist (Abbildung 15 a, Spur 1-3 und 7-9).

Um den Effekt der RNAi durch stealth siHIPK2 zu stützen, wurde eine weitere siRNA in die Versuchsreihe einbezogen und in U2OS Zellen untersucht.

Wie oben beschrieben wurden in U2OS Zellen HIPK2 mit siRNA, siHIPK2 9, depletiert. Die "knock-down" Effizienz wurde mittels Immundetektion überprüft. Zur Induktion der SIRT1 Phosphorylierung an S682 und HIPK2 Stabilisierung wurde Adriamycin appliziert.

Abbildung 15 b zeigt, dass siHIPK2 9 die HIPK2 Proteinmengen depletiert und nach Adriamycinbehandlung reduziert. In der Kontrolle ist die DNA-schadensinduzierte HIPK2 Stabilisierung zu beobachten.

SIRT1 Proteinmengen sind nach HIPK2 Depletion durch RNAi mit siHIPK2 9 auch nach Applikation von Adriamycin erniedrigt.

Die Acetylierung (p53 acK373/382) und Stabilisierung von p53 ist ebenfalls durch HIPK2 Depletion mittels siHIPK2 9 im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Als Ladungskontrolle wurde Aktin genutzt.

Durch RNAi mit drei verschiedenen siRNAs konnte unabhängig gezeigt werden, dass SIRT1 Proteinmengen durch HIPK2 Depletion reduziert werden. Aufgrund dessen kann keine Aussage darüber getroffen werden, inwiefern HIPK2 auf endogener Ebene die Phosphorylierung von SIRT1 an S682 nach DNA-Schädigung vermittelt.

3.3.3 SIRT1 Proteinlevel sind in *Hipk2*^{-/-} MEF reduziert

Die im letzten Kapitel beschriebene Beobachtung der Reduktion der SIRT1 Proteinmengen nach HIPK2 Depletion wurde im Folgenden anhand von immortalisierten HIPK2 "knock-out" Mausembryofibroblasten (MEF) untersucht. Dies bietet die Möglichkeit, die Auswirkungen in physiologischem Kontext zu betrachten. Weiterhin wurden immortale Tamoxifen-induzierbare *Hipk2*^{flox/flox;Rosa26-CreERT2} MEF für 5 Tage mit Tamoxifen behandelt, was zu einer Entfernung der *Hipk2* Allele und somit zur Depletion der Hipk2 Proteinlevel führt, und daraufhin auf die Sirt1 Proteinmengen untersucht.

In Abbildung 16 a ist anhand der Abnahme der Hipk2 Proteinmengen zu sehen, dass der *Hipk2* Genlokus durch Tamoxifenapplikation erfolgreich eliminiert wurde. In den Lysaten der Tamoxifen-behandelten MEF sind die Signalintensitäten für phosphoryliertes Sirt1 pS682 sowie für pan-Sirt1 Proteinmengen verglichen zu denjenigen der unbehandelten MEF reduziert. Als Ladungskontrolle wurde Aktin herangezogen.

Diese Ergebnisse decken sich mit den im obigen Abschnitt beschriebenen Erkenntnissen der RNA-Interferenz in U2OS Zellen. In MEF sind nach Tamoxifen-induzierter Exzision der *Hipk2* Allele die Sirt1 pS682 sowie die Sirt1 Proteinmengen depletiert.

Weiterhin wurden konventionelle *Hipk2*^{-/-} MEF mit wildtyp MEF bezüglich ihres Sirt1 Proteingehaltes verglichen. Hierfür wurde zusätzlich DNA-Schaden durch Adriamycin induziert, um gegebenenfalls eine schadensinduzierte Stabilisierung von Sirt1 verfolgen zu können.

Wie Abbildung 16 b zeigt, ist in wildtyp MEF in der Immunreaktion ein Signal für Sirt1 detektierbar. Dieses Signal ist in *Hipk2*^{-/-} MEF auch nach Adriamycinbehandlung schwach. Als Ladungskontrolle diente Aktin und die Deletion des *Hipk2* Genlokus wurde mittels Genotypisierung überprüfen (Abbildung 16 c).

Demnach ruft konventioneller "knock-out" von *Hipk2* eine Reduktion der Sirt1 Proteinmengen hervor und durch Adriamycinbehandlung erfolgt keine Stabilisierung von Sirt1.

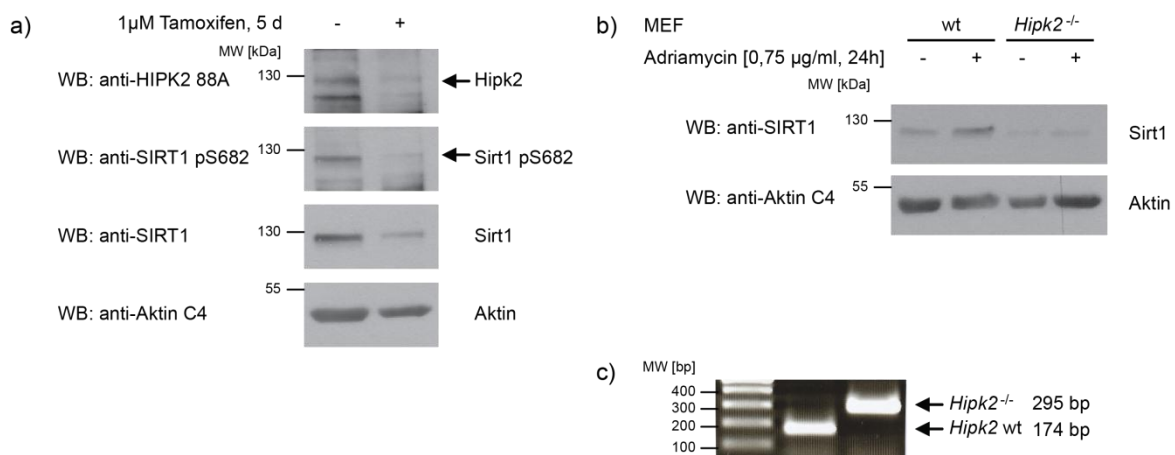


Abbildung 16: SIRT1 Proteinmengen sind in *Hipk2* "knock-out" MEF reduziert.

a) Das Löschen von HIPK2 aus dem Genom durch ein Tamoxifen-induzierbares Cre-Rekombinase System in immortalen embryonalen Mausembryofibroblasten (MEF). In *Hipk2*^{flox/flox; Rosa26-CreERT2} MEF wurde durch Tamoxifenbehandlung (1 µM, 5 Tage (d)) die Exzision der *Hipk2* Allele induziert. Es wurden 100 µg Zelllysate in der Immundetektion analysiert und als Ladungskontrolle diente Aktin. b) Analyse von immortalen, konventionellen *Hipk2*^{-/-} MEF bezüglich ihres SIRT1 Proteingehaltes nach Adriamycinbehandlung (0,75 µg/ml, 24h). Als Ladungskontrolle für 100 µg des analysierten Zelllysats wurde Aktin genutzt. c) Genotypisierung der konventionellen *Hipk2* "knock-out" MEF mittels PCR. Das wildtyp-Amplikon ist 174 bp groß, das Amplikon in "knock-out" MEF 295 bp.

Nach den Erkenntnissen der RNAi Untersuchungen in U2OS Zellen sowie den HIPK2 Deletionsexperimenten in *Hipk2*-defizienten MEF scheint HIPK2 einen stabilisierenden Effekt auf SIRT1 Proteinmengen zu vermitteln oder dessen Expression positiv zu beeinflussen.

3.3.4 Die Phosphorylierung an S27 und S682 hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von SIRT1

Die subzelluläre Lokalisation von SIRT1 kann durch Phosphorylierung, wie beispielsweise für *C. elegans* beschrieben, beeinflusst werden. Phosphorylierung an S27 von humanem SIRT1 bewirkt zum Beispiel eine vermehrte Lokalisation von SIRT1 im Nukleus (Tanno et al., 2007; Greiss et al., 2008; Nasrin et al., 2009). Im Folgenden wurde die Lokalisation von SIRT1 und dessen Phosphorylierung auf diesen Aspekt hin untersucht.

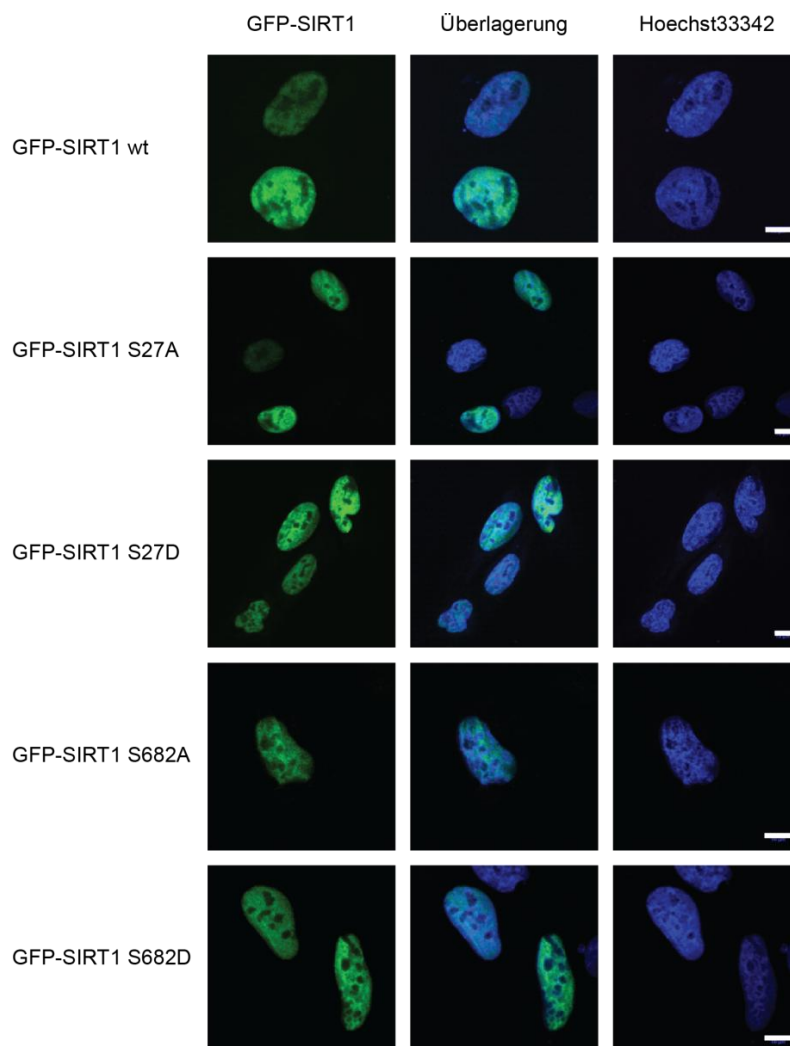


Abbildung 17: SIRT1 Phosphorylierung an S27 und S682 beeinflusst die subzelluläre Lokalisation nicht.

Indirekte Immunfluoreszenz: GFP-SIRT1 und phospho-defiziente und -mimetische GFP-SIRT1 Mutanten (S27A, S27D, S682A und S682D) (je 0,1 µg) wurden in U2OS Zellen exprimiert und 24h nach Transfektion mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Der Zellkern wurde durch Färbung der DNA mittels Hoechst33342 sichtbar gemacht. Die Skalierung entspricht 10 µm.

GFP-SIRT1 Fusionsproteine (siehe Abbildung 17) wurden in U2OS Zellen exprimiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Zellkerne wurden durch Färbung der DNA mit interkalierendem Farbstoff, Hoechst33342, gefärbt. Das GFP-Signal (488 nm, grün) ist

deckungsgleich mit dem Hoechst-Signal (405 nm, blau), was darauf hinweist, dass sowohl GFP-SIRT1 als auch die phospho-mimetischen und -defizienten GFP-SIRT1 Mutanten im Zellkern lokalisieren (Abbildung 17, Überlagerung).

Demnach ruft die Phosphorylierung von SIRT1 an S27 sowie S682 keine Änderung der Lokalisation hervor.

3.4 Untersuchung der SIRT1 Proteinstabilität

HIPK2 RNAi und der Verlust der *Hipk2* Allele in *Hipk2*^{-/-} MEF sowie in Tamoxifen-induzierbaren *Hipk2*^{flox/flox;Rosa26-CreERT2} MEF führen zu einer Reduktion von SIRT1 Proteinmengen, wie in Abschnitt 3.3.2 und 3.3.3 beschrieben wurde. Dieser Beobachtung wurde im Folgenden anhand von Untersuchungen zur SIRT1 Proteinstabilität sowie zur transkriptionellen Regulation von SIRT1 nachgegangen.

3.4.1 Verfolgung der SIRT1-Neusynthese mittels Cycloheximid-Behandlung

Wie in Abschnitt 3.3.2 gezeigt wurde, führt HIPK2 RNAi zu einer Reduktion der SIRT1 Proteinmengen. Zunächst wurde diesbezüglich untersucht, ob sich Ko-Expression von HIPK2 wiederum positiv auf die SIRT1 Proteinmengen auswirkt. HEK293T Zellen wurden mit HA-HIPK2 in steigender Menge sowie Flag-SIRT1 transfiziert und mittels Immundetektion analysiert.

Wie in Abbildung 18 a anhand der ansteigenden Signalsintensitäten von GFP-SIRT1 in Abhängigkeit der vorliegenden HA-HIPK2 Mengen zu sehen ist, werden die Flag-SIRT1 Proteinmengen durch steigende Mengen an HA-HIPK2 stabilisiert. Als Expressionkontrolle diente GFP.

Wenn HIPK2 Ko-Expression alleine SIRT1 Proteinmengen positiv beeinflusst, stellt sich die Frage, wie sich die phosphorylierungs-defizienten SIRT1 (S→A) Mutanten im Hinblick auf ihre Proteinstabilität verhalten.

Zur Untersuchung der Proteinstabilität der phosphorylierungs-defizienten SIRT1 Mutanten wurden U2OS Zellen mit Flag-SIRT1 und Flag-SIRT1 S27A, S682A und S27A, S682A transfiziert. Um die Stabilität der einzelnen Flag-Fusionsproteine verfolgen zu können, wurde die Proteinneusynthese durch Applikation von Cycloheximid (CHX) über die in Abbildung 18 b angegebenen Zeitpunkte gehemmt. Abbildung 18 b zeigt, dass die Proteinlevel von Flag-SIRT1 wildtyp, 27A und S682A durch die CHX Applikation in U2OS Zellen nicht beeinflusst werden. Allein die doppel phosphorylierungs-defiziente Mutante Flag-SIRT1 S27A, S682A scheint nach CHX Behandlung über 24h destabilisiert zu werden.

Zur Kontrolle der Effizienz der Cycloheximidbehandlung diente die Ko-Expression von Flag-p53 und als Ladungskontrolle Aktin. Die CHX-Behandlung war erfolgreich, wie jeweils an der Reduktion der Flag-p53 Proteinmengen zu erkennen ist (Abbildung 18 b).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass HIPK2 in die Stabilitätsregulation von SIRT1 involviert ist und dass beide Phosphorylierungen von SIRT1 an S27 und an S682 die Proteinestabilität in U2OS Zellen beeinflussen.

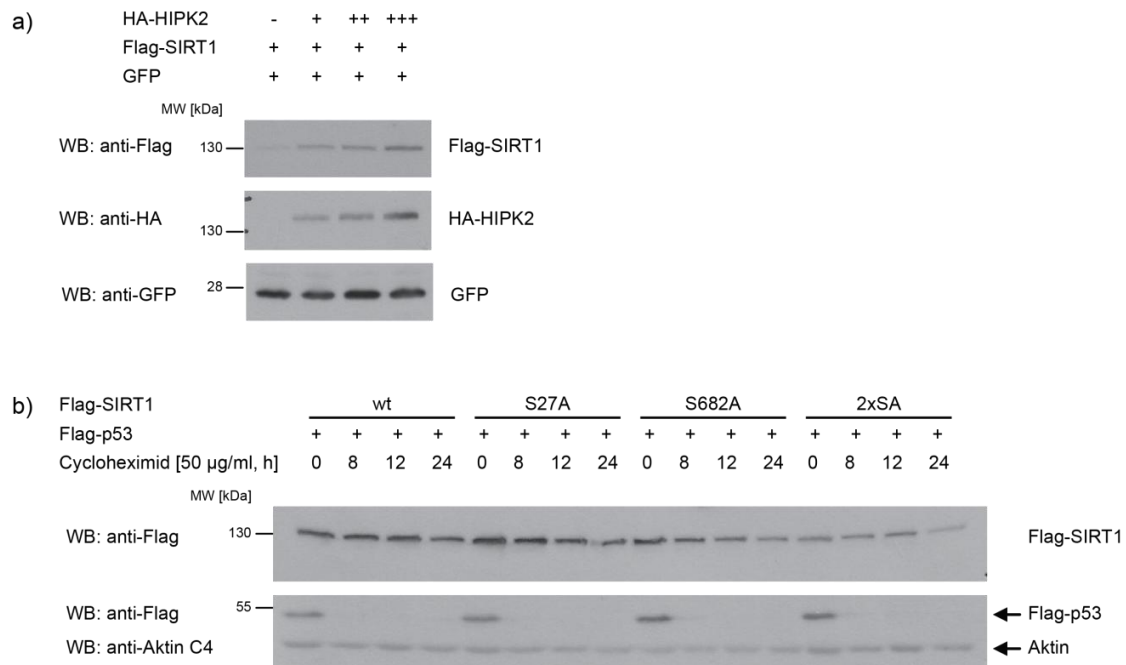


Abbildung 18: HIPK2 reguliert die Proteinestabilität von SIRT1 positiv.

a) Expression von Flag-SIRT1 (0,25 µg) und HA-HIPK2 (8, 10 und 12 µg) in HEK293T Zellen. Je 10% des Zelllysats wurden per Immunreaktion analysiert und die Transfektionseffizienz anhand der GFP Expression (0,2 µg) kontrolliert. b) U2OS Zellen wurden mit Flag-SIRT1 sowie Flag-SIRT1 S27A, S682A und S27A,S682A transfiziert und 24h nach Transfektion für die angegebenen Zeiträume mit Cycloheximid (CHX, 50 µg/ml, nochmalige Applikation nach 8h) behandelt. Die Analyse erfolgte per Immundetektion. Als Ladungskontrolle diente Aktin.

3.4.2 SIRT1 wird in U2OS Zellen weder proteasomal noch lysosomal degradiert

Weiterhin beeinflusst Phosphorylierung die Stabilität von Proteinen, indem unter anderem die proteasomale Proteindegradation moduliert wird (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998; Winter et al., 2008). Dazu wurden zwei der gängigsten Proteindegradationswege, die Degradation durch das 26S-Proteasom sowie lysosomale Degradation, auf deren Beteiligung am Abbau von SIRT1 hin untersucht.

Zunächst wurde der proteasomale Abbau mittels reversiblen Inhibitors der 20S-Untereinheit des Proteasoms, MG132, oder des irreversiblen Inhibitors der 19S-Untereinheit, Lactacystin, blockiert. Alle proteasomal degradierten Proteine sollten demnach angereichert werden. Die Immunfärbung gegen SIRT1 in Abbildung 19 a weist keine Verstärkung des Signals nach Proteasominhibition auf. Demnach scheint SIRT1 in U2OS Zellen nicht proteasomal abgebaut zu werden.

Zur Kontrolle der proteasomalen Hemmung diente p53, welches über das 26S-Proteasom abgebaut wird (Asher et al., 2005). Abbildung 19 a zeigt einen Anstieg der Signalintensität der Immunreaktion von p53. Dies deutet auf die Hemmung des 26S-Proteasoms hin. Als Ladungskontrolle wurde Aktin herangezogen.

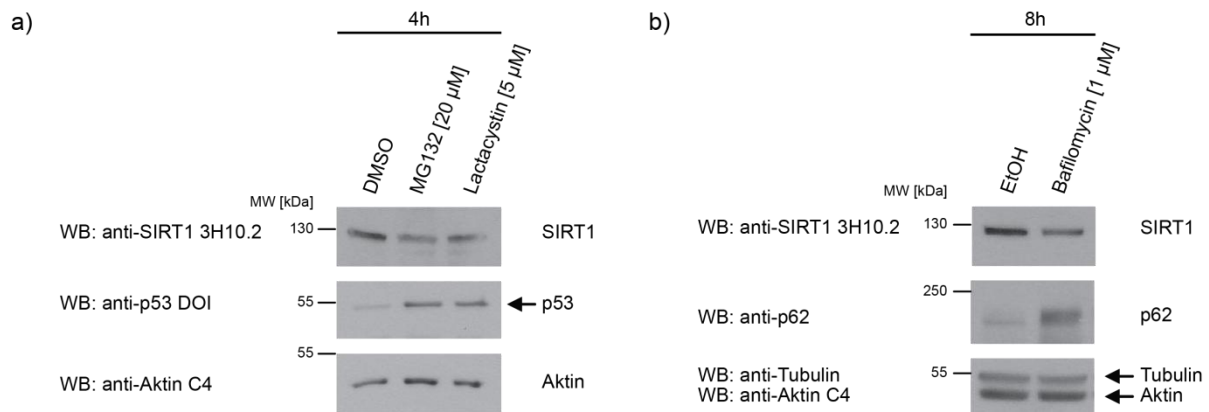


Abbildung 19: SIRT1 wird weder proteasomal noch lysosomal abgebaut.

Es wurden je 100 μg Zelllysate per Immunreaktion analysiert und als Ladungskontrolle diente jeweils Aktin, bzw. Tubulin. a) Hemmung der proteasomalen Degradation mit MG132 (20 μM, 4h) und Lactacystin (5 μM, 4h) in U2OS Zellen. Als Kontrolle der proteasomalen Hemmung wurde p53 herangezogen. b) Hemmung des lysosomalen Abbaus durch Bafilomycin (1 μM, 8h) in U2OS Zellen. Die Hemmung des lysosomalen Abbaus wurde anhand der p62 Anreicherung kontrolliert.

Proteinabbau erfolgt des Weiteren durch Lysosomen. Bafilomycin, ein Inhibitor der in der Lysosomenmembran befindlichen Protonenpumpen, verhindert die Aufrechterhaltung des sauren Milieus innerhalb der Lysosomen und blockiert somit den lysosomalen Proteinabbau. Das als Kontrolle genutzte Protein, p62, wird durch Lysosomen und Phagosomen degradiert. Dieser Prozess kann durch Bafilomycinapplikation gehemmt werden (Yoshimori et al., 1991; Shvets et al., 2008).

SIRT1 scheint in U2OS ebenfalls nicht über diesen Abbauweg degradiert zu werden, da in Abbildung 19 b keine Anreicherung des SIRT1 Signals der Immundetektion nach Bafilomycinbehandlung zu erkennen ist. Das zur Kontrolle untersuchte p62 weist dagegen einen Anstieg der Signalintensität nach Inhibition des lysosomalen Abbaus auf. Als Ladungskontrolle diente Aktin.

Anhand der Experimente zum Proteinabbau von SIRT1 in U2OS Zellen ist zu erkennen, dass SIRT1 weder proteasomal noch über Lysosomen degradiert wird.

3.4.3 HIPK2 ist an der transkriptionellen Regulation von SIRT1 beteiligt

Die beiden vorhergehenden Abschnitte weisen darauf hin, dass die SIRT1 Proteinstabilität weder auf posttranslationaler Ebene (3.4.1) noch auf der Ebene der Proteindegradation (3.4.2) durch HIPK2 reguliert wird. Daher wurde weiterhin die Möglichkeit untersucht, ob HIPK2 in die transkriptionelle Regulation von SIRT1 involviert ist.

Anhand einer quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) Analyse wurde der SIRT1 mRNA Gehalt nach HIPK2 RNAi bestimmt. Als interne Kontrolle wurde der mRNA Gehalt von GAPDH herangezogen.

Der RNAi-vermittelte HIPK2 "knock-down" mit verschiedenen siRNAs depletiert den SIRT1 mRNA-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle um 70% bis 90%, wie in Abbildungen 20 a und 20 b zu erkennen ist. Die Werte des SIRT1 mRNA-Gehaltes schwanken aufgrund der Effizienz der HIPK2 Depletion. Diese wurde mittels Immundetektion überprüft (siehe 3.3.2).

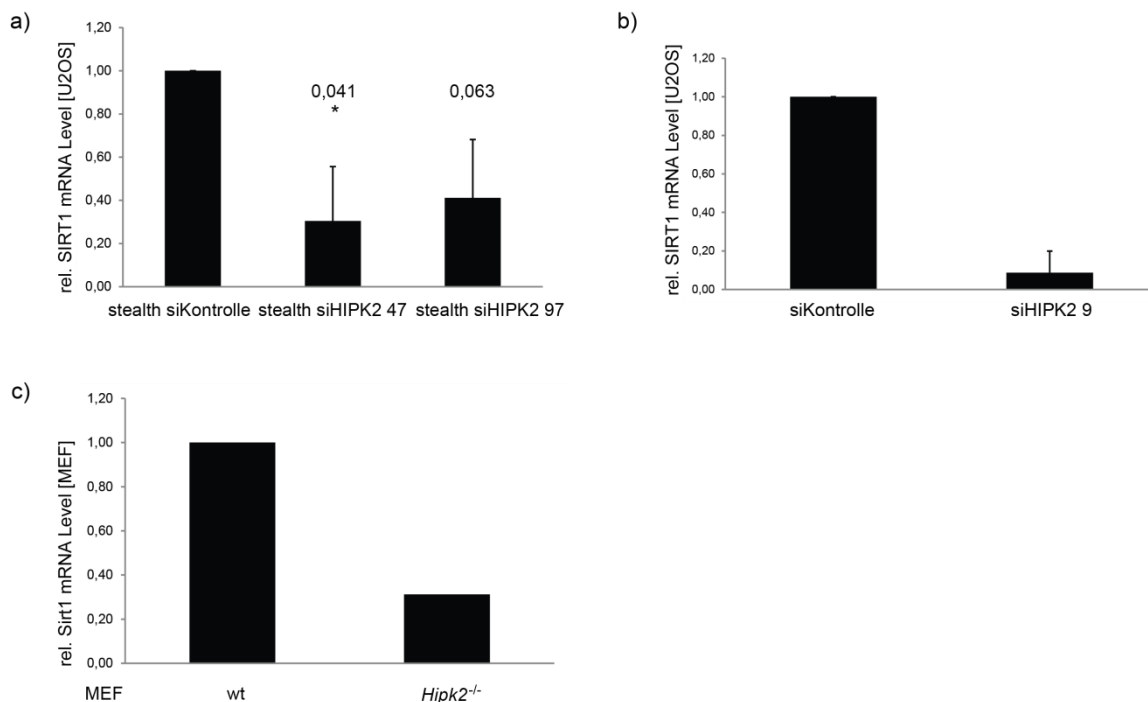


Abbildung 20: HIPK2 ist in die transkriptionelle Regulation von SIRT1 involviert.

Quantitative real-time (qRT-) PCR: Die relativen SIRT1 mRNA Mengen wurden sowohl nach HIPK2 "knock-down", als auch in wildtyp (wt) und *Hipk2*^{-/-} MEF analysiert. Als interne Referenz diente GAPDH. a) Depletion von HIPK2 mittels stealth siHIPK2 47 und 97 (je 5 μ M). Wenn stealth HIPK2 47 appliziert wurde, ist der Abfall der SIRT1 mRNA Mengen signifikant (beidseitiger T-Test, $p \leq 0,05$, Stern (*) bezeichnet Signifikanz, $n=3$). b) HIPK2 "knock-down" durch RNAi mittels siHIPK2 9 (5 μ M) ($n=2$). c) wildtyp und *Hipk2*^{-/-} MEF ($n=1$).

Hipk2^{-/-} MEF weisen ebenfalls reduzierte Sirt1 Proteinmengen auf (3.3.3). Daher wurden auch sie mittels qRT-PCR auf den Gehalt vorliegender muriner Sirt1 mRNA untersucht. Als interne Kontrolle wurde hier der mRNA-Gehalt von muriner Gapdh herangezogen.

Abbildung 20 c zeigt, dass in *Hipk2*^{-/-} MEF die relativen SIRT1 mRNA-Level im Vergleich zu denjenigen in wildtyp MEF um 66% erniedrigt sind.

Zusammenfassend kann aus den Experimenten dieses Kapitels gefolgert werden, dass HIPK2 die SIRT1 Proteinstabilität weder durch posttranslationale Modifikation noch die Proteindegradation vermittelt. Vielmehr scheint HIPK2 die Transkription von SIRT1 positiv zu beeinflussen, was mittels RNA-Interferenz mit drei verschiedenen siRNAs sowie anhand von *Hipk2*^{-/-} MEF unabhängig voneinander gezeigt werden konnte.

3.5 Regulation der SIRT1 Phosphorylierung durch PML

Da berichtet wurde, dass sowohl HIPK2 als auch SIRT1 in PML-Kernkörpern lokalisieren (Vaziri et al., 2001; Hofmann et al., 2002), liegt die Vermutung nahe, dass PML-Kernkörper möglicherweise der Ort der SIRT1 Phosphorylierung durch HIPK2 sein könnten.

3.5.1 SIRT1 und HIPK2 ko-lokalisieren in PML-Kernkörpern

Im Hinblick auf die oben beschriebene Fragestellung wurde zunächst die Lokalisation von SIRT1 und HIPK2 bezüglich der PML-Kernkörper untersucht. Dazu wurden GFP-SIRT1 und mCherry-HIPK2 sowie entweder der entsprechende Leervektor oder PML-IV in U2OS Zellen exprimiert. PML-IV ist eine der Grundkomponenten von PML-Kernkörper, die zur Rekrutierung von HIPK2 und SIRT1 führt (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Langley et al., 2002; Weidtkamp-Peters et al., 2008; Campagna et al., 2011).

Abbildung 21 a zeigt eine partielle Ko-Lokalisation von GFP-SIRT1 und mCherry-HIPK2 im Zellkern. Die nukleäre Lokalisation wurde durch Überlagerung des roten (594 nm) und grünen (488 nm) Kanals und mittels Färbung der DNA mit dem interkalierenden Farbstoff, Hoechst33342, überprüft.

Die Ko-Expression von PML-IV hingegen führt, wie Abbildung 21 b zu sehen ist, zur Rekrutierung von GFP-SIRT1 in Kerndomänen. Innerhalb dieser Domänen ko-lokalisieren GFP-SIRT1 und mCherry-HIPK2, welche als punktförmige Strukturen innerhalb des Zellkerns zu erkennen sind (Abbildung 21 b, Überlagerung). Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um PML-Kernkörper handelt, da die Überexpression von PML-IV zur Formation von PML-Kernkörpern führt (Zhong et al., 2000; Lallemand-Breitenbach et al., 2001). Zur Kontrolle der nukleären Lokalisation wurde die DNA mittels Hoechst33342 gefärbt.

Dieses Ko-Lokalisationsexperiment weist darauf hin, dass PML-Kerndomänen der Ort der SIRT1 Interaktion mit HIPK2 sein können.

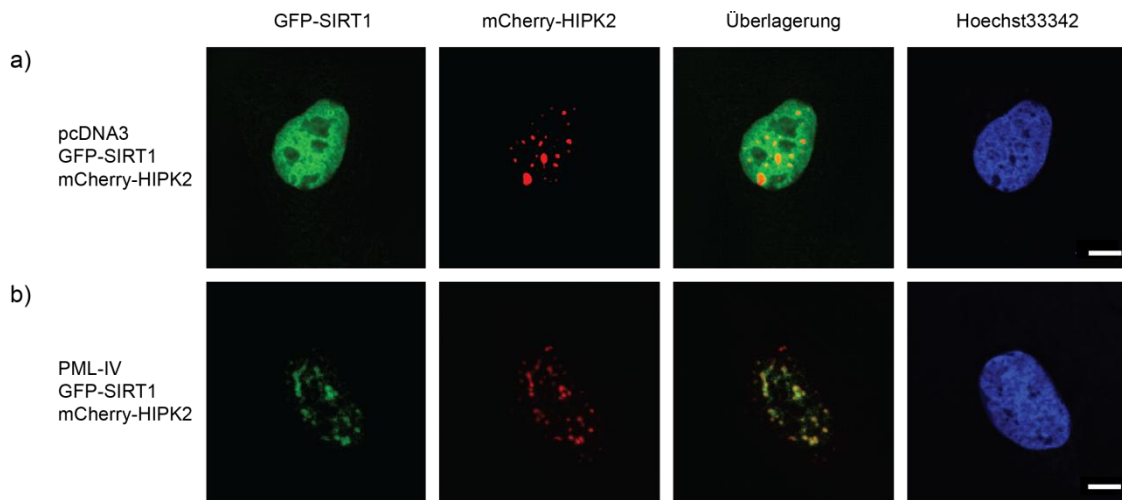


Abbildung 21: SIRT1 und HIPK2 ko-lokalisieren in PML Kernkörpern.

Indirekte Immunfluoreszenz: GFP-SIRT1 (0,1 µg) und mCherry-HIPK2 (0,5 µg) sowie entweder pcDNA3 Leervektor oder PML-IV (je 0,1 µg) wurden in U2OS Zellen exprimiert und nach 24h mit 4% PFA fixiert. Die Fluoreszenzemission basiert auf der Eigenfluoreszenz der Fusionsproteine. Die Skalierung entspricht 10 µm. a) GFP-SIRT1 und mCherry-HIPK2 ko-lokalisieren partiell (Überlagerung) im Zellkern (Hoechst33342). b) In Anwesenheit von PML-IV lokalisieren GFP-SIRT1 und mCherry-HIPK2 in punktartigen Domänen, den PML-Kernkörpern (Überlagerung) im Zellkern (Hoechst33342). PML-IV wurde nicht gefärbt.

3.5.2 PML-IV Ko-Expression verstärkt die SIRT1 Phosphorylierung an S682

SIRT1 und HIPK2 ko-lokalisieren in Anwesenheit von PML-IV in Kerndomänen, den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen PML-Kernkörpern. Diese Beobachtung führt des Weiteren zur Frage, ob die HIPK2-vermittelte Phosphorylierung von SIRT1 an S682 durch die Gegenwart von PML-IV geseteigert wird.

Um dies zu überprüfen, wurde GFP-SIRT1 zusammen mit Flag-HIPK2 und PML-IV in H1299 Zellen exprimiert und mittels Immunreaktion analysiert.

Wie Abbildung 22 zeigt, führt Ko-Expression von Flag-HIPK2 zu Phosphorylierung von GFP-SIRT1 an S682, wie anhand des Signals für phosphoryliertes SIRT1 pS682 zu erkennen ist (Spur 3). Das GFP-SIRT1 pS682 Signal wird durch die Gegenwart von PML-IV weiter verstärkt (Spur 4). PML-IV Ko-Expression alleine erhöht die Phosphorylierung von SIRT1 an S682 hingegen nicht (Abbildung 22, Spur 2). Als Transfektionskontrolle und zur Prüfung der Beladung des SDS-Gels diente GFP.

Demzufolge, ko-lokalisieren SIRT1 und HIPK2 in PML-Kernkörpern und die Anwesenheit von PML-IV verstärkt die HIPK2-vermittelte Phosphorylierung von SIRT1 an S682.

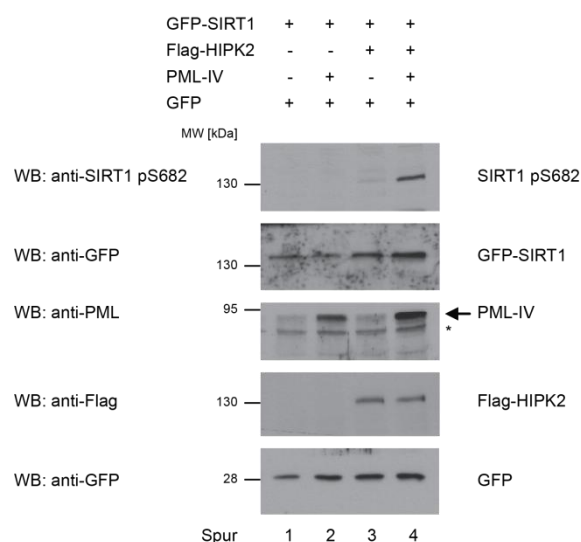


Abbildung 22: PML-IV verstärkt die Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 682.

Expression von GFP-SIRT1 (25 ng), PML-IV (25 ng) und Flag-HIPK2 (2 µg) in H1299 Zellen. Es wurden 10% des Lysats per Immundetektion analysiert und zur Kontrolle der Transfektionseffizienz GFP (20 ng) detektiert. * = unspezifisches Signal.

Diese Beobachtung, dass PML-IV die HIPK2-vermittelte SIRT1 Phosphorylierung an S682 verstärkt, wurde in Immunfluoreszenzanalysen weiter verfolgt. In einer stabilen GFP-SIRT1/U2OS Zelllinie wurde HA-HIPK2 zusammen mit Flag-PML-IV exprimiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Wie in der Überlagerung des grünen und roten Kanals in Abbildung 23 a ist zu erkennen, ko-lokalisieren GFP-SIRT1 (488 nm, grün) und HA-HIPK2 (594 nm, rot) in Gegenwart von Flag-PML-IV (nicht gefärbt) in punktartigen Strukturen im Zellkern (Hoechst33342). Das phospho-spezifische Signal für GFP-SIRT1 pS682 (594 nm, rot) ko-lokalisiert ebenfalls mit Flag-PML-IV (488 nm, grün) im Zellkern, wie in der Überlagerung in Abbildung 23 b gezeigt werden konnte. Die nukleäre Lokalisation der überexprimierten Proteine wurde mittels DNA Färbung mit interkalierendem Hoechst33342 kontrolliert.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Phosphorylierung von SIRT1 an S682 in Gegenwart von HIPK2 und PML-IV erfolgt. Diese Beobachtung konnte anhand von Immunfluoreszenzanalysen in U2OS Zellen bestätigt und PML-Kerndomänen als Ort der SIRT1 Interaktion mit HIPK2 zugeordnet werden.

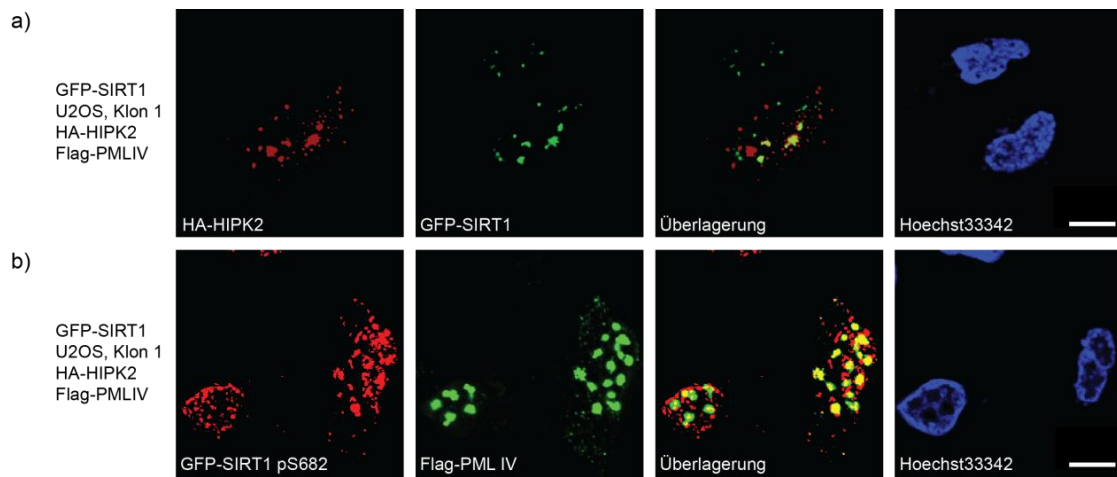


Abbildung 23: HIPK2 und phosphoryliertes SIRT1 pS682 ko-lokalisieren in PML-Kernkörpern.

Indirekte Immunfluoreszenz: In GFP-SIRT1/U2OS (stabile Linie, Klon1) wurde mCherry-HIPK2 (0,5 µg) sowie entweder pcDNA3 Leervektor oder PML-IV (je 0,1 µg) exprimiert und nach 24h mit 4% PFA fixiert. Die Fluoreszenzemission basiert auf der Eigenfluoreszenz der Fusionsproteine oder wurde mit den entsprechenden Antikörpern erzeugt. Die Skalierung entspricht 10 µm. a) Analyse der Lokalisation von GFP-SIRT1 und HA-HIPK2 mit Flag-PML-IV im Zellkern. b) Korrelation des phosphospezifischen SIRT1 pS682 Signals mit Flag-PML-IV im Zellkern.

3.5.3 PML Depletion beeinflusst SIRT1, HIPK2 und p53 Proteinlevel

Wie im obigen Abschnitt beschrieben wurde, ist die Phosphorylierung von SIRT1 an S682 in Anwesenheit von HIPK2 und PML-IV verstärkt. Weiterhin sollte nun untersucht werden, inwiefern PML "knock-down" durch RNAi in U2OS Zellen die SIRT1 Phosphorylierung durch HIPK2 beeinflusst.

Für dieses Experiment wurde PML mittels stealth siPML58 und 90 in U2OS depletiert. Die HIPK2 Aktivierung sowie die SIRT1 Phosphorylierung an S682 wurden durch die Applikation von Adriamycin induziert.

In Abbildung 24 ist zu sehen, dass beide verwendeten stealth siRNAs die Proteinmengen von PML, auch in Gegenwart von Adriamycin, reduzieren (Spur 1 bis 3 und 7 bis 9), während die PML Proteinmengen in der Kontrolle DNA-schadensinduziert über die Zeit ansteigen (Spuren 4 bis 6). Die SIRT1 Phosphorylierung an S682, wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, nimmt in den Kontrollzellen ebenfalls nach Induktion der DNA-Schadensantwort zu, wie auch die Stabilisierung der HIPK2 und p53 Proteinmengen.

Die PML RNAi führt sowohl zur Reduktion von SIRT1 und HIPK2 als auch von p53 Proteinmengen (Abbildung 24 in den Spuren 1 bis 3 und 6 bis 9). Daher liegt der Rückschluss nahe, dass PML nicht nur in Bezug auf die SIRT1 Phosphorylierung, sondern auch die Stabilität von Proteinen, die in PML-Kernkörpern lokalisieren, wie zum Beispiel SIRT1, HIPK2 und p53 eine wichtige Rolle spielen kann. Es kann sich aber ebenfalls um einen unspezifischen Effekt der verwendeten siRNAs handeln. Um dies genauer zu

untersuchen, bedarf es weiterer zielgerichteter Experimente, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

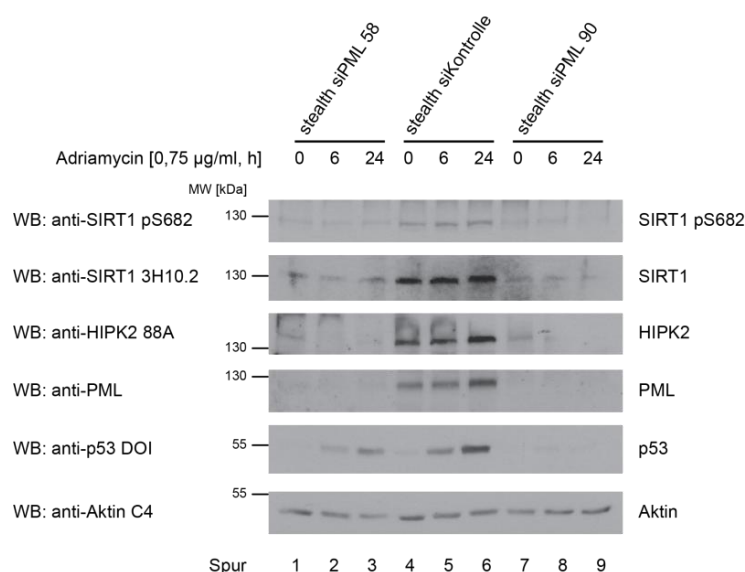


Abbildung 24: PML Depletion reduziert sowohl HIPK2 als auch SIRT1 Proteinmengen.

PML RNA-Interferenz in U2OS Zellen mit stealth siRNA, stealth PML 58 und 90 (je 5 μ M) und anschließender Adriamycinbehandlung (0,75 μ g/ml) über den angegebenen Zeitraum. Es wurden 100 μ g Lysat im Western Blot analysiert und als Ladungskontrolle diente Aktin.

3.6 Phosphorylierung von SIRT1 reduziert die Deacetylaseaktivität

Bisher konnte gezeigt werden, dass sowohl die Phosphorylierung von SIRT1 durch HIPK2 als auch die Interaktion mit HIPK2 nach Initiation der DNA-Schadensantwort verstärkt ist und in PML-Kernkörpern stattfindet. Im Folgenden wurden die funktionellen Auswirkungen der SIRT1 Phosphorylierungen an Serin 27 und Serin 682 bezüglich deren Fähigkeit, die enzymatische SIRT1 Aktivität zu modulieren, untersucht.

3.6.1 Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 682 reduziert die SIRT1 Aktivität

Um herauszufinden, ob die HIPK2-vermittelten Phosphorylierungen von SIRT1 funktionelle Auswirkungen auf die Aktivität der Deacetylasefunktion von SIRT1 haben, wurde dies am Beispiel der p53 Deacetylierung untersucht (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001; Hofmann et al., 2002).

In H1299 Zellen wurde p53 zusammen mit HA-CBP, HA-HIPK2 und Flag-SIRT1 exprimiert und mittels Immundetektion analysiert.

Wie Abbildung 25 a zeigt, wird p53 von der Acetyltransferase HA-CBP an den Lysinen 373 und 382 (ack373 und ack382 in Spur 2) acetyliert, während p53 in Abwesenheit von HA-CBP (Spur 1) keine Acetylmodifikationen aufweist. Beim Vergleich der Spuren 2 und 3 ist zu erkennen, dass die Anwesenheit von HA-HIPK2 sowohl die HA-CBP-vermittelte Acetylierung

von p53 als auch die Phosphorylierung von p53 an Serin 46 verstärkt. Ist Flag-SIRT1 ko-exprimiert, wird der Effekt von HA-CBP auf p53 revertiert, was anhand der Reduktion des Signals der p53 Acetyllevel in Spur 4 zu sehen ist. Wenn aber sowohl HA-HIPK2 als auch Flag-SIRT1 ko-exprimiert wurden, überwiegt der Effekt von HA-HIPK2 über den Flag-SIRT1 Effekt bezüglich der p53-Acetylierung, wie in Spur 5 von Abbildung 25 a anhand der Intensität der p53 acK373/382 sowie p53 pS46 Signale erkennbar ist.

Dies bedeutet, dass HIPK2 die SIRT1 Deacetylasefunktion deaktivieren und somit dessen Aktivität bezüglich p53 negativ beeinflussen kann.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Phosphorylierung von SIRT1 durch HIPK2 die Reduktion der Deacetylaseaktivität beeinflusst, und weiterhin sollte geklärt werden, welche Phosphorylierungen von SIRT1, die an Serin 27 oder diejenige an Serin 682, diesen Effekt vermittelt. Um dies zu validieren, wurde die Aktivität beider phospho-mimetischer SIRT1 Mutanten, Flag-SIRT1 S27D und Flag-SIRT1 S682D, mit derjenigen von Flag-SIRT1 auf der Ebene der p53-Deacetylierung verglichen.

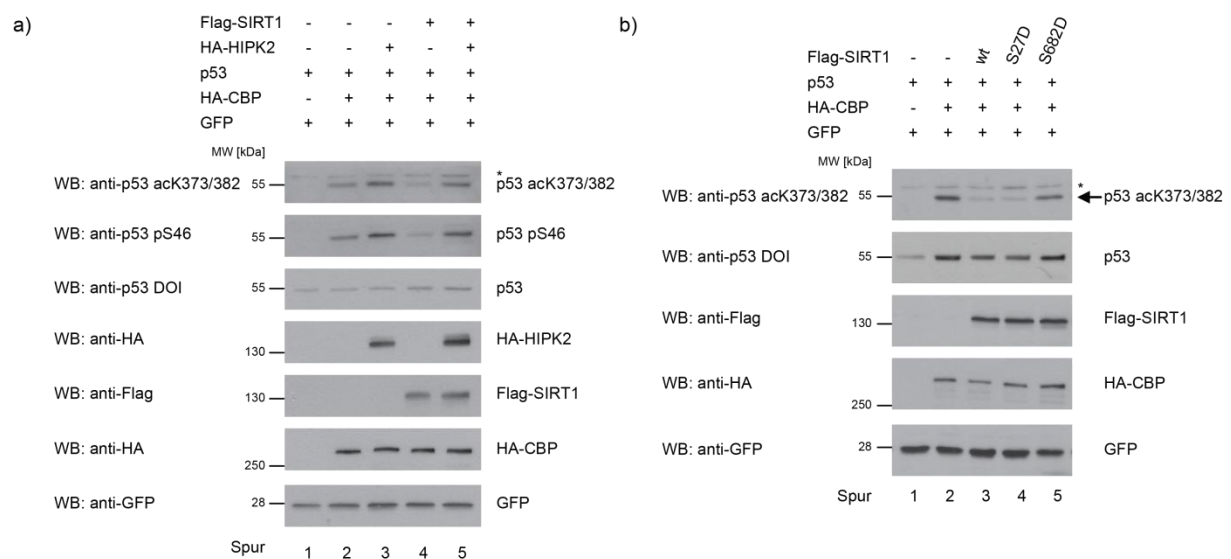


Abbildung 25: HIPK2 hemmt die SIRT1 Deacetylaseaktivität durch die Phosphorylierung von Serin 682.

Überexpressionsexperimente in H1299 Zellen. Jeweils 10% des Lysats wurden mittels Immunreaktion analysiert. Zur Kontrolle der Transfektion diente GFP (20 ng). + = unspezifisches Signal. a) HA-HIPK2 (2 µg) wurde zusammen mit p53 (60 ng), HA-CBP (1 µg) und Flag-SIRT1 (25 ng) in H1299 Zellen exprimiert. b) Flag-SIRT1 und die phospho-mimetischen Mutanten Flag-SIRT1 S27D und Flag-SIRT1 S682D (je 25 ng) wurden mit p53 (60 ng) und HA-CBP (1 µg) in H1299 Zellen exprimiert.

Dazu wurden Flag-SIRT1, Flag-SIRT1 S27D und Flag-SIRT1 S682D zusammen mit p53 und HA-CBP in H1299 Zellen exprimiert und anschließend per Immunreaktion analysiert.

Abbildung 25 b zeigt, dass HA-CBP p53 an den Lysinen 373 und 382 acetyliert (Spur 2), während in Abwesenheit von HA-CBP keine p53 Acetylierung vorliegt (Spur 1). Weiterhin ist

in Abbildung 25 b zu erkennen, dass die Ko-Expression von Flag-SIRT1 und Flag-SIRT1 S27D das Signal das Acetylierungssignal von p53 an acK373/382 reduziert (Spur 3 und 4), verglichen mit dem Signal der p53 Acetylierung, die durch HA-CBP alleine hervorgerufen wird (Spur 2). Wenn aber Flag-SIRT1 S682D zusammen mit p53 und HA-CBP vorliegen (Spur 5), ist zu sehen, dass diese phospho-mimetische SIRT1 Mutante es nicht vermag, p53 an den Lysinen 373 und 382 zu deacetylieren. Die Intensität der Bande für p53 acK373/382 ist hier vergleichbar mit dem Signal, das durch HA-CBP-vermittelte p53-Acetylierung hervorgerufen wird (Spur 2). Dieses Experiment deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von SIRT1 an S682 durch HIPK2 ein Aktivitätsverlust der SIRT1 Deacetylasefunktion vermittelt.

Zur weiteren Bestätigung der Regulation von SIRT1 durch Phosphorylierung an S682 wurde die phosphorylierungs-defiziente Flag-SIRT1 S682A Mutante mit der phospho-mimetische Flag-SIRT1 S682D Mutante und Flag-SIRT1 nach Expression in H1299 Zellen auf deren Effizienz der p53 Deacetylierung hin untersucht.

Abbildung 26 a zeigt in der Analyse der Immunreaktion, dass sich Flag-SIRT1 entsprechend der Flag-SIRT1 S682A Mutante bezüglich der p53 Deacetylierung an acK373/382 verhält (Spur 3 und 5). Die Flag-SIRT1 S682D Mutante ist im Vergleich dazu weniger aktiv, was anhand des intensiveren Signals für p53 acK373/382 in Spur 4 zu erkennen ist. Dies ist vergleichbar mit dem Signal der CBP-vermittelten p53 Acetylierung (Spur 2).

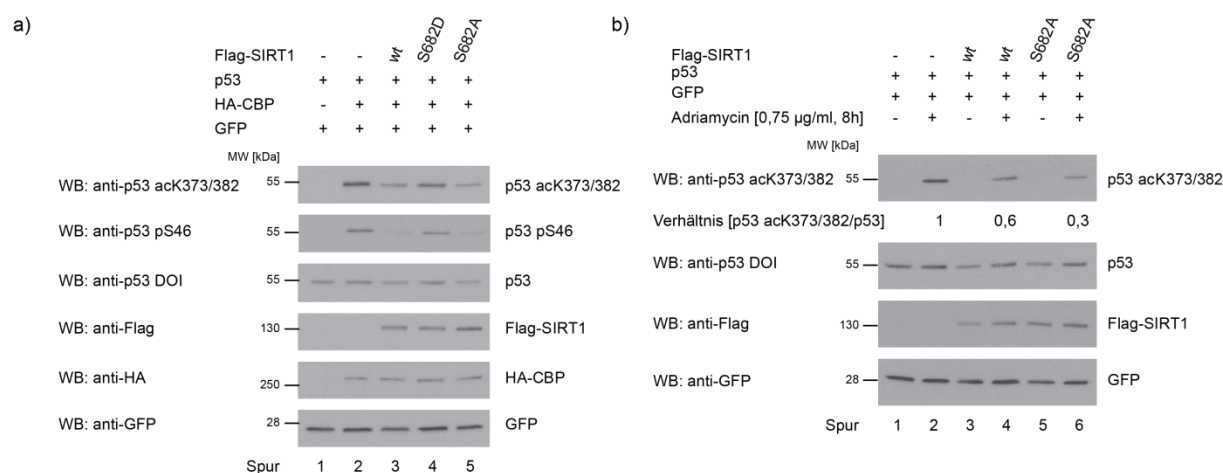


Abbildung 26: Die SIRT1 Deaktivierung erfolgt durch Phosphorylierung nach DNA-Schadensinduktion.

Überexpressionsexperimente in H1299 Zellen. Jeweils 10% des Lysats wurden anschließend mittels Immunreaktion analysiert. Zur Kontrolle der Transfektion diente GFP (20 ng). a) Flag-SIRT1 sowie die Flag-SIRT1 S682D und S682A Mutanten (je 25 ng) wurden mit p53 (60 ng) und HA-CBP (1 µg) in H1299 Zellen exprimiert und deren Effizienz bezüglich der p53 Deacetylierung ermittelt. b) Flag-SIRT1 und die phosphorylierungs-defiziente Flag-SIRT1 S682A Mutante (je 25 ng) wurden mit p53 (60 ng) und HA-CBP (1 µg) in H1299 Zellen exprimiert. 24h nach Transfektion erfolgte Adriamycinbehandlung (0,75 µg/ml, 8h). Die Effizienz der Einleitung der DNA-Schadensantwort wurde anhand der p53 Acetylierung mittels densitometrischer Quantifizierung mit ImageJ Software vorgenommen.

Um letztendlich den Effekt der SIRT1 Phosphorylierung im Hinblick der p53 Deacetylierung nach der Induktion von DNA-Schaden zu bestätigen, wurden Flag-SIRT1 und die phosphorylierungs-defiziente Flag-SIRT1 S682A Mutante in H1299 Zellen exprimiert und mit Adriamycin behandelt. Die Analyse erfolgte mittels Immundetektion.

Wie in Abbildung 26 b in Spur 2 zu erkennen ist, steigt die p53 Acetylierung nach Adriamycinbehandlung, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, an (Spur 1 und 2). Flag-SIRT1 Ko-Expression reduziert das Signal der p53-Acetylierung an acK373/382 um 40% (Spur 4) im Vergleich zur p53-Acetylierung nach DNA-Schaden (Spur 2). Die Anwesenheit der Flag-SIRT1 S682A Mutante hingegen vermindert das p53 Acetylsignal acK373/382 nach Adriamycinbehandlung um 70% (Spur 6). Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch durch Bildung des Quotienten $[p53 \text{ acK373/382}]/[p53]$ mit Hilfe der ImageJ Software.

Zum Vergleich der p53 Acetylierung aller in diesem Abschnitt beschriebener Experimente wurde der Gesamtgehalt an p53 herangezogen und GFP diente als Kontrolle der Transfektionseffizienz.

Zusammengenommen weisen die hier beschriebenen Experimente darauf hin, dass die SIRT1 Phosphorylierung an S682 dessen Deacetylaseaktivität bezüglich p53 herabsetzt und dieser Effekt scheint durch HIPK2 nach Induktion von DNA-Schaden vermittelt zu sein.

3.6.2 SIRT1 Phosphorylierung verstärkt p53 Transaktivierung

Im vorhergehenden Abschnitt wurde beschrieben, dass die Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 682 dessen Aktivität negativ beeinflusst. Weiterhin wurde untersucht, inwiefern sich die Phosphorylierung von SIRT1 auf die Transaktivierung von p53-Zielgenen auswirkt. Dazu wurden Luciferase-Transaktivierungsexperimente durchgeführt. Eine p53-Bindesequenz des *Puma*-Promotors wurde in ein Luciferase-Reporterplasmid kloniert (Yu et al., 2001). Die Transkription der Luciferase wird durch die Bindung von p53 an die *Puma*-Promotorsequenz hervorgerufen und ist je nach Bindungsaffinität moduliert. Acetylierung von p53 erhöht die Affinität zu proapoptischen Promotoren, wie dem *Puma*-Promotor (Puca et al., 2009; Tang et al., 2008). Die Auswertung erfolgt mittels Substratumsatz von Luciferin durch die Luciferase, welches zu einem fluoreszierenden Produkt gespalten wird.

Das *Puma*-Luciferase-Reporterplasmid wurde in H1299 Zellen zusammen mit einer internen Kontrolle, β -Galactosidase, sowie p53, HA-CBP und Flag-SIRT1 und S682D exprimiert. In Abbildung 27 a ist die Auswertung der relativen Luciferaseaktivität gezeigt. Die Normalisierung erfolgte auf die gemessene β -Gal Aktivität. Wie zu erkennen ist, induziert Ko-Expression von HA-CBP die p53 Transaktivierung im Vergleich zur p53 Kontrolle. Anwesenheit von Flag-SIRT1 reduziert die Transaktivierung hingegen, während die phospho-mimetische Mutante Flag-SIRT1 S682D die Transaktivierung des *Puma*-Promotors

durch p53 nicht zu verringern vermag. Der Effekt ist schwach aber reproduzierbar. Die Expression der Proteine wurde mittels Immunreaktion überprüft (Abbildung 27 b).

Da Unterschiede in der Transaktivierung, eine veränderte Proteinaffinität nahelegen, wurde untersucht, inwiefern die Interaktion von SIRT1 mit p53 durch die SIRT1 Phosphorylierung beeinflusst wird. In einem *in vitro* Präzipitationsversuch wurden keine Unterschiede in der Affinität von GST-SIRT1 und GST-SIRT1 S682D bezüglich ^{35}S -Flag-p53 gefunden. Das Autoradiogramm in Abbildung 27 c zeigt, dass ^{35}S -Flag-p53 an die eingesetzten GST-SIRT1 Proteine bindet. Die Ko-Präzipitation von ^{35}S -Flag-p53 wurde anhand von 5% des zur Kontrolle eingesetzten *in vitro*-Translatats verglichen und die Beladung der GST-Proteine wurde mittels Coomassie Brilliantblau Färbung des SDS-Gels kontrolliert.

Dieses Experiment deutet darauf hin, dass *in vitro* die Bindung von SIRT1 an p53 nicht durch die Phosphorylierung von SIRT1 beeinflusst ist. Allerdings kann die phospho-mimetische SIRT1 S682D Mutante die p53 Transaktivierung nicht so effizient verhindern wie SIRT1, was an der verminderten Aktivität der phospho-mimetischen Mutante liegen kann (vergleiche 3.6.1).

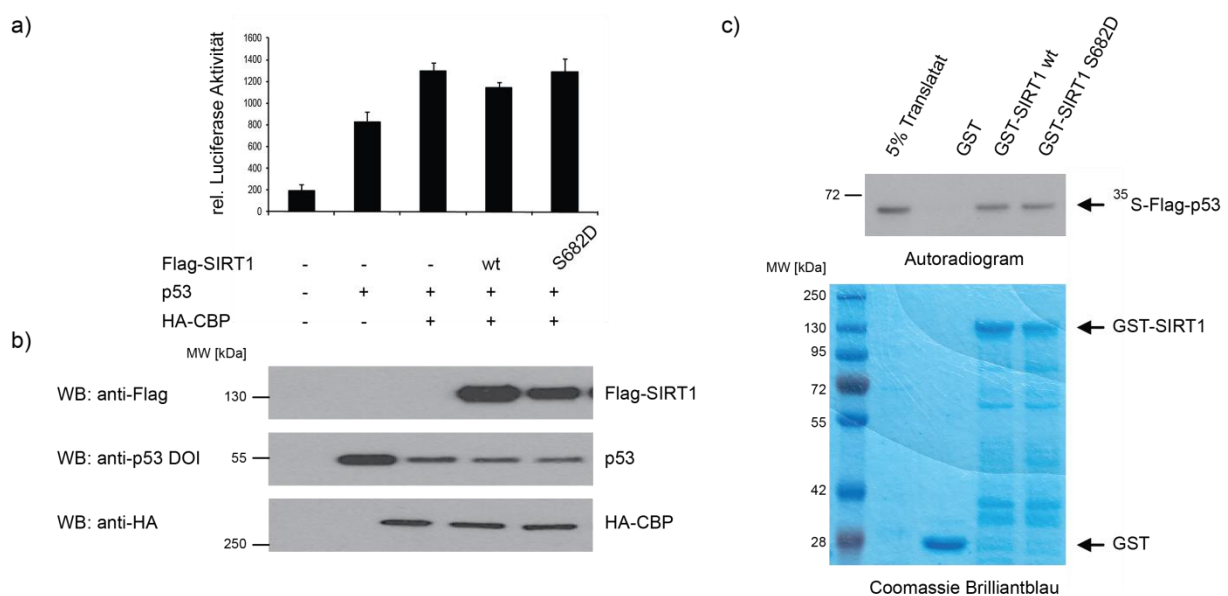


Abbildung 27: SIRT1 Phosphorylierung an Serin 682 verstärkt den transaktivierenden Effekt von p53.

a) Luciferase-Reporterversuch: Flag-SIRT1 sowie die Flag-SIRT1 S682D Mutante (je 5 ng) wurden mit p53 (10 ng) und HA-CBP (1 μg) sowie dem *Puma*-Reporterplasmid und β -Gal, als interne Kontrolle, in H1299 Zellen exprimiert. b) 10% des Lysats wurden im Luciferaseversuch und weiterhin per Immunreaktion analysiert. c) *In vitro* Präzipitationsversuch: GST-SIRT1 und GST-SIRT1 S682D wurde aus *E.coli* BL21 pLysS gereinigt und mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem ^{35}S -Flag-p53 inkubiert. Als Negativkontrolle diente GST und als Ladungskontrolle die Coomassie Brilliantblau Färbung des SDS-Gels. Zur Kontrolle wurden 5% des eingesetzten *in vitro*-Translatats analysiert.

3.6.3 Rekonstitution von U2OS Zellen mit SIRT1 und Mutanten

Um die Beobachtung, dass an Serin 682 phosphoryliertes SIRT1 weniger aktiv ist, unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde die Expression von endogenem SIRT1 in U2OS Zellen mittels lentiviraler Transduktion eines pGLenti-Lox3.7-shSIRT1 Plasmids depletiert und als Kontrolle ein pGLenti-Lox3.7-shLuci Vektor eingebracht (vergleiche 3.1.3). Die U2OS Zellen wurden mittels Flag-SIRT1 und Flag-SIRT1 S682A und S682D Expressionsplasmiden rekonstituiert, die eine dreifache Mutation (3xMut) in der shRNA korrespondierenden Sequenz von SIRT1 enthalten. Somit sind die überexprimierten, mutierten Flag-SIRT1 Proteine resistent gegenüber des SIRT1 "knock-down". Zur Kontrolle wurden U2OS Zellen mit Flag-Leervektor stabil transfiziert und lentiviral wurde entweder der shSIRT1 oder der shLuci Expressionsplasmid eingebracht.

Mit Hilfe dieser Zelllinien sollte aufgeklärt werden, ob die Expression der phosphomimetischen bzw. -defizienten SIRT1 Mutanten Einfluss auf die Acetylierung von endogenem p53 hat und wie sich dies nach Induktion der DNA-Schadensantwort verhält. Dies sollte zum einen mittels Immunreaktionsanalysen, und zum andern anhand der p53 Zielgenexpression per qRT-PCR Analysen ermittelt werden.

Zwei Klone der Flag-SIRT1 S682A U2OS Zelllinie wurden per Immundetektion auf p53 Acetylierung hin untersucht, wie in Abbildung 28 a dargestellt ist. Beim Vergleich der p53 acK373/382 Acetylsignale der Flag-SIRT1 S682A Zelllinien mit den Flag-SIRT1 Zelllinien, ist zu erkennen, dass die Hypophosphorylierung an S682 (im Falle der S682A Punktmutante) die SIRT1 Aktivität zu steigern vermag. p53 verbleibt in diesen Zelllinien auch nach DNA-Schadensinduktion durch Adriamycin an K373/382 deacetyliert. Die p53 Acetyllevel der Flag-SIRT1 S682A U2OS Linien sind reduziert, aber die Stabilisierung der p53 Proteinmenge nach Adriamycinbehandlung ist davon nicht beeinträchtigt und das p53 Signal steigt nach DNA-Schädigung an.

Weiterhin ist in Abbildung 28 a erkennbar, dass durch den SIRT1 "knock-down" (kd) in den Kontrollzellen (U2OS/Kontrolle/shSIRT1) die p53 acK373/382 Level ohne und nach DNA-Schaden, im Vergleich zur Kontrollzelllinie (U2OS/Kontrolle/shLuci), ebenfalls erhöht sind. Der SIRT1 kd wurde mittels Detektion der SIRT1 Proteinmengen durch einen SIRT1 Antikörper analysiert. Wie jeweils aus Spur 3 und 4 in Abbildung 28 a ersichtlich ist, wird das Signal für SIRT1 in den Kontrollzellen nach SIRT1 kd reduziert. p53 wird nach Adriamycinbehandlung stabilisiert, woran die Induktion der DNA-Schadensantwort ausgemacht wurde und als Ladungskontrolle diente Aktin.

Neben der Analyse der posttranslationalen Modifikationsmuster von p53 in Gegenwart der hypoacetylierten Flag-SIRT1 S682A Punktmutante wurde die transaktivierende Aktivität von p53 in Bezug auf die konstitutiv phosphorylierte Flag-SIRT1 S682D Punktmutante hin

untersucht. Dazu wurde die Transkription der p53 Zielgene *Puma*, *53AIP1* und *p21* in einer quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) analysiert.

Abbildung 28 b zeigt, dass die in der Flag-SIRT1 S682D U2OS Zelllinie im Vergleich zur Flag-SIRT1 wildtyp U2OS Zelllinie die relativen mRNA Mengen der p53 Zielgene *Puma*, *53AIP1* und *p21* erhöht vorliegen. Demnach vermindert SIRT1 nach Phosphorylierung an S682 das transaktivierende Potential von p53 nicht mehr effizient.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass die SIRT1 Deacetylaseaktivität durch Phosphorylierung an S682 reguliert wird und nach Phosphorylierung dieses Serinrestes vermag es SIRT1 nicht die p53-Zielgen Transaktivierung zu vermindern.

Die quantitativen Analysen der p53 Zielgenexpression werden in weiteren Experimenten verifiziert und darüber hinaus sind Analysen des Apoptoseverhaltens der Zelllinien, zum Beispiel anhand von FACS-Analysen, geplant.

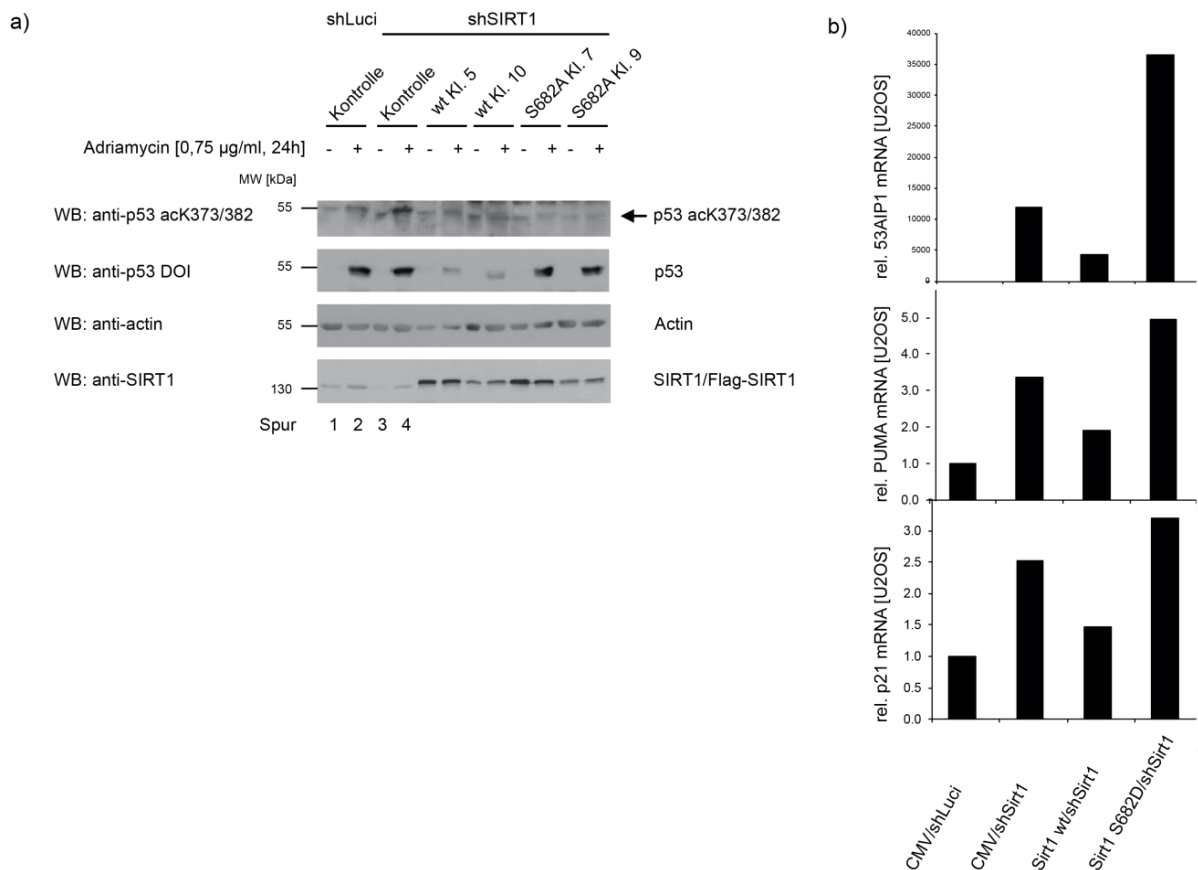


Abbildung 28: Rekonstitution von U2OS Zellen mit Flag-SIRT1, Flag-SIRT1 S682A und S682D.

U2OS Zellen wurden mit Flag-SIRT1, Flag-SIRT1 S682A und S682D rekonstituiert und nachfolgend SIRT1 lentiviral depletiert. a) Vergleich der Flag-SIRT1 mit der Flag-SIRT1 S682A Zelllinie nach Inkubation mit und ohne Adriamycin (0,75 µg/ml, 24h). Es wurden 100 µg des Zelllysats per Immunreaktion analysiert. Als Ladungskontrolle wurde Aktin herangezogen und der SIRT1 "knock-down" anhand der Reduktion der SIRT1 Proteinproteinmengen überprüft. b) Quantitative RT-PCR Analyse: Die relativen mRNA Mengen der p53 Zielgene, *Puma*, *53AIP1* und *p21*, wurden in der Zelllinie U2OS/Flag-SIRT1 S682D im Vergleich zur wildtyp Flag-SIRT1 Zelllinie analysiert (n=1). Als interne Kontrolle diente GAPDH.

3.6.4 Der SIRT1 Aktivitätsverlust nach Phosphorylierung ist kein direkter Effekt

In Zellversuchen reduziert die DNA-schadensinduzierte SIRT1 Phosphorylierung an Serin 682 die Deacetylaseaktivität von SIRT1. Daher wurde untersucht, ob es sich dabei um einen direkten Effekt handelt oder ob ein weiterer in Zellen vorliegender Mediator zur SIRT1 Inaktivierung benötigt wird. Dazu wurde zum einen ein Histon-Deacetylaseversuch und zum anderen ein p53-Deacetylaseversuch durchgeführt, um den Effekt auf die Deacetylierung verschiedener SIRT1 Zielproteine zu testen.

Zunächst wurden Histone aus HEK293T Zellen isoliert und gereinigt. Danach wurde in einem *in vitro* Deacetylaseversuch mit rekombinanten GST-SIRT1 wildtyp, 682A und S682D die Aktivität der GST-SIRT1-Proteine im Vergleich zur Kontrolle, GST, examiniert. SIRT1 kann Lysin 16 von Histon H4 und an Lysin 56 von Histon H3 deacetylieren (Vaquero et al., 2004; Das et al., 2009).

Abbildung 29 a zeigt, dass die Signale der Acetylmarkierungen der Histone H4 acK16 und H3 acK56 durch rekombinantes GST-SIRT1 und die GST-SIRT1 S682D und S682A Punktmutanten im Deacetylaseversuch reduziert wurden. Auf der Ebene der Histondeacetylierung scheint die Phosphorylierung von SIRT1 an S682 demnach keinen Einfluss auf die Effizienz der SIRT1 Deacetylaseaktivität zu haben.

Der Effekt der SIRT1 S682 Phosphorylierung bezüglich der p53 Deacetylierung wurde mit einem kommerziell erhältlichen „SIRT1 Liquid Screening Kit“ (Cayman) untersucht.

Eine synthetische Tetrapeptidsequenz (acRHKacK-AMC) der Aminosäuren 380 bis 382 aus p53, welches das acetylierte Lysin 382 enthält, wurde mit rekombinanten GST-SIRT1 und GST-SIRT1 S682D inkubiert und fluoreszenz-spektrophotometrisch vermessen. Das Tetrapeptid ist an das Fluorophor 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) gekoppelt, welches nach Deacetylierung des Lysins 382 seine Spektraleigenschaften meßbar verändert.

Abbildung 29 b stellt die Normalisierung der gemessenen Fluoreszenz durch p53 Deacetylierung dar. Die Normalisierung erfolgte auf die Werte, die durch p53 Deacetylierung durch GST-SIRT1 ermittelt wurden. Wie zu erkennen ist, deacetylieren sowohl GST-SIRT1 als auch GST-SIRT1 S682D das synthetische Tetrapeptid aus p53 gleichermaßen. In Abbildung 29 c wurden die eingesetzten Proteinmengen von GST-SIRT1 und S682D per Immundetektion überprüft. Die Mengen der eingesetzten Proteine sind vergleichbar. Als Negativkontrolle im p53-Deacetylaseversuch diente GST (nicht gezeigt).

In den in diesem Abschnitt beschriebenen *in vitro* Deacetylaseversuchen, hat die SIRT1 Phosphorylierung keinen Einfluss auf die enzymatische SIRT1 Aktivität. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der beobachtete Effekt der SIRT1 Inaktivierung durch Phosphorylierung an S682 einen Mediator, der im Zellkontext zu finden sein wird, zu benötigen scheint.

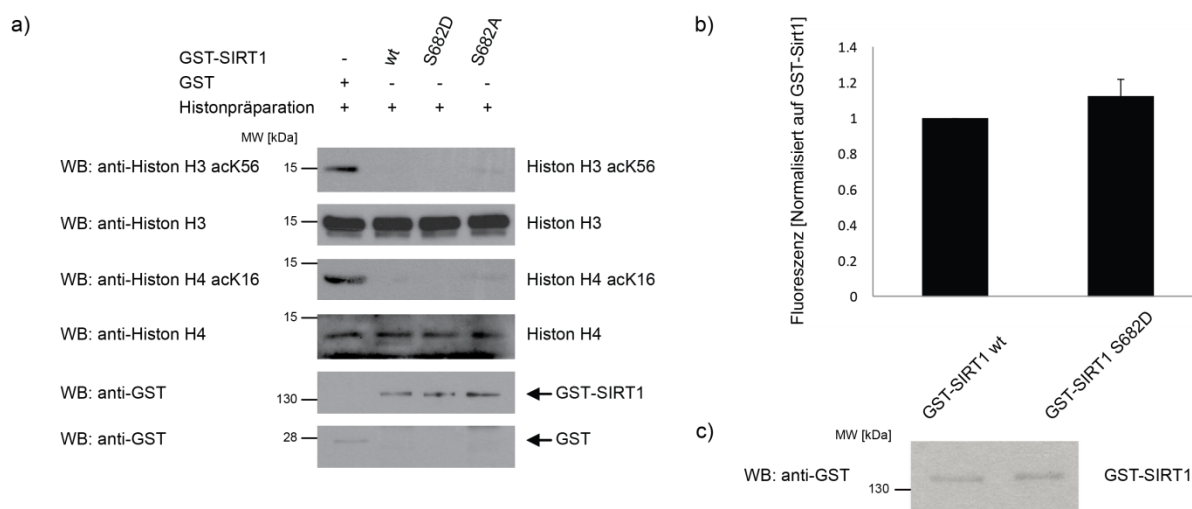


Abbildung 29: Die SIRT1 Inaktivierung benötigt einen zellulären Effektor.

a) *In vitro* Deacetylaseversuch: Histone wurden aus 293T Zellen und GST-SIRT1, S682D und S682A aus *E.coli* BL21 pLysS gereinigt und letztere vom Sepharose-Substrat eluiert. Als Negativkontrolle wurde eluiertes GST eingesetzt. b) Flüssigphaseversuch zur Ermittlung der SIRT1 Aktivität bezüglich p53 *in vitro*. GST-SIRT1 und GST-SIRT1 S682D wurden aus *E.coli* BL21 pLysS gereinigt und vom Sepharose-Substrat eluiert zusammen mit einer synthetischen p53-Tetrapeptidsequenz eingesetzt. Das Diagramm ist auf die Werte der p53 Deacetylierung durch GST-SIRT1 normalisiert. c) Kontrolle der für den Flüssigphaseversuch eingesetzten GST-SIRT1 Proteinmengen in der Immunreaktion.

3.7 Die SIRT1 Aktivität unterliegt einer Phospho-SUMO-1-Schaltung

Auf der Suche nach einem modulierenden Ereignis in Zellen, wurde die SIRT1 SUMOylierung interessant, da bereits beschrieben wurde, dass Modifikation von SIRT1 durch SUMO-1 an Lysin 734 dessen Deacetylaseaktivität erhöht und die SUMO-1-Markierung nach DNA-Schaden durch die SUMO-Peptidase SENP1 entfernt wird. Dadurch verbleibt SIRT1 unter Bedingungen von DNA-Schaden in einem weniger aktiven Zustand (Yang et al., 2007). Auch HIPK2 wird an Lysin 25 SUMO-1-modifiziert (Kim et al., 1999; Gresko et al., 2005), und daher ist es möglich, dass die Interaktion von SIRT1 und HIPK2 über Wechselwirkung zwischen SUMO-1-Modifikation und SUMO-Interaktionsmotiv (SIM), welches in der HIPK2-Proteinstruktur enthalten ist, erfolgt. In Abschnitt 3.5 wurde gezeigt, dass SIRT1 und HIPK2 in PML-Kernkörpern ko-lokalisieren. Es ist weiterhin bekannt, dass SUMOylierung von SIRT1, HIPK2 und p53 deren Lokalisation in PML-Kernkörpern vermittelt (Pearson et al., 2000; D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Langley et al., 2002). Daher liegt es nahe SUMOylierung als zellinternen Mediator der SIRT1 Aktivität zu untersuchen.

3.7.1 Die Bindung von SIRT1 und HIPK2 ist nicht durch SUMOylierung vermittelt

Zunächst wurde untersucht, ob SUMOylierung in die Interaktion von SIRT1 und HIPK2 involviert ist. Um dies zu verifizieren, wurden GFP-SIRT1 und die SUMOylierungs-defiziente Mutante, GFP-SIRT1 K734R, zusammen mit Flag-HIPK2 und der SUMOylierungs-defizienten HIPK2 Mutante, Flag-HIPK2 K25R, in HEK239T Zellen exprimiert.

Flag-Fusionsproteine wurden aus den Zelllysaten präzipitiert und anschließend per Immundetektion analysiert.

In Abschnitt 3.2.1 wurde bereits ausführlich beschrieben, dass SIRT1 und HIPK2 nach DNA-Schadensinduktion verstärkt interagieren. Abbildung 30 a zeigt, dass die SUMOylierungs-defiziente GFP-SIRT1 K734R Punktmutante sowohl ohne als auch nach Applikation von Adriamycin verstärkt mit Flag-HIPK2 K25R ko-präzipitiert, als im Vergleich dazu mit den wildtyp Proteinen.

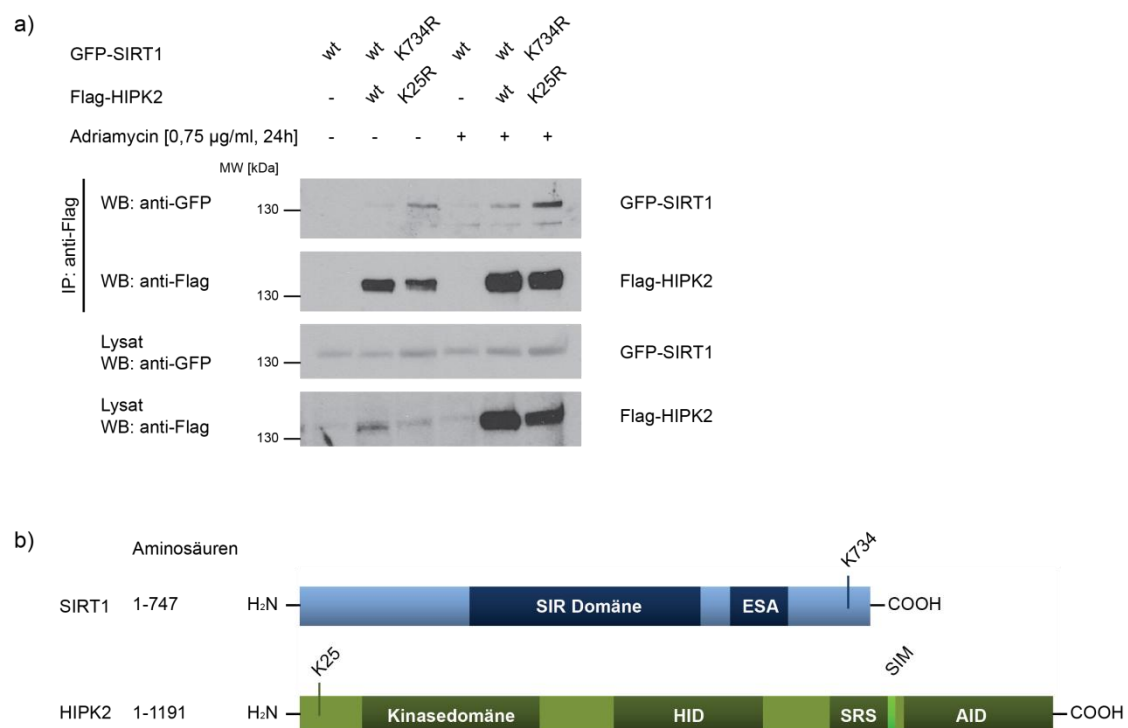


Abbildung 30: Die Interaktion von SIRT1 und HIPK2 ist nicht durch SUMO-1 vermittelt.

a) Ko-Immunopräzipitationsexperiment in HEK293T Zellen. GFP-SIRT1 und GFP-SIRT1 K734R (je 0,25 µg) wurden alleine oder mit Flag-HIPK2 und Flag-HIPK2 K25R (je 10 µg) exprimiert und die Hälfte der Ansätze mit Adriamycin (0,75µg/ml, 24h) behandelt. Als Ladungskontrolle wurden 10% des Zelllysats analysiert. Die Spezifität wurde anhand der Bindung von GFP-SIRT1 an das Agarose-Substrat untersucht. b) Schematische Veranschaulichung der SUMOylierten Aminosäurereste in SIRT1 und HIPK2 sowie des "SUMO-interacting motif" (SIM) in HIPK2.

Abbildung 30 b dient zur schematischen Veranschaulichung der SUMO-1-Modifikationen von SIRT1 (K734) und HIPK2 (K25) sowie des "SUMO-interacting motif" (SIM) in HIPK2.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass SUMO-1-Modifikation von SIRT1 und HIPK2 nicht in die Bindung beider Proteine involviert ist. Vielmehr interagieren SIRT1 und HIPK2 sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Adriamycin verstärkt, wenn sie in nicht SUMOyliertem Zustand vorliegen.

3.7.2 Die Phosphorylierung an S682 vermindert die SUMOylierung von SIRT1

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt gezeigt werden konnte, dass die Bindung von SIRT1 an HIPK2 nicht durch die SUMO-1 Modifikation beider Proteine vermittelt ist, wurde untersucht, ob die HIPK2-abhängige Phosphorylierung von SIRT1 die Modifikation mit SUMO-1 moduliert (vergleiche 1.4.1.3).

Dazu wurden Flag-SIRT1, die phospho-mimetische Mutante Flag-SIRT1 S682D und die SUMOylierungs-defiziente Mutante Flag-SIRT1 K734R zusammen mit GFP-SUMO-1 in H1299 Zellen exprimiert und das Zelllysate anschließend in der Immunreaktion analysiert.

In Abbildung 31 a ist anhand eines schwächeren Signals für GFP-SUMO-1-Flag-SIRT1 S682D zu erkennen, dass Flag-SIRT1 S682D im Vergleich zu Flag-SIRT1, bei vergleichbaren Mengen an Flag-Fusionsprotein, weniger GFP-SUMO-1-modifiziert wird. Die Negativkontrolle, Flag-SIRT1 K734R, wird nicht SUMO-1-modifiziert. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz diente die Detektion von ko-transfiziertem GFP.

Das Verhältnis von GFP-SUMO-1-modifiziertem Flag-SIRT1 zu nicht modifiziertem Flag-Fusionsprotein, $[GFP-SUMO-1-Flag-SIRT1] / [Flag-SIRT1]$, wurde densitometrisch mit Hilfe der ImageJ Software ermittelt und ist in Abbildung 31 b dargestellt. Das Verhältnis der SUMO-1-Modifikation von Flag-SIRT1 S682D ist, im Vergleich zur SUMO-1-Modifikation von Flag-SIRT1, um 70% reduziert.

Da gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung von SIRT1 an S682 die SUMOylierung moduliert, wurde der Fragestellung nachgegangen, ob es sich um einen direkten Effekt handelt oder ob der Effekt über einen weiteren Mediator vermittelt wird.

Um dies zu validieren, wurde ein *in vitro* SUMOylierungsversuch durchgeführt. Mittels gereinigter rekombinanter GST-SUMO-Ligasen (E1-E3) sowie GST-SUMO-1 (SUMO-Modifikations-Kit, Enzo) wurde *in vitro* translatiertes, radioaktiv markiertes ^{35}S -Flag-SIRT1 sowie ^{35}S -Flag-SIRT1 S682D und K734R mit SUMO-1-modifiziert.

Wie in Abbildung 31 c zu erkennen ist, sind die Signale für SUMO-modifiziertes ^{35}S -Flag-SIRT1, GST-SUMO-1- ^{35}S -Flag-SIRT1, für SIRT1 wildtyp und S682D gleich intensiv. Die Negativkontrolle ^{35}S -Flag-SIRT1 K734R wird *in vitro* nicht durch GST-SUMO-1 modifiziert.

Dieses Experiment weist darauf hin, dass ^{35}S -Flag-SIRT1 *in vitro* unabhängig von der Phosphorylierung an Serin 682 SUMOyliert wird.

Demnach scheint es sich um einen indirekten Effekt zu handeln, der die reduzierte SUMOylierung der SIRT1 S682D Mutante hervorruft. Daher wurde weiterhin evaluiert, inwiefern eine gesteigerte DeSUMOylierung involviert sein könnte. SIRT1 wird nach DNA-Schadensinduktion durch die SUMO-Peptidase SENP1 deSUMOyliert (Yang et al., 2007), daher könnte die SIRT1 Phosphorylierung eine Veränderung der Affinität zu SENP1 hervorrufen.

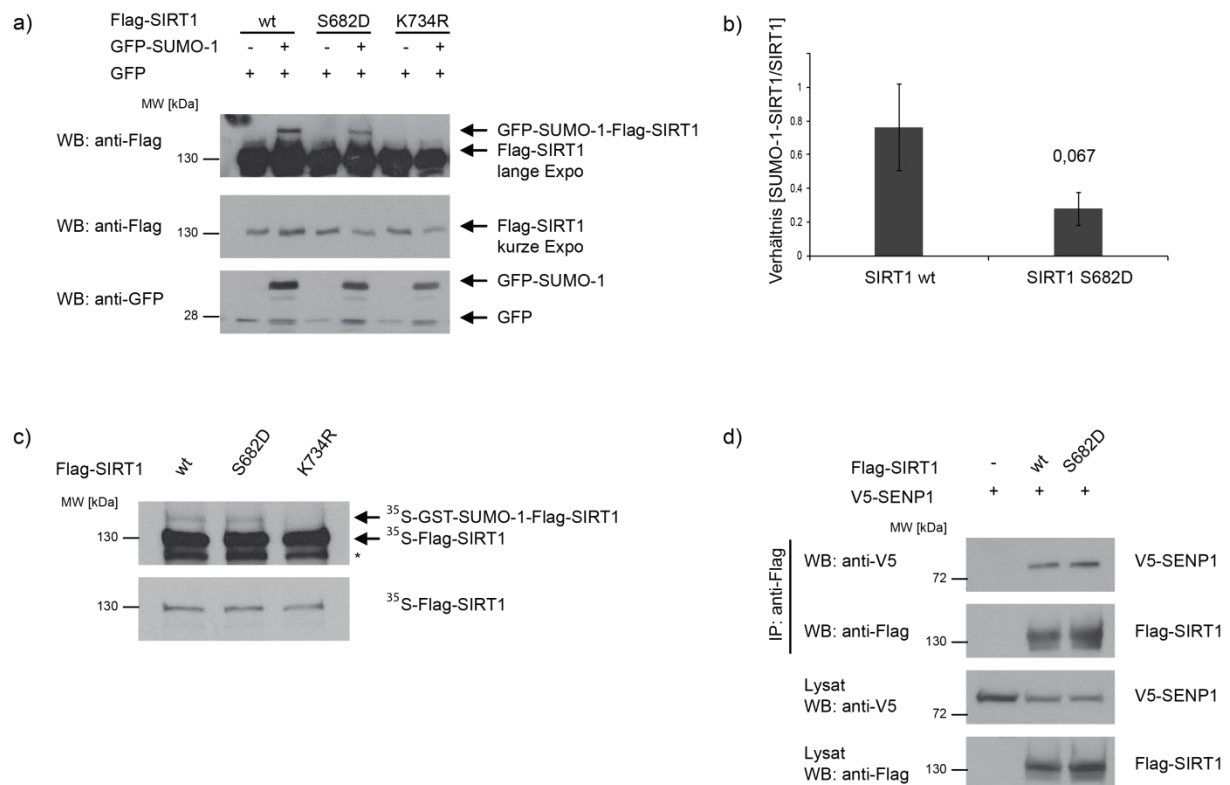


Abbildung 31: Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 682 vermindert die SIRT1 SUMOylierung.

a) Expression von Flag-SIRT1 sowie Flag-SIRT1 S682D und K734R (je 25 ng) zusammen mit GFP-SUMO-1 (0,5 µg) in H1299 Zellen. Zur Kontrolle der Spezifität der SUMOylierung diente die SUMOylierungs-defiziente Mutante Flag-SIRT1 K734R und als Ladungskontrolle GFP (20 ng). Es wurden 10% des Lysats per Immunreaktion analysiert. b) Die Quantifizierung der SUMOylierung erfolgte densitometrisch mittels ImageJ Software. Die SUMOylierung der phospho-mimetischen Flag-SIRT1 S682D Mutante ist nach beidseitigem "Students t-Test" (n=3) nahezu signifikant reduziert (p=0,067), verglichen mit Flag-SIRT1. c) *In vitro* SUMOylierungsversuch: *In vitro* translatierte und radioaktiv markierte ³⁵S-Flag-SIRT1 sowie ³⁵S-Flag-SIRT1 S682D und K734R wurden und mit rekombinanten GST-SUMO-Ligasen (E1-E3) und GST-SUMO-1 inkubiert. Zur Kontrolle der Spezifität diente Flag-SIRT1 K734R. d) Ko-Immunopräzipitationsexperiment in H1299 Zellen: Flag-SIRT1 und Flag-SIRT1 S682D (je 0,1 µg) wurden zusammen mit V5-SENP1 (0,2 µg) exprimiert und mittels anti-Flag M2 Agarose präzipitiert. Als Kontrolle diente die Inkubation von V5-SENP1 mit dem Agarose-Substrat sowie die Analyse von 10% des eingesetzten Zelllysats.

Um dies zu prüfen, wurden Flag-SIRT1, Flag-SIRT1 S682D und V5-SEN1 in H1299 Zellen exprimiert und Flag-SIRT1 mittels anti-Flag M2 Agarose präzipitiert. Die Analyse erfolgte mittels Immundetektion.

Die Intensitäten der Signale für ko-präzipitiertes V5-SEN1 sowohl mit Flag-SIRT1 als auch mit Flag-SIRT1 S682D sind vergleichbar, wie in Abbildung 31 d zu sehen ist. Als Ladungskontrolle wurden 10% des zur Präzipitation eingesetzten Lysats analysiert.

Es wurde kein Unterschied in der Bindungsaffinität von Flag-SIRT1 und Flag-SIRT1S682D zu V5-SEN1 gefunden, daher scheint die SIRT1 Phosphorylierung an S682 die DeSUMOylierung von SIRT1 nicht zu begünstigen.

Die hier beschriebenen Versuche weisen auf ein verändertes SUMOylierungsmuster durch Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 682 hin. Da dieser Effekt weder direkt auf der SIRT1 Phosphorylierung noch auf einer verstärkten DeSUMOylierung von SIRT1 beruht, könnte eine veränderte Affinität von SIRT1 zu SUMO-Ligasen diesen Effekt begründen (vergleiche 4.5.1).

3.7.3 SUMOylierung von SIRT1 reduziert die Phosphorylierung an S682

Im vorangehenden Abschnitt wurde beschrieben, dass die SIRT1 Phosphorylierung die SUMOylierung von SIRT1 moduliert. Als nächstes wurde untersucht, ob auf der anderen Seite die SUMOylierung von SIRT1 dessen Phosphorylierung an Serin 682 beeinflusst, und somit die Aktivität von SIRT1 regulieren kann.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden Flag-SIRT1 und als Negativkontrolle Flag-SIRT1 K734R in H1299 Zellen zusammen mit GFP-SUMO-1 und HA-HIPK2 exprimiert. Flag-SIRT1 wurde aus dem Zelllysate mittels anti-Flag M2 Agarose präzipitiert. Das Präzipitat wurde anschließend mit dem phospho-spezifischen Antikörper anti-SIRT1 pS682 getestet.

Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, konnte keine SIRT1 Serin 682 Phosphorylierung in der GFP-SUMO-1-Flag-SIRT1-Fraktion (Spur 4) detektiert werden, wohingegen ein deutliches Signal für sumoyliertes Flag-SIRT1 zu erkennen ist, wenn die Membran vorher mit Flag-Antikörper inkubiert wurde. Letzteres konnte in der Kontrolle (10% des Gesamtlysats) bestätigt werden. Wie zu erwarten, wurde auch HA-HIPK2 durch SUMO-1-modifiziert, was im Lysat detektiert werden konnte.

Allerdings ist nur ein geringer Anteil von Flag-SIRT1 durch GFP-SUMO-1 modifiziert. Daher ist möglich, das Detektionslimit des phospho-spezifischen Antikörpers, anti-SIRT1 pS682, erreicht zu haben und deshalb kein Signal detektiert werden kann.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse aus Abschnitt 3.7.2 und 3.7.3 darauf hin, dass die SIRT1 Aktivität nach Induktion der DNA-Schadensantwort durch eine Phospho-SUMO-Schaltung reguliert wird. Phosphorylierung scheint SIRT1 zu inaktivieren und somit die aktivierend wirkende SUMOylierung zu reduzieren. Darüber hinaus vermindert die SIRT1

aktivierende SUMOylierung wiederum die Phosphorylierung an Serin 682, welche die Deacetylaseaktivität von SIRT1 verringert.

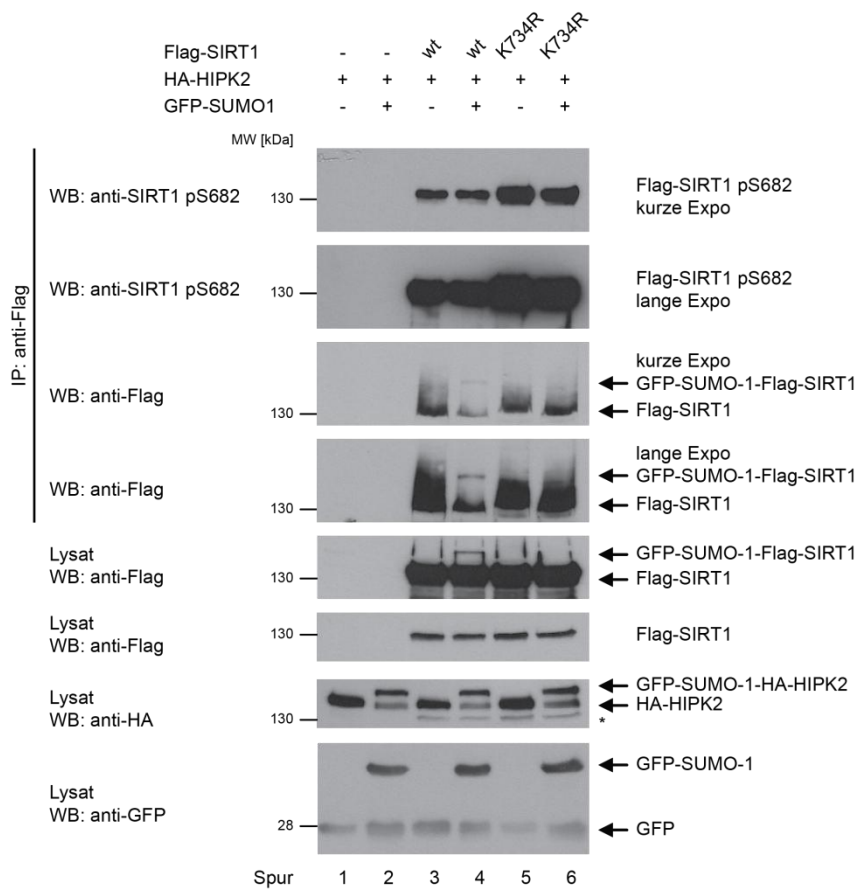


Abbildung 32: Die SUMOylierte Fraktion von SIRT1 scheint nicht an Serin 682 phosphoryliert zu sein.

Ko-Immunopräzipitationsexperiment in H1299 Zellen: Flag-SIRT1 und die SUMOylierungsdefiziente Mutante Flag-SIRT1 K734R (je 100 ng) wurden zusammen mit HA-HIPK2 (2 µg) mit und ohne GFP-SUMO-1 (1 µg) exprimiert und mittels anti-Flag M2 Agarose präzipitiert. Als Kontrolle diente die Analyse von 10% des Lysats sowie die Inkubation von Flag-SIRT1 mit dem Agarose-Substrat. * = unspezifisches Signal.

3.8 Der Aktivator AROS bindet DNA-schadensabhängig an SIRT1

Ein weiterer Aspekt der SIRT1 Regulation liegt bei den SIRT1 Modulatoren DBC1 und AROS. DBC1 inhibiert die SIRT1 Deacetylaseaktivität durch Bindung an die SIR Domäne von SIRT1, wohingegen AROS durch Bindung des N-Terminus von SIRT1 als Aktivator wirkt (Kim et al., 2007; Kim et al., 2008; Zhao et al., 2008).

3.8.1 Die DBC1 Bindung an SIRT1 wird durch Adriamycin nicht beeinflusst

Da bereits berichtet wurde, dass die Interaktion von DBC1 mit SIRT1 durch Agenzien, die stimulierend auf die DNA-Schadensantwort wirken, verstärkt wird (Yuan et al., 2012), wurde

dies im Folgenden mit den bekannten Agenzien, H_2O_2 und UV-C Strahlung, sowie mit Adriamycin getestet.

Flag-SIRT1 wurde zusammen mit HA-DBC1 in H1299 Zellen exprimiert und die DNA-Schadensinduktion mit den obengenannten Agenzien stimuliert. Anschließend erfolgte die Präzipitation von Flag-SIRT1 mit anti-Flag M2 Agarose und ko-präzipitiertes HA-DBC1 wurde per Immundetektion analysiert. Die Affinität von HA-DBC1 zum Agarose-Substrat sowie 10% des zur Präzipitation eingesetzten Lysats wurden kontrolliert.

In Abbildung 33 a ist erkennen, dass das Signal von HA-DBC1 an Flag-SIRT1 durch Adriamycinbehandlung nicht verstärkt wird, wohingegen nach oxidativem Stress, in Form von H_2O_2 , sowie nach UV-C Strahlung eine Intensitätssteigerung des HA-DBC1 Signals erfolgt. Dies deutet darauf hin, dass Adriamycin die Bindung von DBC1 und SIRT1 nicht beeinflusst, wohingegen H_2O_2 und UV-C Strahlung eine stärkere Bindung beider Proteine hervorrufen.

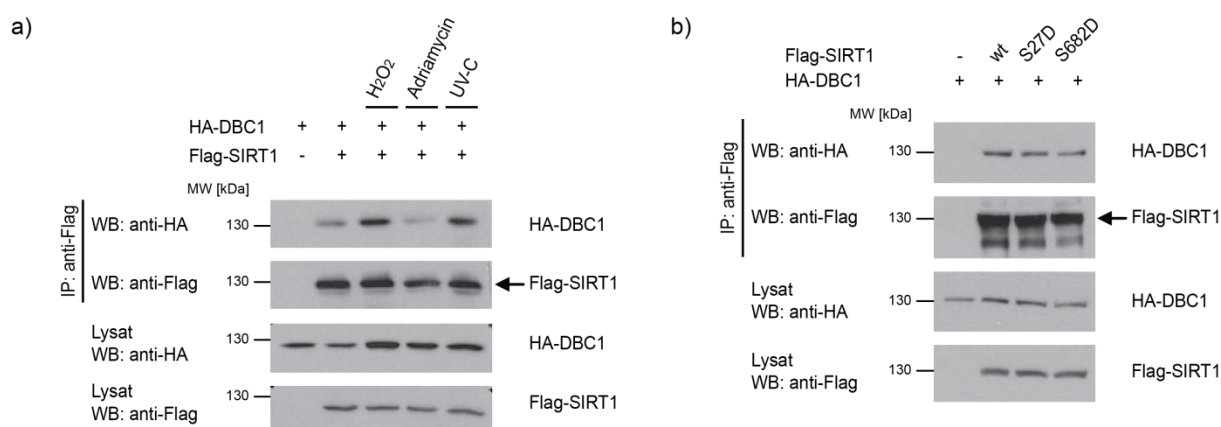


Abbildung 33: SIRT1 Phosphorylierung interferiert nicht mit der DBC1 Bindung.

a) Expression von Flag-SIRT1 (0,25 μ g) zusammen mit HA-DBC1 (0,5 μ g) in HEK293T Zellen. Die Bindung von HA-DBC1 an Flag-SIRT1 wurde nach Applikation von H_2O_2 (1 mM, 1h), UV-C Strahlung (50 j/m^2 , 6h) sowie Adriamycin (0,75 μ g/ml, 6h) per Immunreaktion untersucht. b) Flag-SIRT1 sowie Flag-SIRT1 S27D und S682D (je 0,25 μ g) und HA-DBC1 (0,5 μ g) wurden in HEK293T Zellen exprimiert und Flag-Fusionsproteine mittels anti-Flag M2-Agarose präzipitert. Zur Kontrolle wurden 10% des eingesetzten Lysats analysiert sowie die Spezifität der Bindung durch Inkubation von HA-DBC1 an das Agarose-Substrat untersucht.

Weiterhin wurde die Bindung von DBC1 bezüglich der SIRT1 Phosphorylierung untersucht. Dazu wurden Flag-SIRT1 sowie Flag-SIRT1 S27D und S682D in HEK293T Zellen zusammen mit HA-DBC1 exprimiert und im Anschluss einer Immunpräzipitation der Flag-Fusionsproteine unterzogen.

Abbildung 33 b zeigt, dass HA-DBC1 sowohl mit Flag-SIRT1 als auch mit den phosphomimetischen Mutanten Flag-SIRT1 S27D und S682D ohne Unterschiede der Signalintensitäten ko-präzipitiert. Als Negativkontrolle wurde das anti-Flag M2 Substrat mit HA-DBC1 inkubiert und weiterhin 10% des eingesetzten Lysats analysiert.

Die Bindung von HA-DBC1 an Flag-SIRT1 ist also unabhängig von der durch HIPK2-induzierten SIRT1 Phosphorylierung an S27 oder S682.

In der vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass die SIRT1 Phosphorylierung an Serin 682 durch Adriamycin stimuliert wird (3.3.1). Die Experimente zur Untersuchung der Bindung des Inhibitors DBC1 an SIRT1 deuten darauf hin, dass Adriamycin die Bindung von SIRT1 und DBC1 nicht beeinflusst. Dies befindet sich in Einklang mit den Beobachtungen der Bindungsstudie der phospho-mimetischen SIRT1 Mutanten und DBC1. Weder Phosphorylierung an S27 noch an S682 modulieren die Bindungsaffinität von DBC1 zu SIRT1. Demnach ist der Aktivitätsverlust von SIRT1 nach Adriamycinbehandlung nicht in einer verstärkten Bindung von DBC1 zu begründen. ATM-abhängige DBC1 Phosphorylierung nach oxidativem Stress und UV-Strahlung steigert hingegen die DBC1-SIRT1 Interaktion (Yuan et al., 2012), was in dieser Studie bestätigt werden konnte.

3.8.2 Die Bindung von AROS an SIRT1 ist nach DNA-Schaden verringert

In Abschnitt 3.7 konnte die posttranslationale SUMO-1-Modifikation von SIRT1 mit der Regulation der Aktivität durch Phosphorylierung an S682 in Verbindung gebracht werden. Dieses Kapitel widmet sich der Untersuchung der phosphorylierungs-abhängigen Bindung der SIRT1 Modulatoren. Im vorangehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass sich die Bindung von DBC1 an SIRT1 weder durch Applikation von Adriamycin noch durch SIRT1 Phosphorylierung verändert. Eine weitere Möglichkeit der SIRT1 Regulation besteht durch eine geänderte Bindung des zellinternen SIRT1 Aktivators AROS. AROS steigert durch die Bindung von SIRT1 dessen Deacetylaseaktivität (Kim et al., 2007).

Im Folgenden wurde die Modulation der Bindung von AROS an SIRT1 durch SIRT1 Phosphorylierung und nach Adriamycinbehandlung untersucht.

Für die Bindungsstudie wurde HA-AROS zusammen mit Flag-SIRT1 in HEK293T Zellen exprimiert und mit Adriamycin behandelt. Flag-SIRT1 wurde aus den Zelllysaten präzipitiert und die Ko-Präzipitation von HA-AROS mittels Immundetektion analysiert.

Abbildung 34 a zeigt, dass HA-AROS in unbehandelten Zellen an Flag-SIRT1 bindet (Spur 3). Nach Applikation von Adriamycin ist die Bindung von HA-AROS an Flag-SIRT1 aufgehoben, was am Verlust des Signals für HA-AROS erkennbar ist (Spur 6). Zur Kontrolle der Bindungsspezifität wurde Zelllysate sowie HA-AROS mit anti-Flag M2 Agarose-Substrat inkubiert. Es erfolgte weder eine unspezifische Bindung durch das Lysat noch eine Bindung von HA-AROS an das Substrat. Dies bedeutet, dass die Bindung von HA-AROS an Flag-SIRT1 spezifisch ist. Als Ladungskontrolle wurden 10% des eingesetzten Zelllysats untersucht.

Die Bindung von AROS und SIRT1 ist demnach durch DNA-Schaden modulierbar, da die Applikation von Adriamycin zur Komplexauflösung von SIRT1 und AROS führt.

Aufgrund dieser Beobachtung und da die SIRT1 Phosphorylierung durch HIPK2 nach DNA-Schadensinduktion stimuliert wird (vergleiche Abschnitt 3.3.1), wurde die Spezifität des beobachteten Effektes weitergehend untersucht.

Um den Einfluss von DNA-Schaden auf die Interaktion von SIRT1 und AROS in Bezug zur SIRT1 Phosphorylierung zu setzen, wurden Flag-SIRT1 sowie Flag-SIRT1 S682D und S682A zusammen mit HA-AROS in HEK293T Zellen exprimiert. Flag-Fusionsproteine wurden mittels anti-Flag M2 Agarose aus dem Lysat präzipitiert und per Immundetektion die Ko-Immunopräzipitation von HA-AROS geprüft.

Wie Abbildung 34 b zeigt, ist die Signalintensität für durch Flag-SIRT1 ko-präzipitiertes HA-AROS mit der Menge des durch Flag-SIRT1 S682A ko-präzipitierten HA-AROS vergleichbar. Die Bindung von HA-AROS an Flag-SIRT1 S682D ist im Vergleich dazu vermindert, wie anhand der verringerten Signalintensität von HA-AROS in Spur 3 zu erkennen ist.

Als Negativkontrolle wurde die Bindung von HA-AROS an das Substrat ermittelt und weiterhin wurden 10% des zur Immunpräzipitation eingesetzten Zelllysats analysiert.

Anhand dieses Experiments ist ersichtlich, dass die Interaktion von AROS und SIRT1 durch Phosphorylierung von SIRT1 an S682 reduziert wird.

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Auflösung des SIRT1-AROS Komplexes nach Adriamycin-induzierter Phosphorylierung von SIRT1 an S682 erfolgt. Demnach sollte die phosphorylierungs-defiziente SIRT1 S682A Punktmutante nach DNA-Schadensinduktion weiterhin an SIRT1 binden.

Um dies zu untersuchen, wurden Flag-SIRT1 S682A zusammen mit HA-AROS in HEK293T Zellen exprimiert und durch Adriamycinapplikation DNA-Schaden induziert. Die Präzipitation von Flag-SIRT1 S682A erfolgte mittels anti-Flag M2 Agarose. Zur Kontrolle wurde HA-AROS mit dem Agarose-Substrat inkubiert und als Ladungskontrolle 10% des für die Immunpräzipitation eingesetzten Zelllysats analysiert.

In Abbildung 34 c ist sowohl ohne als auch nach Adriamycinbehandlung ein Signal für das mit Flag-SIRT1 S682A ko-präzipitierte HA-AROS zu erkennen.

Dieses Ergebnis bestätigt die Erwartung, dass HA-AROS unabhängig von DNA-Schaden an die phosphorylierungs-defiziente Flag-SIRT1 S682A Mutante bindet.

Zusammenfassend deuten die hier beschriebenen Ergebnisse darauf hin, dass die Bindung von AROS an SIRT1 durch DNA-Schaden über die Induktion der SIRT1 S682 Phosphorylierung reduziert wird. Dies konnte sowohl durch DNA-Schadensinduktion mittels Adriamycin als auch anhand der verminderten Komplexbildung der phospho-mimetischen SIRT1 S682D Mutante mit AROS gezeigt werden. Weiterhin wurde die Notwendigkeit der SIRT1 Phosphorylierung an S682 für die Komplexauflösung von AROS und SIRT1 durch die unter DNA-Schadensbedingungen bestehenbleibende Komplexbildung von AROS durch die phosphorylierungs-defiziente SIRT1 S682A Mutante bestätigt.

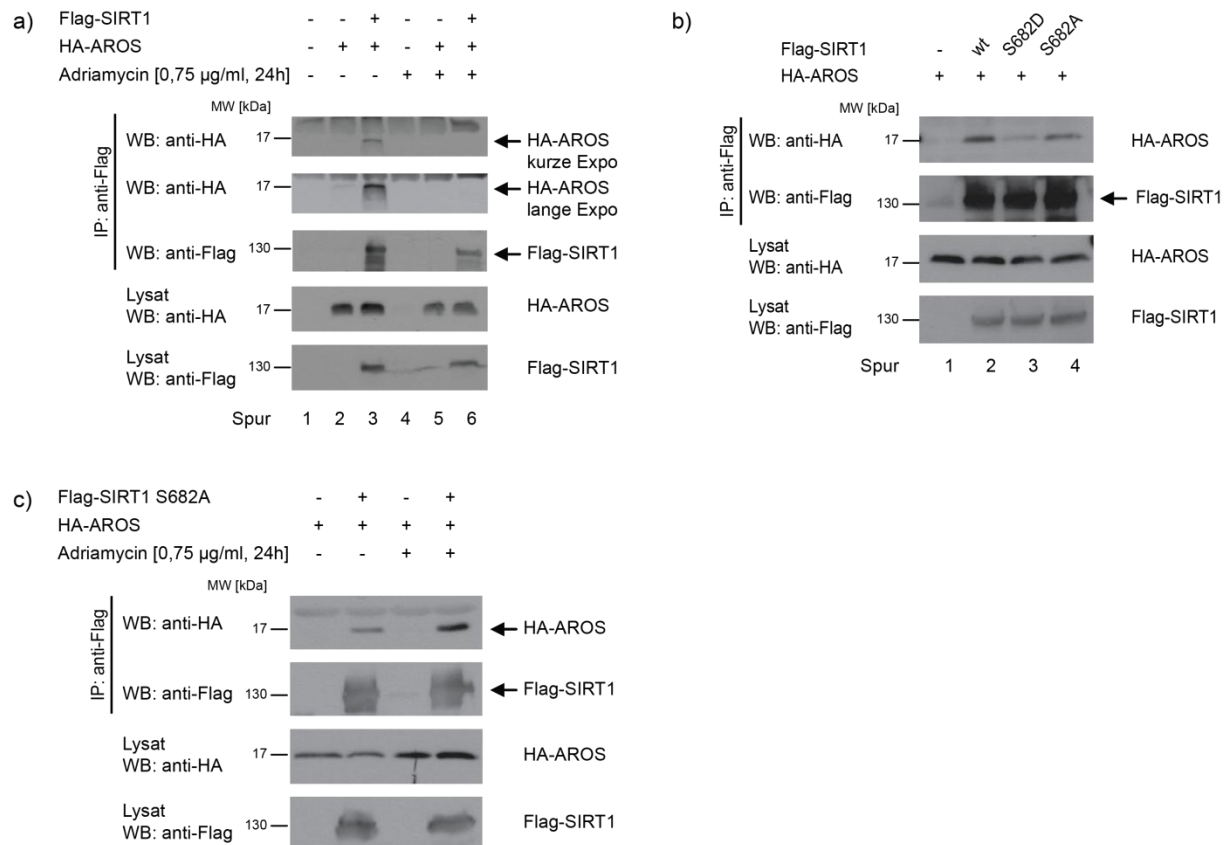


Abbildung 34: Die Bindung von AROS wird durch SIRT1 Phosphorylierung an Serin 682 moduliert.

a) Expression von Flag-SIRT1 (0,25 µg) zusammen mit HA-AROS (3 µg) in HEK293T Zellen und anschließende Behandlung mit Adriamycin (0,75 µg/ml, 24h). Flag-SIRT1 wurde mittels anti-Flag M2-Agarose präzipitiert. Die Bindungsspezifität sowie die Ladung (10% de Lysats) wurden kontrolliert. b) Expression von Flag-SIRT1 sowie Flag-SIRT1 S682D und S682A (je 0,25 µg) zusammen mit HA-AROS (3 µg) in HEK293T Zellen. Flag-Fusionsproteine wurden mittels anti-Flag M2-Agarose präzipitiert. Zur Kontrolle wurden 10% des eingesetzten Lysats sowie die Spezifität der Bindung an das Agarose-Substrant untersucht. c) Flag-SIRT1 S682A (0,25 µg) und HA-AROS (3 µg) wurden in HEK293T Zellen exprimiert und mittels anti-Flag M2-Agarose präzipitiert. DNA-Schaden wurde durch Applikation von Adriamycin (0,75 µg/ml, 24h) induziert. Die Kontrollen erfolgten wie unter a) beschrieben.

3.9 HIPK2 phosphoryliert die SIRT1 Modulatoren AROS und DBC1

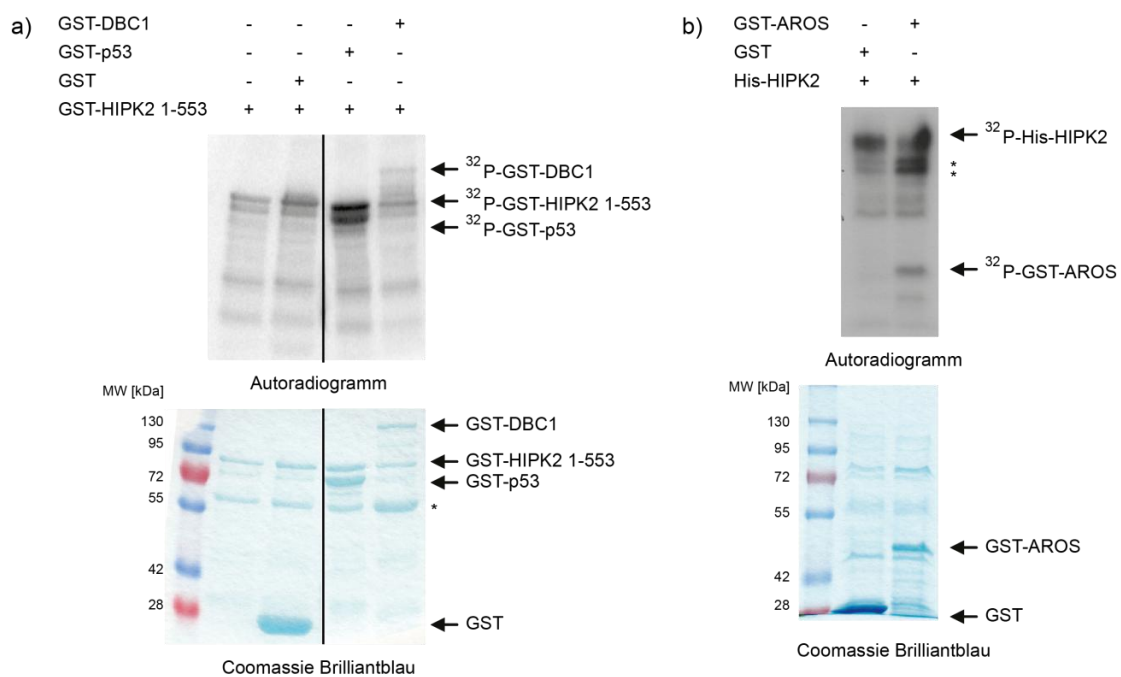
Zuletzt wurde untersucht, ob die SIRT1 Modulatoren, DBC1 und AROS, selbst durch HIPK2 phosphoryliert werden. Dies könnte auf eine weitere Regulation dieser Signalkaskade durch HIPK2 hinweisen.

Die Aminosäuresequenz von DBC1 weist SP und TP- Stellen auf. Dies sind von HIPK2 bevorzugte Motive. Daher wurde untersucht, ob HIPK2 möglicherweise die SIRT1 Regulation seitens der SIRT1 Modulatoren durch Phosphorylierung beeinflussen kann.

Dies wurde durch *in vitro* Kinasereaktionen geprüft. Die im Versuch eingesetzten rekombinanten GST-Proteine wurden aus *E. coli* BL21 pLysS gereinigt und in vergleichbaren Mengen für die Kinasereaktion eingesetzt.

Wie das Autoradiogramm von Abbildung 35 a zeigt, wird GST-DBC1 *in vitro* von GST-HIPK2 1-553 phosphoryliert, nicht aber die Negativkontrolle GST. Als Positivkontrolle wurde GST-p53 verwendet, welches durch GST-HIPK2 1-553 phosphoryliert wird. Die Färbung des SDS-Gels mit Coomassie Brilliantblau diente zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen.

Im Gegensatz zu DBC1 weist der Aktivator AROS keine HIPK2 Phosphorylierungsstellen auf. Dennoch wurde GST-AROS für eine *in vitro* Kinasereaktion eingesetzt, da bekannt ist, dass HIPK2 alternative Stellen im Protein phosphorylieren kann (Rinaldo et al., 2012; Saul et al., 2012).



Im Autoradiogramm der Abbildung 35 b ist die Phosphorylierung von GST-AROS durch His-HIPK2 gezeigt. Auch die hier eingesetzten rekombinanten His- und GST-Proteine wurden aus *E. coli* BL21 pLysS gereinigt und in vergleichbaren Mengen eingesetzt (vergleiche Coomassie Brilliantblau Färbung). GST-AROS aber nicht GST alleine wird von His-HIPK2 phosphoryliert. Als Positivkontrolle wurde die HIPK2-Autophosphorylierung herangezogen.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die SIRT1 Modulatoren DBC1 und AROS von HIPK2 *in vitro* phosphoryliert werden. Die funktionellen Auswirkungen der

Phosphorylierungen sowie die Beteiligung von HIPK2 an einer alternativen SIRT1 Regulation wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

4 Diskussion

Die Serin/Threonin-Kinase "Homeodomain interacting protein kinase" 2 (HIPK2) besitzt eine wichtige Funktion in der Regulation der p53-induzierten Apoptose. Es wurde in unserer Arbeitsgruppe entdeckt, dass nach DNA-Schädigung HIPK2 durch die Phosphorylierung von p53 an Serin (S) 46 dessen Acetylierung an Lysin (K) 382 über einen bisher unbekanntem Mechanismus potenzieren kann. Diese Acetyl-Modifikation erhöht die Affinität von p53 zu Promotoren proapoptotischer Zielgene, woraufhin deren Expression stimuliert und Apoptose eingeleitet wird.

In ungestressten Zellen existiert ein Mechanismus, der die Proteinstabilität von HIPK2 reguliert und so die proapoptotischen Funktionen der Kinase unterdrückt. Unter diesen Bedingungen bildet HIPK2 einen Komplex mit E3-Ubiquitin-Ligasen, welche HIPK2 durch Konjugation von Polyubiquitinketten der proteasomalen Degradation zuführen. In Folge von DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung sowie Applikation von Chemotherapeutika wird unter anderem die E3-Ubiquitin-Ligase Siah-1 von ATM phosphoryliert, worauf sich der HIPK2-Siah-1 Komplex löst. HIPK2 wird stabilisiert und durch Autophosphorylierung aktiviert (Kim et al., 1998; Hofmann et al., 2000; D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Stefano et al., 2004; Dauth et al., 2007; Winter et al., 2008; Puca et al., 2009; und vergleiche 1.2).

Die Klasse III Histondeacetylase "Silent mating type information regulation 2 Type" 1 (SIRT1), ist in vielfältige Regulationsmechanismen der zellulären Homöostase, wie Metabolismus, Zellalterung sowie Apoptose involviert. SIRT1 hat nicht ausschließlich Histone als Zielproteine, sondern unter anderem auch Effektoren der DNA-Reparatur, des Glucose- und Fettstoffwechsels sowie den Tumorsuppressor p53 (siehe 1.4).

SIRT1 reduziert die p53-vermittelte Apoptoseinduktion durch dessen Deacetylierung an Lysin 382 und setzt dadurch die Transkription proapoptotischer Zielgene herab. Daher wird die Funktion von SIRT1 als Tumorsuppressor oder -promotor diskutiert (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001; Langley et al., 2002; Puca et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009; Donmez et al., 2010; Herranz et al., 2010).

SIRT1 hat durch die Regulation des Glucosestoffwechsels positive Auswirkungen auf altersbedingte Krankheiten, wie Typ II Diabetes und Alzheimer (Donmez et al., 2010; Herranz et al., 2010). Aufgrund dessen ist SIRT1 infolge eines breiten öffentlichen Interesses in den letzten Jahren eines der meist untersuchtesten Proteine der verschiedensten Teilgebiete der Biologie geworden. Bisher wurde die Regulation von SIRT1 durch verschiedene transkriptionelle und translationale Mechanismen beschrieben, allerdings sind nur wenige Mechanismen zur Regulation von SIRT1 durch posttranslationale Modifikationen bekannt.

Sowohl HIPK2 als auch SIRT1 besitzen Schlüsselrollen in der Apoptose. HIPK2 initiiert die proapoptotische Zellantwort durch Phosphorylierung von p53 an S46. Diese

Phosphorylierung stimuliert die p53 Acetylierung an K382, was zu der erhöhten Transkription proapoptotischer p53 Zielgenen führt (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Puca et al., 2009). SIRT1 hingegen vermindert die p53 Zielgenexpression durch Deacetylierung von K382 und hemmt somit die Einleitung von Apoptose (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001).

Es wurde unabhängig voneinander beschrieben, dass sowohl HIPK2, SIRT1 als auch p53 in PML-Kernkörpern lokalisieren (Kim et al., 1999; Pearson et al., 2000; D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Langley et al., 2002). Es wird vermutet, dass die genannten Proteine in PML-Kernkörpern zusammengeführt werden, um posttranslationale Modifikationen wechselseitig zu koordinieren.

Die Gegenläufigkeit von SIRT1 und HIPK2 in der Regulation der p53-vermittelten Apoptose und das Zusammentreffen von SIRT1 und HIPK2 in PML-Kernkörpern legen eine wechselseitige Regulation von SIRT1 und HIPK2 nahe.

Die vorliegende Arbeit zeigt einen neuen molekularen Regulationsmechanismus der HIPK2-vermittelten Apoptose durch Phosphorylierung von SIRT1 und daraus resultierender Hemmung der Deacetylasefunktion auf. Durch diesen Mechanismus wird DNA-schadensabhängig die p53-vermittelte Apoptose induziert.

4.1 SIRT1 wird von HIPK2 DNA-schadensabhängig phosphoryliert

HIPK2 ist eine DNA-schadensaktivierte Kinase, die vorrangig Serin- und Threoninreste (T), denen ein Prolin (P) folgt (SP und TP), phosphoryliert (Hofmann et al., 2000). SIRT1 weist sechs SP und zwei TP Motive in der Aminosäuresequenz auf.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass SIRT1 sowohl *in vitro* (Abbildung 4, 5 und 6 a) als auch in Zellen (Abbildung 6 b, 7 und 8) an den Serinen 27 und 682 von HIPK2 phosphoryliert wird. In einer humanen Osteosarkomzelllinie (U2OS) ist die Phosphorylierung von SIRT1 an S682, nicht aber diejenige an S27, durch Applikation von Adriamycin induzierbar (Abbildung 14). Die Phosphorylierung von SIRT1 an S682 ist 24 Stunden nach der Behandlung am stärksten ausgeprägt. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Stabilisierung von HIPK2 zu späten Zeitpunkten nach der DNA-Schadensinduktion (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Di Stefano et al., 2004; Dauth et al., 2007). Weiterhin korreliert die SIRT1 Phosphorylierung an S682 mit der gesteigerten Phosphorylierung von p53 an S46 sowie Acetylierung an K373 und K382 nach Adriamycinbehandlung. Die vollständige Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade wurde anhand der Prozessierung von PARP überprüft. Demnach tritt die Induktion der SIRT1 Phosphorylierung an S682 während der proapoptischen Zellantwort auf.

Doxorubicin (auch Adriamycin genannt) wird seit 40 Jahren als Chemotherapeutikum zur Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen, wie zum Beispiel zur Behandlung von Osteosarkomen, eingesetzt. Adriamycin inhibiert die DNA-Synthese, da es die Separierung

der DNA-Stränge durch Interkalation erschwert und die zur Elongation benötigten Helikasen bzw. DNA-Polymerasen hemmt. Da Adriamycin zur Gruppe der Anthracycline gehört, ist ein Merkmal, die Erzeugung freier Radikale. Dies wiederum führt zu Oxidationsreaktionen, zum Beispiel an Proteinen und Basen der DNA. Eine weitere Konsequenz der Behandlung mit Adriamycin ist die Hemmung der Topoisomerase II nach Inzision des DNA-Strangs. Daraus resultieren DNA-Strangbrüche und die Initiation der DNA-Schadensantwort (vergleiche 1.1, Painter, 1978; Gewirtz, 1999).

Im Rahmen unserer Studie wurde ausgenutzt, dass Adriamycin eine gewisse Spezifität bezüglich der Form der eingeleiteten Apoptose hat. Es wurde beschrieben, dass NF κ B-vermittelter Zelltod nicht durch Adriamycin induziert wird (Campbell et al., 2004; Ho et al., 2005). Dies ist insofern von Vorteil, da SIRT1-vermittelte Deacetylierung von NF κ B die TNF- α -induzierte Apoptose vermittelt (Yeung et al., 2004) und somit in der vorliegenden Studie die p53-vermittelte Apoptose nach Applikation von Adriamycin untersucht werden konnte (siehe 4.3.2).

Für die stresssensitiven und proapoptotischen Kinasen, JNK1 und 2, wurde beschrieben, dass diese SIRT1 an S27 phosphorylieren. Die Phosphorylierung von SIRT1 an dieser Stelle reguliert sowohl die enzymatische Aktivität von SIRT1 als auch dessen Proteinstabilität.

Die JNK2-abhängige SIRT1 Phosphorylierung reguliert p53-abhängig die SIRT1 Proteinstabilität (Ford et al., 2008). Die SIRT1 Phosphorylierung an S27 durch JNK1 scheint hingegen ausschließlich die Substratspezifität von SIRT1 für Histon H3 zu beeinflussen, wobei die Deacetylaseeigenschaften in Bezug auf p53 unverändert bleiben (Nasrin et al., 2009).

Da HIPK2 über Daxx, MKK4 und MKK7 nach Schadensinduktion JNK1 aktiviert, könnte die Phosphorylierung von SIRT1 an Serin 27 in Zellen ein indirekter über JNK1-vermittelter Effekt von HIPK2 sein, der sich nicht in einer veränderten Affinität von SIRT1 zu p53 niederschlägt (Hofmann et al., 2003; Wang et al., 2006). Dies könnte ein weiterer HIPK2-vermittelter Effekt der SIRT1 Regulation sein. In einer *in vitro* Kinasereaktion konnte die direkte Phosphorylierung von SIRT1 an S27 durch HIPK2 festgestellt werden (Abbildung 5). Daher besteht die Möglichkeit, dass die Phosphorylierung des Serins 27 in Zellen durch HIPK2 vermittelt wird, dadurch aber keiner Veränderung der Deacetylaseaffinität von SIRT1 gegenüber p53 hervorgerufen wird, wie es bereits für JNK1-abhängige SIRT1 Phosphorylierung beschrieben wurde (Nasrin et al., 2009).

Des Weiteren phosphorylieren DYRK1 und DYRK3 in U2OS Zellen nach Behandlung mit Etoposid SIRT1 an T522. Sowohl DYR-Kinasen und als auch HIP-Kinasen sind Mitglieder einer Proteinfamilie. Die DYRK1- und DYRK3-vermittelte Phosphorylierung von SIRT1 steigert die Deacetylasefunktion und reduziert die Proteinmengen an acetyliertem p53. DYRK1 und DYRK3 steigern dadurch SIRT1-abhängig das Zellüberleben, da die Expression

proapoptotischer p53-Zielgene inhibiert wird (Guo et al., 2010). Die HIPK2-verwandten Kinasen DYRK1 und DYRK3 unterdrücken demnach die p53-induzierte Apoptose und vermitteln das Zellüberleben. Dies könnte zur Eigenschaft von SIRT1 als Tumorpromotor beitragen und aus der Art des vorliegenden DNA-Schadens resultieren. Etoposid, das Glycosid des Naturstoffs Podophyllotoxin, verfügt nicht über die Anthrachinonstruktur von Adriamycin und somit erfolgt durch Etoposid keine Steigerung der intrazellulären ROS. Dennoch hemmt Etoposid, wie Adriamycin, die Topoisomerase II und induziert DNA-Strangbrüche (Fleming et al., 1989).

Darüber hinaus sind Phosphomodifikationen von SIRT1 an Threonin (T) 530 und S540 durch die zellzyklusregulierende Kinase "Cyclin-abhängige Kinase" 1 (CDK1) und Cyclin B bekannt, welche die Deactylaseaktivität von SIRT1 verringern. Die reduzierte enzymatische Aktivität von SIRT1 erleichtert die Zellzyklusprogression. Die durch CDK1/CyclinB phosphorylierten Aminosäuren sind zwischen Säugern hochkonserviert (Sasaki et al., 2008). Das in der vorliegenden Arbeit identifizierte und durch HIPK2 phosphorylierte S682 von SIRT1 ist ebenfalls konserviert, wie in Abbildung 36 durch Vergleichsanalysen der SIRT1 Proteinsequenzen von *H. sapiens*, *M. musculus* und *X. laevis* gezeigt ist. Weitere Vergleichsanalysen der SIRT1 Proteinsquenzen ergaben, dass das Serin an Stelle 27 im Gegensatz zu demjenigen an Stelle 682 nicht konserviert ist.

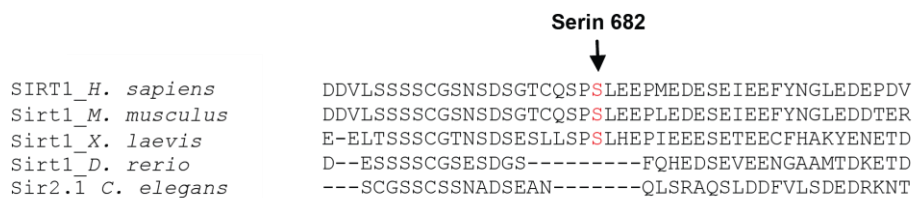


Abbildung 36: Schematische Darstellung eines Ausschnitts der Aminosäuresequenz von SIRT1.

Veranschaulichung der Konservierung des Serins an Stelle 682 von SIRT1 zwischen verschiedenen Spezies. SIRT1 aus *H. sapiens*, *M. musculus* und *X. laevis* weisen ein Serin an dieser Stelle auf. In *D. rerio* und *C. elegans* ist die Phosphorylierungsstelle jedoch nicht konserviert.

Aufgrund der publizierten Ergebnisse und der Erkenntnisse der Proteinsequenzanalyse spricht die Phosphorylierung des S682 von SIRT1 für eine wichtige Rolle in der SIRT1 Aktivitätsregulation durch posttranslationale Modifikation, wie es schon für andere Phosphomodifikationen an SIRT1 beschrieben wurde (Ford et al., 2008; Sasaki et al., 2008; Nasrin et al., 2009; Guo et al., 2010).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass SIRT1 von HIPK2 an den Serinen 27 und 682 *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung an S682 ist DNA-schadenssensitiv und steigt nach Adriamycinapplikation sowohl dosisabhängig als auch über die Zeit an. Adriamycin erzeugt verschiedene Arten von Schaden in der Zelle, wie zum

Beispiel durch ROS hervorgerufene Oxidationen von Basen und Proteinen und Einzel- sowie Doppelstrangbrüche. DNA-Schaden wiederum stabilisiert und aktiviert HIPK2, was mit der SIRT1 Phosphorylierung an S682 korreliert (Gewirtz, 1999; Dauth et al., 2007; de la Vega et al., 2012).

4.2 DNA-Schaden verstärkt die Bindung von SIRT1 und HIPK2

In Abschnitt 4.1 wurde diskutiert, dass SIRT1 durch HIPK2 phosphoryliert wird und dass die Phosphorylierung an S682 durch DNA-schädigende Applikation von Adriamycin verstärkt wird. Diese Beobachtung impliziert, dass beide Proteine schadensabhängig miteinander interagieren, woraufhin die SIRT1 Phosphorylierung durch HIPK2 induziert wird.

Übereinstimmend mit der Vermutung wurde eine Interaktion von SIRT1 und HIPK2 sowohl auf endogener Ebene (Abbildung 10) als auch nach Überexpression beider Proteine (Abbildung 9) gefunden. Darüber hinaus wird die Bindung von SIRT1 und HIPK2 durch Adriamycinbehandlung verstärkt. Dieses Ergebnis korreliert mit der SIRT1 Phosphorylierung an Serin 682 nach Applikation von Adriamycin und kann somit durch die verstärkte Interaktion von HIPK2 und SIRT1 nach DNA-Schaden erklärt werden.

Die Bindung von SIRT1 an HIPK2 wurde detaillierter charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass SIRT1 an die N-terminale, konservierte Kinasedomäne von HIPK2 bindet, während HIPK2 mit der zentralen SIR Domäne von SIRT1 interagiert.

Wie anhand der Kartierung der Interaktion von HIPK2 an SIRT1 in Abbildung 11 b zu erkennen ist, erfolgt die Bindung an die isolierte SIR Domäne. Ist aber der N- oder C-terminale Bereich von SIRT1 vorhanden (vergleiche die schematische Darstellung in Abbildung 11 c) bindet HIPK2 in geringerem Ausmaß. Dies kann in Zusammenhang mit den regulatorischen Effekten der N- und C-terminalen Bereiche von SIRT1 stehen, da diese Abschnitte durch intramolekulare Konformationsänderung mit der SIR Domäne wechselwirken und dadurch die Deacetylaseaktivität von SIRT1 steigern können (Kang et al., 2011; Pan et al., 2012).

Der SIRT1 Inhibitor "Deleted in Breast Cancer 1" (DBC1) bindet ebenfalls an die SIR Domäne von SIRT1 und reduziert dadurch die enzymatische Aktivität von SIRT1 (Kim et al., 2008; Zhao et al., 2008; 1.4.1.4). Es wurde beschrieben, dass DBC1 mit der ESA Domäne (vergleiche Abbildung 3) von SIRT1 kompetitiv um die Bindung der SIR Domäne konkurriert (Kang et al., 2011). Ein vergleichbarer Mechanismus der SIRT1 Inhibition durch Bindung von HIPK2 an die SIR Domäne ist denkbar.

ATM-abhängige Phosphorylierung von DBC1 nach genotoxischem Stress verstärkt die Bindungsaffinität von DBC1 bezüglich SIRT1. Dies reduziert die intramolekulare Bindung der ESA Domäne an die SIR Domäne und vermindert die Deacetylaseaktivität von SIRT1 (Yuan

et al., 2012). Ein ähnlicher Mechanismus der phosphorylierungsabhängigen SIRT1 Inaktivierung könnte durch HIPK2 erfolgen.

Die publizierten Daten konnten reproduziert und eine verstärkte Bindung von DBC1 und SIRT1 nach oxidativem Stress (H_2O_2) und UV-C Strahlung nachgewiesen werden (Abbildung 33 a). HIPK2 und DBC1 konkurrieren nicht um die Bindung der SIR Domäne von SIRT1, wie durch die unveränderte Affinität von DBC1 zu SIRT1 nach Applikation von Adriamycin gezeigt werden konnte (Abbildung 33 a). Weiterhin bewirkt die SIRT1 Phosphorylierung an S682 keine Steigerung der Bindung von DBC1 an SIRT1 (Abbildung 33 b). Dies legt nahe, dass HIPK2 nicht mit DBC1 um die Bindung der SIR Domäne konkurriert und dass HIPK2 die SIRT1 Inaktivierung anderweitig vermittelt (siehe Kapitel 4.3.2). Daher scheint es sich bei der SIRT1 Phosphorylierung durch HIPK2 nicht um einen verstärkenden Effekt der DBC1 Bindung zu handeln, sondern vielmehr um zwei getrennte Wege der SIRT1 Inaktivierung nach DNA-Schaden.

Die Bindungseigenschaften von Proteinen können weiterhin durch Modifikation mit SUMO-1 Resten verändert werden. Die kovalente Konjugation von SUMO-1 an bestimmte Motive, wie (V,I,L)KxE, von Proteinen ermöglicht die Interaktion mit "SUMO-interacting motifs" (SIMs) anderer Proteine und kann dadurch die Bindung zweier Proteine verstärken (Rodriguez et al., 2001; Hecker et al., 2006; Roscic et al., 2006; Kerscher, 2007).

SIRT1 und HIPK2 werden ebenfalls SUMOyliert (Kim et al., 1999; Gresko et al., 2005; Hofmann et al., 2005; Yang et al., 2007). Die SUMO-Modifikation von SIRT1 erfolgt an K734 und wirkt aktivitätssteigernd. Nach Induktion von genotoxischem Stress, wie UV-C Strahlung und H_2O_2 Behandlung, wird der SUMO-1 Rest durch die Protease SENP1 abgespalten, was die Deacetylaseaktivität von SIRT1 reduziert (Yang et al., 2007). Auch HIPK2 liegt bei einer erhöhten intrazellulären Konzentration von ROS deSUMOyliert vor (de la Vega et al., 2012). Die Interaktion von SIRT1 und HIPK2 ist nach Adriamycinapplikation verstärkt (Abbildung 9), daher wurde der Frage nachgegangen, inwiefern SUMOylierung an der Bindung beider Proteine beteiligt ist.

Beide durch Punktmutation nicht SUMOylierbaren Proteine, SIRT1 K734R und HIPK2 K25R, binden verstärkt aneinander, und dies bereits in Abwesenheit von DNA-Schaden (Abbildung 30). Das Ergebnis steht in Einklang damit, dass sowohl SIRT1 als auch HIPK2 nach DNA-Schädigung in DeSUMOyliertem Zustand vorliegen und nach genotoxischem Stress die Bindung von SIRT1 und HIPK2 verstärkt ist (Abbildungen 9 und 10). Somit könnte die verstärkte Bindung zu einer effizienteren HIPK2-vermittelten Phosphorylierung von SIRT1 nach DNA-Schädigung beitragen.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit die durch DNA-Schaden regulierte Bindung von SIRT1 und HIPK2 gefunden wurde, welche nach Adriamycinapplikation verstärkt wird. Die Bindung beider Proteine ist durch die

Kinasedomäne von HIPK2 und die SIR Domäne von SIRT1 vermittelt. Weiterhin steht die Bindung von HIPK2 nicht in Konkurrenz mit dem SIRT1 Inhibitor DBC1, da die Interaktion von DBC1 an SIRT1 durch Adriamycingabe nicht verstärkt wird. Darüber hinaus ist die SUMOylierung von SIRT1 und HIPK2 für deren Bindung nicht erforderlich, da die Interaktion der SUMOylierungs-defizienten Punktmutanten im Vergleich zu den wildtyp Proteinen sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Adriamycin erhöht ist.

4.3 HIPK2 reguliert SIRT1

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HIPK2 in die posttranslationale Regulation von SIRT1 durch Phosphorylierung der Serine 27 und 682 involviert ist.

Zusätzlich gibt es Hinweise, dass HIPK2 auf transkriptioneller Ebene die SIRT1 Expression reguliert.

4.3.1 HIPK2 ist in die transkriptionelle Regulation von SIRT1 involviert

Der Einfluss von HIPK2 auf die Expression bzw. Stabilität von SIRT1 kann sowohl nach ektopischer Expression von HIPK2 anhand von steigenden SIRT1 Proteinmengen (Abbildung 18 a) als auch nach HIPK2 "knock-down" (kd) in U2OS Zellen (Abbildung 15) und in *Hipk2*^{-/-} MEF (Abbildung 16) anhand der Reduktion der SIRT1 Proteinmengen beobachtet werden. Um die möglichen Ursachen, die den beschriebenen Effekt hervorrufen, aufzuklären, wurden verschiedene Aspekte der Regulation der SIRT1 Proteinmengen untersucht.

Es wurde bereits berichtet, dass die JNK2-vermittelte Phosphorylierung von SIRT1 an S27 dessen Proteinstabilität erhöht (Ford et al., 2008). Daher lag es nahe, einen ähnlichen Ansatz zu verfolgen, um die Proteinstabilität von SIRT1 in Abhängigkeit der HIPK2-vermittelten Phosphorylierung zu beobachten.

Hierfür wurden im U2OS Zellmodell sowohl das wildtyp Protein als auch die phosphorylierungs-defizienten Punktmutanten, SIRT1 S27A und S682A bezüglich ihrer Proteinstabilität nach Hemmung der Translation durch Cycloheximid (CHX) untersucht (vergleiche 5.2.3.6). Die phosphorylierungs-defizienten SIRT1 Mutanten, S27→A und S682→A, tragen eine Punktmutation zu Alanin, wodurch keine Phosphomodifikation durch HIPK2 an diesen Stellen erfolgen kann.

Die Behandlung der Zellen mit CHX führte nicht zu der erwarteten Veränderung der Proteinstabilität der SIRT1 S27A bzw. S682A Punktmutanten gegenüber dem wildtyp Protein (Abbildung 18 b). Bezüglich der JNK2-abhängigen SIRT1 Stabilität muss darauf hingewiesen werden, dass diese Studie in HCT116 Kolorektalkarzinomzellen durchgeführt wurde (Ford et al., 2008). Die Zelllinienspezifität des beobachteten Effektes nach CHX Applikation wird weiterhin durch eine Studie zur Untersuchung der Proteinstabilität von

SIRT1 in Bezug auf "Ubiquitin-specific peptidase" 22 (USP22) bestätigt. In HCT116 und HEK293 Zellen konnte gezeigt werden, dass die SIRT1 Proteinstabilität in Anwesenheit von USP22 unempfindlich gegenüber CHX Behandlung sowie proteasomaler Degradation ist (Lin et al., 2012). Der zelllinienspezifischen Effekt kann in der unterschiedlichen Ploidität und Herkunft der Zellen begründet sein. U2OS Zellen sind poliplodide Knochenkrebszellen, wohingegen es sich bei HCT116 Zellen um diploide Kolorektalkarzinomzellen handelt. Die Poliploidität der U2OS Zellen zieht chromosomale Aberrationen nach sich und aufgrund der Gewebsdiversität können unterschiedliche Genexpressionsmuster vorliegen. Weitere Gründe für die unterschiedlichen Beobachtungen der SIRT1 Proteinstabilität nach CHX Behandlung können aus der CHX-Konzentration sowie der Dauer der Behandlung resultieren.

Aufgrund der beschriebenen Beobachtung ist es naheliegende, dass die SIRT1 Proteinstabilität nicht auf HIPK2-vermittelter Phosphorylierung des S27 und S682 beruht, daher sollte der Signalweg der SIRT1 Destabilisierung detaillierter untersucht werden. Dazu wurde U2OS Zellen mit Inhibitoren des proteasomalen, lysosomalen (Abbildung 19 a und b) und Caspase-abhängigen (Daten nicht gezeigt) Degradationssignalweges behandelt. Die Ergebnisse zeigen, dass die SIRT1 Proteinmengen in U2OS Zellen durch keinen der untersuchten Inhibitoren beeinflusst wird, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass unter diesen Bedingungen eine SIRT1 Regulation erfolgt. Allerdings kann auch in diesem Fall ein zelllinienspezifischer Effekt nicht ausgeschlossen werden, da es sowohl in HCT116 Zellen als auch MEF durch MG-132 vermittelte Inhibition der proteasomalen Degradation zu einer Anreicherung der SIRT1 Proteinmengen kommt. Dies wurde in Bezug auf die USP22-vermittelte Deubiquitylierung und der daraus resultierenden Stabilisierung von SIRT1 festgestellt (Lin et al., 2012).

Ein weiterer Mechanismus der Regulation der Proteinmengen ist die Genexpression. Die SIRT1 Genexpression wird nach DNA-Schädigung auf transkriptioneller Ebene reguliert, wie zum Beispiel durch den Transkriptionsfaktor E2F1. SIRT1 wiederum bindet E2F1 und bildet durch Deacetylierung des Transkriptionsfaktors eine negative Rückkopplung (Wang et al., 2006). Auch p53 reguliert in FOXO3a-abhängiger Weise die SIRT1 Expression, wohingegen SIRT1 durch Deacetylierung von FOXO und p53 deren proapoptische Aktivität herabsetzt, die Induktion von Zellzyklusarrest und Stressresistenz aber nicht beeinträchtigt (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001; Brunet et al., 2004; Motta et al., 2004; Nemoto et al., 2004).

Ähnliches könnte für eine transkriptionelle Regulation durch HIPK2 gelten. Eine Rolle von HIPK2 als transkriptioneller Ko-Repressor ist im Komplex mit PcG-Proteinen und Homeotranskriptionsfaktoren sowie in der Vimentin Regulation bekannt (Kim et al., 1998; Roscic et al., 2006; Nodale et al., 2012). Kürzlich wurde bekannt, dass HIPK2 bei geringen Dosen oxidativen Stress als Ko-Aktivatoren der Expression ROS-detoxifizierender Gene wirkt

(de la Vega et al., 2012). Daher wäre es möglich, dass HIPK2 als Ko-Aktivator der SIRT1 Expression fungiert. Dies wurde in HIPK2 RNAi Experimenten in Osteosarkomzellen (U2OS) untersucht.

Nach Depletion von HIPK2 in U2OS Zellen wurde eine Reduktion von SIRT1 Proteinmengen beobachtet und dieser Effekt ist durch Adriamycinapplikation nicht revertierbar (Abbildung 15). Die Reduktion der SIRT1 Proteinmengen beruht auf einer Depletion der SIRT1 mRNA Mengen um 50-90% (Abbildung 20). Die Schwankungen resultieren aus unterschiedlichen HIPK2 "knock-down" Effizienz in U2OS Zellen. Diese Beobachtung konnte auf Proteinebene spezieübergreifend in immortalisierten Tamoxifen induzierbaren *Hipk2*^{flox/flox;Rose26-CreERT2} und *Hipk2*^{-/-} MEF bestätigt werden (Abbildung 16). In diesem Fall sind die SIRT1 mRNA Mengen in *Hipk2*^{-/-} MEF um 70% reduziert (Abbildung 21).

Daraus kann gefolgert werden, dass es sich bei der SIRT1 Depletion sowohl in U2OS Zellen als auch in *Hipk2*^{-/-} MEF um eine transkriptionelle durch HIPK2-vermittelte Reduktion der SIRT1 Proteinmengen handelt. Demnach fungiert HIPK2 als ein transkriptioneller Ko-Aktivator der SIRT1 Expression. Die JNK2-vermittelte SIRT1 Stabilisierung durch Phosphorylierung an S27 wurde ebenfalls mittels JNK2 RNAi in HCT116 Zellen verifiziert. Allerdings verbleiben die SIRT1 mRNA Mengen durch JNK2 kd unverändert und somit beeinflusst JNK2 die SIRT1 Expression nicht (Ford et al., 2008).

Wenn HIPK2 die SIRT1 Transkription positiv reguliert, könnte es wichtig sein, dass HIPK2 einen effizienten Mechanismus zur SIRT1 Inaktivierung besitzt, da Zellen ansonsten wegen fehlender Initiation von Apoptose einer erhöhten Mutationsrate durch SIRT1 ausgesetzt sein könnten (O'Hagan et al., 2008; Wang et al., 2012). Dies ist ein therapeutisch relevanter Aspekt, da "multi-drug resistant" (MDR) Tumore nach der Chemotherapie erhöhte Mengen an SIRT1 mRNA Mengen aufweisen. SIRT1 "knock-down" kann den MDR-Phänotyp teilweise revertieren (Chu et al., 2005). Daher wäre es naheliegend zu untersuchen, ob Tumore, die erhöhte SIRT1 mRNA Spiegel aufweisen, ebenfalls erhöhte HIPK2 Proteinmengen besitzen.

Im Hinblick auf die Regulation der SIRT1 Proteinstabilität durch HIPK2 konnte gezeigt werden, dass HIPK2 weder phosphorylierungsabhängig die Stabilität von SIRT1 erhöht noch die proteasomale bzw. lysosomale Degradation beeinflusst. Vielmehr ist HIPK2 ein transkriptioneller Ko-Aktivator der SIRT1 Expression. Besonders interessant könnte dies bezüglich der Therapie von MDR-Tumoren sein, da diese erhöhte SIRT1 mRNA Spiegel aufweisen (Chu et al., 2005).

4.3.2 SIRT1 wird nach Phosphorylierung an S682 durch HIPK2 inaktiviert

Wie in Kapitel 4.1 diskutiert wurde, wird SIRT1 durch HIPK2 auf posttranslationaler Ebene modifiziert. Da die Fragestellung der Arbeit, die Regulation von SIRT1 nach DNA-Schaden

bezüglich der Apoptoseinduktion ist, wurde der Tumorsuppressor p53 als Zielprotein der Untersuchungen genutzt (vergleiche 1.3). Im Rahmen der Studie wurde das Chemotherapeutikum Adriamycin zur Induktion von DNA-Schaden verwendet. Hierbei ist von Vorteil, dass Adriamycin nicht den NF κ B-vermittelten Zelltod induziert (Campbell et al., 2004; Ho et al., 2005).

Es ist bekannt, dass SIRT1 p53 an Lysin 382 deacetyliert, was dessen proapoptotische Aktivität herabsetzt (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001; Langley et al., 2002). Die SIRT1 Aktivität ist wiederum über Phosphorylierung durch DNA-schadensinduzierte Kinasen reguliert. JNK1-vermittelte SIRT1 Phosphorylierung an S27 steigert die SIRT1 Aktivität bezüglich der Deacetylierung von Histon H3 (Nasrin et al., 2009). Phosphorylierung von SIRT1 durch die HIPK2 verwandten Kinasen, DYRK1 und DYRK3, steigert dessen enzymatische Aktivität in Bezug auf die Deacetylierung von p53 an K382 und reduziert somit die Induktion von Apoptose (Guo et al., 2010).

Das Serin 682 von SIRT1 ist stark konserviert, daher liegt eine regulatorische Wirkung durch Modifikation dieses Restes bezüglich der SIRT1 Aktivität nahe, wie es bereits für die Reduktion der SIRT1 Aktivität durch Phosphorylierung von konservierten Resten durch CDK1/CyclinB gezeigt wurde (Sasaki et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die DNA-schadensensitive Phosphorylierung von SIRT1 an S682 eine negative Regulation der SIRT1 Deacetylaseaktivität bewirkt. Anhand der Acetyllevel von p53 wurde die Aktivität von SIRT1 zum einen in Gegenwart von HIPK2, und zum anderen durch phospho-mimetische SIRT1 Punktmutanten in An- und Abwesenheit von DNA-schädigender Adriamycinbehandlung untersucht (Abbildung 25 und 26). Zusammengenommen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die SIRT1 Phosphorylierung durch HIPK2 an Serin 682 nach DNA-Schaden die enzymatische Aktivität von SIRT1 hinsichtlich der p53 Deacetylierung herabsetzt. Somit verbleibt p53 in einem hyperacetylierten Zustand.

Das Weiteren phosphoryliert HIPK2 SIRT1 an S27. Diese Modifikation führt aber keine Verminderung der SIRT1 Deacetylaseaktivität herbei. In Abbildung 37 ist schematisch die Phosphorylierung von SIRT1 durch HIPK2 an S27 und DNA-schadensensitiv an S682 dargestellt.

Die beobachtete Interaktion zwischen SIRT1 und HIPK2 und die sich vermutlich anschließende DNA-schadensabhängige Phosphorylierung von SIRT1 an S682 führt zur Reduktion der SIRT1 Deacetylaseaktivität und Zunahme der Menge an acetyliertem p53.

Die unterschiedlichen Beobachtungen zur Aktivität von SIRT1 nach Phosphorylierung durch DYRK 1 und DYRK3 sowie HIPK2 können in der Induktion des DNA-Schadens begründet sein. Die durch DYRK hervorgerufene Aktivierung der Deacetylasefunktion von SIRT1 erfolgt nach Applikation von Etoposid, wodurch DNA-Strangbrüche aber keine Erhöhung der

intrazellulären ROS hervorgerufen wird. Die Reduktion der SIRT1 Deacetylaseaktivität durch HIPK2 wird nach Behandlung mit Adriamycin hervorgerufen. Adriamycin besitzt eine Anthrachinonstruktur, die es zur Generierung von ROS befähigt. Demnach könnte darin die SIRT1 Inaktivierung begründet sein.

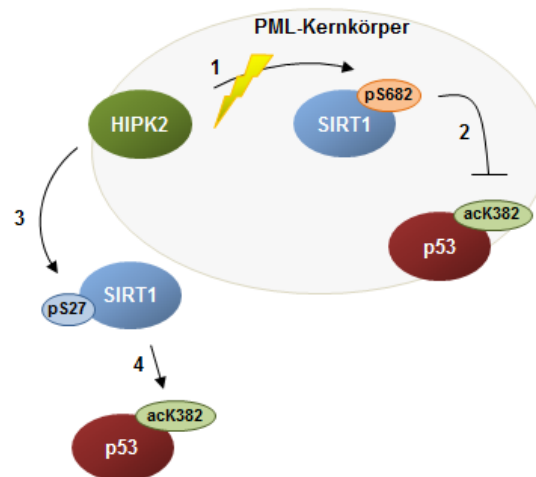


Abbildung 37: Modell der Phosphorylierung von SIRT1 durch HIPK2.

Die HIPK2-vermittelte Phosphorylierung von SIRT1 an S682 ist nach Adriamycinbehandlung verstärkt (1) und bewirkt eine Reduktion der SIRT1 Deacetylaseaktivität (2). Die posttranslationale Modifikation von SIRT1 durch HIPK2 erfolgt PML-Kernkörper. HIPK2 phosphoryliert SIRT1 ebenfalls an Serin 27 (3), woraus keine Änderung der enzymatischen Aktivität von SIRT1 folgt (4). Ob diese Phosphorylierung ebenfalls in PML-Kernkörpern erfolgt ist noch nicht geklärt.

4.3.3 HIPK2-vermittelte SIRT1 Phosphorylierung an S682 erfolgt in PML-Kernkörpern

Es wurde unabhängig voneinander beschrieben, dass sowohl HIPK2 als auch SIRT1 sowie p53 in PML-Kernkörpern lokalisieren und dort posttranslational modifiziert werden und selbst an der posttranslationalen Modifikation anderer Proteine beteiligt sind (Kim et al., 1999; Pearson et al., 2000; D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Langley et al., 2002). SIRT1 ist in die Regulation der Größe der PML-Kernkörper involviert, während die Verweildauer von HIPK2 in den nukleären Substrukturen durch die Komponente PML-IV verlängert wird (Weidtkamp-Peters et al., 2008; Campagna et al., 2011). Die Rekrutierung von p53 in PML-Kernkörper erfolgt durch alle PML-Isoformen, aber nur die Assoziation von PML-IV mit p53 vermittelt die p53 Aktivierung durch posttranslationale Modifikation (Fogal et al., 2000; Guo et al., 2000). HIPK2 stimuliert die proapoptotische Zellantwort durch Phosphorylierung von p53 an S46 in PML-Kernkörpern. Diese Phosphorylierung potentiert die p53 Acetylierung an K382, welche durch CBP/p300 ebenfalls in PML-Kernkörpern erfolgt, und daraus folgend wird die Transkription proapoptotischer p53 Zielgene erhöht (D'Orazi et al., 2002; Hofmann

et al., 2002; Puca et al., 2009). SIRT1 hingegen vermindert die p53 Zielgenexpression und somit Apoptose durch Deacetylierung von p53 an K382. Dies wird durch Anwesenheit von PML-IV verstärkt (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001; Langley et al., 2002). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob PML-Kernkörper für die räumliche Zusammenführung und Komplexierung von HIPK2 und SIRT1 relevant sind und weiterhin, ob die Phosphorylierung von SIRT1 durch HIPK2 in PML-Kernkörpern erfolgt.

In Kapitel 3.5 konnte gezeigt werden, dass sowohl HIPK2 als auch SIRT1 zusammen in PML-Kernkörpern ko-lokalisieren (Abbildung 21) und dass die Anwesenheit von PML-IV die S682 Phosphorylierung von SIRT1 verstärkt (Abbildung 22). Darüber hinaus erfolgt die Phosphorylierung von SIRT1 durch HIPK2 in PML-Kernkörpern. Anhand von Immunfluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass das Signal von phosphoryliertem SIRT1 pS682 zusammen mit HIPK2 und SIRT1 sowie mit PMLIV in PML-Kernkörpern ko-lokalisiert (Abbildung 23). In Abbildung 37 ist die HIPK2-abhängige SIRT1 Phosphorylierung in PML-Kernkörpern schematisch dargestellt.

Aus den beschriebenen Ergebnissen ist ersichtlich, dass PML-IV, bzw. PML-Kernkörper eine regulatorische Rolle in der HIPK2-vermittelten SIRT1 Inaktivierung durch Phosphorylierung an S682 spielen.

4.3.4 SIRT1 Phosphorylierung an S27 und S682 beeinflusst nicht dessen subzelluläre Lokalisation

Eine weitere Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob die Phosphorylierung von SIRT1 eine Veränderung der subzellulären Lokalisation zur Folge hat. Es wurde bereits berichtet, dass die SIRT1 Phosphorylierung an S27 durch JNK1 in HCT116 Zellen eine erhöhte nukleäre Lokalisation von SIRT1 nach sich zieht (Nasrin et al., 2009). Anhand von Immunfluoreszenzanalysen in U2OS Zellen konnte keine phosphorylierungsbedingte Veränderung der subzellulären Lokalisation von SIRT1 beobachtet werden. Weder die Phosphorylierung an S27 noch diejenige an S682 vermittelt die Translokation von SIRT1 in das Zytoplasma (Abbildung 17).

Für das *C. elegans* Homolog von SIRT1, Sir-2.1, ist bekannt, dass es nach DNA-schadensinduzierter Apoptose aus dem Zellkern in das Zytoplasma translokalisiert, wo es p53-unabhängig Apoptose induziert (Greiss et al., 2008). Für humanes SIRT1 ist bekannt, dass es hauptsächlich nukleär vorliegt. Aber aufgrund zweier nukleärer Exportsignale (NES) kann SIRT1 in das Zytoplasma wechseln, wo es durch "Phosphoinositid 3'-hydroxykinase" (PI3K)-vermittelte Phosphorylierung zurückgehalten werden kann (Tanno et al., 2007). Im Zytoplasma reguliert SIRT1 über Ku70, die BAX-vermittelt Apoptose (Sawada et al., 2003; Cohen et al., 2004; Cohen et al., 2004). Anders als in *C. elegans* existieren in Säugern mehrere Homologe von SIRT mit unterschiedlicher Lokalisation in der Zelle. Diese

verfügen teilweise ebenfalls über eine Deacetylasefunktion (Frye, 1999; Frye, 2000) und somit ist die DNA-schadensvermittelte Translokation von SIRT1 in das Zytoplasma oder die Mitochondrien nicht erforderlich, um Apoptose einzuleiten. Bezüglich der zytoplasmatischen Apoptoseantwort ist die Translokation von SIRT1 in das Zytoplasma oder die Mitochondrien redundant, da sowohl zytoplasmatisches SIRT2 als auch mitochondriales SIRT3, über Deacetylaseaktivität verfügen und ebenfalls in die Apoptoseinduktion involviert sein können (Matsushita et al., 2005; Talos et al., 2005; Li et al., 2010; Li et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich aus den in Kapitel 4.3 dargestellten Ergebnissen folgern, dass die DNA-schadensabhängige Phosphorylierung von SIRT1 an S682 durch HIPK2 die Deacetylaseaktivität von SIRT1 herabsetzt. Weiterhin scheint diese Phosphorylierung unter anderem in PML-Kernkörpern zu erfolgen und ruft keine Veränderung der subzellulären SIRT1 Lokalisation hervor.

4.4 SIRT1 Phosphorylierung an S682 steigert die p53 Transaktivierung

Im vorangegangenen Kapitel wurde diskutiert, dass SIRT1 Phosphorylierung durch die DNA-schadensaktivierte HIPK2 an S682 phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung zu einer verringerten enzymatischen Deacetylaseaktivität von SIRT1 führt. Dies wurde anhand einer erhöhten Acetylierung von p53 an K373 und K382 beobachtet. Weiterhin wurde untersucht, ob dies einen direkten Einfluss auf das Transaktivierungspotential des Transkriptionsfaktors p53 ausübt. Die funktionellen Auswirkungen der SIRT1 Inaktivierung wurden anhand von Luciferase-Reporterversuchen durch die transaktivierende Wirkung von p53 auf die Konsensussequenz des *Puma*-Promotors charakterisiert.

PUMA ist ein Mitglied der "BH3-only" Gruppe der Bcl-2 Proteinfamilie (Nakano und Vousden, 2001; Yu et al., 2001). PUMA reguliert unter apoptotischen Bedingungen die Degeneration der Mitochondrien und induziert Apoptose, indem die Cytochrom C Ausschüttung und die Aktivierung von Caspasen eingeleitet wird (Chipuk et al., 2005; Kuwana et al., 2005; Kim et al., 2006). Wegen seiner apoptotischen Wirkung ist PUMA streng reguliert. Dies erfolgt nach heutigem Wissen nicht über posttranslationale Modifikationen, sondern durch Kontrolle der Genexpression. Das Onkogen c-Myc, FOXO3a und p53 steigern unter anderen die Expression von PUMA und induzieren somit Apoptose (Hermeking und Eick, 1994; Fernandez et al., 2003; You et al., 2006).

Das Chemotherapeutikum Adriamycin vermittelt p53 Aktivierung, was zur Expression von PUMA führt. PUMA bindet im Zytoplasma acetylierungsabhängig an BAX (vergleiche 1.4.3) und BAK und transduziert das proapoptotische Signal an die Mitochondrien. Dies führt zur Perforation der äußeren Mitochondrienmembran und zur Freisetzung mitochondrialer Proteine, wie zum Beispiel Cytochrom C, in das Zytoplasma (Yu et al., 2003; Cohen et al., 2004; Chipuk et al., 2005; Kuwana et al., 2005). Ein pathophysiologischer Effekt in p53-

defizienten oder -defekten Tumoren ist die fehlende PUMA-vermittelte Apoptose, da die *Puma*-Expression nicht induziert werden kann (Yu und Zhang, 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von SIRT1 durch Phosphorylierung an S682 das transaktivierende Potential von p53 bezüglich der *Puma*-Expression steigert. Im Luciferase-Reporterversuch ist die Expression der unter der Kontrolle des *Puma*-Promotors stehenden Luciferase in Gegenwart der phospho-mimetischen SIRT1 S682D Mutante gesteigert, verglichen mit dem wildtyp SIRT1 Protein (Abbildung 27 a).

Die Inaktivierung der enzymatischen Deacetylasefunktion von SIRT1 durch HIPK2-vermittelte Phosphorylierung an S682 steigert das transaktivierende Potential von p53 bezüglich der Expression proapoptotischer Zielgene, wie es für die *Puma*-Expression gezeigt werden konnte, und führt somit zu Apoptose.

Durch Phosphorylierung eines Proteins kann sich die Affinität zu Bindungspartnern verändern (Winter et al., 2008). Daher wurde untersucht, ob die Bindungsaffinität von p53 zu phosphoryliertem SIRT1 verringert ist. In einem *in vitro* Präzipitationsversuch wurden keine Unterschiede der Bindung von p53 zu SIRT1 wildtyp und zur phospho-mimetische Mutante S682D gefunden (Abbildung 27 b).

Die phosphorylierungsvermittelte SIRT1 Inaktivierung erhöht die Mengen an acetyliertem p53, was aber *in vitro* nicht aus einer verminderten Bindungsaffinität von p53 zu phosphoryliertem SIRT1 pS682 resultiert. Diesbezüglich ist zu berücksichtigen, dass *in vivo* weitere posttranslationale Modifikationen von p53 oder SIRT1 die Bindungsaffinität beeinflussen können.

Eine weitere Bestätigung der SIRT1 Regulation durch Phosphorylierung an S682 wurde in rekonstituierten U2OS Zellen gefunden (Abbildung 28). Nach Rekonstitution mit Flag-SIRT1 S682A sind die p53 Acetylmengen auch nach Applikation von Adriamycin, im Vergleich zu den vorliegenden Mengen der Flag-SIRT1 Zelllinie, reduziert (Abbildung 28 a). Darüber hinaus sind in der Flag-SIRT1 S682D Zelllinie die mRNA Mengen von p53 Zielgenen, wie *Puma*, *53AIP1* und *p21*, erhöht (Abbildung 28 b).

Da die Steigerung der Acetyly-p53 Proteinmengen nicht durch eine verringerte Assoziation von phosphoryliertem SIRT1 zu p53 erklärt werden kann, ist denkbar, dass die SIRT1 Inaktivierung auf einer durch die Phosphorylierung beruhenden intramolekularen Konformationsänderung beruht. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Affinität von SIRT1 zu dem Ko-Aktivatoren AROS reduziert oder die Modifikation durch SUMO beeinflusst wird.

4.5 Die SIRT1 Regulation erfolgt durch einen zellulären Mediator

Die Phosphorylierung von SIRT1 durch HIPK2 an S682 ist durch DNA-Schaden induziert und vermindert die Deacetylasefunktion von SIRT1. Dies hat zur Folge, dass p53 nicht mehr

effizient an K382 deacetyliert und die Transkription von proapoptotischen Zielgenen einleitet wird. Der aktivitätsvermindernde Effekt, den die Phosphorylierung an S682 hervorruft, wurde genauer charakterisiert. Neben der SIRT1-vermittelten Deacetylierung von p53 wurde auch die Deacetylierung der Histone H3 und H4 verfolgt, um zu untersuchen, ob es sich um einen p53-spezifischen und globalen Effekt der SIRT1 Inaktivierung handelt. SIRT1 deacetyliert p53 an acK382, Histon H3 an acK56 sowie H4 an acK16 (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001; Vaquero et al., 2004; Das et al., 2009).

Wie aus Kapitel 3.6.4 hervorgeht, ist die SIRT1 Inaktivierung nicht ausschließlich durch die Phosphorylierung an S682 vermittelt. SIRT1 und die phospho-mimetische SIRT1 S682D Punktmutante weisen in *in vitro* Experimenten keinen Unterschied bezüglich der Effizienz der Deacetylierung von H3 acK56, H4 acK16 sowie p53 acK382 auf (Abbildung 29).

Demzufolge ruft die SIRT1 Phosphorylierung an S682 keine aktivitätsvermindernde Konformationsänderung hervor. Weiterhin kann die Phosphorylierung von SIRT1 die Bindung von Modulatoren, wie zum Beispiel DBC1 und AROS beeinflussen (Kim et al., 2007; Kim et al., 2008; Zhao et al., 2008). In Kapitel 4.2 konnte bereits eine veränderte Bindung des SIRT1 Inhibitors DBC1 ausgeschlossen werden. Daher bleibt die Möglichkeit einer verringerten Komplexierung von AROS, oder aber die Phosphorylierung von SIRT1 löst nachfolgend eine Veränderung des SUMOylierungsmusters aus und reguliert darüber die SIRT1 Aktivität (Yang et al., 2007).

4.5.1 SIRT1 unterliegt einer reversen Phospho-SUMO-1-Schaltung

Die Rekrutierung von Proteinen in PML-Kernkörper verläuft meist SUMO-vermittelt (Kim et al., 1999; Fogal et al., 2000; Pearson et al., 2000). Es ist bereits publiziert, dass SIRT1 posttranslational SUMO-modifiziert wird und diese Modifikation ist in die Regulation der Deacetylaseaktivität des Proteins involviert. Es wurden daher untersucht, ob eine SUMOylierungsbasierte Regulation der enzymatischen Aktivität von SIRT1 nach HIPK2-vermittelter Phosphorylierung an S682 erfolgt. In Zellen liegt SIRT1 an Lysin 734 SUMOyliert vor, was die Deacetylaseaktivität von SIRT1 steigert. Nach genotoxischem Stress, wie oxidativer Stress oder UV-C Strahlung, wird dieser SUMO-Rest durch die SUMO-Peptidase SENP1 abgespalten und die SIRT1 Aktivität dadurch reduziert (Yang et al., 2007).

Die Phosphorylierung von SIRT1 an S682 könnte die DeSUMOylierung verstärken. Es wurde von Proteinphosphorylierungen berichtet, die eine darauffolgende SUMOylierung entweder begünstigen (Hietakangas et al., 2006) oder erschweren (Desterro et al., 1998). Solche reversen Phospho-SUMO-Schaltungen, bei denen auf die Phosphorylierung folgende SUMOylierung erschwert wird, wie zum Beispiel für NFκB (Desterro et al., 1998), sind bisher selten beschrieben.

Das für diese Studie verwendete DNA-Schadensagens Adriamycin induziert sowohl endogenen oxidativen Stress durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als auch Doppelstrangbrüche durch Inhibition der Topoisomerase II (vergleiche 4.1). Daher wurde der Hypothese nachgegangen, inwiefern die DNA-schadensinduzierte Phosphorylierung von SIRT1 an S682 die SUMOylierung von SIRT1 beeinflusst.

SIRT1 Phosphorylierung an S682 reduziert die SUMOylierung um 70% (Abbildung 31 a und 31 b). Zur Veranschaulichung dient das in Abbildung 38 schematisch dargestellte Modell. Dieser Effekt ist jedoch nicht direkt durch die Phosphorylierung bedingt, wie in einem *in vitro* SUMOylierungsexperiment gezeigt werden konnte (Abbildung 31 c). *In vitro* werden die phospho-mimetische SIRT1 S682D Mutante und wildtyp SIRT1 in gleichem Ausmaß SUMOyliert und darüber hinaus erfolgt keine verstärkte DeSUMOylierung der phospho-mimetischen Punktmutante durch SENP1 (Abbildung 31 d). Allerdings wurde in Kapitel 3.7.3 gezeigt, dass die SUMOylierte Fraktion von SIRT1 an Serin 682 nicht durch HIPK2 phosphoryliert wird, wodurch eine seltene reverse Phospho-SUMO-Schaltung wahrscheinlich ist. Hierbei verhindert die jeweilige Modifikation, entweder Phosphorylierung oder SUMOylierung, des Proteins die nachfolgende Modifikation.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die SIRT1 Modifikation einer reversen Phospho-SUMO-Schaltung unterliegt, da die SIRT1 Phosphorylierung an S682 die SUMOylierung vermindert, bzw. die SUMO-1-modifizierte SIRT1 Fraktion an S682 durch HIPK2 nicht phosphoryliert wird. Letzteres kann in einer verminderten Bindung von HIPK2 an SIRT1 im Vergleich zu den SUMOylierungs-defizienten Punktmutanten begründet sein (Abbildung 30 a). Nach DNA-Schadensinduktion wird die SUMO-1 Modifikation durch SENP1 entfernt (Yang et al., 2007) und die Interaktion von HIPK2 und SIRT1 ist folglich verstärkt (Abbildung 30 a). Die verringerte SUMO-Modifikation des phosphorylierten SIRT1 pS682 beruht weder auf einer verstärkten DeSUMOylierung noch auf einem direkten Effekt der SIRT1 Phosphorylierung an S682. Daher ist eine weitere Möglichkeit, eine durch Phosphorylierung an S682 erniedrigte Affinität von SIRT1 zu SUMO E3-Ligasen, wodurch die geringeren SUMO-1-SIRT1 Proteinmengen erklärt werden können.

4.5.2 SIRT1 bindet phosphorylierungsabhängig den Ko-Aktivator AROS

Neben der phospho-abhängigen SUMO-Modifikation von SIRT1 wurde untersucht, ob die Bindung der SIRT1 Modulatoren, DBC1 und AROS, durch Phosphorylierung von SIRT1 an S682 beeinflusst wird.

DBC1 ist ein intrinsischer SIRT1 Inhibitor, dessen Expression im Verlauf der Progression bestimmter Brusttumore reduziert wird (Hiraike et al., 2010; Sung et al., 2010). Für die Interaktion von DBC1 und SIRT1 wurde gezeigt, dass die Bindung von DBC1 an die SIR Domäne durch ATM-abhängige DBC1 Phosphorylierung nach oxidativem Stress und UV-C

Strahlung verstärkt wird (Yuan et al., 2012). Es ist demnach naheliegend, die Bindungsaffinität von SIRT1 und DBC1 nach HIPK2-vermittelter SIRT1 Phosphorylierung an S682 zu untersuchen.

Meine Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von DBC1 und SIRT1 durch Applikation von Adriamycin, im Gegensatz zu H₂O₂ sowie UV-C Strahlung, nicht verstärkt wird (Abbildung 33 a). Auch die DNA-schadensinduzierte Phosphorylierung von SIRT1 an S682 beeinflusst die Bindung von DBC1 und SIRT1 nicht (Abbildung 33 b). Daraus kann gefolgert werden, dass der inhibitorische Effekt der SIRT1 Phosphorylierung an S682 nicht durch eine verstärkte Bindung von DBC1 resultiert.

Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass HIPK2 befähigt ist, DBC1 *in vitro* zu phosphorylieren (Abbildung 35 a). Dies deutet auf einen weiteren möglichen regulatorischen Effekt durch HIPK2-vermittelte Phosphorylierung in diesem Signalweg hin.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die durch Adriamycin induzierte und HIPK2-vermittelte Phosphorylierung von SIRT1 an S682 nicht in die Bindung von DBC1 und SIRT1 involviert ist. Außerdem kann aus der unveränderten Bindung von DBC1 und SIRT1 nach Adriamycinbehandlung gefolgert werden, dass die Phosphorylierung von DBC1 durch HIPK2 ebenfalls nicht an der DBC1-SIRT1 Komplexauflösung beteiligt sein kann. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass Adriamycin im Gegensatz zu H₂O₂ und UV-C Strahlung auch DNA-Doppelstrangbrüche hervorruft. Möglicherweise entscheidet die Art des vorliegenden DNA-Schadens über den Mechanismus der SIRT1 Inaktivierung, wie schon unter 4.3.2 diskutiert.

Daher wurde die Beteiligung des intrinsischen SIRT1 Aktivators AROS an dieser Kaskade untersucht. AROS aktiviert SIRT1 durch Bindung des N-Terminus von SIRT1 (Kim et al., 2007). Somit ist auch AROS ein interessantes Zielprotein bezüglich der SIRT1 Regulation in Abhängigkeit der SIRT1 Phosphorylierung an S682, da die Komplexauflösung von AROS und SIRT1 mit einer verminderten enzymatischen SIRT1 Deacetylaseaktivität einhergeht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindung von SIRT1 und AROS in Abhängigkeit der DNA-schadensinduzierten SIRT1 Phosphorylierung an S682 erfolgt. Nach Adriamycinapplikation ist eine Auflösung des SIRT1-AROS Komplexes zu beobachten (Abbildung 34 a). Die phosphorylierungs-defiziente SIRT1 S682A Mutante ist jedoch unempfindlich gegenüber der Behandlung mit Adriamycin und der AROS-SIRT1 S682A Komplex bleibt nach DNA-Schadensinduktion bestehen (Abbildung 34 c). Die verminderte Bindungsaffinität von AROS an SIRT1 ist durch die Phosphorylierung von SIRT1 an S682 vermittelt, da zu beobachten ist, dass die Bindung von AROS an die phospho-mimetische SIRT1 S682D Mutante vermindert ist (Abbildung 34 b). Zur Veranschaulichung dient das Modell in Abbildung 38.

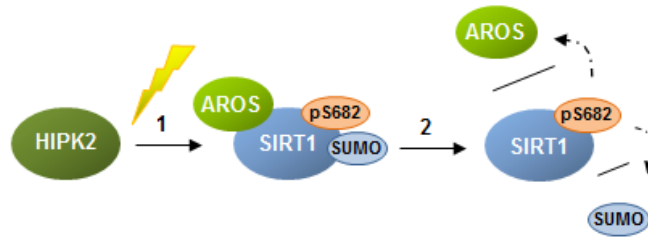


Abbildung 38: Die HIPK2-vermittelte SIRT1 Phosphorylierung interferiert mit der Bindung von AROS und der SIRT1 Modifikation mit SUMO-1.

Nach genotoxischem Stress erfolgt die HIPK2-vermittelte SIRT1 Phosphorylierung an S682(1). Daraufhin wird der Komplex zwischen SIRT1 und dem Aktivator AROS sowie die SIRT1 Modifikation mit SUMO-1 vermindert (2).

Eine weitere Beobachtung ist, dass AROS von HIPK2 *in vitro* phosphoryliert wird (Abbildung 35 b), obwohl AROS keine für HIPK2 typischen Konsensusmotive in der Primärsequenz aufweist. Es ist aber bekannt, dass HIPK2 auch Serine und Threonine in Histon H2B, die nicht von Prolin gefolgt werden, sowie ein Tyrosinrest der Kinasedomäne in einem Autophosphorylierungsmechanismus posttranslational modifizieren kann (Rinaldo et al., 2012; Saul et al., 2012). Inwieweit sich die HIPK2-vermittelte AROS Phosphorylierung auf die Komplexierung von SIRT1 und AROS auswirkt, muss noch geklärt werden.

Die Bindung von AROS wird folglich durch SIRT1 Phosphorylierung an S682 moduliert. DNA-Schadensinduktion durch Adriamycin und die dadurch induzierte Phosphorylierung von SIRT1 an S682 führt zur Reduktion der AROS-SIRT1-Interaktion. Darüber hinaus ist es möglich, dass die HIPK2-vermittelte Phosphorylierung von AROS ebenfalls zur Komplexauflösung von SIRT1 und HIPK2 beiträgt, welche die HIPK2-abhängige SIRT1 Inaktivierung hervorruft.

Es wurde beschrieben, dass Applikation von Etoposid die Bindung von SIRT1 und AROS verstärkt (Kim et al., 2007). Etoposid hemmt, wie Adriamycin, die Topoisomerase II und induziert DNA-Strangbrüche (Fleming et al., 1989), jedoch erfolgt durch Etoposid keine Steigerung der intrazellulären ROS. Daher könnte das Verhalten der unterschiedlichen Bindung von AROS zu SIRT1 nach genotoxischem Stress durch Adriamycin und Etoposid anhand von erhöhten Mengen an ROS erklärt werden. Die AROS-SIRT1 Interaktion wurde bisher noch nicht in Bezug auf Redoxstress untersucht wurde. Im Hinblick der Regulation von SIRT1 durch DYRK1 und DYRK3 wurde nach Etoposidbehandlung, wie auch für die AROS-SIRT1 Bindung, eine gesteigerte Deacetylaseaktivität gefunden (Guo et al., 2010). Demnach ist es möglich, dass der Mechanismus der SIRT1 In-/ Aktivierung durch die Art des induzierten DNA-Schadens reguliert wird.

Ein weiterer Mechanismus ist die Regulation von AROS durch HIPK2. Für AROS konnte gezeigt werden, dass AROS *in vitro* und nach Überexpression an HIPK2 bindet (Anhang, Abbildung 41 a und b) und weiterhin *in vitro* durch HIPK2 phosphoryliert wird (Abbildung 35

b). Darüber hinaus wird AROS nach Adriamycinapplikation über das Proteasom abgebaut (Anhang, Abbildung 42 a , b und c). Inwiefern die Phosphorylierung von AROS durch DNA-Schaden moduliert wird, und ob dies in Zusammenhang mit einer veränderten Degradation durch das 26S-Proteasom steht, muss durch weitere Experimente geklärt werden. AROS ist ein nukleoläres Protein (Maeda et al., 2006) und daher könnte die HIPK2-vermittelte Phosphorylierung von AROS die Translokation von AROS aus den Nukleoli in das Nukleoplasma bewirken. Die Beteiligung von HIPK2 an nukleolären Prozessen konnte in präliminären Labor internen Experimenten gezeigt werden. Demnach ist eine phosphorylierungsbedingte Regulation von AROS durch HIPK2 möglich.

4.6 Modell zur Apoptoseregulation durch HIPK2

Die aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse weisen auf einen molekularen Mechanismus hin, durch welchen SIRT1 während der HIPK2-vermittelten Apoptose inaktiviert wird. Die Ergebnisse (rote Markierung) sind in dem in Abbildung 39 dargestellten Modell übergreifend dargestellt.

In ungestressten Zellen wird HIPK2 durch Siah-1-vermittelte Konjugation von Polyubiquitin über das Proteasom degradiert (1). Die Induktion von Doppelstrangbrüchen nach genotoxischem Stress aktiviert die Kinase ATM, welche im Anschluss die E3-Ubiquitin-Ligase Siah-1 phosphoryliert (2). Durch ATM-abhängige Phosphorylierung von Siah-1 an S19 bricht der Siah-1-HIPK2-Komplex, HIPK2 wird nicht mehr proteasomal degradiert, und somit stabilisiert (3). HIPK2 Autophosphorylierung führt zur Aktivierung der Kinase (Shiloh, 2003; Gresko et al., 2006; Dauth et al., 2007; Winter et al., 2008; Saul et al., 2012).

HIPK2 phosphoryliert DNA-schadenssensitiv SIRT1 an S682 (4) und diese Phosphorylierung erfolgt in Gegenwart von PML-IV verstärkt (vergleiche Modell in Abbildung 37). Die Phosphorylierung von SIRT1 an S682 bewirkt die Auflösung des Komplexes zwischen SIRT1 und dessen Ko-Aktivator AROS und reduziert die postrtranslationale Modifikation von SIRT1 durch SUMO-1, wodurch die enzymatische SIRT1 Deacetylaseaktivität gehemmt wird (5).

HIPK2, p53 und SIRT1 lokalisieren in PML-Kernkörper, woraufhin posttranslationale Modifikationsprozesse eingeleitet werden (6). HIPK2 phosphoryliert p53 an S46 in PML-Kernkörpern (7) und dies bewirkt eine verstärkte Acetylierung von K382 durch CBP (7). Da dieser Rest von p53 durch SIRT1 deacetyliert wird, wirkt SIRT1 somit dem proapoptischen Effekt von HIPK2 entgegen (Fogal et al., 2000; Pearson et al., 2000; D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Langley et al., 2002; Campagna et al., 2011).

SIRT1 befindet sich durch die Phosphorylierung an S682 in einem Zustand einer verminderten enzymatischen Aktivität (7). Die Hemmung der SIRT1 Deacetylaseaktivität durch Phosphorylierung an S682 hat zur Folge, dass p53 in einem aktiven, acetylierten

Zustand verbleibt (7) und die Expression von proapoptotischen p53 Zielgenen, wie zum Beispiel *Puma*, eingeleitet wird (8). Daraus resultiert eine effiziente Induktion der Apoptose.

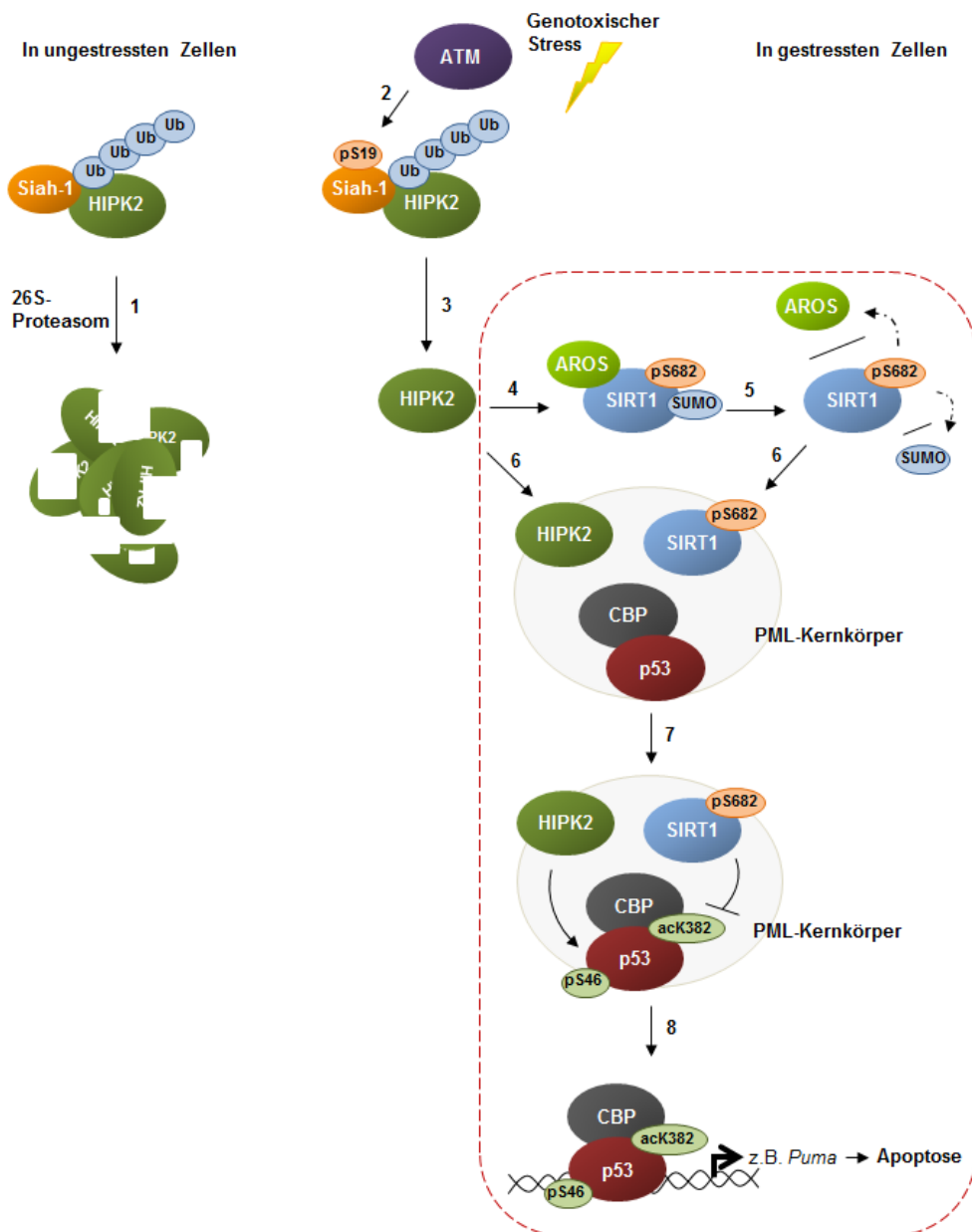


Abbildung 39: Modell zur HIPK2-vermittelten Apoptoseregulation durch SIRT1 Inaktivierung.

In ungestressten Zellen wird HIPK2 Siah-1-abhängig proteasomal abgebaut (1). Nach DNA-Schaden durch genotoxischen Stress phosphoryliert ATM Siah-1 (2), was zur Stabilisierung und Aktivierung von HIPK2 führt (3). Die HIPK2-vermittelte Phosphorylierung von SIRT1 an S682 (4) bewirkt die Komplexauflösung zwischen SIRT1 und AROS sowie die Verminderung der SIRT1-Modifikation durch SUMO-1 (5). SIRT1 und HIPK2 lokalisieren in PML-Kernkörpern, wo die posttranslationale SIRT1-Modifikation erfolgt (6). HIPK2 phosphoryliert p53 an S46, was die CBP-vermittelte Acetylierung von p53 an K382 verstärkt (Hofmann et al., 2002). Die enzymatische Aktivität von SIRT1 ist durch die Phosphorylierung an S682 vermindert und p53 verbleibt in hyperacetyliertem Zustand (7). Die p53-Acetylierung an K382 steigert das transaktivierende Potential von p53 und erhöht somit die Transkription proapoptotischer p53-Zielgene, wie z. B. *Puma* (8). Die Markierung (----) zeigt die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse an.

Der hier vorgestellte Mechanismus, der die Gewährleistung einer effizienten Apoptoseinduktion durch SIRT1 Inhibition beschreibt, könnte für die Behandlung von Tumorerkrankungen hinsichtlich einer Kombinationstherapie wichtig werden.

4.7 Relevanz und Ausblick

Ein größeres werdendes Problem der Behandlung von Tumorerkrankungen stellt die Tatsache dar, dass Tumore nicht auf Chemotherapie ansprechen oder sich mit der Zeit Resistenzen gegenüber den eingesetzten Therapeutika entwickeln. Daher ist die Verbesserung der bestehenden Chemotherapien durch neue Wirkstoffe zur direkten Kombinationstherapie für viele Tumorerkrankungen und auch Virus-induzierte Krankheiten von großer Bedeutung. Fehlende Funktion, Deregulation und Delokalisation von Proteinen beruhen zum Teil auf Mutationen der jeweiligen Gene. Sowohl für SIRT1 als auch HIPK2 ist bekannt, dass die Expressionsmuster in bestimmten Tumoren verändert sind, worauf zum Teil die Tumorprogression und Therapieresistenzen beruhen (siehe Kapitel 1.2.3 und Kapitel 1.4.4). In Brusttumoren ist beispielweise die HIPK2-vermittelte SIRT1 Regulation nicht gegeben, da HIPK2 durch HMGA1 in das Zytoplasma rekrutiert wird. Darüber hinaus kann die SIRT1 Aktivität aufgrund des Verlusts des SIRT1 Inhibitors DBC1 zusätzlich erhöht werden. Hier könnte durch Inhibition der enzymatischen SIRT1 Aktivität, zum Beispiel mittels Tenovin-6, HIPK2-unabhängige Apoptose eingeleitet werden (Cheng et al., 2003; Heltweg et al., 2006; Pierantoni et al., 2007; Han et al., 2008; Lain et al., 2008). Auch bei AML liegen erhöhte SIRT1 Proteinmengen vor, was unter anderem Apoptose inhibiert, und dies wird zusätzlich durch eine inaktive und delokalisierte Variante von HIPK2 verstärkt (Lowenberg et al., 1999; Bradbury et al., 2005; Li et al., 2007).

Weiterhin wurde eine Deregulation von SIRT1 und HIPK2 in Hauttumoren gefunden. Das HPV23 E6 Protein verhindert die Komplexierung von HIPK2 mit p53 und unterdrückt somit eine effiziente Apoptoseinduktion. Dies könnte durch die erhöhte SIRT1 Expression in Hauttumoren weiterhin verhindert werden. Auch hier könnte die Inhibition der SIRT1 Aktivität in Kombination zur Therapie vorteilhaft sein (Scheffner et al., 1993; Heltweg et al., 2006; Hida et al., 2007; Lain et al., 2008; Muschik et al., 2011). Eine statistische Analyse der Genexpressionsmuster verschiedener Tumore, wie zum Beispiel Brust- und Hauttumore, könnte eine Korrelation der Deregulation von SIRT1 und HIPK2 anzeigen. Daraus könnten wiederum wichtige Erkenntnisse der zugrundeliegenden Mechanismen, für Mutationen sowie für Therapiestrategien gewonnen werden. Eine derartige Analyse könnte initial *in silico* mit Hilfe des Programms "Oncomine" (www.oncomine.org) durchgeführt werden. Diesem Analyseverfahren liegen RNA Proben aus Primärtumoren sowie Zelllinien, die aus Tumorgewebe gewonnen wurden, zugrunde.

Bezüglich der Therapiestrategien wurde berichtet, dass in therapieresistenten MDR Tumoren erhöhte SIRT1 mRNA Level gefunden wurden. Die erhöhte Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapie beruht unter anderem auf der SIRT1-abhängigen Induktion des *mdr1*-Promotors und daraus resultierender Expression von P-Glycoprotein (oder auch "multidrug resistance protein 1", MDR). P-Glycoprotein ist als Transmembranprotein ein Mitglied der "ATP-binding cassette transporters" (ABC-transporter) Proteinfamilie und vermittelt die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Adriamycin. Dieser Aspekt ergäbe eine potentielle Verknüpfung zur SIRT1 Regulation durch HIPK2 bezüglich der Tumorthherapie mittels Adriamycin (Jones und George, 2004; Chu et al., 2005; Firestein et al., 2008). Ob diese Beobachtung in Zusammenhang mit erhöhten HIPK2 Proteinmengen steht, muss noch geklärt werden. Die Hemmung der SIRT1 Deacetylaseaktivität im Allgemeinen könnte in jedem Fall eine vielversprechende Kombination zur Tumorthherapie von Tumoren mit erhöhter SIRT1 Expression und Aktivität darstellen.

Es ist bekannt, dass die Inhibition der enzymatischen Deacetylaseaktivität von SIRT1 in Tumorzellen dazu beitragen kann, Apoptose zu induzieren (Heltweg et al., 2006; Lain et al., 2008).

In der vorliegenden Promotionsarbeit konnte ein neuer Mechanismus zur SIRT1 Inaktivierung entschlüsselt werden. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Regulation von SIRT1 durch die proapoptotische Kinase HIPK2 hin und bieten die Möglichkeit für neue Therapieansätze, wie zum Beispiel "targeted therapy" von HIPK2, wodurch dessen Aktivierung zusätzlich zur konventionellen Therapie gesteigert werden kann. Ein weiterer Therapieansatz ist eine zusätzliche Kombination der SIRT1 Inhibition durch spezifische Moleküle. Diese Ansätze könnten durch eine statistische Analyse der Genexpressionsmuster von SIRT1 und HIPK2 in verschiedenen Tumorarten unterstützt werden.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Geräte und Spezialmaterialien

Es folgt eine Auflistung der Geräte und Spezialmaterialien. Alle standardmäßig genutzten Materialien sind in unserem Labor vorrätig und von renomierten Herstellern bezogen.

Tabelle 1: Geräte und Spezialmaterialien

Gerätebezeichnung	Hersteller
Agarosegel-Elektrophoresekammer	CTI GmbH
CO ₂ -Inkubator CB210	Binder
Deckgläschen	Thermo Scientific
ELISA-Reader Muliscan MS	Labsystems
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA Health Care
Feinwaage TE124S-OCE	Sartorius
FluoView Software	Olympus
Geltrockner Modell 582	Bio-Rad Laboratories
Gefrierschrank -80 °C	Sanyo
Gradientengel Mini Protean TGX	Bio-Rad Laboratories
ImageJ	http://rsb.info.nih.gov/ij/
Inkubationsschüttler Minitron	Infors GmbH
Konfokales Mikroskop FV1000	Olympus
Kryoröhrchen	Roth
Kippschüttler UltraRocker	Bio-Rad Laboratories
Kühlzentrifuge Varifuge RF	Heraeus Sepatech
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf
Magnetrührer IKAMAG [®] RCT	IKA [®] Werke
Membra-Cell [™] Dialysiermembran MWCO 5000	Serva
Mini PROTEAN [®] 3 System	Bio-Rad Laboratories
Mini Trans-Blot [®] System	Bio-Rad Laboratories

Weiterführung Tabelle 1: Geräte und Spezialmaterialien

Gerätebezeichnung	Hersteller
Mr. Frosty Cryocontainer	Nalgene
NAMP100 Amplify Fluorographic Reagent	Amersham Biosciences
NanoDrop Spektrophotometer ND-1000	Thermo Scientific
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Objekträger	Roth
Petrischalen	Greiner
pH-Meter 765 Calimatic	Knick
Photometer Ultraspec 3000 pro	Amersham Biosciences
Phosphorimager und Software	Amersham Biosciences
Pipettierhilfe Matrix Cell Mate® II	Thermo Fisher Scientific
Pipettierhilfe Pipetman® Pipette Kit	Gilson
PVDV-Membran Hybond™-P	Amersham Biosciences
PVDF-Sterilfilter MILLEXHV 0,45µm und 0,22 µm	Milipore
Real Time PCR System 7300	Applied Biosystems
Röntgenfilme Fuji Super FX	FUJIFILM
Röntgenfilmkassetten	Roth
Sonifiziergerät Sonifier® S-250A	Branson
Sterilwerkbank "Steril Guard Hood"	The Baker Company, inc.
Synergy2 mit Software	BioTek
Tecan Invitnrite M2000 mit Software	Tecan
Thermocycler MyCycler	Bio-Rad Laboratories
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermopapier	Mitsubishi
Tischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Tischkühlzentrifuge Biofuge® fresco	Heraeus
Ultrazentrifuge RC5C	Sorvall Instruments
UV Stratalinker 1800®	Stratagene
Waage CP2202S-OCE	Sartorius
Wasserbad Julabo UC	Julabo

Weiterführung Tabelle 1: Geräte und Spezialmaterialien

Gerätebezeichnung	Hersteller
Zellkulturschalen Ø 15 cm, Ø 10 cm, Ø 6 cm	Greiner
Zellkulturschalen 6 Löcher	Greiner
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner

5.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Antibiotika

Standardmäßig verwendete Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Biozol, GE Healthcare, Invitrogen, Merck, Roche Diagnostics, Roth und Sigma-Aldrich bezogen oder anders vermerkt.

Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien und Antibiotika

Chemikalien, Reagenzien und Antibiotika	Hersteller
γ - ³² P-ATP	Perkin Elmer
Adriamycin, Stammlösung 10 mg/ml	Sigma
Ammoniumperoxysulfat (APS)	AppliChem
Ampicillin (Amp), Stammlösung 100 mg/ml	Gerbu
Anti-Flag [®] M2-Affinity Gel	Sigma
ATP	US Biological
β -Glycerophosphat	AppliChem
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Coomassie Brilliant Blue G-250	Bio-Rad Laboratories
Coomassie Roti [®] Blue (kolloidales Coomassie)	Roth
Complete (Protease-Inhibitor-Cocktail)	Roche
Cycloheximid (CHX)	Roth
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Roth
N-Ethylmaleimid (NEM), Stammlösung 1M	Roth
Ethidiumbromid-Lösung, 0,025%	Roth
G418-Lösung (50 mg/ml)	Roche
GFP-trap [®]	ChromoTek

Weiterführung Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien und Antibiotika

Chemikalien, Reagenzien und Antibiotika	Hersteller
Gluthation (GSH)	Sigma-Aldrich
Gluthation-Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
Hepes	Gibco (Invitrogen)
Hoechst 33258	Sigma
Imidazol	Sigma
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Roth
Kanamycin (Kan), Stammlösung 50 mg/ml	Gerbu
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen
L- ³⁵ S-Methionin	Perkin Elmer
MG-132	Biomol
Mowiol 4-88	Roth
NAD ⁺	Roth
Natriumpyruvat	Gibco (Invitrogen)
Natriumvanadat	Sigma
NiNTA-Agarose	Qiagen
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco (Invitrogen)
Phenylmethylsulfoniumfluorid (PMSF)	AppliChem
Pipes	Sigma
Polybren	Millipore
Ponceau S	Sigma
Protein A/G Agarose	Santa Cruz
RNase out (RNase-Inhibitor)	Invitrogen
Rotiphoresegel 30 (37,5:1)	Roth
Streptomycin (Strep), Stammlösung 100 mg/ml	Roth
Tamoxifen, Stammlösung 1 mM	Sigma Aldrich
Trizol®	ambion
Trypanblau	Sigma Aldrich

5.1.3 Kits

Es folgt eine Übersicht der für die Arbeit verwendeten Kits.

Tabelle 3: Kits

Kit	Hersteller
Gateway [®] LR Clonase [®] Enzyme Mix	Invitrogen
Gateway [®] Cloning Kit	Invitrogen
High Capacity RNA-to-cDNA Kit	Applied Biosystems
Pierce [®] BCA [™] Protein Assay Kit	Perbio
Pierce [®] ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen
SIRT1 Direct Fluorescent Screening Assay Kit	Cayman
SUMOylation Kit	Enzo
SuperSignal [®] West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific
SuperSignal [®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific
TaqMan [®] Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems
TNT [®] Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
TrueBlot [™] Set	eBioscience

5.1.4 Protein- und DNA-Marker

Tabelle 4: Protein- und DNA-Marker

Marker	Hersteller
GeneRuler [™] 100 bp, 1kbp	Fermentas
PageRuler [™] Plus Prestained	Fermentas

5.1.5 Puffer

Den zur Zellyse verwendeten Puffern wurden die Proteaseinhibitoren PMSF (Endkonzentration 1 mM) und Complete (Endkonzentration 1x), der Phosphataseinhibitor Natriumvanadat (1 μ M) sowie der Proteasominhibitor MG132 (10 μ M) vor der Verwendung zugesetzt. Dieses Inhibitorengemisch wird im Folgenden mit "Inhibitoren" beschrieben. DTT wurde ebenfalls direkt vor der Verwendung zugegeben.

Tabelle 5: Puffer

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung
AROS-Puffer	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1 %	NP-40
	1mM	EDTA
	1 mM	NaF Inhibitoren
CSK-Puffer	100 mM	NaCl
	300 mM	Sukrose
	3 mM	MgCl ₂
	10 mM	PIPES, pH6,8
Coomassie-Färbelösung	0,5% (w/v)	Coomassie in H ₂ O
Coomassie-Entfärbelösung	10%	Eisessig
	45%	Methanol
DBC1-Lysepuffer	50 mM	Tris-HCl, pH 7,9
	137 mM	NaCl
	10 mM	NaF
	1 mM	EDTA
	1 %	Triton X-100
	0,2 %	Sarkosyl
	10 %	Glycerol
		Inhibitoren
Deacetylase-Reaktionspuffer	100 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	2 mM	DTT
DNA-Ladepuffer, 6x	85%	Formamid
	10 mM	EDTA, pH 8
	0,001%	Bromphenolblau
	0,001%	Xylencyanol

Weiterführung Tabelle 5: Puffer

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung
EB-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8,5
GST-Elutionspuffer	15 mM	Glutathion PBS, pH 7,4
HBS-Transfektionspuffer, 2x	275 mM	NaCl
	10 mM	KCl
	1,7 mM	Na ₂ HPO ₄
	10 mM	Dextrose
	45 mM	HEPES
HEMGEN	100 mM	KCl
	25 mM	HEPES, pH 7,4
	0,1 mM	EDTA, pH 8
	12,5 mM	MgCl ₂
	10%	Glycerol
His-Elutionspuffer	200 mM	KCl
	250 mM	Imidazol HEMGEN
Hybridisierungspuffer	100 mM	Kaliumacetat
	30 mM	Hepes, KOH pH7,4
	2 mM	Mg(CH ₃ COO) ₂
Hypotonischer Lysepuffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	KCl
	1,5 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
		Inhibitoren
<i>In vitro</i> Interaktionspuffer, SIRT1	20 mM	Tris-HCl, pH7,4
	0,05%	NP40
		Inhibitoren
<i>In vitro</i> Interaktionspuffer, HIPK2	0,05%	NP40
		1xPBS
<i>In vitro</i> Interaktionspuffer, AROS	20 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	100 mM	NaCl
	0,1%	NP40
		Inhibitoren

Weiterführung Tabelle 5: Puffer

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung
Kinasepuffer	20 mM	HEPES, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	25 mM	β -Glycerophosphat
	20 mM	MgCl ₂
	10 mM	NaF
	2 mM	DTT
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	^S γ -ATP
	0,32 mCu	³² -P- γ -ATP
LacZ-Puffer, 5x	100 mM	Na ₂ PO ₄ , pH7,5
	10 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄
	50 mM	β -Mercaptoethanol
Luciferase-Reporterversuch, Injektionsmix	25 mM	Glycylglycin
	0,2 mM	L-Luciferin
	10 mM	DTT
Luciferase-Reporterversuch, Lysepuffer	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	0,1%	NP40
	5 mM	EDTA
	25 mM	NaF
		Inhibitoren
Luciferase-Reporterversuch, Reaktionsmix	25 mM	Glycylglycin
	2 mM	ATP
	15 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
Lysepuffer, 1% SDS	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1%	NP40
	10%	Glycerol
	1%	SDS
	5 mM	EDTA
	25 mM	NaF
	Inhibitoren	

Weiterführung Tabelle 5: Puffer

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung
Lysepuffer, 0,1% SDS	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1%	NP40
	10%	Glycerol
	0,1%	SDS
	5 mM	EDTA
	25 mM	NaF Inhibitoren
Lysepuffer für genomische DNA-Isolation	100 mM	Tris-HCl, pH8,0
	5 mM	EDTA
	0,2%	SDS
	200 mM	NaCl
	50 mM	LiCl, frisch zugeben
"Phosphate buffered saline" (PBS), pH 7,4	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
"Puffer A"	10 mM	Hepes, pH 7,9
	1,5 mM	MgCl ₂
	0,5 mM	DTT
		Inhibitoren
RF1, pH 5,8 (mit Eisessig)	100 mM	RbCl ₂
	50 mM	MnCl
	10 mM	CaCl ₂
	30 mM	MOPS
	10%	Glycerin
RF2, pH 6,8 (mit NaOH)	10 mM	RbCl ₂
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	MOPS
	10 %	Glycerin
SDS-Page-Puffer, 10x	250 mM	Tris-Base
	1,92 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS

Weiterführung Tabelle 5: Puffer

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung
SDS-Probenpuffer, 5x	312,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	25%	β-Mercaptoethanol
	10%	Glycerol
	10%	SDS
	0,01%	Bromphenolblau
SDS-Sammelgel	125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	5%	Acrylamid
	0,1%	SDS
	0,04%	APS
	0,075%	TEMED
SDS-Trenngel	35 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	7,5-13%	Acrylamid
	0,1%	SDS
	0,04%	APS
	0,075%	TEMED
"Stripping" Puffer	2%	SDS
	100 mM	Mercaptoethanol
TAE, 50x	60 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	2 M	Tris-HCl, pH 8
	1 M	Eisessig
	50 mM	EDTA, pH8
TE-Puffer	10 Teile	Tris-HCL, pH8,0
	1 Teil	EDTA
"Tris buffered saline" (TBS)	50 mM	Tris, pH 7,5
	150 mM	NaCl
TBS-T	0,1%	Tween 20
		TBS
Transfer-Puffer, 10x	250 mM	Tris
	1,9 M	Glycin

5.1.6 Medien

5.1.6.1 Bakterienkultivierung

Die Selektion von Bakterienkulturen erfolgte mittels Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Streptomycin zu LB-Agar und LB-Medium.

Tabelle 6: Medien zur Bakterienkultivierung

Medium	Konzentration	Zusammensetzung
LB-Agarplatten	1,5%	Agar LB-Medium
LB-Medium	10 g/l 5 g/l 5 g/l	Trypton Hefeextrakt NaCl

5.1.6.2 Gewebekultur

Für die Gewebekultur wurden Medien und Zusätze der Firma Invitrogen verwendet, ansonsten wurde es anderes vermerkt.

Tabelle 7: Medien für die Gewebekultur

Medium	Konzentration	Zusammensetzung
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin		Gibco
Fötale Kälberserum (FKS)		PAA
OptiMEM		Gibco
Trypsin/EDTA-Lösung, 0,025%		Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplementiert, *	10% 100 mM 100 mM 10 µg/ml	Fötale Kälberserum (FKS) Hepes Pyruvat Penicillin/Steptomycin
DMEM, supplementiert, G418	10% 100 mM 100 mM 10 µg/ml 1 mg/ml	Fötale Kälberserum (FKS) Hepes Pyruvat Penicillin/Steptomycin G418
Kryopräservationsmedium, in DMEM	20% 5%	FKS DMSO

*MEF wurden in DMEM, supplementiert mit 20% FKS, kultiviert.

5.1.7 Enzyme

Tabelle 8: Enzyme und Restriktionsendonukleasen

Enzym	Hersteller
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
DNase, RNase frei	Roche Diagnostics
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
Proteinase K	Roche Diagnostics
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNase A	Invitrogen
Taq DNA Polymerase	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase	AppliChem

5.1.8 Synthetische Oligonukleotide

5.1.8.1 Oligonukleotide für die RNA-Interferenz (RNAi)

Die Sequenzen der Oligonukleotide für RNA-Interferenz sind ausschließlich gegen humane Sequenzen gerichtet und erkennen meist alle Transkriptvarianten der Zielgene.

Tabelle 9: Oligonukleotide für RNA-Interferenz

Name	Zielsequenz	Hersteller
Stealth siHIPK2 47 forw	5' caggguuugccugcugaauuuuau 3'	Invitrogen
Stealth siHIPK2 47 rev	5' auuuuuuuuucagcaggcaaacccug 3'	Invitrogen
Stealth siHIPK2 97 forw	5' ccaccaaccugaccaugaccuuuaa 3'	Invitrogen
Stealth siHIPK2 97 rev	5' uuuuuuuuuuaggucaaggucagguuggugg 3'	Invitrogen
Stealth siPML 58 forw	5' gccugucgguguaccggcagauugu 3'	Invitrogen
Stealth siPML 58 rev	5' acaaucugccguacaccgacaggc 3'	Invitrogen
Stealth siPML 90 forw	5' ucgacgaguucaaggugcgccugca 3'	Invitrogen
Stealth siPML 90 rev	5' ugcaggcgcaccuugaacucgucga 3'	Invitrogen
Stealth neg Control forw	Medium GC-Gehalt	Invitrogen
Stealth neg Control rev	Medium GC-Gehalt	Invitrogen
siHIPK2 9	5' ccaggtgaacatgacgacaga 3'	Qiagen
GL2 siKontrolle	5' aacgtacgcgggaataactcga 3'	Qiagen

5.1.8.2 Oligonukleotide für quantitative real-time PCR (qRT-PCR) Analysen

TaqMan[®] Sonden wurden als Set von Applied Biosystems bezogen. Das verwendete Fluorophor am 5'-Ende ist 5-Carboxyfluorescein (5'-FAM, Absorption $\lambda=492$ nm, Emission $\lambda=518$ nm). Der Akzeptor am 3'-Ende, "Dihydrocyclopyrroloindiol Tripeptid Minor Groove Binder" (MGB-3'), verfügt über keine Eigenfluoreszenz.

Tabelle 10: Oligonukleotide für die qRT-PCR

Name	Bestellnummer	Hersteller
GAPDH, 20x	Hs02758991_g1	Applied Biosystems
SIRT1, 20x	Hs01009005_m1	Applied Biosystems
mGAPDH, 20x	Mm99999915_g1	Applied Biosystems
mSIRT1, 20x	Mm00490758_m1	Applied Biosystems
Puma, 20x	Hs00248075_m1	Applied Biosystems
p21, 20x	Hs00355782_m1	Applied Biosystems
TP53AIP1, 20x	Hs00986095_m1	Applied Biosystems

5.1.8.3 Oligonukleotide für die Genotypisierung

Die Primer für die Genotypisierung der MEF *Hipk2*^{-/-} wurden Labor intern zur Verfügung gestellt.

Tabelle 11: Oligonukleotide für die PCR zur Genotypisierung der wildtyp und *Hipk2*^{-/-} MEF

Name	Zielsesequenz		
AU-HIPK2-13	5'	gaattctggtgactctcagg	3'
AU-HIPK2-14	5'	ctcatccaatgatctttgtcc	3'
AU-HIPK2-18	5'	cccagcacaatattgctcc	3'

5.1.8.4 Oligonukleotide für die Standard-PCR

Die Standardoligonukleotide wurden für Subklonierungen von DNA-Sequenzen von ausgewählten Peptiden genutzt.

Tabelle 12: Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Sequenz			Endonuklease
AROS for	5'	tatataggatccatgtccgccgcctgc	3'	EcoRI
AROS rev	5'	gcaggaataactcggcctcgagtatata	3'	BamHI

5.1.8.5 Oligonukleotide für die Mutagenese-PCR

Die Mutagenese Primer wurden mit Hilfe des Mutageneseprimer-Programms von Agilent Technologies erstellt und für die Einführung von Punktmutationen in SIRT1 Sequenz verwendet.

Tabelle 13: Oligonukleotide für die Mutagenese-PCR

Name	Zielsequenz
SIRT1 S682D forw	5' tgatagtgaggacatgccaggatccaagtttagaagaaccc 3'
SIRT1 S682D rev	5' gggttcttctaaactggatcctggcatgtcccactatca 3'
SIRT1 a1698g_g1704a_a1710g forw	5' ctaagagtaatgatgattggatgtatctgagtcaaaagggtgtatgg 3'
SIRT1 a1698g_g1704a_a1710g rev	5' ccatacaaccttttgactcagatacatccaaatcatcattactcttag 3'

5.1.8.6 Oligonukleotide für Hybridisierungsreaktionen

Die Oligonukleotide zur Herstellung der shRNA-Expressionsplasmide wurden anhand des Protokolls von "oligoengine" erstellt und zur Klonierung der Sequenz über Subklonierung in pSuper in den pGLentiLox 3.7 Vektor verwendet.

Tabelle 14: Oligonukleotide für Hybridisierungsreaktionen

Name	Zielsequenz
shSIRT1_forw, Araki et al. 2004	5' gatccctgatttagatgtgtctgaattcaagagattcagacacatctaa 3' atcatttttgaaa
shSIRT1_rev, Araki et al. 2004	5' agctttccaaaaatgatttagatgtgtctgaatctctgaattcagacaca 3' tctaaatcaggg

5.1.9 Kommerziell hergestellte cDNA

Tabelle 15: Kommerziell hergestellte cDNA

Name	Beschreibung	Hersteller
AROS	Komplettsynthese durch GeneArt®, LifeTechnologies mit EcoRI (5')- und BamHI (3')-Schnittstellen	GeneArt
DBC1	Human Homo sapiens, KIAA1967, transcript variant1, mRNA KIAA1967 (CloneID: IOH55751, NM_021174.5)	Invitrogen
SIRT1 K734R	Synthese von 1387 bp, zwischen interner BgIII-Schnittstelle von SIRT1 und XbaI in pCMV-3Tag-1A	GeneArt
SIRT1 S27D	Synthese von 878 bp, zwischen BamHI in pCMV-3Tag-1A und interner BgIII-Schnittstelle von SIRT1	GeneArt

5.1.10 Expressionsplasmide

Im Rahmen der Arbeit genutzte Vektoren und Expressionsplasmide sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 16: Vektoren

Name	Verwendung	Hersteller
p RSVrev	Eukaryotischer Expressionsvektor	Addgene
pBV-Luc-PUMA F1	Eukaryotischer Expressionsvektor	Gabe v. Dr. B. Vogelstein
pcDNA3	Eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen
pcDNA3_HA	Eukaryotischer Expressionsvektor	Labor intern
pCMV-3Tag-1A	Eukaryotischer Expressionsvektor	Stratagene
pCMV-3Tag-1A-dXhoI	Eukaryotischer Expressionsvektor mit Mutation der XhoI-Schnittstelle	Labor intern
pCMV-βGal	Eukaryotischer Expressionsvektor	Addgene
pDEST-15-GST	Prokaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen
pDEST-K2-HA	Eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen
pEGFP-C1	Eukaryotischer Expressionsvektor	Clontech
pGEX4T.1	Prokaryotischer Expressionsvektor	GE Healthcare
pGLentiLox 3.7	Eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen
pmCherry	Eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen
pMDLg	Eukaryotischer Expressionsvektor	Addgene
pSuper	Eukaryotischer Expressionsvektor	Oligoengine
pVSVg	Eukaryotischer Expressionsvektor	Addgene

Tabelle 17: Expressionsplasmide

cDNA	Vektor	Fusion	Hersteller
AROS	pGEX4T.1	GST	E. Conrad
AROS	pcDNA3_HA	HA	E. Conrad
CBP	pcDNA3	HA	Labor intern
DBC1	pDEST-15-GST	GST	E. Conrad
DBC1	pDEST-K2-HA	HA	E. Conrad
HIPK2	pTRIEX	6xHis, Flag	Labor intern
HIPK2	pcDNA3	Flag	Labor intern
HIPK2	pcDNA3	HA	Labor intern
HIPK2	mCherry	mCherry	Labor intern
HIPK2	pEGFP-C1	GFP	Labor intern
HIPK2 1-189	pGEX4T.1	GEX	Labor intern

Weiterführung Tabelle 17: Expressionsplasmide

cDNA	Vektor	Fusion	Hersteller
HIPK2 189-520	pGEX4T.1	GEX	Labor intern
HIPK2 521-800	pGEX4T.1	GEX	Labor intern
HIPK2 K221A	pTRIEX	6xHis, Flag	Labor intern
HIPK2 K221A	pcDNA3	Flag	Labor intern
HIPK2 K221A	pcDNA3	HA	Labor intern
HIPK2 K25R	pcDNA3	Flag	Labor intern
HIPK2 1-553	pcDNA3	Flag	Labor intern
HIPK2 551-1191	pcDNA3	Flag	Labor intern
p53	pGEX4T.1	GST	Labor intern
p53	pcDNA3	Keine	Labor intern
p53	pcDNA3	Flag	Labor intern
PML-IV	pcDNA3	Keine	Labor intern
PML-IV	pcDNA3	Flag	Gab v. Dr. P. Hämmerich
shSIRT	pGLentiLox 3.7	Keine	E. Conrad
shSIRT1	pSuper	Keine	E. Conrad
SIR Domäne	pGEX4T.1	GST	Labor intern
SIRT1	pEGFP-C1	GFP	E. Conrad
SIRT1	pCMV-3Tag-1A-dXhol	3xFlag	Labor intern
SIRT1	pGEX4T.1	GST	Labor intern
SIRT1	pEGFP-C1	GFP	E. Conrad
SIRT1 2xSA	pGEX4T.1	GST	E. Conrad
SIRT1 2xSA	pCMV-3Tag-1A-dXhol	3xFlag	Labor intern
SIRT1 2xSA	pEGFP-C1	GFP	E. Conrad
SIRT1 2xSD	pCMV-3Tag-1A-dXhol	3xFlag	E. Conrad
SIRT1 2xSD	pEGFP-C1	GFP	E. Conrad
SIRT1 3xMut S682A	pCMV-3Tag-1A-dXhol	3xFlag	E. Conrad
SIRT1 3xMut S682D	pCMV-3Tag-1A-dXhol	3xFlag	E. Conrad
SIRT1 3xMut	pCMV-3Tag-1A-dXhol	3xFlag	E. Conrad
SIRT1 K734R	pCMV-3Tag-1A-dXhol	3xFlag	E. Conrad
SIRT1 K734R	pEGFP-C1	GFP	E. Conrad
SIRT1 S27A	pGEX4T.1	GST	Labor intern
SIRT1 S27A	pCMV-3Tag-1A-dXhol	3xFlag	Labor intern
SIRT1 S27A	pEGFP-C1	GFP	E. Conrad
SIRT1 S27D	pCMV-3Tag-1A-dXhol	3xFlag	E. Conrad
SIRT1 S27D	pEGFP-C1	GFP	E. Conrad

Weiterführung Tabelle 17: Expressionsplasmide

cDNA	Vektor	Fusion	Hersteller
SIRT1 S682A	pCMV-3Tag-1A-dXhoI	3xFlag	Labor intern
SIRT1 S682A	pEGFP-C1	GFP	E. Conard
SIRT1 S682D	pGEX4T.1	GST	E. Conrad
SIRT1 S682D	pCMV-3Tag-1A-dXhoI	3xFlag	Labor intern
SIRT1 S682D	pEGFP-C1	GFP	E. Conard
SIRT1 1-507	pGEX4T.1	GST	Labor intern
SIRT1 232-747	pGEX4T.1	GST	Labor intern
SUMO-1	pEGFP-C1	GFP	Gabe v. Dr. F. Melchior

5.1.11 Bakterienstämme

Tabelle 18: Bakterienstämme

Stamm	Verwendung	Hersteller
<i>E. coli</i> Top10	Amplifikation von Plasmid-DNA	Invitrogen
<i>E. coli</i> scs110	Amplifikation von Plasmid-DNA ohne Methylierung	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 pLysS	Gewinnung rekombinanter Proteine	Novagen

5.1.12 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 19: Eukaryotische Zelllinien

Name	Beschreibung	Hersteller
H1299	Humane Lungenkrebszelllinie, p53 defizient	ATCC
HEK293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert mit dem T-Antigen des SV-40 Virus	ATCC
MEF wildtyp	Murine embryonale Fibroblasten	Lab. intern
MEF <i>Hipk2</i> ^{-/-}	Murine embryonale Fibroblasten	Lab. intern
MEF <i>Hipk2</i> ^{flox/flox;Rosa26-CreERT2}	Murine embryonale Fibroblasten	Lab. intern
U2OS	Humane Osteosarcom Zelllinie	ATCC

Die im Folgenden genannten Zelllinien wurden durch Selektion mittels G418, Endkonzentration 1 mg/ml, erzeugt.

Tabelle 20: Generierte stabile eukaryotische Zelllinien

Name	Beschreibung
U2OS/GFP-SIRT1	Humane Osteosarcom Zelllinie, stabil transfiziert mit pEGFP-SIRT1, Klon 1
U2OS/pCMV-3Tag-1A	Humane Osteosarcom Zelllinie, stabil transfiziert mit pCMV-3Tag-1A, Massenkultur
U2OS/Flag-SIRT1	Humane Osteosarcom Zelllinie, stabil transfiziert mit pCMV-3Tag-1A-dXhol-SIRT1 3xMut, Klone 5, 10
U2OS/Flag-SIRT1 S682D	Humane Osteosarcom Zelllinie, stabil transfiziert mit pCMV-3Tag-1A-dXhol-SIRT1 3xMut S682D Klone 4, 5
U2OS/Flag-SIRT1 S682A	Humane Osteosarcom Zelllinie, stabil transfiziert mit pCMV-3Tag-1A-dXhol-SIRT1 3xMut S682A Klone 7, 9
U2OS/HA-AROS	Humane Osteosarcom Zelllinie, stabil transfiziert mit cDNA-3_HA-AROS, Massenkultur

5.1.13 Antikörper

5.1.13.1 Erstantikörper

Erstantikörper wurden für Immunreaktionsanalysen in 5% Magermlich/TBS-T, 5% BSA/TBS-T oder 5% BSA/PBS in den angegebenen Verdünnungen angesetzt. Für Immunfluoreszenzexperimente wurden die Antikörper in PBS verdünnt.

Tabelle 21: Erstantikörper für Immunreaktion, Immunfluoreszenz und IP

Erstantikörper	Wirt	Verdünnung	Verdünnung	IP	Hersteller
		WB	IF		
Acetyl-Lysin	Maus	1:500			Millipore
Aktin C4	Maus	1:20000			MP Biomedicals
Flag M2	Maus	1:1000	1:1000		Sigma
Flag- FL373	Kaninchen	1:1000			Santa Cruz
GFP-FL393	Kaninchen	1:1000			Santa Cruz
HA 3F10	Ratte	1:1000			Roche
HIPK2 88A	Kaninchen	1:2000			Eurogentech
HIPK2 C1	Kaninchen			0,5 µg	Dr. Pineda
HIPK2 C3	Kaninchen		1:100	0,5 µg	Dr. Pineda
Histon H3	Ziege	1:1000			Santa Cruz
Histon H3 acK9	Kaninchen	1:5000			Millipore
Histon H3 acK56	Kaninchen	1:1000			Epitomics
Histon H4	Kaninchen	1:1000			Millipore

Weiterführung Tabelle 21: Erstantikörper für Immunreaktion und Immunfluoreszenz und IP

Erstantikörper	Wirt	Verdünnung	Verdünnung	IP	Hersteller
		WB	IF		
Histon H4 acK16	Kaninchen	1:1000			Millipore
PARP1	Maus	1:500			BD Pharming
p53 DOI	Maus	1:1000			Santa Cruz
p53 acK373/382	Kaninchen	1:1000			Upstate
p53 pS46	Maus	1:1000			Biozol
p53 pS46	Kaninchen	1:1000			Cell Signaling
PML	Kaninchen	1:1000	1:100		Santa Cruz
SIRT1	Kaninchen	1:1000			Millipore
SIRT1	Maus	1:1000			Millipore
SIRT1 MOI	Maus		1:50		AK Online
SIRT1 pS27	Kaninchen	1:1000			Cell Signaling
SIRT1 pS682	Kaninchen	1:1000 (T1*)	1:100 (T3*)		Dr. Pineda

* T1: Kaninchen 1, T3: Kaninchen 3

Die von den Firmen Dr. Pineda und Eurogentech hergestellten und affinitätsgereinigten Peptidantikörper sind gegen folgende Peptidsequenzen gerichtet:

Tabelle 22: Sequenzen der generierten Erstantikörper

Name		Sequenz	
HIPK2 88A	H ₂ N-	QKCGLKRKSEEIENTSC	-COOH
HIPK2 C1	H ₂ N-	QKCGLKRKSEEIENTSC	-COOH
HIPK2 C3	H ₂ N-	QKCGLKRKSEEIENTSC	-COOH
SIRT1 pS682	H ₂ N-	KGTCQpSPSLE	-COOH

5.1.13.2 Zweitantikörper

Die für Immunreaktionsanalysen eingesetzten Zweitantikörper wurden in 5% Milch verdünnt.

Tabelle 23: Zweitantikörper für die Immunreaktion

Zweitantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen-HRPO	Ziege	1:15000	Dianova
Anti-Maus-HRPO	Ziege	1:15000	Dianova
Anti-Ratte-HRPO	Ziege	1:15000	Dianova
Anti-Ziege-HRPO	Esel	1:15000	Dianova

Zweitantikörper für Immunfluoreszenzanalysen wurden in PBS verdünnt.

Tabelle 24: Zweitantikörper für Immunfluoreszenz

Zweitantikörper /Excitation, Emission [nm]	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen-Alexa-488/ 488, 507	Ziege	1:500	Invitrogen
Anti-Maus- Alexa-488/ 488, 507	Ziege	1:500	Invitrogen
Anti-Kaninchen-Alexa-594/ 594, 610	Ziege	1:500	Invitrogen
Anti-Maus- Alexa-594/ 594, 610	Ziege	1:500	Invitrogen
Anti-Kaninchen-Alexa-405/ 405, 455	Ziege	1:500	Invitrogen

5.2 Methoden

5.2.1 Mikrobiologische Methoden

5.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

E. coli Top10, scs110 und BL21 pLysS wurden in 1x LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) entsprechend der Resistenz der transformierten Plasmide bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) über Nacht inkubiert.

5.2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Chemische Behandlung befähigt Bakterien Plasmid-DNA aufzunehmen. Dies wird als Kompetenz bezeichnet. *E. coli* der Stämme Top10, scs110 und BL21 pLysS wurden in 3 ml 1x LB-Medium inokuliert und über Nacht (37 °C, 180 rpm) inkubiert. Am Folgetag wurden 2 ml der Suspension in 20 ml 1x LB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte $OD_{600nm} = 0,4- 0,6$ inkubiert (37 °C, 180 rpm). Nach Erreichen der entsprechenden OD wurden die Bakterien in ein steriles, vorgekühltes Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 min auf Eis gehalten und im Anschluss durch Zentrifugation (4 °C, 2000 g, 5 min) pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml RF1- Puffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Durch wiederholte Zentrifugation wurden die Bakterien in 1 ml RF2- Puffer gepuffert und 1 h auf Eis gehalten, anschließend wurde die Bakteriensuspension aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der chemisch kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

5.2.1.2.1 Transformation von Bakterien

Als Transformation wird das Einbringen fremder Plasmid-DNA in *E. coli* bezeichnet. Chemisch kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,2 bis 1 µg Plasmid-DNA versetzt. Um DNA in Bakterien zu transferieren, wurden diese für 30 s bei 42 °C inkubiert

und für 5 min auf Eis gehalten. Die transformierten Bakterien wurden mit 750 µl 1xLB-Medium versetzt und inkubiert (1h, 37 °C, 800 rpm). Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf antibiotikumhaltige Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Inokulation einer Bakterienkultur wurde eine Kolonie von der Agarplatte in 1x LB- Medium mit Antibiotikum überführt und über Nacht inkubiert (37 °C, 180 rpm).

5.2.1.3 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* BL21 pLysS

Zur Expression von Glutathion-S-transferase (GST)- oder an einem sechsfachen Histidin-Rest (6xHis)- gekoppelten rekombinanten Fusionsproteinen, wurden *E. coli* BL21 pLysS mit den entsprechenden bakteriellen Expressionsvektoren transformiert und in 100 ml 1x LB-Medium mit Antibiotikum über Tag (37 °C, 180 rpm) vermehrt. Die Bakteriensuspension wurde auf 500 ml mit 1x LB- Medium mit Antibiotikum aufgefüllt und mit 300 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) versetzt, um die unter der Kontrolle des induzierbaren lac-Promotors stehende Expression der Proteine zu einzuleiten. Um eine bestmögliche Faltung der rekombinanten Proteine zu erhalten, wurden die induzierten Bakteriensuspensionen über Nacht (18 °C, 180 rpm) inkubiert.

5.2.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.2.1 Plasmidpräparation

E. coli Top10 wurden mit den zu extrahierenden Plasmiden transformiert. Plasmidpräparationen in kleinem Maßstab wurden in 3-5 ml, für Präparationen in großem Maßstab 250 ml 1x LB-Medium mit Antibiotikum inokuliert und über Nacht inkubiert (37 °C, 180 rpm). Die Plasmidisolierung erfolgte mittels Plasmidextraktions Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Plasmide wurden in EB-Puffer eluiert und die Plasmidkonzentration wurde mittels NanoDrop anhand der Absorption bei 260 nm vermessen. Die Reinheit der DNA wurde durch den Quotienten der Absorption [260 nm/280 nm] bestimmt.

5.2.2.2 RNA-Isolation

RNA wurde aus humanen Zellen entweder mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben oder durch Trizol[®] Extraktion gewonnen.

Für die Extraktion von RNA durch Trizol[®] Fällung wurde das Kulturmedium abgenommen und 1 ml Trizol[®] pro Loch einer 6-Loch-Schale zugegeben. Durch Pipettieren wurden die Zellen lysiert und das Lysat in ein Eppendorfgefäß überführt. Zugabe von 200 µl Chloroform transferiert RNA und DNA in die wässrige Phase. Das Gemisch wurde 3 min bei RT inkubiert und im Anschluss die Phasen durch Zentrifugation (12000xg, 4 °C, 15 min) getrennt. Die Wasserphase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die RNA durch Zugabe

von 500 µl Isopropanol gefällt. Durch Zentrifugation wurde die RNA pelletiert (12000xg, 4 °C, 10 min) und anschließend mit 1 ml 75% Isopropanol durch Aufwirbeln gewaschen und erneut pelletiert (7500xg, 4 °C, 5 min). Das RNA-Pellet wurde luftgetrocknet, in 40 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei 55 °C für 10 min gelöst.

Falls im Anschluss eine qRT-PCR Analyse erfolgen sollte, wurde die RNA mit RNase-freier Dnase behandelt (30 min, RT). Die Dnase wurde bei 65 °C für 20 min inaktiviert.

Die RNA Konzentration wurde mittels NanoDrop anhand der Absorption bei 280 nm vermessen. Die Reinheit der RNA wurde durch den Quotienten der Absorption [260 nm/280 nm] bestimmt.

5.2.2.3 Reverse Transkription (RT)

Die Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mittels High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben.

5.2.2.4 Isolation genomischer DNA

Zur Gewinnung genomischer DNA wurden ca. 1 Mio. Zellen in 500 µl Lysepuffer mit Protinase K (Endkonzentration 0,1 mg/ml) über Nacht lysiert (56 °C, 600 rpm). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation präzipitiert (17000xg, 10 min) und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Die genomische DNA wurde mittels Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation gewonnen (17000 xg, 20 min). Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen (17000 xg, 5min) und luftgetrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 70 µl TE-Puffer resuspendiert und gelöst (2h bei 60 °C). Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

5.2.2.5 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

5.2.2.5.1 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) wurde genutzt, um die Reduktion der SIRT1 Proteinmengen nach HIPK2 RNA-Interferenz sowie die Expression von p53 Zielgenen zu untersuchen. Die cDNA wurden in einer 1:5 Verdünnung mit den in Tabelle 10 aufgeführten TaqMan[®] Sonden für die quantitative Expressionsanalyse eingesetzt. Die Polymerase baut das 5'-Ende der Sonde während der Synthese ab, wodurch sich das Donor- (FAM) und Akzeptorfluorofor (MGB) voneinander entfernen und somit die Fluoreszenzintensität ansteigt. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge des Amplifikates zu. Als Konrollen wurden Wasser und der RT-Mix ohne cDNA vermessen. Die Proben wurden in Triplikaten analysiert.

Reaktionsmix (Gesamtvolumen 20 µl):

10 µl	TaqMan® Gene Expression Master Mix
1 µl	TaqMan® Sonden (vgl. Tabelle 13)
5 µl	cDNA (1:5 Verdünnung mit Wasser)
5 µl	ddH ₂ O

qRT-PCR Protokoll (Vortemperierung auf 50 °C für 2 min):

1)	Initiale Denaturierung	10 min	95 °C	40 Zyklen
2)	Denaturierung	15 sek	95 °C	
	Hybridisierung/Elongation	1 min	60 °C	

5.2.2.5.2 Genotypisierungs-PCR

Zur Genotypisierung der wildtyp und *Hipk2*^{-/-} MEF wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Oligonukleotide eingesetzt.

Reaktionsmix (Gesamtansatz 25 µl):

2,5 µl	10x Taq Polymerase Puffer mit MgCl ₂
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
ca. 50 ng	zu amplifizierende DNA
Je 0,2 µl	"forward" und "reverse" Primer (10 pM)
0,25 U	Taq Polymerase
22,5 µl	ddH ₂ O

PCR- Programm:

1)	Initiale Denaturierung	3 min	94 °C	33 Zyklen
2)	Denaturierung	30 sek	94 °C	
	Primerhybridisierung	45 sek	60 °C	
	Elongation	30 sek	72 °C	
3)	Termination	5 min	72 °C	

5.2.2.5.3 Standard-PCR

Mittels Polymerase-Kettenreaktion wurden standardmäßig DNA- Abschnitte amplifiziert, um unter anderem Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme außerhalb der kodierenden Sequenz (CDS) einzuführen, was die Klonierung in verschiedene Vektoren ermöglicht (siehe Tabelle 12).

Reaktionsmix (Gesamtvolumen 20 µl, 3% DMSO Endkonzentration):

4 µl	10x Phusion HF® GC-Puffer
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	zu amplifizierende DNA (25 pg/µl)
Je 1 µl	"forward" und "reverse" Primer (0,5 µM)
0,02 U	Taq Polymerase
22,5 µl	ddH ₂ O

PCR- Programm:

1)	Initiale Denaturierung	30 sek	98 °C	
2)	Denaturierung	10 sek	98 °C	
	Primerhybridisierung	30 sek	55 °C	
	Elongation	60 sek	72 °C	28 Zyklen
3)	Termination	5 min	72 °C	

5.2.2.5.4 Mutagenese-PCR

Durch eine Mutagenese-PCR wurden unter der Verwendung der in Tabelle 13 aufgeführten Oligonukleotide eine oder mehrere Mutationen in kodierende Sequenzen eingeführt.

Im Falle der phospho-mimetischen oder -defizienten SIRT1 Mutanten wurden gezielt Serine (S) zu Alanin (A) oder Aspartat (D) mutiert. In die pCMV-3Tag-1A-dXhoI-SIRT1 Vektoren wurde eine Trippelmutation in die Bindesequenz der sh-SIRT1 RNA (pSuper-shSIRT1 oder pGLentiLox 3.7-shSIRT1) eingebracht. Dies ermöglichte die Generierung von stabilen Überexpressionslinien, wodurch gleichzeitig ein knock-down des endogenen SIRT1 erfolgen kann. Die Mutagenese PCR erfolgte nach dem Protokoll der Standard-PCR.

5.2.2.5.5 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zum direkten Einbringen kurzer DNA-Sequenzen (Tabelle 14) in Vektoren mußten diese zuerst hybridisiert werden. Je 100 µg (in 1 µl) der in Tabelle 17 aufgeführten Oligonukleotide wurden mit 48 µl Hybridisierungspuffer versetzt, 4 min bei 95 °C und weiterhin 10 min bei 70 °C inkubiert. Darauf folgte eine sukksesive Abkühlungsphase der hybridisierten Oligonukleotide auf 4 °C.

Zur besseren Ligation mit dem Vektor wurden die hybridisierten Oligonukleotide phosphoryliert. Die Ligation erfolgte wie unter 5.2.2.7.1 beschrieben.

Phosphorylierung der Oligonukleotide (Gesamtvolumen 10 µl; 30 min, 37 °C; 10 min, 70 °C):

2 µl	hybridisierte Oligonukleotide
1 µl	T4 Polynukleotidkinase-Puffer
5 U	T4 Polynukleotidkinase
1 µl	ATP (10 mM)
5 µl	ddH ₂ O

5.2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse von Nucleinsäuren erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese, wobei die Nucleinsäuren proportional zu ihrer Größe und Ladung über ein elektrisches Feld aufgetrennt wurden. Es wurden Agarosegele zwischen 1- 1,5% Agarose in 1xTAE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden in 1x DNA-Ladepuffer aufgenommen und in die Taschen des Gels geladen. Die Ermittlung der Größe der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe eines DNA-Größenmarkers.

5.2.2.7 Herstellung von Expressionsplasmiden

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Expressionsplasmide sind mit anderen in Tabelle 17 aufgeführt.

5.2.2.7.1 Klassische Klonierung

Restriktionsspaltung von DNA

DNA enthält palindromische Sequenzen, die von Restriktionsendonucleasen erkannt werden, welche die DNA hydrolytisch spalten. Die Enzyme wurden im angegebenen Restriktionspuffer nach Herstellerangaben verwendet. Für einen präparativen Verdau wurden 0,5- 1 µg DNA, für einen analytischen Verdau 150- 300 ng DNA eingesetzt.

Dephosphorylierung der DNA

Um eine Religation der DNA an den Schnittstellen nach der Hydrolyse zu vermeiden, wurden die 5'-Enden dephosphoryliert. Zur Dephosphorylierung wurde "Calf Intestinal Phosphatase" (CIP) nach Herstellerangaben eingesetzt.

Reinigung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Reinigung wurden die DNA-Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt und die DNA aus dem Gel ausgeschnitten. Mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) wurde die DNA aus der Agarosematrix nach Herstellerangaben herausgelöst.

Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wird durch DNA-Ligasen katalysiert, wobei eine Phosphodiesterbindung zwischen 3'-OH und 5'-Phosphatgruppe ausgebildet wird. Die Ligation von Vektor und Inserts wurde im Verhältnis 1:5, inklusive Negativkontrolle, angesetzt und nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss wurde die DNA in kompetente *E. coli* Top10 transformiert.

5.2.2.7.2 Gateway Klonierung (Invitrogen)

Invitrogen vertreibt die patentierte Gateway-Klonierungsmethode, die auf dem spezifischen Rekombinationssystem des Lambda-Bakteriophagen basiert. Diese Klonierungsstrategie beruht zum einen auf den "site-specific-attachment" (att) Rekombinationssequenzen und zum anderen auf dem Clonase™ Enzymmix, der die zur Rekombination benötigten Enzyme, Integrase (Int) und Excisionase (Xis) sowie den Integration Host Factor (IHF) enthält. att-Erkennungssequenzen, attB auf dem Plasmid und attP auf dem Lambda-Phagen Chromosom, dienen als Bindungsstellen für die Rekombinationsproteine. Die Rekombination erfolgt zwischen attB- und attP-Sequenzen, die in attL und attR-Sequenzen resultieren. Die Gensequenz von Interesse wurde in einem Entry-Vektor (pEntry), der attL-Sequenzen enthält, geliefert und mittels Gateway-Strategie in einen Destinationsvektor (pDest), der attR-Sequenzen enthält, umklont. Die Selektion auf positive Klone erfolgte mittels *ccdB*-Gen, das für ein Protein kodiert, das die bakterielle DNA-Gyrase inhibiert. Die *ccdB*-Sequenz befindet sich zwischen den att-Sequenzen des Vektors, in den die DNA-Sequenz von Interesse kloniert werden soll und wird durch die Rekombination in den Donor-, bzw. Entry-Vektor transferiert. Somit teilen sich die Bakterien, die den Donor-, bzw. Entry-Vektor enthalten, durch die Hinderung der Gyrase nicht mehr. Die Gateway-Klonierung wurde nach Herstellerangaben im halben Ansatzvolumen durchgeführt.

5.2.3 Zellbiologische Methoden

5.2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂, 21% O₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in supplementiertem DMEM nach Herstellerangaben. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium abgenommen, der Zellrasen einmal mit 1xPBS gewaschen und abhängig von der Kulturgefäßgröße mit 0,5 -2 ml Trypsin-EDTA (0,05%) vom Gefäßboden gelöst. Der Ablösevorgang wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Kulturmedium gestoppt, die Zellen durch vorsichtiges Scheren vereinzelt und je nach gewünschter Zellzahl in ein frisches Kulturgefäß (vergleiche Tabelle 25) überführt.

Tabelle 25: Zellzahlen nach Kulturgefäßgröße

Kulturgefäß	Zellzahl
15 cm Ø	1×10^6 - $2,5 \times 10^6$
10 cm Ø	$0,8 \times 10^6$ - 2×10^6
6 cm Ø	$2,5 \times 10^5$
6-Lochschale/pro Loch	$0,8$ - 1×10^5

Die Zellzahl wurde mittels Trypanblaufärbung und Neubauerzählkammer nach Herstellerangaben ermittelt. Für Experimente wurden die Zellen 24h vor der Transfektion oder Behandlung ausgesäht.

5.2.3.2 Konservierung eukaryotischer Zelllinien

Eukaryotische Zellen wurden in flüssigem Stickstoff (-178 °C) gelagert. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert, in Kulturmedium aufgenommen und anschließend pelletiert (1200 rpm, 4 °C, 5 min). Das Zellpellet wurde in Kryopräservationsmedium resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden graduell (1 °C pro Minute) im Kryocontainer "Mr. Frosty" auf -80 °C abgekühlt und danach in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37 °C angewärmt bis nur noch ein kleiner Eiskern im Kryoröhrchen verblieb, dann in 5 ml Kulturmedium gegossen und pelletiert (1200 rpm, 4 °C, 5 min). Das Zellpellet wurde in 5-10 ml Medium resuspendiert und in ein Kulturgefäß der geeigneten Größe überführt.

5.2.3.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Es wird zwischen temporärem Einbringen von DNA (transiente Transfektion) und dauerhafter Integration von DNA in das Gemon der Zelle (stabile Transfektion) unterschieden. Eine stabile Transfektion erfolgt durch Antibiotikumselektion über mehrere Wochen.

5.2.3.3.1 Transiente Transfektion nach der Kalziumphosphat-Methode

Die Transfektion nach der Kalziumphosphat-Methode zur ektopischen Proteinexpression und Virenproduktion eignet sich für HEK293T Zellen, da sie die gebildeten Kalziumphosphat-DNA-Kristalle besonders gut aufnehmen. Der Transfektionsmix bestehend aus 450 µl ddH₂O mit der gewünschten Plasmid-DNA, 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 500 µl 2xHBS wurde nach dem Zerkleinern der Kalziumphosphat-DNA-Kristalle durch Verwirbeln auf die Zellen gegeben. Differenzen der DNA-Mengen wurden mit den entsprechenden Leervektoren ausgeglichen.

5.2.3.3.2 Transiente Transfektion mittels Lipofectamin™ 2000

Alle weiteren Zelllinien wurden mit dem lipophilen Transfektionsreagens Lipofectamin™ 2000 im Verhältnis 3:1 (Lipofectamin™ 2000: DNA) nach Herstellerangaben in OptiMEM transfiziert. Differenzen der DNA-Mengen wurden mit den entsprechenden Leervektoren ausgeglichen.

5.2.3.3.3 Stabile Transfektion von U2OS Osteosarkom Zellen

Die stabile Intrgration von Fremd-DNA-Fragmenten in U2OS Osteosarkom Zellen wurde nach Transfektion von 1 µg der gewünschten Plasmide mit Lipofectamin™ 2000 und durch Antibiotikumselektion mit G418 (1 mg/ml) erreicht. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzeugten stabilen Zelllinien sind in Tabelle 20 aufgeführt.

5.2.3.4 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) wurde mittels Transfektion von stealth small interfering RNA (stealth siRNA) und small interfering RNA (siRNA) (siehe Tabelle 9) mit Lipofectamin™ 2000 nach Herstellerangaben oder durch Transduktion von Expressionsvektoren, die unter einem RNA-PolymeraseIII-Promoter kodieren, durchgeführt. Durch RNAi wird die Expression von Proteinen depletiert, indem die Translation der messenger RNA (mRNA) durch die komplementäre Sequenz der siRNA oder shRNA verhindert wird. Doppelsträngige RNA-Fragmente werden von dem Enzym Dicer erkannt und in siRNAs oder shRNAs von 22-24 bp gespalten. Diese siRNAs oder shRNAs werden von RISC (RNA Induced Silencing Complex) erkannt und zu einer der mRNA komplementären Sequenz abgebaut, was die Proteinsynthese inhibiert.

Die RNAi erfolgte in 6-Loch-Schalen und die U2OS Zellen wurden nach dem in Abbildung 40 dargestellten Schema weiter behandelt.

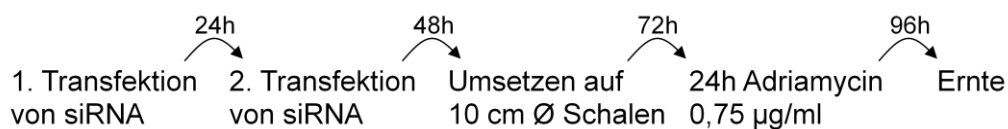


Abbildung 40: Schematische Darstellung der RNAi in U2OS Zellen.

U2OS Zellen wurden in 6-Loch-Schalen kultiviert und mit stealth siRNA oder siRNA transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen eines Ansatzes in 10 cm Ø Schalen transferiert und nachfolgend mit Adriamycin behandelt (0,75 µg/ml, siehe Zeitangaben). Die Ernte und Lyse erfolgte wie unter 4.2.4.3 beschrieben.

5.2.3.5 Lentivirale Transduktion eukaryotischer Zellen

Das Einbringen von DNA in Zellen mittels Viren wird als Transduktion bezeichnet. Virale Vektoren, die von pathogenen Viren abgeleitet sind, wurden so modifiziert, dass sie zwar infektiös, aber nicht mehr replikationsfähig sind. Lentivirale Vektoren können, im Gegensatz zu retroviralen Vektoren, sowohl proliferierende Zellen als auch teilungsunfähige Zellen transduzieren. Die Transduktion wurde im Drei-Plasmid-System ausgeführt. Die Verpackungszelllinie HEK293T wurde nach der Calciumphosphat-Methode mit pGLenti-Lox 3.7, der das zu inserierende Transgen enthält (20 µg), sowie mit den Verpackungsplasmiden pVSVg (5 µg), pMDLg (5 µg) und pRSVrev (5 µg), die für Proteine kodieren, die zur Bildung der intakten, infektiösen Viruspartikel benötigt werden, transfiziert. 4 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Der Vektor pGLenti-Lox 3.7 basiert auf dem murinen Leukämievirus (MLV) und trägt das zu inserierende Transgen, shSIRT1 sowie das Verpackungssignal ψ . Diese sind wiederum von "long terminal repeats" (LTR), die für die Prozessierung und Insertion des Transgens in das Genom der Wirtszelle sorgen, flankiert. ψ wiederum bewirkt eine effiziente Verpackung der Viren. Das pVSVg kodiert für das Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus (VSV-G), das den Tropismus des Virus bestimmt und die Aufnahme in die Wirtszelle vermittelt. Das pMDMg kodiert für das Capsidprotein "group-specific antigen" (GAG) und die Reversetranskriptase Pol. pRSVrev kodiert für "regulator of expression of virion proteins" (Rev), welches an die LTRs der viralen mRNA bindet, worauf diese aus dem Kern exportiert und prozessiert werden. Nach 72h wurde der Virusüberstand abgenommen, durch einen 0,45 µm Filter die größeren Verunreinigungen daraus entfernt, und je 2 ml des Überstand auf die Zielzellen (70-80% konfluent) in 6-Loch-Platten gegeben. Um die Oberflächeneigenschaften zu verbessern wurden 8 µg/ml Polybren zugesetzt. Nach 24 Stunden wurden die transduzierten Zellen auf Ø 10 cm Platten umgesetzt.

5.2.3.6 Behandlung von Zellen

Die Behandlungen wurden 24h nach Aussaat der Zellen für die angegebenen Zeiträume durchgeführt. Die Kontrollzellen wurden mit dem jeweiligen Lösungsmittel über den gleichen Zeitraum inkubiert.

5.2.3.6.1 DNA-Schadensinduktion durch Adriamycin

Adriamycin inhibiert die Dissoziation der Topoisomerase II nach der Sektion des DNA-Doppelstrangs und simuliert auf diese Weise einen DNA-Doppelstrangbruch und initiiert die DNA-Schadensantwort. Weiterhin wird durch Radikalbildung die intrazelluläre ROS Konzentration erhöht (Painter, 1978; Tanaka, 1980). Die Konzentration zur

Doppelstrangbruchinduktion betrug 0,75 µg/ml (1,3 µM) Adriamycin für 6-24h im Kulturmedium. Die Stammkonzentration beträgt 10 mg/ml in H₂O.

5.2.3.6.2 Hemmung des proteasomalen Abbaus durch MG132 und Lactacystin

Der reversible Inhibitor der 20S-Einheit des Proteasoms, MG132 (Tsubuki et al., 1993), wurde für 4-8h in der Konzentration von 20 µM (Stock 20 mM in DMSO) und der irreversible Inhibitor der 19S-Untereinheit, Lactacystin (Fenteany und Schreiber, 1998), wurde für 4h in einer Konzentration von 5 µM (Stammlösung 2,5 mM in DMSO) eingesetzt.

5.2.3.6.3 Hemmung der Proteinneusynthese durch Cycloheximid (CHX)

CHX hemmt die Bindung der tRNAs an Ribosomen, die E2F-vermittelte Kopplung der Aminosäure an das wachsende Protein sowie das Freisetzen der tRNA aus dem Ribosom (Obrig et al., 1971; Schneider-Poetsch et al., 2010). Die Endkonzentration im Kulturmedium betrug 50 µg/ml (Stammlösung 50 mg/ml in Ethanol). 8h nach der initialen CHX Gabe erfolgte eine erneute Applikation von CHX (50 µg/ml).

5.2.3.6.4 UV-C Bestrahlung

Die dosengenaue (50 J/m²) Bestrahlung von Zellen erfolgte mittels UV Stratalinker 1800[®]. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und das Kulturgefäß ohne Deckel im Stratalinker positioniert. Die weitere Kultivierung erfolgte im Medium bei 37°C.

5.2.3.6.5 Tamoxifengabe

Hipk2^{flox/flox;Rosa26-CreERT2} MEF haben ein Cre-Rekombinase Allel (Cre-ERT2) am ubiquitären ROSA Locus. An die Cre-Rekombinase ist ein Östrogenrezeptor fusioniert, welcher die Rekombinase im Zytoplasma hält. Nach Applikation von Tamoxifen, erfolgt die Translokation der Rezeptor-Rekombinase-Fusion in den Zellkern, wo die *Hipk2* Allele flankiert mit LoxP-Stellen vorliegt. Somit kann ein konditioneller HIPK2 "knock-out" nach Tamoxifengabe erfolgen. Die Behandlung mit Tamoxifen in einer Konzentration von 1 µM (Stammlösung 1 mM in Ethanol) erstreckte sich über 5 Tage (d).

5.2.3.7 Luciferase Assay

H1299 Zellen wurden in 6 Loch-Platten kultiviert und mit dem Reporterplasmid pBV-Luc-PUMA F1 (Yu et al., 2001), Flag-SIRT1, Flag-SIRT1 S682D sowie HA-CBP und p53 mit Lipofectamin[®] 2000 transfiziert. Zur Normalisierung wurde pCMV-βGal ko-transfiziert. Die Lyse erfolgte in 200 µl Luciferase-Reporterassay Lysepuffer (10 min, 4 °C). Die Zelltrümmer wurden per Zentrifugation pelletiert (13.000rpm, 10 min, 4 °C). Das Lysat wurde

in Triplikaten im Luciferase Assay (20 µl Lysat) mit Luciferase-Reporterversuchs-Reaktionspuffer (100µl/20 µl) und mittels Luciferase-Reporterversuch Injektionspuffer (50 µl/20µl) im „Synergy2“ vermessen. Zur Normalisierung wurde die βGal-Aktivität in Gegenwart von LacZ-Puffer (100 µl/10 µl Lysat) im ELISA-Reader Muliscan MS in Triplikaten gemessen.

5.2.4 Proteinbiochemische Methoden

5.2.4.1 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Rekombinante humane Proteine werden in *E.coli* pLysS exprimiert, wobei wenig Proteinmodifizierung stattfindet. Daher eignen sich nach dieser Methode gereinigte Proteine für *in vitro* Experimente, wie Kinasereaktionen, Spezifitätstests für Antikörper und *in vitro* Präzipitationsversuche.

5.2.4.1.1 Isolierung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli* BL21 pLysS

Nach Expression der GST-Fusionsproteine in *E. coli* BL21 pLysS, wurden die Bakterien pelletiert (6000 rpm, 4 °C, 10 min) und in 10 ml 1xPBS, 1 mM PMSF resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurde die Bakteriensuspension sonifiziert und auf 0,5% Triton X-100 eingestellt. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden pelletiert (10.000 rpm, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Glutathion-Sepharose versetzt. Die Anbindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathionmatrix erfolgte für 1,5-2 Stunden bei 4 °C. Im Anschluss wurde die Glutathion-Sepharose zweimal mit 1xPBS, 0,1% Triton X-100 und einmal mit 1xPBS gewaschen (2000 rpm, 4 °C, 1 min). Die GST-Fusionsproteine wurden entweder an die Sepharose-Matrix gekoppelt in 1xPBS aufgenommen (Lagerung bei 4 °C) oder von der Matrix mit 15 mM Glutathion in 1xPBS, pH 7,4, eluiert und gegen 1xPBS dialysiert (Lagerung bei -80 °C). Die Proteinaufreinigung wurde in einer SDS-Page mittels Coomassie Brilliantblau Färbung überprüft.

5.2.4.1.2 Isolierung von His-Fusionsproteinen aus *E. coli* BL21 pLysS

Nach der Expression der His-Fusionsproteine in *E. coli* BL21 pLysS, wurden die Bakterien pelletiert (6000 rpm, 4 °C, 10 min) und in 10 ml HEMGN-Puffer, 1 mM PMSF resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurde die Bakteriensuspension sonifiziert und auf 0,5% NP40 eingestellt. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden pelletiert (10.000 rpm, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl NiNTA-Agarose versetzt. Die Anbindung der 6xHis-gekoppelten Proteine an die NiNTA-Matrix erfolgte für 1,5-2 Stunden bei 4 °C. Im Anschluss wurde die NiNTA-Agarose dreimal mit HEMGN, 200mM KCl, 10 mM Imidazol gewaschen (2000 rpm, 4 °C, 1 min). Die 6xHis-Fusionsproteine wurden von der NiNTA-Matrix mit 2,5M Imidazol inHEMGEN eluiert und über Nacht gegen

HEMGN dialysiert (Lagerung -80 °C). Die Proteinreinigung wurde im Immunblotverfahren überprüft.

5.2.4.2 Isolierung von Histonkomplexen

HEK293T Zellen wurden gesammelt und pelletiert (300g, 10min) und mit 10 ml 1xPBS gewaschen (300g, 10 min). Das Zellpellet wurde in 1 ml hypotonischem Lysepuffer lysiert (30 min, rotieren, 4 °C). Die Zellkerne wurden per Zentrifugation (10000g, 10 min, 4 °C) gesammelt und in 400 µl 0,4N Schwefelsäure resuspendiert (30 min, rotieren). Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation pelletiert (16000g, 10 min) und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Durch tropfenweise Zugabe von 132 µl Trichloressigsäure (Endkonzentration 33%) und Inkubation (30 min, 4 °C) wurden die Histone gefällt. Die Histone wurden pelletiert (16000g, 10 min) und zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen (16000g, 4 min). Im Anschluss wurden die Histone luftgetrocknet und in 100 µl ddH₂O gelöst. Zur Kontrolle der Menge und Reinheit der gewonnenen Histone wurde eine SDS-Page mit anschließender Coomassie Brilliantblau Färbung der Histone vorgenommen.

5.2.4.3 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten nach Adriamycinbehandlung zu verschiedenen Zeitpunkten und RNAi Experimenten wurden die Zellen im Kulturmedium in ein Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (2000 rpm, 4 °C, 5 min). Das Zellpellet wurde einmal mit kaltem 1xPBS gewaschen, in 100-200 µl 1% SDS-Lysepuffer (Tabelle 5) resuspendiert und sonifiziert, um die genomische DNA zerkleinern. Die Lysate wurden immer auf Eis gehalten. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden pelletiert (13.000 rpm, 4 °C, 20 min) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Für Immunpräzipitationen endogener Proteine aus Zelllysaten wurde „Puffer A“ gewählt und die Zelllyse erfolgte ohne Sonifizieren.

Die Bestimmung des Proteingehalts der Zelllysate erfolgte mittels BCA Protein Assay[®] Kit (Pierce) nach Herstellerangaben. Zur Kalibrierung wurde eine Konzentrationsreihe von 0 bis 2 µg/µl BSA verwendet.

Für Immunpräzipitationsexperimente nach ektopischer Expression der Proteine wurden die Zellen auf der Platte einmal mit 1xPBS gewaschen. Das PBS wurde gut abgenommen und 350 µl Lysepuffer mit Inhibitoren auf die Platte gegeben. Die Zellen wurden direkt im Lysepuffer mit Inhibitoren (vergleiche Tabelle 5 und 26) abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C für 20 min lysiert. Die Lysate wurden immer auf Eis gehalten. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden pelletiert (13.000 rpm, 4 °C, 20 min) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Tabelle 26: Lysepuffer für Immunpräzipitationsexperimente

Puffer	Immunopräzipitationsexperiment
0,1% SDS Lysepuffer	SIRT1/HIPK2, SIRT1/SEN1
AROS-Lysepuffer	SIRT1/AROS, HIPK2/AROS
DBC1-Lysepuffer	SIRT1/DBC1

Zellen aus Überexpressionsexperimenten, woran sich keine Immunopärzipitation angeschlossen, wurden in 200-350 µl 1x Probenpuffer nach einmaligen Waschen mit 1xPBs auf der Platte lysiert.

5.2.4.4 Immunpräzipitation und Präzipitation von Proteinkomplexen

Mittels Immunpräzipitationen (IP) wurden Proteine mit Hilfe von Antikörpern aus einem Proteingemisch spezifisch isoliert. Diese Methode wurde angewandt, um Proteininteraktionen als Co-Immunpräzipitation zu untersuchen.

Bei IPs von endogen vorliegenden Proteinen wurde das Zelllysat vor der Proteinbestimmung mit 30 µl Protein A/G- Agarose inkubiert, um Hintergrund durch unspezifische Proteinbindung an die Agarosematrix zu zuverhindern.

Um die Menge der eingesetzten Proteine zu kontrollieren, wurden je 10% der Lysate abgenommen und separat analysiert.

Für parallel angesetzte (Co-) IPs wurden gleiche Proteinmengen bzw. Lysatvolumina eingesetzt. Die entsprechenden Lysatmengen wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit Lysepuffer auf 600 µl aufgefüllt und 0,5 µg eines gegen das Zielprotein gerichteten Antikörpers, 25 µl Anti-Flag M2 Agarose[®] (Sigma) oder 15 µl GFP-trap[®] (ChromoTek) zugegeben. Die Anbindung erfolgte bei 4 °C für 2 Stunden. Nach der Inkubationszeit wurden dem Proteingemisch 30 µl Protein A/G-Agarose zugegeben (nicht, wenn Anti-Flag M2 Agarose[®] oder GFP-trap[®] eingesetzt wurde). Protein A/G bindet an den Fc-Teil von Antikörpern und somit die Antikörper-Protein-Komplexe an der Agarosematrix immobilisiert. Die Agarosematrix mit den gekoppelten Antikörper-Proteinkomplexen wurde dreimal mit 650 µl Lysepuffer gewaschen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nachdem die Lysepufferreste vollständig entfernt wurden, wurden jeweils 25 µl 1x Probenpuffer zugeben und aufgeköcht (95 °C, 5 min).

5.2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden anhand ihrer Größe in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, der 2% Natriumdodecylsulfat (SDS) und β-Mercaptoethanol enthält. Das SDS überlagert die Eigenladung der Proteine und das β-Mercaptoethanol reduziert intra- und intermolekulare

Disulfidbrücken. Bestehende Wasserstoffbrücken werden durch aufkochen (95 °C, 5 min) gebrochen. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel mit einem geeigneten Acrylamidanteil geladen, im Sammelgel fokussiert und im Trenngel aufgetrennt. Ein hoher Acrylamidanteil ist für kleine Proteine und ein geringer Anteil für große Proteine geeignet.

5.2.4.6 Proteindetektion mittels Coomassie Brilliantblau

Proteine ab einer Menge von circa 250 ng können mittels Coomassie Brilliantblau Färbung im SDS-Polyacrylamidgel-Gel angefärbt werden. Coomassie komplexiert die basischen Reste der Aminosäuren der Proteine und färbt diese irreversibel. Diese Methode wurde herangezogen, um GST-Fusionsproteine zu färben. Das SDS- Polyacrylamidgel-Gel wurde in Coomassie Brilliantblau Färbelösung inkubiert und im Anschluss mit Entfärber der Überschuss an Coomassie Brilliantblau gewaschen, wobei gleichzeitig durch den im Entfärber enthaltenen Eisessig die Proteine im Gel fixiert wurden. Alternativ wurden SDS-Gele mit kolloidalem Coomassie (Roti Blue[®], Roth) nach Herstellerangaben gefärbt. Die entfärbten Gele wurden im Vakuum getrocknet (80 °C, 1h).

5.2.4.7 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot)

Im Immunblotverfahren (Western Blot) werden Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, wobei die Bindung der Proteine an die Membran nicht kovalent ist. Die Membran wurde nach Herstellerangaben vorbereitet. Die Membran und das Gel wurden zwischen 2 Filterpapieren in eine Kassette gespannt und in eine mit 1x Western Blot-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer platziert. Der Transfer erfolgte bei 80 V, 4 °C für 1 h 20 min oder über Nacht bei 4 °C, 0,08 A (~ 20 V).

5.2.4.8 Proteindetektion mittels Ponceau S

Ponceau S ist ein Azofarbstoff, der reversibel an die positiven Reste der Aminosäuren anlagert und Proteine rot anfärbt. Damit kann der Proteintransfer auf eine PVDF oder Nitrozellulosemembran kontrolliert werden. Ponceau S wurde mit TBS-T abgewaschen und die Membran im Anschluss mit 5% Magermilch, Superblock oder Baily's blockiert.

5.2.4.9 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Blockieren der freien Bindestellen auf der Membran mit 5% Magermilch, Superblock oder Baily's wurden die Membranen mit Erstantikörper (siehe Tabelle 21) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss dreimal mit TBS-T für 5 Minuten gewaschen und mit Zweitantikörper (siehe Tabelle 23) für 1 Stunde inkubiert. Der Überschuss an Zweitantikörper wurde mit TBS-T abgewaschen (dreimal, 5 min). Die indirekte Detektion

der Proteine erfolgte mittels ECL Reagenzien (Thermo Scientific und Pierce) im Verhältnis 1:1. Die durch den Substratumsatz der Horse Reddish Peroxidase (HRPO) entstehende Chemilumineszenz wurde auf einen Röntgenfilm exponiert und nach Entwicklung nachgewiesen (Immunreaktion). Wenn die gleiche Membran für Untersuchungen mit unterschiedlichen Antikörpern genutzt werden sollte, wurde im Falle von Erstantikörpern unterschiedlicher Spezies der Zweitantikörper mit 1% Natriumazid gewaschen oder bei Antikörpern der gleichen Spezies der Erstantikörper mittels "Stripping"-Puffer entfernt (56 °C, 30 min).

5.2.4.10 Immunfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie

Die subzelluläre Lokalisation von Proteinen wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Zellen wurden in geeigneten Kulturgefäßen auf Glasplättchen kultiviert und je nach experimentellem Vorgehen transfiziert. Die Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS mit 4% Paraformaldehyd (PFA) auf den Glasplättchen fixiert (20 min, RT) und mittels 0,1% Triton X-100 permeabilisiert (5 min, RT). Gegebenenfalls wurde eine Präextraktion des Zytoplasmas durchgeführt, um den Hintergrund durch unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren. Dazu wurden die Zellen mit CSK-Puffer inkubiert (30 min, RT) und im Anschluss dreimal mit 1xPBS gewaschen.

Es konnte die Eingenfluoresz von Fusionsproteinen detektiert werden. War dies nicht möglich, wurden die Proteine zur Detektion mit spezifischen Erstantikörpern (siehe Tabelle 21) inkubiert (1h, RT). Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS erfolgte die Inkubation mit an Chromophore gekoppelten Zweitantikörpern (siehe Tabelle 24) für 30 min, woran die Färbung des Zellkerns mittels Hoechst33342 (Endkonzentration 1,25 µg/ml, 5 min, RT) angeschlossen. Zur Konservierung wurden die Glasplättchen mit Mowiol[®] auf Objektträger fixiert und am konfokalen Mikroskop (Olympus) analysiert.

5.2.4.11 *In vitro* Deacetylasesreaktion

Im Deacetylaseversuch sollten Unterschiede in der Aktivität der GST-SIRT1 Mutanten untersucht werden. Für den Versuch wurden die gereinigten und vom Substrat eluierten GST, GST-SIRT1, GST-SIRT1 S682A und S682D (jeweils 0,5 µl Eluat) sowie die präparierten Histone (0,5 µl für einen gesamten Versuch) zusammen mit NAD⁺ (10 mM Endkonzentration) in einem Gesamtvolumen von 30 µl eingesetzt. Das Volumen wurde entsprechend mit Deacetylase-Reaktionspuffer aufgefüllt. Die Deacetylierungsreaktion erfolgte für 20 min bei 30 °C. Anschließend wurden die Proben mit 5x Ladepuffer versetzt und mittels Immunreaktion analysiert.

5.2.4.12 *In vitro* p53-Flüssigphaseversuch (Cayman)

Der "SIRT1 Direct Fluorescent Screening Assay" wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Anstatt des mitgelieferten SIRT1 wurden gereinigte und vom Substrat eluierte GST-SIRT1 und GST-SIRT1 S682D in gleichen Mengen eingesetzt. Die Messung erfolgte mittels Tecan Invinite M2000 und zugehöriger Software. Die Änderung der SIRT1 Aktivität wurde auf die initialte SIRT1 Aktivität normalisiert. Die eingesetzten Mengen an GST-Protein wurden per Immunreaktion kontrolliert.

5.2.4.13 *In vitro* HIPK2-Kinasereaktion

Durch eine *in vitro* Kinasereaktion wurde die direkte Phosphorylierung von SIRT1, DBC1 und AROS durch HIPK2 nachgewiesen.

Rekombinante GST-SIRT1, GST-AROS, GST-DBC1 und His-HIPK2 Proteine wurden in 1x Kinasepuffer in Gegenwart von γ -³²P-ATP in einem Gesamtvolumen von 30 μ l inkubiert (30 min, 800 rpm). Die Kinasereaktion wurde durch Zugabe von 5x SDS-Probenpuffer gestoppt (5 min, 95 °C). Die Proteine wurden mittels SDS-Page separiert, im Gel fixiert und mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. Das SDS-Gel wurde im Vakuum getrocknet (80 °C, 1h). Im Anschluss wurde ein Röntgenfilm bei -80 °C für 2-24 Stunden exponiert oder das getrocknete Gel auf einem Röntgenshirm eines Phosphormagers exponiert und mittels Phosphormager-Software ausgelesen.

5.2.4.14 *In vitro* Translation von ³⁵S-markierten Proteinen

Zur Erzeugung radioaktivmarkierter Proteine in zellfreiem Kontext wurde das "TNT[®] Coupeled Reticulocyte Lysate System" (Promega) verwendet. Für Translationen von pcDNA3-Flag-HIPK2 und pcDNA3-HA-AROS wurde die T7-Polymerase eingesetzt. Zur Translation von pCMV-3Tag-1A-dXhoI-SIRT1 und Mutanten wurde die T3 Polymerase genutzt.

Reaktionsmix (Gesamtvolumen 50 μ l):

1 μ l	Plasmid-DNA (1 μ g/ μ l)
25 μ l	Retikulozytenlysat
2 μ l	TNT Reaktionspuffer
40 U	RNase Inhibitor
1 μ l	Aminosäuremix, ohne Methionin
2 μ l	³⁵ S-Methionin
10 U	RNA-Polymerase (T3 oder T7)
17 μ l	RNase freies H ₂ O

Die Reaktion wurde inkubiert (30 °C, 90 min) und die Proben im Anschluss entweder mit 1x Probenpuffer versetzt oder für nachfolgende Reaktionen eingesetzt.

5.2.4.15 *In vitro* Präzipitationsversuch

Anhand des GST-Interaktionsversuches wurden direkte Bindungen von Proteinen charakterisiert. Dazu wurde das GST-Fusionsprotein zusammen mit dem zu untersuchenden ³⁵S-markierten Protein im geeigneten Puffer (siehe Tabelle 5 und 27) inkubiert (2h, 4 °C, Rad) und im Anschluss dreimal mit dem entsprechenden Puffer gewaschen und mit 1x Probenpuffer versetzt. Die Analyse der Interaktion erfolgte per SDS-Page und anschließender Coomassie Brilliantblau Färbung der Proteine. Das SDS-Gel wurde im Vakuum getrocknet (1h, 80 °C) und die Signale auf einen Röntgenfilm exponiert (-80 °C). Die Bindung des Interaktionspartner wurde photometrisch anhand der Exposition des Röntgenfilms analysiert.

Tabelle 27: Puffer für *in vitro* GST-Präzipitationsversuche

Puffer	GST-Interaktionsversuch
<i>In vitro</i> Interaktionspuffer, SIRT1	GST-SIRT1/ ³⁵ S-Flag-HIPK2
<i>In vitro</i> Interaktionspuffer, HIPK2	GST-HIPK2/ ³⁵ S-Flag-SIRT1
<i>In vitro</i> Interaktionspuffer, AROS	GST-AROS/ ³⁵ S-Flag-HIPK2

5.2.4.16 *In vitro* SUMOylierung

Der *in vitro* SUMOylierungsversuch wurde mittels SUMOylierungs Kit (Enzo) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Modifikation wurden 5 µl ³⁵S-Flag-SIRT1, ³⁵S-Flag-SIRT1 S682D und K734R eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit rekombinanten SUMO-Ligasen (E1-E3) in Gegenwart von GST-SUMO-1 inkubiert (60 min, 30 °C). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5x Probenpuffer gestoppt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-Page.

6 Literaturverzeichnis

- Abdelmohsen, Pullmann Jr, et al. (2007). "Phosphorylation of HuR by Chk2 Regulates SIRT1 Expression." Molecular Cell **25**(4): 543-557.
- Abida, Nikolaev, et al. (2007). "FBXO11 Promotes the Neddylation of p53 and Inhibits Its Transcriptional Activity." Journal of Biological Chemistry **282**(3): 1797-1804.
- Aikawa, Nguyen, et al. (2006). "Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation." Embo J **25**(17): 3955-3965.
- An, Huang, et al. (2010). "DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression." Bmc Molecular Biology **11**.
- Anderson, Bitterman, et al. (2003). "Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*." Nature **423**(6936): 181-185.
- Arai, Matsushita, et al. (2007). "Novel homeodomain-interacting protein kinase family member, HIPK4, phosphorylates human p53 at serine 9." FEBS Letters **581**(29): 5649-5657.
- Asher, Tsvetkov, et al. (2005). "A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73." Genes & Development **19**(3): 316-321.
- Askew, Ashmun, et al. (1991). "Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis." Oncogene **6**(10): 1915-1922.
- Aylon und Oren (2007). "Living with p53, Dying of p53." Cell **130**(4): 597-600.
- Bakkenist und Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." Nature **421**(6922): 499-506.
- Banin, Moyal, et al. (1998). "Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage." Science **281**(5383): 1674-1677.
- Banks, Kon, et al. (2008). "SirT1 Gain of Function Increases Energy Efficiency and Prevents Diabetes in Mice." Cell metabolism **8**(4): 333-341.
- Barnes und Lindahl (2004). "Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells." Annual Review of Genetics **38**: 445-476.
- Bartek, Lukas, et al. (2004). "Checking on DNA damage in S phase." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 792-804.
- Baur, Pearson, et al. (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet." Nature **444**(7117): 337-342.
- Bergamaschi, Samuels, et al. (2004). "ASPP1 and ASPP2: Common Activators of p53 Family Members." Mol Cell Biol **24**(3): 1341-1350.
- Biton und Ashkenazi (2011). "NEMO and RIP1 Control Cell Fate in Response to Extensive DNA Damage via TNF- α Feedforward Signaling." Cell **145**(1): 92-103.
- Blander und Guarente (2004). "THE SIR2 FAMILY OF PROTEIN DEACETYLASES." Annual Review of Biochemistry **73**(1): 417-435.
- Bordone, Cohen, et al. (2007). "SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction." Aging Cell **6**(6): 759-767.
- Bossis und Melchior (2006). "SUMO: regulating the regulator." Cell Division **1**.
- Bottero, Busuttill, et al. (2001). "Activation of Nuclear Factor κ B through the IKK Complex by the Topoisomerase Poisons SN38 and Doxorubicin: A Brake to Apoptosis in HeLa Human Carcinoma Cells." Cancer Res **61**(21): 7785-7791.
- Brachmann, Sherman, et al. (1995). "The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability." Genes & Development **9**(23): 2888-2902.
- Bradbury, Khanim, et al. (2005). "Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors." Leukemia **19**(10): 1751-1759.
- Brooks und Gu (2009). "How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer?" Nat Rev Cancer **9**(2): 123-128.

- Brooks und Gu (2010). "New insights into p53 activation." Cell Res **20**(6): 614-621.
- Brooks und Gu (2011). "The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway." Protein & Cell **2**(6): 456-462.
- Brown, Wei, et al. (1997). "Bypass of Senescence After Disruption of p21CIP1/WAF1 Gene in Normal Diploid Human Fibroblasts." Science **277**(5327): 831-834.
- Brunet, Sweeney, et al. (2004). "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase." Science **303**(5666): 2011-2015.
- Burdak-Rothkamm, Short, et al. (2006). "ATR-dependent radiation-induced [gamma]H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells." Oncogene **26**(7): 993-1002.
- Burma, Chen, et al. (2001). "ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks." Journal of Biological Chemistry **276**(45): 42462-42467.
- Buscemi, Perego, et al. (2004). "Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks." Oncogene **23**(46): 7691-7700.
- Buschmann, Potapova, et al. (2001). "Jun NH2-Terminal Kinase Phosphorylation of p53 on Thr-81 Is Important for p53 Stabilization and Transcriptional Activities in Response to Stress." Mol Cell Biol **21**(8): 2743-2754.
- Calzado, de la Vega, et al. (2009). "An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response." Nat Cell Biol **11**(1): 85-91.
- Campagna, Herranz, et al. (2011). "SIRT1 stabilizes PML promoting its sumoylation." Cell Death and Differentiation **18**(1): 72-79.
- Campbell, Rocha, et al. (2004). "Active Repression of Antiapoptotic Gene Expression by RelA(p65) NF- κ B." Molecular Cell **13**(6): 853-865.
- Canman, Lim, et al. (1998). "Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53." Science **281**(5383): 1677-1679.
- Canto, Gerhart-Hines, et al. (2009). "AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD(+) metabolism and SIRT1 activity." Nature.
- Chao, Wu, et al. (2006). "Acetylation of Mouse p53 at Lysine 317 Negatively Regulates p53 Apoptotic Activities after DNA Damage." Mol Cell Biol **26**(18): 6859-6869.
- Chehab, Malikzay, et al. (2000). "Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53." Genes & Development **14**(3): 278-288.
- Chen, Carson, et al. (2008). "Acetylated Lysine 56 on Histone H3 Drives Chromatin Assembly after Repair and Signals for the Completion of Repair." Cell **134**(2): 231-243.
- Chen und Greene (2004). "Shaping the nuclear action of NF-[kappa]B." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(5): 392-401.
- Chen, Wang, et al. (2005). "Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses." Cell **123**(3): 437-448.
- Cheng, Mostoslavsky, et al. (2003). "Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(19): 10794-10799.
- Chipuk, Bouchier-Hayes, et al. (2005). "PUMA Couples the Nuclear and Cytoplasmic Proapoptotic Function of p53." Science **309**(5741): 1732-1735.
- Cho, Gorina, et al. (1994). "CRYSTAL-STRUCTURE OF A P53 TUMOR-SUPPRESSOR DNA COMPLEX - UNDERSTANDING TUMORIGENIC MUTATIONS." Science **265**(5170): 346-355.
- Choi, Seo, et al. (2008). "Ubiquitination and degradation of homeodomain-interacting protein kinase 2 by WD40 repeat/SOCS box protein WSB-1." J Biol Chem **283**(8): 4682-4689.
- Christmann, Tomicic, et al. (2003). "Mechanisms of human DNA repair: an update." Toxicology **193**(1-2): 3-34.
- Chu, Chou, et al. (2005). "Control of multidrug resistance gene mdr1 and cancer resistance to chemotherapy by the longevity gene sirt1." Cancer Res **65**(22): 10183-10187.
- Ciccia und Elledge (2010). "The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives." Molecular Cell **40**(2): 179-204.

- Cimprich und Cortez (2008). "ATR: an essential regulator of genome integrity." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 616-627.
- Cohen, Lavu, et al. (2004). "Acetylation of the C Terminus of Ku70 by CBP and PCAF Controls Bax-Mediated Apoptosis." Molecular Cell **13**(5): 627-638.
- Cohen, Miller, et al. (2004). "Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase." Science **305**(5682): 390-392.
- Colman, Anderson, et al. (2009). "Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys." Science **325**(5937): 201-204.
- Cook, Ju, et al. (2009). "Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions." Nature **458**(7238): 591-596.
- Costa, Chiganças, et al. (2003). "The eukaryotic nucleotide excision repair pathway." Biochimie **85**(11): 1083-1099.
- Crone, Glas, et al. (2011). "Zyxin Is a Critical Regulator of the Apoptotic HIPK2-p53 Signaling Axis." Cancer Res **71**(6): 2350-2359.
- D'Amours, Desnoyers, et al. (1999). "Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions." Biochemical Journal **342**: 249-268.
- D'Orazi, Cecchinelli, et al. (2002). "Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis." Nat Cell Biol **4**(1): 11-19.
- Das, Lucia, et al. (2009). "CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56." Nature **459**(7243): 113-117.
- Dauth, Kruger, et al. (2007). "Homeodomain-interacting protein kinase 2 is the ionizing radiation-activated p53 serine 46 kinase and is regulated by ATM." Cancer Res **67**(5): 2274-2279.
- de la Vega, Fröbius, et al. (2011). "Control of nuclear HIPK2 localization and function by a SUMO interaction motif." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1813**(2): 283-297.
- de la Vega, Grishina, et al. (2012). "A Redox-Regulated SUMO/Acetylation Switch of HIPK2 Controls the Survival Threshold to Oxidative Stress." Molecular Cell **46**(4): 472-483.
- Desterro, Rodriguez, et al. (1998). "SUMO-1 Modification of I κ B α Inhibits NF- κ B Activation." Molecular Cell **2**(2): 233-239.
- Di Stefano, Rinaldo, et al. (2004). "Homeodomain-interacting protein kinase-2 activity and p53 phosphorylation are critical events for cisplatin-mediated apoptosis." Experimental Cell Research **293**(2): 311-320.
- Doll und Peto (1981). "THE CAUSES OF CANCER - QUANTITATIVE ESTIMATES OF AVOIDABLE RISKS OF CANCER IN THE UNITED-STATES TODAY." Journal of the National Cancer Institute **66**(6): 1191-&.
- Donmez, Wang, et al. (2010). "SIRT1 Suppresses β -Amyloid Production by Activating the α -Secretase Gene ADAM10." Cell **142**(2): 320-332.
- Falck, Coates, et al. (2005). "Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage." Nature **434**(7033): 605-611.
- Fan und Luo (2010). "SIRT1 Regulates UV-Induced DNA Repair through Deacetylating XPA." Molecular Cell **39**(2): 247-258.
- Feng, Lin, et al. (2005). "Functional Analysis of the Roles of Posttranslational Modifications at the p53 C Terminus in Regulating p53 Stability and Activity." Mol Cell Biol **25**(13): 5389-5395.
- Fenteany und Schreiber (1998). "Lactacystin, Proteasome Function, and Cell Fate." Journal of Biological Chemistry **273**(15): 8545-8548.
- Fernandez, Frank, et al. (2003). "Genomic targets of the human c-Myc protein." Genes & Development **17**(9): 1115-1129.
- Firestein, Blander, et al. (2008). "The SIRT1 Deacetylase Suppresses Intestinal Tumorigenesis and Colon Cancer Growth." PLoS ONE **3**(4): e2020.
- Fleming, Miller, et al. (1989). "ETOPOSIDE - AN UPDATE." Clinical Pharmacy **8**(4): 274-293.
- Fogal, Gostissa, et al. (2000). "Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform." Embo J **19**(22): 6185-6195.
- Ford, Ahmed, et al. (2008). "JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein stability." Cell Cycle **7**(19): 3091-3097.

- Ford, Jiang, et al. (2005). "Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival." Cancer Res **65**(22): 10457-10463.
- Fortini und Dogliotti (2007). "Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways." DNA Repair **6**(4): 398-409.
- Frye (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 (2000). "Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins." Biochem Biophys Res Commun **273**(2): 793-798.
- Furuyama, Kitayama, et al. (2004). "Abnormal Angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient Mice." Journal of Biological Chemistry **279**(33): 34741-34749.
- Gatei, Young, et al. (2000). "ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure." Nature Genetics **25**(1): 115-119.
- Gerhart-Hines, Dominy, et al. (2011). "The cAMP/PKA Pathway Rapidly Activates SIRT1 to Promote Fatty Acid Oxidation Independently of Changes in NAD+." Molecular Cell **44**(6): 851-863.
- Gewirtz (1999). "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin." Biochemical pharmacology **57**(7): 727-741.
- Glotzer (2005). "The Molecular Requirements for Cytokinesis." Science **307**(5716): 1735-1739.
- Goldberg, Sionov, et al. (2002). "Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation." Embo J **21**(14): 3715-3727.
- Green und Kroemer (2009). "Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53." Nature **458**(7242): 1127-1130.
- Greiss, Hall, et al. (2008). "C. elegans SIR-2.1 translocation is linked to a proapoptotic pathway parallel to cep-1/p53 during DNA damage-induced apoptosis." Genes Dev **22**(20): 2831-2842.
- Gresko, Möller, et al. (2005). "Covalent modification of human homeodomain interacting protein kinase 2 by SUMO-1 at lysine 25 affects its stability." Biochem Biophys Res Commun **329**(4): 1293-1299.
- Gresko, Roscic, et al. (2006). "Autoregulatory control of the p53 response by caspase-mediated processing of HIPK2." Embo J **25**(9): 1883-1894.
- Grooteclaes, Deveraux, et al. (2003). "C-terminal-binding protein corepresses epithelial and proapoptotic gene expression programs." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(8): 4568-4573.
- Gu und Roeder (1997). "Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain." Cell **90**(4): 595-606.
- Gu, Shi, et al. (1997). "Synergistic activation of transcription by CBP and p53." Nature **387**(6635): 819-823.
- Guo, Salomoni, et al. (2000). "The function of PML in p53-dependent apoptosis." Nat Cell Biol **2**(10): 730-736.
- Guo, Williams, et al. (2010). "DYRK1A and DYRK3 Promote Cell Survival through Phosphorylation and Activation of SIRT1." Journal of Biological Chemistry **285**(17): 13223-13232.
- Haince, Kozlov, et al. (2007). "Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Signaling Network Is Modulated by a Novel Poly(ADP-ribose)-dependent Pathway in the Early Response to DNA-damaging Agents." Journal of Biological Chemistry **282**(22): 16441-16453.
- Haince, McDonald, et al. (2008). "PARP1-dependent Kinetics of Recruitment of MRE11 and NBS1 Proteins to Multiple DNA Damage Sites." Journal of Biological Chemistry **283**(2): 1197-1208.
- Hallows, Lee, et al. (2006). "Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(27): 10230-10235.

- Han, Song, et al. (2008). "SIRT1 Regulates Apoptosis and Nanog Expression in Mouse Embryonic Stem Cells by Controlling p53 Subcellular Localization." Cell Stem Cell **2**(3): 241-251.
- Hassa und Hottiger (2008). "The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases." Frontiers in Bioscience-Landmark **13**: 3046-3082.
- Haupt, Maya, et al. (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." Nature **387**(6630): 296-299.
- Hecker, Rabiller, et al. (2006). "Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting Motifs." Journal of Biological Chemistry **281**(23): 16117-16127.
- Heltweg, Gatbonton, et al. (2006). "Antitumor Activity of a Small-Molecule Inhibitor of Human Silent Information Regulator 2 Enzymes." Cancer Res **66**(8): 4368-4377.
- Hermeking und Eick (1994). "MEDIATION OF C-MYC-INDUCED APOPTOSIS BY P53." Science **265**(5181): 2091-2093.
- Herranz, Munoz-Martin, et al. (2010). "Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer." Nat Commun **1**: 3.
- Hida, Kubo, et al. (2007). "Strong expression of a longevity-related protein, SIRT1, in Bowen's disease." Archives of Dermatological Research **299**(2): 103-106.
- Hietakangas, Anckar, et al. (2006). "PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(1): 45-50.
- Hiraike, Wada-Hiraike, et al. (2010). "Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1." Br J Cancer **102**(6): 1061-1067.
- Hirao, Kong, et al. (2000). "DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2." Science **287**(5459): 1824-1827.
- Ho, Dickson, et al. (2005). "Nuclear Factor- κ B Induced by Doxorubicin Is Deficient in Phosphorylation and Acetylation and Represses Nuclear Factor- κ B-Dependent Transcription in Cancer Cells." Cancer Res **65**(10): 4273-4281.
- Hock und Vousden (2010). "Regulation of the p53 pathway by ubiquitin and related proteins." International Journal of Biochemistry & Cell Biology **42**(10): 1618-1621.
- Hoeijmakers (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-374.
- Hofmann, Jaffray, et al. (2005). "Regulation of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) effector function through dynamic small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification." J Biol Chem **280**(32): 29224-29232.
- Hofmann, Mincheva, et al. (2000). "Human homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) is a member of the DYRK family of protein kinases and maps to chromosome 7q32-q34." Biochimie **82**(12): 1123-1127.
- Hofmann, Moller, et al. (2002). "Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2." Nat Cell Biol **4**(1): 1-10.
- Hofmann, Stollberg, et al. (2003). "HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells." Cancer Res **63**(23): 8271-8277.
- Hollstein, Rice, et al. (1994). "DATABASE OF P53 GENE SOMATIC MUTATIONS IN HUMAN TUMORS AND CELL-LINES." Nucleic Acids Research **22**(17): 3551-3555.
- Howitz, Bitterman, et al. (2003). "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan." Nature **425**(6954): 191-196.
- Huang, Chang, et al. (2009). "Targeted genetic and viral therapy for advanced head and neck cancers." Drug Discovery Today **14**(11-12): 570-578.
- Huang, Feinberg, et al. (2002). "The Zinc Finger Domain of NEMO Is Selectively Required for NF- κ B Activation by UV Radiation and Topoisomerase Inhibitors." Mol Cell Biol **22**(16): 5813-5825.
- Huang, Ju, et al. (2007). "Phosphorylation of CBP by IKK α Promotes Cell Growth by Switching the Binding Preference of CBP from p53 to NF- κ B." Molecular Cell **26**(1): 75-87.
- Huang, Wuerzberger-Davis, et al. (2000). "NF- κ B Activation by Camptothecin." Journal of Biological Chemistry **275**(13): 9501-9509.

- Huang, Wuerzberger-Davis, et al. (2003). "Sequential Modification of NEMO/IKK γ by SUMO-1 and Ubiquitin Mediates NF- κ B Activation by Genotoxic Stress." *Cell* **115**(5): 565-576.
- Hupp und Lane (1994). "Allosteric activation of latent p53 tetramers." *Current Biology* **4**(10): 865-875.
- Ikura, Tashiro, et al. (2007). "DNA Damage-Dependent Acetylation and Ubiquitination of H2AX Enhances Chromatin Dynamics." *Mol Cell Biol* **27**(20): 7028-7040.
- Imai, Armstrong, et al. (2000). "Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase." *Nature* **403**(6771): 795-800.
- Insinga, Monestiroli, et al. (2004). "Impairment of p53 acetylation, stability and function by an oncogenic transcription factor." *Embo Journal* **23**(5): 1144-1154.
- Isono, Nemoto, et al. (2006). "Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals." *Mol Cell Biol* **26**(7): 2758-2771.
- Issaeva, Bozko, et al. (2004). "Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors." *Nat Med* **10**(12): 1321-1328.
- Itahana, Ke, et al. (2009). "p53 Oligomerization Is Essential for Its C-terminal Lysine Acetylation." *Journal of Biological Chemistry* **284**(8): 5158-5164.
- Ito, Lai, et al. (2001). "p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2." *Embo J* **20**(6): 1331-1340.
- Ivy, Hicks, et al. (1985). "MAP POSITIONS OF YEAST GENES SIR1, SIR3 and SIR4." *Genetics* **111**(4): 735-744.
- Ivy, Klar, et al. (1986). "Cloning and characterization of four SIR genes of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **6**(2): 688-702.
- Jackson und Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." *Nature* **461**(7267): 1071-1078.
- Jeffrey, Gorina, et al. (1995). "CRYSTAL-STRUCTURE OF THE TETRAMERIZATION DOMAIN OF THE P53 TUMOR-SUPPRESSOR AT 1.7 ANGSTROMS." *Science* **267**(5203): 1498-1502.
- Jeong, Juhn, et al. (2007). "SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70." *Experimental and Molecular Medicine* **39**(1): 8-13.
- Jones und George (2004). "The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research." *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**(6): 682-699.
- Kaeberlein, Kirkland, et al. (2004). "Sir2-Independent Life Span Extension by Calorie Restriction in Yeast." *PLoS Biol* **2**(9): e296.
- Kaeberlein, McVey, et al. (1999). "The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms." *Genes & Development* **13**(19): 2570-2580.
- Kang, Suh, et al. (2011). "Peptide Switch Is Essential for Sirt1 Deacetylase Activity." *Molecular Cell* **44**(2): 203-213.
- Kawanishi und Hiraku (2006). "Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation." *Antioxidants & Redox Signaling* **8**(5-6): 1047-1058.
- Kern, Kinzler, et al. (1991). "IDENTIFICATION OF P53 AS A SEQUENCE-SPECIFIC DNA-BINDING PROTEIN." *Science* **252**(5013): 1708-1711.
- Kerscher (2007). "SUMO junction - what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs." *Embo Reports* **8**(6): 550-555.
- Khanna und Jackson (2001). "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection." *Nature Genetics* **27**(3): 247-254.
- Kim, Chen, et al. (2008). "DBC1 is a negative regulator of SIRT1." *Nature* **451**(7178): 583-586.
- Kim, Chen, et al. (2009). "p30 DBC is a potential regulator of tumorigenesis." *Cell Cycle* **8**(18): 2932-2935.
- Kim, Choi, et al. (1999). "Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(22): 12350-12355.

- Kim, Choi, et al. (1998). "Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors." J Biol Chem **273**(40): 25875-25879.
- Kim, Kho, et al. (2007). "Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity." Mol Cell **28**(2): 277-290.
- Kim, Rafiuddin-Shah, et al. (2006). "Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies." Nat Cell Biol **8**(12): 1348-1358.
- Komuro, Kurihara, et al. (1988). "Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells." FEBS Letters **238**(2): 249-252.
- Kozlov, Graham, et al. (2006). "Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation." Embo J **25**(15): 3504-3514.
- Kroemer, Galluzzi, et al. (2007). "Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death." Physiological Reviews **87**(1): 99-163.
- Krummel, Lee, et al. (2005). "The C-terminal lysines fine-tune P53 stress responses in a mouse model but are not required for stability control or transactivation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(29): 10188-10193.
- Kubbutat, Jones, et al. (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." Nature **387**(6630): 299-303.
- Kussie, Gorina, et al. (1996). "Structure of the MDM2 Oncoprotein Bound to the p53 Tumor Suppressor Transactivation Domain." Science **274**(5289): 948-953.
- Kuwana, Bouchier-Hayes, et al. (2005). "BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly." Molecular Cell **17**(4): 525-535.
- Kwon und Ott (2008). "The ups and downs of SIRT1." Trends in Biochemical Sciences **33**(11): 517-525.
- Lagouge, Armann, et al. (2006). "Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α ." Cell **127**(6): 1109-1122.
- Lai, Ferry, et al. (2001). "Human mdm2 Mediates Multiple Mono-ubiquitination of p53 by a Mechanism Requiring Enzyme Isomerization." Journal of Biological Chemistry **276**(33): 31357-31367.
- Lain, Hollick, et al. (2008). "Discovery, In Vivo Activity, and Mechanism of Action of a Small-Molecule p53 Activator." Cancer Cell **13**(5): 454-463.
- Lallemand-Breitenbach, Zhu, et al. (2001). "Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor α degradation." Journal of Experimental Medicine **193**(12): 1361-1371.
- Landry, Sutton, et al. (2000). "The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5807-5811.
- Langley, Pearson, et al. (2002). "Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence." Embo J **21**(10): 2383-2396.
- Lavra, Rinaldo, et al. (2011). "The Loss of the p53 Activator HIPK2 Is Responsible for Galectin-3 Overexpression in Well Differentiated Thyroid Carcinomas." PLoS ONE **6**(6): e20665.
- Le Cam, Linares, et al. (2006). "E4F1 Is an Atypical Ubiquitin Ligase that Modulates p53 Effector Functions Independently of Degradation." Cell **127**(4): 775-788.
- Lee, Elenbaas, et al. (1995). "p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches." Cell **81**(7): 1013-1020.
- Lee, Moore, et al. (1998). "Saccharomyces Ku70, Mre11/Rad50, and RPA Proteins Regulate Adaptation to G2/M Arrest after DNA Damage." Cell **94**(3): 399-409.
- Lee und Paull (2004). "Direct Activation of the ATM Protein Kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 Complex." Science **304**(5667): 93-96.
- Lee und Paull (2005). "ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex." Science **308**(5721): 551-554.

- Lee, Xu, et al. (2003). "Distinct functions of Nijmegen breakage syndrome in ataxia telangiectasia mutated-dependent responses to DNA damage." Molecular Cancer Research **1**(9): 674-681.
- Li, Arai, et al. (2007). "Mutations of the HIPK2 gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome impair AML1- and p53-mediated transcription." Oncogene **26**(51): 7231-7239.
- Li, Banck, et al. (2010). "p53-Induced Growth Arrest Is Regulated by the Mitochondrial *Sirt3* Deacetylase." PLoS ONE **5**(5): e10486.
- Li, Banin, et al. (2001). "ATM Is Required for I κ B Kinase (IKK) Activation in Response to DNA Double Strand Breaks." Journal of Biological Chemistry **276**(12): 8898-8903.
- Li, Brooks, et al. (2003). "Mono- Versus Polyubiquitination: Differential Control of p53 Fate by Mdm2." Science **302**(5652): 1972-1975.
- Li, Casta, et al. (2008). "Regulation of WRN Protein Cellular Localization and Enzymatic Activities by SIRT1-mediated Deacetylation." Journal of Biological Chemistry **283**(12): 7590-7598.
- Li, Luo, et al. (2002). "Acetylation of p53 Inhibits Its Ubiquitination by Mdm2." Journal of Biological Chemistry **277**(52): 50607-50611.
- Li, Matsumori, et al. (2011). "SIRT2 down-regulation in HeLa can induce p53 accumulation via p38 MAPK activation-dependent p300 decrease, eventually leading to apoptosis." Genes to Cells **16**(1): 34-45.
- Lin, Yang, et al. (2012). "USP22 Antagonizes p53 Transcriptional Activation by Deubiquitinating Sirt1 to Suppress Cell Apoptosis and Is Required for Mouse Embryonic Development." Molecular Cell **46**(4): 484-494.
- Lindahl (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." Nature **362**(6422): 709-715.
- Lindahl und Barnes (2000). "Repair of endogenous DNA damage." Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **65**: 127-133.
- Liu, Liu, et al. (2009). "The critical role of the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer." Cancer Res **69**(5): 1702-1705.
- Liu, Scolnick, et al. (1999). "p53 Sites Acetylated In Vitro by PCAF and p300 Are Acetylated In Vivo in Response to DNA Damage." Mol Cell Biol **19**(2): 1202-1209.
- Logan und Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annual Review of Cell and Developmental Biology **20**: 781-810.
- Lowenberg, Downing, et al. (1999). "Acute Myeloid Leukemia." New England Journal of Medicine **341**(14): 1051-1062.
- Luo, Nikolaev, et al. (2001). "Negative control of p53 by Sir2 α promotes cell survival under stress." Cell **107**(2): 137-148.
- Lynch, Shah, et al. (2010). "SIRT1 Undergoes Alternative Splicing in a Novel Auto-Regulatory Loop with p53." PLoS ONE **5**(10): e13502.
- Maeda, Toku, et al. (2006). "A novel nucleolar protein interacts with ribosomal protein S19." Biochem Biophys Res Commun **339**(1): 41-46.
- Mantovani, Tocco, et al. (2007). "The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP." Nat Struct Mol Biol **14**(10): 912-920.
- Mao, Wu, et al. (2012). "Hipk2 cooperates with p53 to suppress [gamma]-ray radiation-induced mouse thymic lymphoma." Oncogene **31**(9): 1176-1180.
- Matsuoka, Ballif, et al. (2007). "ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage." Science **316**(5828): 1160-1166.
- Matsushita, Takami, et al. (2005). "Role of NAD-dependent deacetylases SIRT1 and SIRT2 in radiation and cisplatin-induced cell death in vertebrate cells." Genes to Cells **10**(4): 321-332.
- Matsuzawa, Li, et al. (2003). "Structural Analysis of Siah1 and Its Interactions with Siah-interacting Protein (SIP)." Journal of Biological Chemistry **278**(3): 1837-1840.
- Mattagajasingh, Kim, et al. (2007). "SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(37): 14855-14860.

- Mattison, Roth, et al. (2012). "Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study." *Nature* **489**(7415): 318-321.
- Maya, Balass, et al. (2001). "ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage." *Genes & Development* **15**(9): 1067-1077.
- McLure, Takagi, et al. (2004). "NAD+ Modulates p53 DNA Binding Specificity and Function." *Mol Cell Biol* **24**(22): 9958-9967.
- Michan und Sinclair (2007). "Sirtuins in mammals: insights into their biological function." *Biochem J* **404**(1): 1-13.
- Michishita, Park, et al. (2005). "Evolutionarily Conserved and Nonconserved Cellular Localizations and Functions of Human SIRT Proteins." *Molecular Biology of the Cell* **16**(10): 4623-4635.
- Moehlenbrink, Bitomsky, et al. (2010). "Hypoxia suppresses chemotherapeutic drug-induced p53 Serine 46 phosphorylation by triggering HIPK2 degradation." *Cancer Letters* **292**(1): 119-124.
- Moll, Marchenko, et al. (2006). "p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction." *Oncogene* **25**(34): 4725-4743.
- Möller, Sirma, et al. (2003). "PML Is Required for Homeodomain-interacting Protein Kinase 2 (HIPK2)-mediated p53 Phosphorylation and Cell Cycle Arrest but Is Dispensable for the Formation of HIPK Domains." *Cancer Res* **63**(15): 4310-4314.
- Motta, Divecha, et al. (2004). "Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors." *Cell* **116**(4): 551-563.
- Muschik, Braspenning-Wesch, et al. (2011). "Cutaneous HPV23 E6 Prevents p53 Phosphorylation through Interaction with HIPK2." *PLoS ONE* **6**(11): e27655.
- Nahle, Polakoff, et al. (2002). "Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F." *Nat Cell Biol* **4**(11): 859-864.
- Nakano und Vousden (2001). "PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53." *Molecular Cell* **7**(3): 683-694.
- Nardinocchi, Puca, et al. (2011). "HIF-1 alpha antagonizes p53-mediated apoptosis by triggering HIPK2 degradation." *Aging-U.S.* **3**(1): 33-+.
- Nasrin, Kaushik, et al. (2009). "JNK1 Phosphorylates SIRT1 and Promotes Its Enzymatic Activity." *PLoS ONE* **4**(12): e8414.
- Nemoto, Fergusson, et al. (2004). "Nutrient Availability Regulates SIRT1 Through a Forkhead-Dependent Pathway." *Science* **306**(5704): 2105-2108.
- Nodale, Sheffer, et al. (2012). "HIPK2 downregulates vimentin and inhibits breast cancer cell invasion." *Cancer Biology & Therapy* **13**(4).
- O'Hagan, Mohammad, et al. (2008). "Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island." *PLoS Genet* **4**(8): e1000155.
- Oberdoerffer, Michan, et al. (2008). "SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging." *Cell* **135**(5): 907-918.
- Obrig, Culp, et al. (1971). "The Mechanism by which Cycloheximide and Related Glutarimide Antibiotics Inhibit Peptide Synthesis on Reticulocyte Ribosomes." *Journal of Biological Chemistry* **246**(1): 174-181.
- Oda, Arakawa, et al. (2000). "p53AIP1, a Potential Mediator of p53-Dependent Apoptosis, and Its Regulation by Ser-46-Phosphorylated p53." *Cell* **102**(6): 849-862.
- Okoshi, Ozaki, et al. (2008). "Activation of AMP-activated Protein Kinase Induces p53-dependent Apoptotic Cell Death in Response to Energetic Stress." *Journal of Biological Chemistry* **283**(7): 3979-3987.
- Painter (1978). "Inhibition of DNA Replicon Initiation by 4-Nitroquinoline 1-Oxide, Adriamycin, and Ethyleneimine." *Cancer Res* **38**(12): 4445-4449.
- Palacios, Herranz, et al. (2010). "SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination." *Journal of Cell Biology* **191**(7): 1299-1313.
- Pan, Yuan, et al. (2012). "SIRT1 Contains N- and C-terminal Regions That Potentiate Deacetylase Activity." *Journal of Biological Chemistry* **287**(4): 2468-2476.
- Park, Ahmad, et al. (2012). "Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases." *Cell* **148**(3): 421-433.

- Pearson, Carbone, et al. (2000). "PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras." Nature **406**(6792): 207-210.
- Perfettini, Castedo, et al. (2005). "Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope." Journal of Experimental Medicine **201**(2): 279-289.
- Pfluger, Herranz, et al. (2008). "Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(28): 9793-9798.
- Pierantoni, Rinaldo, et al. (2007). "High-mobility group A1 inhibits p53 by cytoplasmic relocalization of its proapoptotic activator HIPK2." Journal of Clinical Investigation **117**(3): 693-702.
- Polekhina, House, et al. (2002). "Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF-[alpha] signaling." Nat Struct Mol Biol **9**(1): 68-75.
- Potente, Ghaeni, et al. (2007). "SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth." Genes & Development **21**(20): 2644-2658.
- Potente, Urbich, et al. (2005). "Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization." The Journal of Clinical Investigation **115**(9): 2382-2392.
- Price, Gomes, et al. (2012). "SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function." Cell metabolism **15**(5): 675-690.
- Pruitt, Zinn, et al. (2006). "Inhibition of SIRT1 Reactivates Silenced Cancer Genes without Loss of Promoter DNA Hypermethylation." PLoS Genet **2**(3): e40.
- Puca, Nardinocchi, et al. (2009). "HIPK2 modulates p53 activity towards pro-apoptotic transcription." Molecular Cancer **8**(1): 85.
- Revollo, Grimm, et al. (2004). "The NAD Biosynthesis Pathway Mediated by Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Regulates Sir2 Activity in Mammalian Cells." Journal of Biological Chemistry **279**(49): 50754-50763.
- Rich, Allen, et al. (2000). "Defying death after DNA damage." Nature **407**(6805): 777-783.
- Riley, Sontag, et al. (2008). "Transcriptional control of human p53-regulated genes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 402-412.
- Rinaldo, Moncada, et al. (2012). "HIPK2 Controls Cytokinesis and Prevents Tetraploidization by Phosphorylating Histone H2B at the Midbody." Molecular Cell **47**(1): 87-98.
- Rinaldo, Prodosmo, et al. (2007). "MDM2-Regulated Degradation of HIPK2 Prevents p53Ser46 Phosphorylation and DNA Damage-Induced Apoptosis." Molecular Cell **25**(5): 739-750.
- Rodgers, Lerin, et al. (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." Nature **434**(7029): 113-118.
- Rodriguez, Dargemont, et al. (2001). "SUMO-1 Conjugation in Vivo Requires Both a Consensus Modification Motif and Nuclear Targeting." Journal of Biological Chemistry **276**(16): 12654-12659.
- Rogakou, Boon, et al. (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." Journal of Cell Biology **146**(5): 905-915.
- Rogakou, Pilch, et al. (1998). "DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139." Journal of Biological Chemistry **273**(10): 5858-5868.
- Roscic, Möller, et al. (2006). "Phosphorylation-Dependent Control of Pc2 SUMO E3 Ligase Activity by Its Substrate Protein HIPK2." Molecular Cell **24**(1): 77-89.
- Ryan, Ernst, et al. (2000). "Role of NF-[kappa]B in p53-mediated programmed cell death." Nature **404**(6780): 892-897.
- Sakamoto, Huang, et al. (2010). "Regulation of Genotoxic Stress Response by Homeodomain-interacting Protein Kinase 2 through Phosphorylation of Cyclic AMP Response Element-binding Protein at Serine 271." Molecular Biology of the Cell **21**(16): 2966-2974.
- Samuels-Lev, O'Connor, et al. (2001). "ASPP Proteins Specifically Stimulate the Apoptotic Function of p53." Molecular Cell **8**(4): 781-794.
- Sasaki, Maier, et al. (2008). "Phosphorylation regulates SIRT1 function." PLoS ONE **3**(12): e4020.

- Saul, de la Vega, et al. (2012). "HIPK2 kinase activity depends on cis-autophosphorylation of its activation loop." Journal of Molecular Cell Biology.
- Saunders und Verdin (2007). "Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging." Oncogene **26**(37): 5489-5504.
- Sawada, Hayes, et al. (2003). "Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70." Nat Cell Biol **5**(4): 352-357.
- Scheffner, Huibregtse, et al. (1993). "THE HPV-16 E6 AND E6-AP COMPLEX FUNCTIONS AS A UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE IN THE UBIQUITINATION OF P53." Cell **75**(3): 495-505.
- Schneider-Poetsch, Ju, et al. (2010). "Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin." Nat Chem Biol **6**(3): 209-217.
- Schumm, Rocha, et al. (2006). "Regulation of p53 tumour suppressor target gene expression by the p52 NF- κ B subunit." Embo J **25**(20): 4820-4832.
- Selivanova, Kawasaki, et al. (1998). "Reactivation of mutant p53: a new strategy for cancer therapy." Seminars in Cancer Biology **8**(5): 369-378.
- Shall und de Murcia (2000). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?" Mutation Research/DNA Repair **460**(1): 1-15.
- Shieh, Ahn, et al. (2000). "The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites." Genes & Development **14**(3): 289-300.
- Shiloh (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat Rev Cancer **3**(3): 155-168.
- Shvets, Fass, et al. (2008). "The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes." Journal of Cell Science **121**(16): 2685-2695.
- Stefano, Blandino, et al. (2004). "HIPK2 neutralizes MDM2 inhibition rescuing p53 transcriptional activity and apoptotic function." Oncogene **23**(30): 5185-5192.
- Stracker, Carson, et al. (2002). "Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex." Nature **418**(6895): 348-352.
- Sun, Jiang, et al. (2009). "Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60." Nat Cell Biol **11**(11): 1376-1382.
- Sung, Kim, et al. (2010). "Balance between SIRT1 and DBC1 expression is lost in breast cancer." Cancer Science **101**(7): 1738-1744.
- Sung, Lee, et al. (2011). "Role of the SUMO-interacting motif in HIPK2 targeting to the PML nuclear bodies and regulation of p53." Experimental Cell Research **317**(7): 1060-1070.
- Taira, Nihira, et al. (2007). "DYRK2 Is Targeted to the Nucleus and Controls p53 via Ser46 Phosphorylation in the Apoptotic Response to DNA Damage." Molecular Cell **25**(5): 725-738.
- Talos, Petrenko, et al. (2005). "Mitochondrially Targeted p53 Has Tumor Suppressor Activities In vivo." Cancer Res **65**(21): 9971-9981.
- Tang, Zhao, et al. (2008). "Acetylation Is Indispensable for p53 Activation." Cell **133**(4): 612-626.
- Tanner, Landry, et al. (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, Sakamoto, et al. (2007). "Nucleocytoplasmic Shuttling of the NAD⁺-dependent Histone Deacetylase SIRT1." Journal of Biological Chemistry **282**(9): 6823-6832.
- Tanny, Dowd, et al. (1999). "An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing." Cell **99**(7): 735-745.
- Tsubuki, Kawasaki, et al. (1993). "Purification and Characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA Degrading Protease Expected to Regulate Neurite Formation: A Novel Catalytic Activity in Proteasome." Biochem Biophys Res Commun **196**(3): 1195-1201.
- Uhl, Csernok, et al. (2010). "Role of SIRT1 in homologous recombination." DNA Repair **9**(4): 383-393.
- Um, Park, et al. (2010). "AMP-Activated Protein Kinase-Deficient Mice Are Resistant to the Metabolic Effects of Resveratrol." Diabetes **59**(3): 554-563.

- van der Veer, Ho, et al. (2007). "Extension of Human Cell Lifespan by Nicotinamide Phosphoribosyltransferase." Journal of Biological Chemistry **282**(15): 10841-10845.
- Vaquero, Scher, et al. (2004). "Human SirT1 Interacts with Histone H1 and Promotes Formation of Facultative Heterochromatin." Molecular Cell **16**(1): 93-105.
- Varfolomeev, Maecker, et al. (2005). "Molecular Determinants of Kinase Pathway Activation by Apo2 Ligand/Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand." Journal of Biological Chemistry **280**(49): 40599-40608.
- Värv, Kristjuhan, et al. (2010). "Acetylation of H3 K56 Is Required for RNA Polymerase II Transcript Elongation through Heterochromatin in Yeast." Mol Cell Biol **30**(6): 1467-1477.
- Vassilev, Vu, et al. (2004). "In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2." Science **303**(5659): 844-848.
- Vaziri, Dessain, et al. (2001). "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase." Cell **107**(2): 149-159.
- Ventura, Kirsch, et al. (2007). "Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo." Nature **445**(7128): 661-665.
- Vogelstein, Lane, et al. (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-310.
- Vousden und Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.
- Vousden und Woude (2000). "The ins and outs of p53." Nat Cell Biol **2**(10): E178-E180.
- Wang, Chen, et al. (2006). "Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage." Nat Cell Biol **8**(9): 1025-1031.
- Wang, Hasan, et al. (2011). "NAMPT overexpression in prostate cancer and its contribution to tumor cell survival and stress response." Oncogene **30**(8): 907-921.
- Wang, Iordanov, et al. (2006). "c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Apoptosis by Down-regulating the Transcriptional Co-repressor CtBP." Journal of Biological Chemistry **281**(46): 34810-34815.
- Wang, Sengupta, et al. (2008). "Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice." Cancer Cell **14**(4): 312-323.
- Wang, Yuan, et al. (2012). "SIRT1 deacetylase promotes acquisition of genetic mutations for drug resistance in CML cells." Oncogene.
- Wang, Zheng, et al. (2008). "Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-Associated Tumorigenesis." Molecular Cell **32**(1): 11-20.
- Ward (1988). "DNA DAMAGE PRODUCED BY IONIZING-RADIATION IN MAMMALIAN-CELLS - IDENTITIES, MECHANISMS OF FORMATION, AND REPARABILITY." Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology **35**: 95-125.
- Waugh und Wilson (2008). "The Interleukin-8 Pathway in Cancer." Clinical Cancer Research **14**(21): 6735-6741.
- Wei, Ku, et al. (2007). "HIPK2 represses β -catenin-mediated transcription, epidermal stem cell expansion, and skin tumorigenesis." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(32): 13040-13045.
- Wei, Li, et al. (2005). "Insights into Selective Activation of p53 DNA Binding by c-Abl." Journal of Biological Chemistry **280**(13): 12271-12278.
- Weidtkamp-Peters, Lenser, et al. (2008). "Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies." Journal of Cell Science **121**(16): 2731-2743.
- Whibley, Pharoah, et al. (2009). "p53 polymorphisms: cancer implications." Nat Rev Cancer **9**(2): 95-107.
- Winter, Sombroek, et al. (2008). "Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR." Nat Cell Biol **10**(7): 812-824.
- Wogan, Hecht, et al. (2004). "Environmental and chemical carcinogenesis." Seminars in Cancer Biology **14**(6): 473-486.
- Xiao, Li, et al. (2009). "WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity." Nature **457**(7225): 57-62.
- Xirodimas, Saville, et al. (2004). "Mdm2-Mediated NEDD8 Conjugation of p53 Inhibits Its Transcriptional Activity." Cell **118**(1): 83-97.

- Xue, Zender, et al. (2007). "Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas." Nature **445**(7128): 656-660.
- Yamagata und Kitabayashi (2009). "Sirt1 physically interacts with Tip60 and negatively regulates Tip60-mediated acetylation of H2AX." Biochem Biophys Res Commun **390**(4): 1355-1360.
- Yamaguchi, Woods, et al. (2009). "p53 Acetylation Is Crucial for Its Transcription-independent Proapoptotic Functions." Journal of Biological Chemistry **284**(17): 11171-11183.
- Yamamori, DeRicco, et al. (2010). "SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair." Nucleic Acids Research **38**(3): 832-845.
- Yang, Fu, et al. (2007). "SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress." Nat Cell Biol **9**(11): 1253-1262.
- Yang, Hou, et al. (2005). "Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation." Embo J **24**(5): 1021-1032.
- Yang und Sauve (2006). "NAD metabolism and sirtuins: Metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity." The AAPS Journal **8**(4): E632-E643.
- Yeung, Hoberg, et al. (2004). "Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase." Embo J **23**(12): 2369-2380.
- Yoshimori, Yamamoto, et al. (1991). "BAFILOMYCIN-A1, A SPECIFIC INHIBITOR OF VACUOLAR-TYPE H⁺-ATPASE, INHIBITS ACIDIFICATION AND PROTEIN-DEGRADATION IN LYSOSOMES OF CULTURED-CELLS." Journal of Biological Chemistry **266**(26): 17707-17712.
- You und Bailis (2010). "DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints." Trends in Cell Biology **20**(7): 402-409.
- You, Pellegrini, et al. (2006). "FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal." The Journal of Experimental Medicine **203**(7): 1657-1663.
- Yu, Wang, et al. (2003). "PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(4): 1931-1936.
- Yu und Zhang (2005). "The transcriptional targets of p53 in apoptosis control." Biochem Biophys Res Commun **331**(3): 851-858.
- Yu, Zhang, et al. (2001). "PUMA Induces the Rapid Apoptosis of Colorectal Cancer Cells." Molecular Cell **7**(3): 673-682.
- Yuan, Luo, et al. (2012). "Regulation of SIRT1 activity by genotoxic stress." Genes & Development **26**(8): 791-796.
- Yuan, Minter-Dykhouse, et al. (2009). "A c-Myc-SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation." J Cell Biol **185**(2): 203-211.
- Yuan, Zhang, et al. (2007). "SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein." Mol Cell **27**(1): 149-162.
- Zacchi, Gostissa, et al. (2002). "The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults." Nature **419**(6909): 853-857.
- Zhang (2003). "Are poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 and deacetylation by Sir2 linked?" Bioessays **25**(8): 808-814.
- Zhang, Nottke, et al. (2005). "Homeodomain-interacting protein kinase-2 mediates CtBP phosphorylation and degradation in UV-triggered apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2802-2807.
- Zhang, Wang, et al. (2007). "Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(3): 829-833.
- Zhang, Yoshimatsu, et al. (2003). "Homeodomain Interacting Protein Kinase 2 Promotes Apoptosis by Downregulating the Transcriptional Corepressor CtBP." Cell **115**(2): 177-186.
- Zhao, Kruse, et al. (2008). "Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1." Nature **451**(7178): 587-590.
- Zheng, You, et al. (2002). "The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response." Nature **419**(6909): 849-853.

Zhong, Salomoni, et al. (2000). "Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis." Journal of Experimental Medicine **191**(4): 631-639.

7 Anhang

7.1 Ergänzende Ergebnisse zur HIPK2-vermittelten AROS Regulation

7.1.1 AROS bindet HIPK2

In Kapitel 3.9 wurde beschrieben, dass AROS von HIPK2 *in vitro* phosphoryliert wird. Daher lag die Vermutung nahe, dass beide Proteine miteinander interagieren.

Zunächst wurde die Bindung der Proteine in einem *in vitro* Präzipitationsversuch untersucht. Dazu wurde aus *E. coli* BL21 pLysS gereinigtes, rekombinantes GST-AROS mit *in vitro* translatierter, radioaktiv markierter ^{35}S -Flag-HIPK2 inkubiert. GST-AROS bindet ^{35}S -Flag-HIPK2 wie in Abbildung 41 a gezeigt ist. 1% des eingesetzten *in vitro*-Translatats sowie die Coomassie Brilliantblau Färbung des SDS-Gels wurden als Ladungskontrollen genutzt.

Zur Untersuchung der Interaktion von AROS und HIPK2 im Zellkontext, wurden HA-AROS und Flag-HIPK2 in HEK293T Zellen exprimiert und mittels anti-Flag-M2 Agarose präzipitiert. HA-AROS bindet an Flag-HIPK2 (Abbildung 41 b). Als Ladungskontrolle wurden 10% des Zelllysats eingesetzt.

Diese Experimente zeigen, dass AROS sowohl *in vitro* als auch nach Expression in Zellen an HIPK2 bindet.

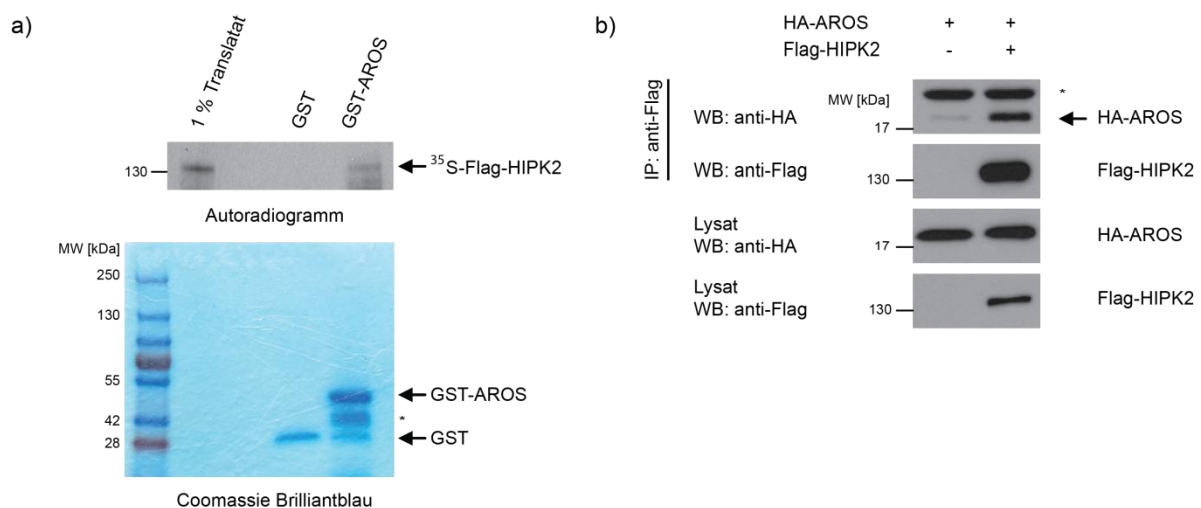


Abbildung 41: AROS bindet HIPK2 *in vitro* und *in vivo*.

a) *In vitro* Präzipitationsversuch: GST-AROS und GST wurden aus *E. coli* BL21 pLysS gereinigt und mit *in vitro* translatierter, radioaktiv markierter ^{35}S -Flag-HIPK2 inkubiert. Als Ladungskontrolle diente die Coomassie Brilliantblau Färbung des SDS-Gels sowie 0,1% des eingesetzten *in vitro*-Translatats. * = unspezifisches Signal. b) Expression von Flag-HIPK2 (10 μg) zusammen mit HA-AROS (3 μg) in HEK293T Zellen. Flag-HIPK2 wurde mittels anti-Flag M2-Agarose präzipitiert. Es wurde die Spezifität durch Inkubation von HA-AROS mit dem Agarose-Substrat sowie die Ladung (10% de Lysats) kontrolliert. * = unspezifisches Signal.

7.1.2 AROS ist ein instabiles Protein

Des Weiteren ist bekannt, dass Phosphorylierung die Proteinstabilität beeinflussen kann (Winter et al., 2008). Daher wurde untersucht, ob AROS über das 26S-Proteasom abgebaut wird.

In der stabilen Zelllinie U2OS/HA-AROS wurde die proteasomale Degradation durch reversible Hemmung der 20S-Untereinheit des Proteasoms mit dem Inhibitor MG132 (8h, 20 μ M) verhindert. Das Signal für HA-AROS weist einen Anstieg der AROS Proteinmengen nach MG132 Behandlung, im Vergleich zur Kontrolle, auf (Abbildung 42 a). Die Effizienz der MG132 Behandlung wurde durch die Stabilisierung der p53 Proteinmengen überprüft und als Ladungskontrolle Aktin herangezogen.

AROS wird somit über das 26S-Proteasom abgebaut.

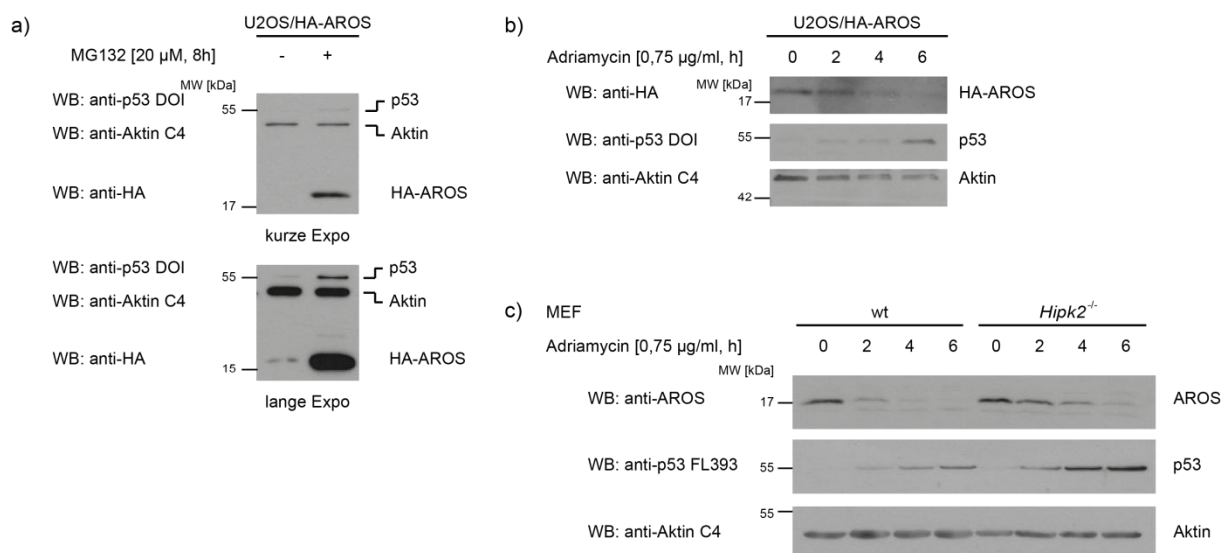


Abbildung 42: AROS wird nach DNA-Schaden proteasomal degradiert.

c) 10% des Gesamtlysats von U2OS/HA-AROS nach Behandlung mit MG132 (20 μ M, 8h). Die Analyse erfolgte per Immundetektion. Als Kontrolle der erfolgreichen MG132 Behandlung diente p53 und als Ladungskontrolle diente Aktin. b) Die stabile Massenkultur U2OS/HA-AROS wurde für die angegebenen Zeitpunkte mit Adriamycin behandelt (0,75 μ g/ml). 10% des Zelllysats wurden per Immunreaktion analysiert. Zur Kontrolle der Schadensinduktion wurde die p53 Stabilität überprüft. Als Kontrolle wurde Aktin überprüft. c) Wildtyp und *Hipk2*^{-/-} MEF wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit Adriamycin (0,75 μ g/ml) behandelt und 100 μ g des Gesamtlysats mittels Immundetektion analysiert. Die Kontrolle, p53, wird zeitabhängig nach Schadensinduktion stabilisiert. Zur Kontrolle der geladenen Proteinmengen wurde Aktin genutzt.

Da HIPK2 nach DNA-Schaden stabilisiert und aktiviert wird, wurde untersucht, wie sich AROS Proteinmengen nach DNA-Schadensinduktion durch Adriamycin (0,75 μ g/ml) verhalten.

Wie in Abbildung 42 b zu erkennen ist, sind in der Zelllinie U2OS/HA-AROS 6h nach Applikation von Adriamycin keine AROS Proteinmengen mehr detektierbar. Die DNA-

Schadensinduktion wurde anhand der Stabilisierung von p53 verfolgt und als Ladungskontrolle diente Aktin. Nicht nur in der Expressionszelllinie, sondern auch in MEFs konnte eine Abnahme der AROS Proteinmengen nach DNA-Schädigung verfolgt werden (Abbildung 42 c). In wildtyp MEF wird AROS nach 6h in Folge der Adriamycinbehandlung degradiert, wohingegen der Abbau von AROS in *Hipk2*^{-/-} MEF langsamer verläuft und nach 6h noch eine geringe AROS Proteinmenge detektierbar ist. Im Nullwert der *Hipk2*^{-/-} MEF ist im Vergleich zu den wildtyp MEF ein stärkeres Signal für AROS detektierbar, was für eine erhöhte AROS Proteinmenge in Abwesenheit von HIPK2 spricht. Das Einsetzen der DNA-Schadensantwort in MEFs wurde ebenfalls mit Hilfe der p53 Stabilisierung überprüft und als Ladungskontrolle diente Aktin. Der HIPK2 "knock-out" wurde mittels Genotypisierungs-PCR überprüft (vergleiche Abbildung 16 c).

Daraus kann gefolgert werden, dass HIPK2 zwar nicht alleine den AROS Abbau nach DNA-Schadensinduktion vermittelt, aber zu einem gewissen Ausmaß daran beteiligt zu sein scheint. Interessant wäre es, das Verhalten der AROS Proteinstabilität über eine weiter ausgedehnte Zeitreihe bis zu 48h nach Adriamycinbehandlung zu beobachten.

Zusammengenommen konnte hiermit die in Kapitel 3.9 besprochene, mögliche Regulation von AROS durch HIPK2 ergänzt werden. AROS bindet sowohl *in vitro* als auch nach Überexpression an HIPK2 und wird nach DNA-schädigender Adriamycinbehandlung über das 26S-Proteasom degradiert. Zielgerichtete Versuche müssen den Einfluß von HIPK2 auf den proteasomalen Abbau von AROS noch klären. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

7.2 Auflistung von Zusammenarbeiten

Einige Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in Zusammenarbeit oder unter meiner Anleitung durchgeführt.

Tabelle 28: Auflistung der Versuche, die in Zusammenarbeit entstanden sind.

Experiment in Abbildung	Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit erzielt
-------------------------	---

16 c)

23

25 a)

33 a)

34 b)

35 b)

Danksagung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von April 2009 bis Oktober 2012 am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg unter der Anleitung von in der Arbeitsgruppe "Zelluläre Seneszenz" erarbeitet.

Herr Prof. Dr. übernahm die Eigenschaft als Gutachter der Johannes-Gutenberg Universität Mainz.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Hilfsmittel durchgeführt habe. Experimentelle Daten und Materialien, die nicht von mir selbst erhoben, bzw. hergestellt wurden, habe ich besonders gekennzeichnet.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt habe und die Dissertation nicht in dieser oder anderer Form als Prüfungsarbeit verwendet oder bei einer anderen Fakultät vorgelegt habe.

Heidelberg, den 04.12.2012

