

# **Untersuchungen zur Regulierung der Circadianen Rhythmik durch Sirtuin 6**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

**Doktor rerum naturalium**

dem Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der

**Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz**

vorgelegt von

**Katharina Wolf**

**Mainz, im April 2016**

**Dekan:**

**Prodekan:**

**Erster Berichtstatter:**

**Zweiter Berichtstatter:**

**Mündliche Prüfung: 02. Juni 2016**

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abstract	V
1. Einleitung	7
1.1. Lebererkrankungen bei Chronodisruption und SIRT6-Defizienz	7
1.2. SIRT6 als epigenetischer Regulator	9
1.2.1. Sirtuine, die Homologen der „Silent information regulator“	9
1.2.2. Deacetylierungen und ADP-Ribosylierungen durch SIRT6	9
1.2.3. Auswirkungen der SIRT6-Defizienz: Phänotypie	13
1.3. Circadiane Rhythmik	13
1.3.1. Grundlagen und Bedeutung der diurnalen Chronobiologie	13
1.3.2. Chronodisruption führt zum progeroiden Phänotyp	15
1.3.3. Retinsäure-assoziierte Kernrezeptoren als Regulatoren der Circadianen Rhythmik und des Immunsystems	20
2. Zielsetzung und Modellsysteme	27
3. Ergebnisse	31
3.1. Epigenetische Regulation der Circadianen Rhythmik durch SIRT6	31
3.1.1. SIRT6-Defizienz führt zur Chronodisruption	31
3.1.2. Epigenetische Veränderungen bei SIRT6-Defizienz	35

3.1.3.	Posttranslationale Modifikationen von ROR $\alpha$ und PGC-1 $\alpha$	41
3.1.4.	Einfluss äußerer Faktoren auf die Circadiane Rhythmik	46
3.1.5.	Expression der Per2- und Cry1-Expression in Altersabhängigkeit	49
3.2.	Einfluss der CCGs auf die Differenzierung von Immunzellen	55
3.2.1.	CD11b <sup>+</sup> -Zellen in der SIRT6 KO-Leber	55
3.2.2.	Neutrophilie, Lymphopenie und Monozytose bei SIRT6 KO	57
3.2.3.	F4/80 <sup>+</sup> -Zellen in der SIRT6 KO-Leber	62
3.2.4.	Veränderte Polarisierung in SIRT6-defizienten BMM $\Phi$	64
4.	Diskussion	73
4.1.	Sirtuine als epigenetische Stellschrauben der Circadianen Rhythmik	73
4.1.1.	Veränderte Histonmodifikationen am RORE	73
4.1.2.	Posttranslationale Modifikationen von PGC-1 $\alpha$ und ROR $\alpha$	74
4.1.3.	Retinsäure als Modulator der CCGs über EZH2	76
4.2.	Chronische Entzündungen als mögliche Folge der SIRT6-bedingten Chronodisruption	77
4.2.1.	Immunologischer Alterungsphänotyp bei SIRT6 KO	77
4.2.2.	M2-Polarisierung von SIRT6 KO-Makrophagen	78
4.2.3.	Frühzeitige Alterung bei Fehlen von SIRT6 und bei Chronodisruption	80
4.2.4.	Erhöhte PER2- und C/EBP $\beta$ -Expression im SIRT6 KO-Modell	81
4.2.5.	Regulation der PER2-Expression durch CRY1 und MYBBP1a	82
4.3.	Weitergehende Interpretationen und Hypothesen	83
5.	Zusammenfassung und Ausblick	85
6.	Material und Methoden	89
6.1.	Versuchstierhaltung und -zucht	89
6.1.1.	Zucht der 129- <i>Sirt6</i> <sup>tm1Fwa/J</sup> - und B6- <i>Sirt6</i> <sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup> -Mäuse	89
6.1.2.	Genotypisierung der Versuchstiere	91

---

6.1.3.	Durchführung eines Isotransplantationsversuchs	94
6.2.	Mauspräparation und Zellkultur	94
6.2.1.	Mauspräparation	94
6.2.2.	Isolation der Milzzellen	95
6.2.3.	Generierung vonBMM $\Phi$	96
6.2.4.	Gewinnung von Hepatozyten	97
6.2.5.	Zellkultur von Hepatom- und Hepatoblastomzellen	97
6.2.6.	Zellviabilitätsassay	98
6.3.	Bildgebende Methoden	99
6.3.1.	Herstellung und Färbung von Paraffinschnitten	99
6.3.2.	Herstellung und Färbung von Gefrierschnitten	100
6.3.3.	Immunfluoreszenzfärbung	100
6.3.4.	Proximitäts-Ligations-Assay	101
6.3.5.	Durchflusscytometrie	102
6.3.6.	Cytokinkonzentrationsbestimmung mittels ELISA	102
6.4.	Molekularbiologische Methoden	103
6.4.1.	Proteingewinnung und -konzentrationsbestimmung	103
6.4.2.	Western Blot	104
6.4.3.	Semiquantitative Real-Time PCR (RT-PCR)	106
6.4.4.	Immunpräzipitation	108
6.4.5.	Chromatin-Immunpräzipitation	109
6.4.6.	Klonierung eines Reportergenplasmids	112
6.4.7.	Transformation	113
6.4.8.	Transfektion von Hepatozyten	114
6.4.9.	Luziferase-Reportergen-Assay	114

7. Literatur	CXVII
8. Anhang	CXXXIX
8.1. Abbildungsverzeichnis	CXXXIX
8.2. Abkürzungsverzeichnis	CXLIII

# Abstract

Disruption of circadian rhythms can increase the risk of obesity, metabolic syndrome, and cancer in both human night-shift workers and animal disease models. Circadian rhythm is driven by a set of core clock and clock-controlled genes (CCGs) which regulate about 10% of all genes in the genome, e.g. factors involved in the differentiation and activation of innate immune cells. Sirtuin 6 (SIRT6) is a NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase and ADP ribosyl transferase that influences cell metabolism, DNA repair and telomere maintenance, inflammation and cancer development. Mice lacking SIRT6 develop a strong degenerative phenotype with growth restriction, shortened lifespan, hypoglycemia, hepatic steatosis but less subcutaneous fat, lordokyphosis, cancer development, chronic inflammation and lymphopenia — all in all often termed as progeroid syndrome.

This thesis takes a closer look at the effect of a systemic SIRT6 deficiency in the liver with a focus on the circadian rhythm machinery. The expression of the CCGs in mouse liver tissue sampled at different Zeitgeber times demonstrated a severe chronodisruption in SIRT6-deficient mice. Chromatin immunoprecipitation revealed a SIRT6- and daytime-dependent histone pattern as well as a reduced binding of the activating transcription factor ROR $\alpha$  to the retinoic acid-related orphan receptor response element (RORE), located in the promoter region of several CCGs. These findings clearly indicate an important role of SIRT6 in the maintenance of the circadian rhythm. Furthermore, consequences of a SIRT6-dependent chronodisruption have been evaluated using a mouse strain with a celltype specific SIRT6 knockout in myeloid cells. In these mice, the SIRT6 knockout induced a shift from adaptive to innate immunity, possibly caused by the altered ROR $\alpha$  and REV-ERB $\alpha$  expression in immune cells. These results support the hypothesis of a chronic inflammatory phenotype in SIRT6 KO mice. Interestingly, there are remarkable similarities to mice lacking the clock gene BMAL1, which implicates a disrupted circadian rhythm. The deregulated circadian rhythm, the altered immunity and the increased tumorigenesis in absence of SIRT6 and BMAL1 bear a striking resemblance to the changes observed during aging. Therefore, the understanding of cellular functions of SIRT6 and their modulation is of major importance not only to decode pathways which are involved in disease progression but also to develop new therapeutic strategies.





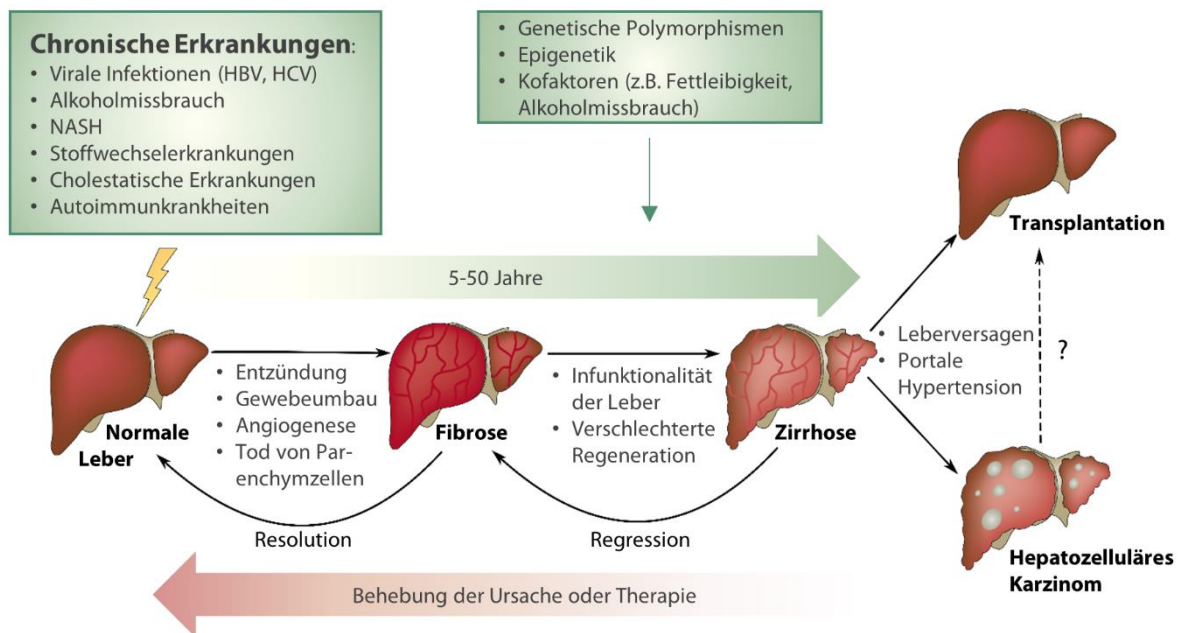
# 1. Einleitung

## 1.1. Lebererkrankungen bei Chronodisruption und SIRT6-Defizienz

Die Leber ist die größte Drüse im menschlichen Organismus und macht etwa 2-3% des Körpergewichts aus.<sup>1</sup> Sie ist verantwortlich für die Synthese von Gerinnungsfaktoren und Plasmaproteinen,<sup>2</sup> für die Produktion von Galle, die Nahrungsfette emulgiert,<sup>3</sup> für die Verwertung und Speicherung von Nahrungsbestandteilen und damit verbunden für Abbau und Ausscheidung von Stoffwechselprodukten.<sup>4-6</sup> Auch Medikamente oder Gifte werden von der Leber abgebaut, was zur Detoxifizierung des Organismus führt.<sup>7</sup> Durch Alkoholmissbrauch und fettreiche Ernährung, virale Infektionen (z. B. mit Hepatitis B/C-Virus), metabolische oder cholestatische Erkrankungen sowie Autoimmunreaktionen kann eine Fettleber und/oder eine Hepatitis entstehen (Abb. 1-1). Die Entzündung resultiert meist aus dem Absterben der Hepatozyten oder Cholangiozyten, bei dem durch die Freisetzung der Zellinhalte Immunzellen angelockt werden. Bei iterativer Schädigung der Leber kommt es folglich zu einer chronischen Entzündung, die durch Gewebeumbau und Angiogenese in eine Fibrose münden kann. Wird die Ursache nicht behoben oder die Fibrose nicht medikamentiert, führt die vermehrte Apoptose und/oder Nekrose von Hepatozyten zu einer Leberzirrhose, die sich durch eine veränderte Leberstruktur sowie eine verminderte Regenerationsfähigkeit und eine Dysfunktionalität der Leber auszeichnet. Sie begünstigt nach heutigem Wissensstand die Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC), das eine der häufigsten bösartigen Tumorarten und hepatologischen Todesursachen ist.<sup>8</sup>

Die Analyse von genetischen und epigenetischen Veränderungen oder Polymorphismen, die zu einer Prädisposition für Lebererkrankung durch eine erhöhte oder verminderte Expression bestimmter Gene führen, könnten womöglich als diagnostische Marker

verwendet werden und zur — manchmal lebensrettenden — Früherkennung von hepatologischen Erkrankungen beitragen. So wurde z. B. für die Kernrezeptoren REV-ERBa und REV-ERBβ gezeigt, dass ihr Fehlen eine starke Hepatosteatosis in der Maus auslöst.<sup>9</sup> Die Genexpression der REV-ERBs wird von einem Komplex aus den Transkriptionsfaktoren BMAL1 und CLOCK, wesentlichen Regulatoren der Circadianen Rhythmik, initiiert,<sup>10</sup> dessen transkriptionelle Aktivität wiederum u. a. von den Sirtuinen SIRT1 und SIRT6 gesteuert wird.<sup>11,12</sup> Auch das Fehlen von SIRT6 selbst kann das Entstehen einer Fettleber,<sup>13</sup> einer Hepatitis und Fibrose<sup>14</sup> sowie eines HCC<sup>15</sup> begünstigen. In den nächsten Kapiteln soll genauer auf die molekularen Mechanismen, die bei einer Defizienz von SIRT6 und den circadianen Genen zu Lebererkrankungen führen könnten, eingegangen werden.



**Abb. 1-1: Pathogenese von Lebererkrankungen.**

Chronische Erkrankungen, wie z.B. alkoholbedingte und nicht-alkoholbedingte Steatohepatitis (NASH), virale Infektionen oder Stoffwechselerkrankungen, führen zur Hepatitis, einer Entzündung des Lebergewebes. Durch Gewebeumbau und Angiogenese kommt es zunächst zur Fibrose, die sich im Laufe der Zeit zu einer Zirrhose entwickeln kann. Wird die Ursache der Erkrankung nicht behoben oder die Zirrhose nicht therapiert, kann es zur Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms kommen.

Mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. verändert nach: *Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ.*, Pellicoro et al., Nature reviews. Immunology, 2014.

## 1.2. SIRT6 als epigenetischer Regulator

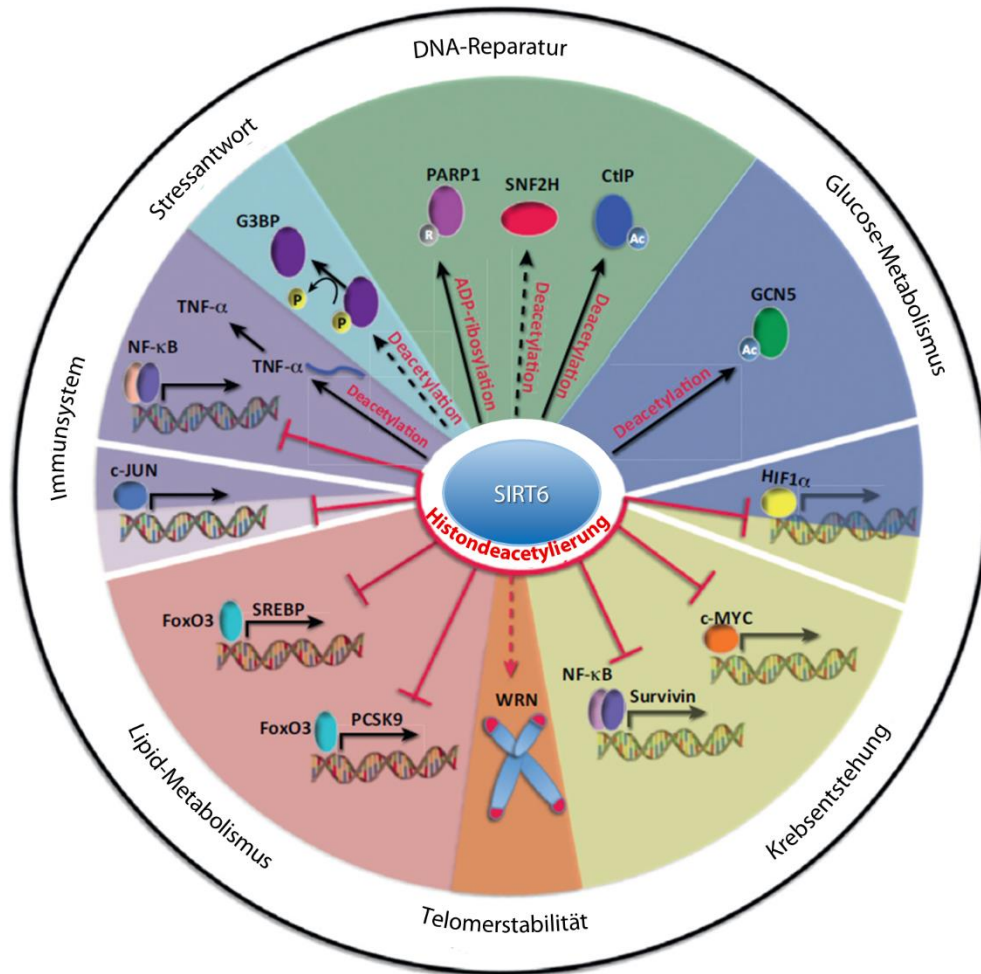
### 1.2.1. Sirtuine, die Homologen der „Silent information regulator“

Die Proteinfamilie der Sirtuine wurde zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt.<sup>16</sup> *Silent information regulator 2* (Sir2) beeinflusst dort über Strukturveränderungen des Chromatins<sup>17</sup> und Verminderung der Genexpression<sup>18,19</sup> die Lebenserwartung der Hefezelle positiv.<sup>20</sup> Es weist eine **NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase<sup>21,22</sup> und ADP-Ribosyltransferaseaktivität<sup>23</sup>** auf. Die sieben Homologen in Säugetieren werden als Sirtuine (SIRT1-7) bezeichnet<sup>24</sup> und sind vorwiegend im Nucleus (SIRT1, SIRT6 und SIRT7), in den Mitochondrien (SIRT3, SIRT4 und SIRT5) und im Cytoplasma (SIRT2) lokalisiert.<sup>25,26</sup> Ihre Aufgaben sind vielfältig: Sie sind involviert in DNA-Reparatur und Genomstabilität, in metabolischen und immunologischen Prozessen und dadurch in der Entstehung von Krankheiten wie Krebs und Diabetes.<sup>27,28</sup> Besonders entscheidend ist ihre Histondeacetylasefunktion, da das Wechselspiel von acetylierten und deacetylierten Histonen die transkriptionelle Aktivität in der Histonumgebung beeinflusst.<sup>29</sup> Sind die Histone acetyliert, lockert sich die Chromatinstruktur durch die eingefügte funktionelle Gruppe auf und die Anlagerung der Transkriptionsmaschinerie wird ermöglicht.<sup>30</sup> Wird das acetylierte Euchromatin durch Deacetylierung zu Heterochromatin, sinkt die transkriptionelle Aktivität. Diese Regulation der Genexpression wird als epigenetisch bezeichnet, da sie nicht in der Gensequenz codiert ist.<sup>31</sup> Die Sirtuine, darunter auch SIRT6, sind also durch ihre Histondeacetylaseaktivität wichtige Modulatoren der **epigenetischen Genregulation**.<sup>32,33</sup>

### 1.2.2. Deacetylierungen und ADP-Ribosylierungen durch SIRT6

Sirtuin 6 (**SIRT6**) wird ubiquitär exprimiert<sup>34</sup> und ist etwa 40 kDa groß.<sup>35</sup> Seine **Expression** wird durch die Bindung von c-Fos an den SIRT6-Promotor gestartet, kann allerdings durch verschiedene microRNAs vermindert werden.<sup>36,37</sup> Die **Stabilität** des Proteins erhöht sich durch Ubiquitylierung an Lysinrest 170 durch das *Carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein* (CHIP), wodurch es vor proteasomalen Abbau geschützt ist.<sup>38</sup> Die enzymatische **Aktivität** von SIRT6 ist abhängig von dem Co-Faktor NAD<sup>+</sup> und von freien Fettsäuren.<sup>39</sup> Sirtuin 6 hat *in vitro* sowohl eine schwache Deacetylase- als auch eine schwache ADP-Ribosyltransferaseaktivität,<sup>40,41</sup> wobei die Deacetylierungsrate signifikant erhöht werden konnte, sobald mit Nucleosomen statt mit Histonen gearbeitet wurde.<sup>42</sup>

Außerdem wird ihm die Deacylierung des Tumornekrosefaktors TNF- $\alpha$  zugesprochen.<sup>43</sup> Über diese drei enzymatischen Reaktionen erschließt sich SIRT6 ein breites Spektrum an Substraten und Aufgabenbereichen, die von Kugel und Mostoslavsky zusammengefasst wurden (Abb. 1-2). Zu den Funktionen von SIRT6 in der Zelle gehören die Erhaltung der Telomerstabilität, die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, die Anpassung des Glucose- und Lipidstoffwechsels, die Regulation des Immunsystems, die Krebsentstehung und die Lebensdauer des Organismus.<sup>44</sup>



**Abb. 1-2: Übersicht über die Wirkungsweise der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Deacetylase Sirtuin 6.**

Sirtuin 6 (SIRT6) beeinflusst über seine Deacetylase-, Deacylase- und ADP-Ribosyltransferaseaktivität die Genomstabilität, den Glucose- und Lipidmetabolismus, die Zellproliferation und das Immunsystem. Die Deacetylierung der Lysinreste 9 und 56 an Histon H3 durch SIRT6 reprimiert die Genexpression und beeinflusst u.a. die Expression von NF- $\kappa$ B-, FoxO3-, HIF1 $\alpha$ - und c-Myc-Zielgenen. Eine direkte Interaktion mit SIRT6 wurde für TNF $\alpha$ , G3BP, PARP1, SNFH2, CtIP sowie GCN5 nachgewiesen.

Mit Genehmigung von Elsevier verändert nach: *Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6*, Kugel und Mostoslavsky, Trends in Biochemical Sciences, 2014.

Genauere molekularbiologische Untersuchungen zeigten, dass sich durch die Deacetylierung von Histon H3 an Lysinrest 9 (H3K9) und 56 (H3K56) das *Werner syndrome protein* (WRN) an die Telomere anlagern kann, was zur erhöhten Stabilität der Chromosomenenden und zur verbesserten DNA-Reparatur führt.<sup>40,45-47</sup> Die Integrität der DNA und der Telomere ist entscheidend für die Lebensdauer der Zelle;<sup>48</sup> Patienten mit Werner-Syndrom zeigen dementsprechend ein erhöhtes Krebsrisiko und frühzeitige Alterungserscheinungen<sup>47</sup>. Die **Genomstabilität** wird weiterhin erhöht durch die ADP-Ribosylierung der *Poly(ADP-ribose) polymerase* (PARP1) und die Deacetylierung des *C-terminal binding protein interacting protein* (CtIP) durch SIRT6 sowie dessen Interaktion mit DNA-abhängigen Proteinkinasen oder dem Protein SNF2H (*SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin, SMARCA5*).<sup>49-52</sup> Diese Faktoren sind für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA durch nicht-homologe Endverknüpfung (*Non-homologous end-joining*, NHEJ) und homologe Rekombination verantwortlich. Im humanen Zellkulturmodell führten die Modifikationen von PARP1, CtIP und SNF2H durch SIRT6 zur Aktivierung und zur Rekrutierung der genannten Proteine zu Doppelstrangbrüchen in der DNA. Eine unzureichende Reparatur dieser DNA-Schäden kann zu Mutationen und dadurch zur Tumorgenese führen.<sup>53</sup>

Zudem greift SIRT6 in den **Metabolismus** ein: Zhong *et al.* studierten den Glucosemetabolismus im Mausmodell, da SIRT6-defiziente Mäuse häufig eine letale Hypoglykämie aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass SIRT6 die Glykolyse und die Gluconeogenese vermindert, indem es H3K9 am Promotor des Glykolyseaktivators *Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$*  (HIF1 $\alpha$ ) und die Acetylase *General control of amino-acid synthesis* (GCN5) deacetyliert.<sup>54,55</sup> GCN5 acetyliert wiederum den *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 $\alpha$ ), der dadurch vom Chromatin dissoziiert, womit die Expression von Enzymen der Gluconeogenese gehemmt wird. Bezüglich des Lipidmetabolismus ist die Lage etwas unklarer: Kim *et al.* fanden eine erhöhte Triglyzeridsynthese in SIRT6-defizienten Mäusen, die die Ursache für die Fettleber darstellen könnte.<sup>13</sup> Die Expression von *Sterol regulatory element-binding protein* (SREBP)<sup>56</sup>, PGC-1 $\alpha$ , *Forkhead-Box protein* (FoxO1)<sup>57</sup> und *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ )-regulierten Genen<sup>58</sup> sowie die Phosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und der Serin/Threonin-Kinase 11 (STK11/LKB1)<sup>57</sup>

scheint durch SIRT6 gehemmt zu werden, die genauen Mechanismen sind allerdings noch nicht erforscht. Ebenso wenig ist geklärt, weshalb SIRT6 die PGC-1 $\alpha$ -Expression erhöhen und dennoch seine Inaktivierung über die GCN5-Deacetylierung auslösen sollte.

Der Einfluss von SIRT6 auf **immunologische Prozesse** wurde ebenfalls untersucht und ergab sowohl pro- als auch antiinflammatorische Auswirkungen. Van Gool *et al.* fanden im Mausmodell eine verminderte Sekretion des proinflammatorischen Faktors TNF- $\alpha$  bei SIRT6-Defizienz, die sie der unterschiedlichen NAD<sup>+</sup>-Konzentration in den Immunzellen zuschrieben.<sup>59</sup> Auch Pan *et al.* beschrieben SIRT6 als einen NAD<sup>+</sup>-Sensor, da es auch ohne Substrat den Co-Faktor binden kann.<sup>35</sup> Zudem postulierten Jiang *et al.*, dass SIRT6 in murinen embryonalen Fibroblasten und Knochenmarksmakrophagen TNF- $\alpha$  deacyliert und dadurch seine Sekretion herbeiführt. Andererseits gibt es kontroverse Diskussionen, ob SIRT6 H3K9 am Promotor von NF- $\kappa$ B-Zielgenen (*Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) deacetyliert und damit deren Expression verringert, was einer antiinflammatorischen Wirkung entsprechen würde.<sup>60,61</sup> Eine antiinflammatorische Wirkung von SIRT6 durch die Interaktion mit c-Jun und der damit verbundenen H3K9-Deacetylierung an den Promotoren von *Methyl-accepting chemotaxis protein* (MCP-1), Interleukin (IL-)6 und TNF- $\alpha$  fanden auch Xiao *et al.*<sup>14</sup> Sie bringen die erhöhte Expression dieser Cytokine bei Fehlen von SIRT6 mit der Entzündung und Fibrose der Leber von SIRT6-defizienten Mäusen in Verbindung.

Sirtuin 6 greift weiterhin in die **Zellproliferation** ein, indem es in humanen Zellkulturlinien und murinen embryonalen Stammzellen direkt mit c-Myc interagiert und als Corepressor die Expression von c-Myc-Zielgenen reprimiert. Da c-Myc die Zellproliferation erhöht und als Protoonkogen gilt, wird sein Inhibitor SIRT6 als Tumorsuppressor gehandelt.<sup>62</sup> Min *et al.* konnten im Mausmodell zeigen, dass SIRT6 die Expression des antiapoptotischen Proteins Survivin durch die H3K9-Deacetylierung und die verminderte Expression und Bindung von Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B an den Survivin-Promotor inhibiert. In diesem Modell wurde außerdem die Regulation der SIRT6-Expression bei der Diethylnitrosamin-induzierten HCC-Entstehung diskutiert: Die Expression von SIRT6 wurde durch c-Fos aktiviert, dessen Expression wiederum von c-Jun reprimiert. Auch in dieser Arbeit von Min *et al.* wurde deutlich, dass SIRT6 im Anfangsstadium des HCC supprimierend auf die Tumorzellproliferation wirken kann.<sup>36</sup>

### 1.2.3. Auswirkungen der SIRT6-Defizienz: Phänotypie

Das Fehlen von SIRT6 löst einen stark **degenerativen Phänotyp** in der Maus aus. SIRT6-defiziente Mäuse sind kleiner als ihre wildtypischen Geschwister und weisen eine Lordokyphose und eine verringerte Knochendichte auf. Sie sterben im Alter von etwa einem Monat, was die etwas vage Bezeichnung der Sirtuine als „**Langlebigkeitsgene**“ erklärt. Außerdem haben sie weniger subkutanes Fett und eine Hypoglykämie, womöglich auf Grund der verstärkten Glykolyse.<sup>34</sup> Die erhöhte Glykolyse und Triglyzeridsynthese resultiert außerdem in einer Fettleber (*Steatosis hepatis*).<sup>13</sup> Die SIRT6-defizienten Mäuse zeigten zudem eine Lymphopenie, die womöglich von der chronischen Entzündung des Darms<sup>34</sup> und der Leber<sup>14</sup>, die in einer Fibrose münden kann, herrührte. Es wurde außerdem festgestellt, dass im Mausmodell die SIRT6-Expression in Herzen mit Herzfehler und Hypertrophie verringert ist.<sup>63</sup> Beim Menschen ist die SIRT6-Expression in Lebern mit HCC verringert und korreliert mit einer schlechten Prognose.<sup>15</sup> Dies korreliert mit der erhöhten Krebsentstehung bei SIRT6-Defizienz, was auf die erhöhte Zellproliferation durch c-Myc und Survivin und die erhöhte Glykolyse, die dem Warburg Effekt in Tumorzellen ähnelt, zurückgeführt wurde.<sup>54,64</sup> Überraschenderweise wurden aber in epithelialen und hämatopoetischen Tumorzellen erhöhte SIRT6-Level gefunden.<sup>65,66</sup> Dies könnte für eine Zelltyp-spezifische Funktion von SIRT6 sprechen. Der degenerative Phänotyp bei SIRT6-Defizienz wird oft mit einer **Progeria**, einer frühzeitigen Alterung, in Verbindung gebracht.

## 1.3. Circadiane Rhythmik

### 1.3.1. Grundlagen und Bedeutung der diurnalen Chronobiologie

Die Thematik der Circadianen Rhythmik beschreibt physiologische Prozesse, die den Tag-Nacht-Rhythmus betreffen, d.h. die eine Periode von etwa 24 h aufweisen. Die Oszillation von physiologischen Parametern in einem 24 h-Intervall unter Berücksichtigung äußerer Einflüsse wurde von Colin Pittendrigh in der Mitte des 20. Jahrhunderts im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* aufgezeigt.<sup>67</sup> Die Begrifflichkeit und Bedeutung der Circadianen Rhythmik wurde etwas später von einem Pionier der Chronobiologie, Franz Halberg, eingeführt.<sup>68</sup> Nachdem zunächst eher phänotypische Merkmale wie die Anzahl von Immunzellen im Blut in Abhängigkeit von der Tageszeit untersucht wurden,<sup>69-71</sup> gab es nach und nach auch Hinweise auf die molekularen Mechanismen der „inneren Uhr“. In den Modellorganismen *Neurospora* und *Drosophila*

wurden die circadianen Gene *period* (*per*), *timeless* (*tim*) und *frequency* (*frq*) entdeckt,<sup>72,73</sup> in Säugetieren etwas später *Clock*<sup>74</sup>, *Bmal1*<sup>75</sup>, *Period* (*Per*)<sup>76</sup> und *Cryptochrom* (*Cry*)<sup>77</sup>, die als **Core Clock Genes** (CCG) bezeichnet werden.<sup>78</sup> Diese Gene zirkulieren in der Zelle, pendeln zwischen Cytoplasma und Nucleus, und bilden über Interaktionen und Rückkopplungsmechanismen, Synthese und Degradation, Modifikationen und Lokalisation einen endogenen 24 h-Rhythmus. Sie beeinflussen so die Expression von etwa 10 % des Genoms.<sup>79-81</sup> Vergleich man diese oszillierenden Gene in verschiedenen Zelltypen, deckten sich jedoch nur 5-10 %.<sup>82</sup> Diese Varianz ließ eine komplexe Regulation und Interaktion der CCGs mit zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren und epigenetischen Modulatoren vermuten, die von Paolo Sassone-Corsi in diversen Übersichtsartikeln zusammen gefasst wurden:<sup>83-86</sup> Epigenetische Aktivatoren sind demnach CLOCK, eines der CCGs, das eine Histon-Acetyltransferase ist,<sup>87</sup> sowie die Acetyltransferasen p300 und *Creb binding protein* (CBP).<sup>88</sup> Zudem trimethyliert *Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia* (MLL) H3K4, was zu einer transkriptionellen Aktivierung führt.<sup>89</sup> Reprimierend wirken hingegen die Sirtuine als Histondeacetylasen<sup>11,12,90</sup> und die DNA- sowie Histonmethylierung durch den *Enhancer of zeste homologue 2* (EZH2).<sup>91</sup> Ein Circadianer Rhythmus dieser epigenetischen Faktoren könnte einen breiten Einfluss auf das gesamte Transkriptom haben. Für die Sirtuine könnte z.B. die oszillierende NAD<sup>+</sup>-Konzentration eine circadiane Aktivität bedingen.<sup>92,93</sup> Auch die Arbeit von Koike *et al.* gibt einen guten Überblick über das **circadiane Epigenom** in der Leber.<sup>94</sup> Ungeachtet dieser endogenen Uhr ist der Organismus im Laufe eines Tages stetig äußeren Einflüssen ausgesetzt, denen er sich anpassen muss: Licht, Nahrung, Bewegung und Stress, Temperatur sowie soziökonomischen Faktoren. Diese äußeren Einflüsse werden als **Zeitgeber** bezeichnet. Sie wurden als erstes von Jürgen Aschoff 1954 in seiner Publikation „Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik“ beschrieben und seitdem auch im Englischen mit dem deutschen Ausdruck bezeichnet.<sup>95</sup> Der offensichtlichste Zeitgeber für die Circadiane Rhythmik ist Licht. Es wird vom Auge detektiert, das Signal an den Suprachiasmatischen Nucleus (SCN), die „*Master Clock*“,<sup>96,97</sup> weitergeleitet und dort verarbeitet.<sup>98,99</sup> Vom SCN werden neuronale und hormonelle Botenstoffe an die Körperperipherie, die sogenannten „*Slave Oscillators*“, gesendet.<sup>100</sup> Die Informationen der endogenen Uhr der „*Master Clock*“ werden mit denen des „*Slave Oscillators*“ abgeglichen und physiologische Prozesse werden koordiniert. In der



Leber sind dies u. a. der Kohlenhydrat-, Gallensäuren- und Lipidstoffwechsel, die Synthese von Plasmaproteinen und die Entgiftung.<sup>101</sup>

Als wichtiger Mediator und Botenstoff zwischen endogener und exogener Rhythmik gilt Melatonin. Während der Dunkelphase steigt die Melatoninkonzentration deutlich an, registriert das Auge den Zeitgeber Licht, fällt die Konzentration wieder ab.<sup>102,103</sup> Vermutet wird, dass der SCN ein neuronales Signal an die Zirbeldrüse (*Epiphysis cerebri, Glandula pinealis*) sendet, die Melatonin ausschüttet, das rückkoppelnd wieder auf den SCN und dessen Synthese und Abbau der CCGs wirkt.<sup>104</sup> Melatoninrezeptoren wurden allerdings nicht nur auf den Zellen des SCN, sondern auch auf den Insulin sekretierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas gefunden.<sup>105,106</sup> Mehrere Studien u. a. vom Diabetologen Elmar Peschke fanden heraus, dass die Melatoninsekretion sich im Gleichgewicht mit der Sekretion von Insulin und Glucagon befindet.<sup>107-109</sup> Der **Melatonin-Insulin-Antagonismus** ermöglicht es dem Organismus tageszeitabhängig und damit effizient auf Nahrungszufuhr zu reagieren. Bei Aufnahme von Nahrung konnte beobachtet werden, dass die Leber ihren eigenen Rhythmus entwickelt, unabhängig vom SCN. Der Zeitgeber **Nahrung** dominierte also in diesem Fall über den Zeitgeber Licht und die Melatoninsekretion.<sup>110,111</sup> Eine mögliche Regulation des Gleichgewichts besteht auch über *D site of albumin promoter binding protein* (DBP): Seine Expression wird von den CCGs kontrolliert<sup>112,113</sup> und oszilliert daher circadian.<sup>114</sup> Da es die Insulinproduktion und -sekretion beeinflusst, oszillieren diese ebenfalls.<sup>115</sup> DBP ist außerdem verantwortlich für die Expression von detoxifizierenden Enzymen und für den Abbau von Xenobiotika.<sup>116</sup>

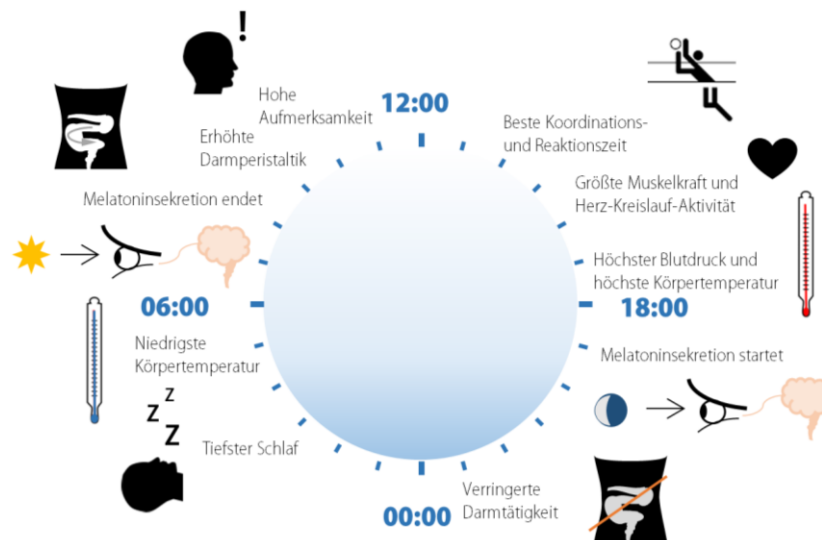
### 1.3.2. Chronodisruption führt zum progeroiden Phänotyp

Durch Schichtarbeit oder häufigen Zeitzonewechsel beispielsweise kann es passieren, dass die endogene und die exogene Uhr nicht mehr synchron sind, also die physiologischen Prozesse nicht mehr an die äußeren Gegebenheiten und Erfordernisse angepasst sind. Es wird von einer **Chronodisruption** gesprochen.<sup>117</sup> Der breite Einflussbereich der CCGs zieht ein ebenso breites Spektrum an Konsequenzen bei fehlerhaftem Ablauf der Circadianen Rhythmik nach sich, deren molekulare Ursachen noch nicht vollständig geklärt sind. Die Chronodisruption wird oft mit der Entstehung von Krebs, Diabetes und dem metabolischen Syndrom sowie Schlafstörungen und dadurch psychologischen Krankheiten in Verbindung gebracht.<sup>118</sup> Da in epidemiologischen Studien eine starke Korrelation von

Schichtarbeit, Chronodisruption und Krebsentstehung zu Tage trat, liegt ein besonderes Augenmerk der Chronobiologie auf dem Einfluss der Chronodisruption auf die Tumorigenese.<sup>119</sup> Zunächst wurde in Ratten beobachtet, dass solche, die kontinuierlich Licht ausgesetzt waren, bei Induktion mit Dimethylbenzanthracen mehr Tumore v. a. in den Eierstöcken und Brustdrüsen entwickelten als Ratten, die einem Hell-Dunkel-Rhythmus folgten. Es wurde ein prokanzerogener Effekt von kontinuierlichem Licht geschlussfolgert. Da Licht die Melatoninsekretion senkt, wurde ein Effekt des Hormons auf die Tumorigenese untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der prokanzerogene Effekt des kontinuierlichen Lichts durch die Gabe von Melatonin revidiert werden konnte.<sup>120–122</sup> Es folgten molekularbiologische Analysen, die die Beeinflussung der Zellproliferation und Apoptose sowie von DNA-Reparaturmechanismen durch die CCGs, resultierend aus der Regulation von u. a. c-Myc, p53, c-Jun, GADD45 (*Growth arrest and DNA damage*),  $\beta$ -Catenin und Caseinkinase CKII zeigten.<sup>123,124</sup> Das Wissen um die circadianen Abläufe in der Tumorentstehung eröffnet die Möglichkeit der Chronopharmakologie und Chronotherapie, also der Behandlung von Krankheiten unter Berücksichtigung der Tageszeit.<sup>125,126</sup> Eine zusammenfassende Darstellung dieses Kapitels ist in Abbildung 1-3 gezeigt: Die circadianen physiologischen Prozesse werden von äußeren Zeitgebern wie Licht, Nahrung und Temperatur reguliert und führen z. B. zu tageszeitabhängigen Melatoninausschüttungen,<sup>102,103</sup> Körpertemperaturänderungen,<sup>127,128</sup> Stoffwechselfvorgängen,<sup>129,130</sup> kardiovaskulären Prozessen<sup>131</sup> sowie Aktivitätsphasen und Verhaltensweisen.<sup>132</sup> Dieser systemische Circadiane Rhythmus befindet sich in ständigem Informationsaustausch und Synchronisieren mit der zellulären Uhr, den CCGs, die über einen **autoregulatorischen Transkriptions-Translations-Rückkopplungsmechanismus** (*autoregulatory transcription translation negative feedback loop*, TTFL) eine endogene Rhythmik bilden.<sup>133</sup> Der zentrale Proteinkomplex der Circadianen Rhythmik besteht aus den Transkriptionsfaktoren BMAL1 (auch MOP3 oder ARNTL genannt) und CLOCK. CLOCK hat eine Acetyltransferaseaktivität und acetyliert sowohl Histon H3 als auch BMAL1.<sup>87</sup> Zusammen binden sie an *Enhancer-Box* (E-Box)-Elemente in der DNA und initiieren die Transkription der nachfolgenden Gene.<sup>134</sup> Die charakteristische Basenabfolge der E-Box lautet CANNTG mit dem beliebigen Nukleotid N und befindet sich in der Promotorregion zahlreicher Gene.<sup>135</sup> So löst der CLOCK:BMAL-Komplex beispielsweise die Transkription von zwei CRY-Genen (*CRY1* und *CRY2*) sowie von drei PER-Genen

(*PER1*, *PER2* und *PER3*) aus, die wiederum einen Komplex bilden, der den CLOCK:BMAL-Komplex und damit die eigene Expression inhibiert. Es entsteht also eine negative Rückkopplung.<sup>136,137</sup> Durch Ubiquitylierung und Deacetylierung wird PER2 von CKI $\epsilon$  und SIRT1 zum proteasomalen Abbau markiert, was die Transkription der CRY- und PER-Proteine wieder steigen lässt.<sup>90,138</sup> Diese Schleife von CLOCK:BMAL- und CRY:PER-Komplexen wird stabilisiert durch einen zweiten Mechanismus: Die **nukleären Rezeptoren REV-ERB ( $\alpha,\beta$ ) und ROR ( $\alpha,\beta,\gamma$ )** binden an eine spezifische Sequenz, genannt ROR-Element (RORE), in der Promotorregion von BMAL1 und regulieren darüber seine Expression. Das RORE-Element zeichnet sich durch die konservierte Basenabfolge AAAGT(A/G)(G/T)GT(T/C)A aus.<sup>10,139,140</sup> Während RORs aktivierend auf die Transkription wirken, reprimieren REV-ERBs die BMAL1-Expression durch die Rekrutierung von Corepressor N-CoR und Histondeacetylase HDAC3.<sup>141,142</sup> Da die Promotorregion von REV-ERB $\alpha$  sowohl eine E-Box<sup>143</sup> als auch ein RORE<sup>144,145</sup> enthält, entsteht ein weiterer Rückkopplungsmechanismus (s. Abb. 1-3). Die Promotoranalyse der CCGs von Bozek *et al.* zeigte noch weitere Sequenzmotive und mögliche regulatorische Transkriptionsfaktoren auf, so z.B. HIF-1 und C/EBP.<sup>146</sup> Sind diese endogene und die exogene Uhr nicht aufeinander abgestimmt, ist das Transkriptom des Organismus nicht auf die erforderlichen physiologischen Prozesse eingestellt.<sup>147</sup> Dies führt zu den bereits genannten Auswirkungen wie Schlafstörungen,<sup>148,149</sup> die mit psychologischen Krankheiten einhergehen können, metabolisches Syndrom<sup>150</sup> und Krebs.<sup>151</sup>

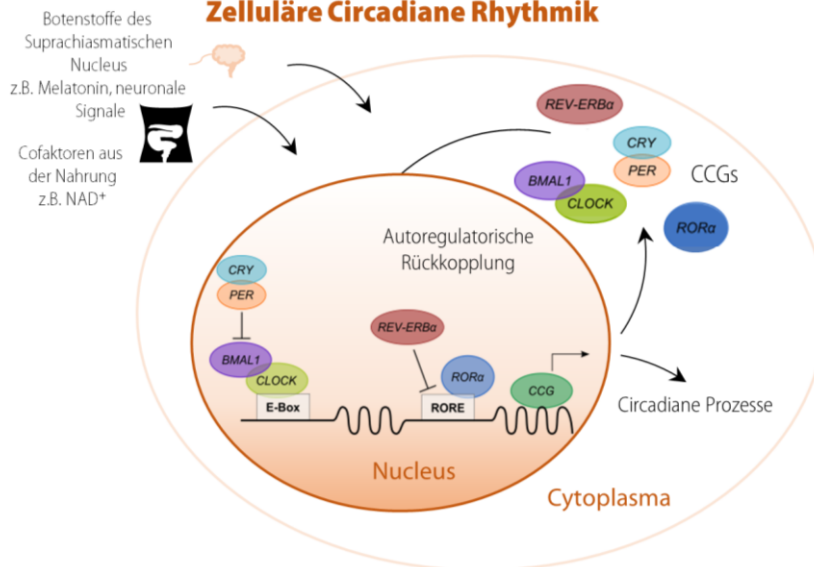
Auch im Mausmodell konnten Auswirkungen einer Chronodisruption gefunden werden. Der BMAL1 KO-Phänotyp, bei dem die Mäuse einen Verlust der Circadianen Rhythmik, eine Chronodisruption, aufweisen, ähnelt interessanterweise dem bereits beschriebenen progeroiden Phänotyp der SIRT6 KO-Mäuse.<sup>152</sup> Die BMAL1 KO-Mäuse sind kleiner als ihre wildtypischen Geschwister und sterben früher, sie weisen kaum Fettgewebe auf und haben ein verändertes Hämogramm. Kondratov *et al.* fanden auch pathologische Veränderungen des Auges, die normalerweise mit dem Alterungsprozess einhergehen wie z. B. eine Hornhautentzündung.<sup>153</sup> Die **Alterung** von Säugetieren geht nach heutigem Wissensstand einher mit Genominstabilität — die auch zu Krebs führen kann — sowie dem Verkürzen der Telomere<sup>48</sup> und einer Änderung epigenetischer Marker.<sup>154</sup> Des Weiteren korreliert der Alterungsprozess mit einer proinflammatorischen Verschiebung des



**Circadianer Rhythmus des Organismus**



**Zelluläre Circadiane Rhythmik**



**Abb. 1-3: Chronodisruption kann metabolisches Syndrom, Schlafstörungen und Krebs auslösen.**

Über einen autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus bilden die *Core Clock Genes* (CCG) einen endogenen 24h-Rhythmus über den sie etwa 10% des Genoms regulieren. Die Synchronisation dieses circadianen Transkriptoms mit den circadianen physiologischen Prozessen, wie Verdauung, Schlaf-Wach-Rhythmus und Herz-Kreislauf-Aktivität, gewährleistet eine effiziente und zeitnahe Reaktion des Körpers auf Umwelteinflüsse, Pathogene, Toxine, Nahrung, körperliche Aktivität etc. Die Abstimmung von endogenem und exogenem Rhythmus wird durch Zeitgeber wie Temperatur, Licht und Nahrung koordiniert. Schlägt die Synchronisation fehl, z.B. durch Schichtarbeit, Jetlag oder Medikamenteneinnahme, kommt es zur Chronodisruption, die zu Krebs, Schlafstörungen, Fettleibigkeit und Diabetes führen kann.

In Anlehnung an: [learn.pharmacy.unc.edu/insomnia/node/6](http://learn.pharmacy.unc.edu/insomnia/node/6) (26.03.16 10:38, oben) sowie *The circadian clock pacemaker and tumour suppressor*, Fu und Lee, Nature reviews. Cancer, 2003 (unten, mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd.).

Immunsystems,<sup>155</sup> die mit einer Abnahme der Barrierefunktion der Epithelien,<sup>156</sup> einer Neutrophilie<sup>157</sup> und einer verstärkten, Sirtuin-abhängigen Expression von NF-κB-Zielgenen zusammenhängt.<sup>158-160</sup> Ein wichtiger Aspekt der Alterung ist die Autophagie: Der "Selbstverdau" zellulärer Strukturen verhindert häufig die Entartung oder das Absterben der Zelle durch Apoptose oder Nekrose, da alte oder fehlerhafte cytoplasmatische Elemente lysosomal abgebaut und „recycelt“ werden.<sup>161</sup> Mehrere Studien haben gezeigt, dass Langlebigkeit mit einer intakten Autophagie einhergeht und mit der Histonacetylierung, der Kalorienrestriktion sowie dem p53-, dem *Insulin growth factor 1* (IGF-1)- und dem *Mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR)-Signalweg zusammenhängt.<sup>162</sup> Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist das *CCAAT Enhancer-Binding Protein-beta* (C/EBPβ). Es wird nicht nur in bestimmten Phasen der Zelldifferenzierung von z. B. Adipozyten<sup>163,164</sup> und Neutrophilen<sup>165</sup> exprimiert, sondern verursacht auch einen Circadianen Rhythmus der Autophagie.<sup>166</sup> Die Expression von C/EBPβ unterliegt selbst einer tageszeitabhängigen Oszillation und es bindet direkt an den Promotor von Autophagiegenen, deren Expression es aktiviert.<sup>167</sup> Zudem wird vermutet, dass es auch an der Transkription der CCGs<sup>146</sup> und derer Zielgene wie DBP<sup>114</sup> beteiligt ist. Reinke *et al.* fanden auch einen Einfluss von PER2 auf die Autophagie und eine altersabhängige Circadiane Rhythmik: Die PER2-Expression war in den Zellen älterer Probanden deutlich erhöht im Vergleich zu den jüngeren.<sup>168</sup>

Wie bereits erwähnt, gehören die *period*-Gene zu den ersten entdeckten circadianen Genen und ihr Fehlen bzw. ihre Dysfunktionalität führen zu einer Chronodisruption.<sup>169</sup> Sie bilden einen Komplex mit den Cryptochromen, evolutionär konservierten Magneto- und Photorezeptoren,<sup>170,171</sup> der hier als Repressor des CLOCK:BMAL-Komplexes vorgestellt wurde. Vorzugsweise interagiert CRY1 mit PER2 über eine Zinkbindung und Disulfidbrücken.<sup>172</sup> Die Interaktion wird u. a. über Polyamine reguliert, deren Konzentration mit dem Alter ansteigt.<sup>173</sup> Über Knockout-Modelle konnte die Verbindung von CRY1 und/oder PER2 zum Östrogenrezeptor-Signalweg,<sup>174</sup> zu Lipidmetabolismus<sup>175</sup> und Gluconeogenese<sup>176</sup> und zur Expression proinflammatorischer Cytokine<sup>177</sup> aufgezeigt werden. Hara *et al.* fanden heraus, dass CRY1 zusammen mit dem *Myb-binding protein 1a* (MYBBP1a) an den *Per2*-Promotor bindet und darüber dessen Expression kontrolliert.<sup>178</sup> Es kommt zu einer **CRY-gesteuerten Akkumulation von PER2** im Zellkern.<sup>179</sup> Der NF-κB-Repressor MYBBP1a wurde außerdem als ein direkter Interaktionspartner von SIRT6

identifiziert.<sup>180</sup> Die Inhibition der *Per2*-Expression durch CRY1 wäre ein weiterer stabilisierender Rückkopplungsmechanismus der endogenen Circadianen Rhythmik. Neben den Rückkopplungen halten auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung und SUMOylierung der CCGs die Oszillation stabil. Sie beeinflussen nicht nur den Aktivierungszustand der CCGs, sondern auch ihre nucleocytoplasmatische Lokalisierung oder markieren sie zum Proteinabbau.<sup>181,182</sup> Besonders *Small ubiquitin-related modifiers* (SUMO) sind bekannt für ihre vielfältigen Auswirkungen auf die **Proteinlokalisierung**.<sup>183</sup>

### 1.3.3. Retinsäure-assoziierte Kernrezeptoren als Regulatoren der Circadianen Rhythmik und des Immunsystems

Die RORs und REV-ERBs gehören zur Familie der Kernrezeptoren. Diese Gruppe besteht aus etwa 50 bekannten Transkriptionsfaktoren, die bei Bindung eines Liganden die Konformation ändern, wodurch sie an die DNA binden und die Transkription von Genen regulieren können.<sup>184,185</sup> Es sollen nur die für diese Arbeit relevanten **Retinsäure-assoziierten nukleären Faktoren** besprochen werden, unter die hier die Retinoid-bindenden Faktoren RAR und ROR sowie der ROR-Antagonist REV-ERB fallen.

**Tabelle 1-1:** Übersicht über Retinsäure-assoziierte Kernrezeptoren und ihre Interaktionen.

KURZNAME	BEDEUTUNG	INTERAGIERT MIT
ATRA	all-trans-Retinsäure, Tretinoin, Vitamin-A-Säure	RAR, ROR
RAR	Retinsäurerezeptor (NR1B)	Retinoide (z.B. ATRA)
RXR	Retinoid-X-Rezeptor (NR2B)	RAR
ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i> , NR1F	Cholesterin, Retinoide, Melatonin
REV-ERB	<i>Reverse orientation c-erbA</i> , NR1D	Häme
RARE	RAR-bindendes Element	RAR+RXR
RORE	ROR-bindendes Element	ROR, REV-ERB

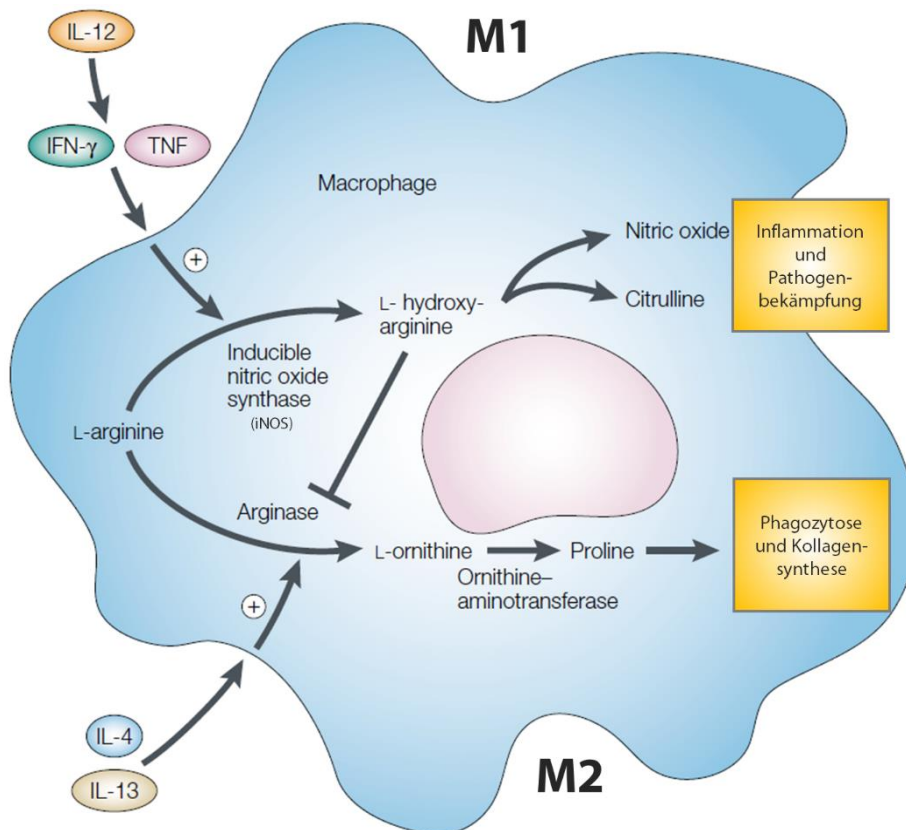
Die Expression der CCGs wird von Melatonin kontrolliert, aber auch andere Liganden der Retinsäure-assoziierten Faktoren wie ATRA spielen eine Rolle in der Regulation der Circadianen Rhythmik.<sup>186</sup> Die klassischen Kernrezeptoren für Retinoide sind die RARs, die sich mit den RXRs zu Heterodimeren zusammenlagern und an das RARE in der DNA binden.<sup>187</sup> Gene, die dieses Element enthalten, sind u. a. Cytochrom CYP26A1, eine

Retinsäurehydroxylase,<sup>188,189</sup> und RAR $\beta$ ,<sup>190</sup> über das eine Regulationsschleife im Retinsäurestoffwechsel entsteht. Zudem beeinflusst ATRA u.a. über die Homöobox(HOX)-Gene die Zelldifferenzierung<sup>191</sup> und über RAR $\beta$  das Zellwachstum,<sup>192</sup> weshalb es auch in der Krebstherapie verwendet wird.<sup>193</sup> Gillespie *et al.* studierten die Promotorumgebung dieser Gene genauer und konnten zeigen, dass der *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2) gebunden ist und die umliegenden Histone an Lysinrest 27 trimethyliert sind, was zur Stilllegung der Transkription führt. Die Bindung von ATRA an das RAR-RXR-Heterodimer führt zur Konformationsänderung: Der PRC2 löst sich und die Transkription startet.<sup>194</sup> Der PRC2 prägt allerdings nicht nur die RARE-Umgebung, seine enzymatisch aktive Untereinheit EZH2 monomethyliert auch ROR $\alpha$  und markiert es dadurch für den proteasomalen Abbau.<sup>195</sup> Die RORs haben ein breites Spektrum an Liganden und binden je nach Subtyp Cholesterin,<sup>196</sup> Retinoide<sup>197</sup> oder Melatonin.<sup>198,199</sup> Wie bereits beschrieben kompetieren sie mit REV-ERBs um die Bindung am RORE<sup>200</sup> und steuern dadurch die Circadiane Rhythmik über die Expression der CCGs BMAL1, REV-ERB $\alpha$  und CRY1<sup>140</sup> sowie die Immunantwort, den Lipid- und Steroidstoffwechsel und die Gewebeentwicklung.<sup>201,202</sup> ROR $\alpha$  interagiert dabei mit dem Koaktivator PGC-1 $\alpha$ , dessen Aktivierungsstatus über die Sirtuine SIRT1 und SIRT6 reguliert wird.<sup>203</sup> REV-ERB $\alpha$  und sein Homologon REV-ERB $\beta$ , die Gegenspieler der ROR-Faktoren, binden Häme als Liganden und das RORE mit der DNA-Bindestelle.<sup>204,205</sup> Sie sind nicht nur wichtige Regulatoren der Circadianen Rhythmik, sondern sie beeinflussen auch den Lipidstoffwechsel in der Leber: das Fehlen von REV-ERBs in der Mausleber führt zu einer *Hepatosteatosis*.<sup>9,206</sup>

Die nukleären Rezeptoren ROR $\alpha$  und REV-ERB $\alpha$  sind zusätzlich zu ihrer Funktion in der Stabilisierung der zellulären Uhr wichtige **Transkriptionsfaktoren in Immunzellen**. Die Tageszeitabhängigkeit der Leukozytenkonzentration im Blut war schon früh ins Auge gefallen, die molekularen Bindeglieder von Circadianer Rhythmik und Immunantwort waren jedoch zunächst nicht bekannt.<sup>207,208</sup> Die beobachteten Veränderungen in Phagozytose, Migration und Expression von Adhäsionsmolekülen sowie Cytokinsekretion und Pathogenbekämpfung in Mäusen mit Defizienzen in einem oder mehreren der CCGs zu unterschiedlichen Zeitgeber-Zeiten zeigten in allen Fällen den hohen Einfluss der Circadianen Rhythmik auf die Immunantwort.<sup>209,210</sup> Zwei Subtypen der ROR-Familie,

ROR $\alpha$  und ROR $\gamma$ t, konnten als entscheidende Transkriptionsfaktoren in der **Differenzierung von Interleukin-17 produzierenden Zellen** identifiziert werden.<sup>211-213</sup> Dieses Cytokin wurde zunächst im Überstand einer CD4<sup>+</sup>-T-Zelllinie gefunden, deren Zellen daraufhin als T<sub>h</sub>17-Zellen bezeichnet wurden. Sie sekretieren neben IL-17, das zu den proinflammatorischen Cytokinen gehört und womöglich eine Rolle in der Gewebereparatur und der Entstehung von Autoimmunkrankheiten spielt, IL-21, -22 und -23.<sup>214-216</sup> Es gibt allerdings auch Immunzellen der angeborenen Immunantwort, die IL-17 sekretieren, u.a.  $\gamma\delta$ -T-Zellen und invariante Natürliche Killerzellen.<sup>217</sup> IL-17 rekrutiert und aktiviert neutrophile Granulozyten in das befallene Gewebe,<sup>218,219</sup> die bei Degranulierung antimikrobielle Defensine, (Metallo-)Proteasen und *reactive oxygen species* (ROS) ausschütten und als Phagozyten Pathogene aufnehmen.<sup>220</sup> Die T<sub>h</sub>17-Zellen entwickeln sich aus der T-Vorläuferzelle unter Einfluss von Tumorstromafaktor TGF- $\beta$ , IL-6 und IL-23. Hilfreich sind zudem proliferationsstimulierende Faktoren wie anti-CD3, anti-CD28 und IL-2, während das Interferon IFN- $\gamma$  und IL-4 die Differenzierung hin zu T<sub>h</sub>1 oder T<sub>h</sub>2-Zellen verschieben.<sup>221,222</sup> Interessanterweise erhöht auch REV-ERBa die Differenzierung zu T<sub>h</sub>17-Zellen, indem es die Expression von *Nuclear factor interleukin 3 regulated* (NFIL3) reprimiert, das wiederum die ROR $\gamma$ t-Expression vermindert.<sup>223</sup> Es reguliert auch die Expression von Cytokinen in Makrophagen, wie z.B. IL-12p40,<sup>224</sup> IL-10<sup>225</sup> und CCL2.<sup>226</sup> Allen voran beeinflusst REV-ERBa in diesen Zellen die Expression von IL-6,<sup>224</sup> das — wie bereits erwähnt — für die T<sub>h</sub>17-Differenzierung benötigt wird. Makrophagen sind F4/80-positive phagozytierende Zellen, die wie Neutrophile zu den myeloiden Zellen der angeborenen Immunantwort gehören und die Pathogene und Zelltrümmer aufnehmen und abbauen. Sie sekretieren Chemokine und Cytokine, die andere Immunzellen anlocken und das Mikromilieu am Entzündungsherd beeinflussen.<sup>227</sup> Es gibt zwei Subtypen von Makrophagen, die durch eine sogenannte Polarisierung entstehen. Die Expression von proinflammatorischen Cytokinen wie IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-12 ist von M1-Makrophagen bekannt, der **Polarisierung der Makrophagen**, die v. a. unter Einfluss von IFN- $\gamma$  erfolgt. Bei IL-12 sollte berücksichtigt werden, dass nur das Heterodimer IL-12p70 aus den Untereinheiten IL-12p40 und IL-12p35 proinflammatorisch ist, während das Homodimer aus zwei IL-12p40-Einheiten antagonistisch wirkt.<sup>228,229</sup> M1-Makrophagen sekretieren auch ROS, fördern die T<sub>h</sub>1-Differenzierung und wirken somit antimikrobiell und tumorizid. Auch Lipopolysaccharid (LPS) kann eine M1-Polarisierung auslösen, allerdings sollte



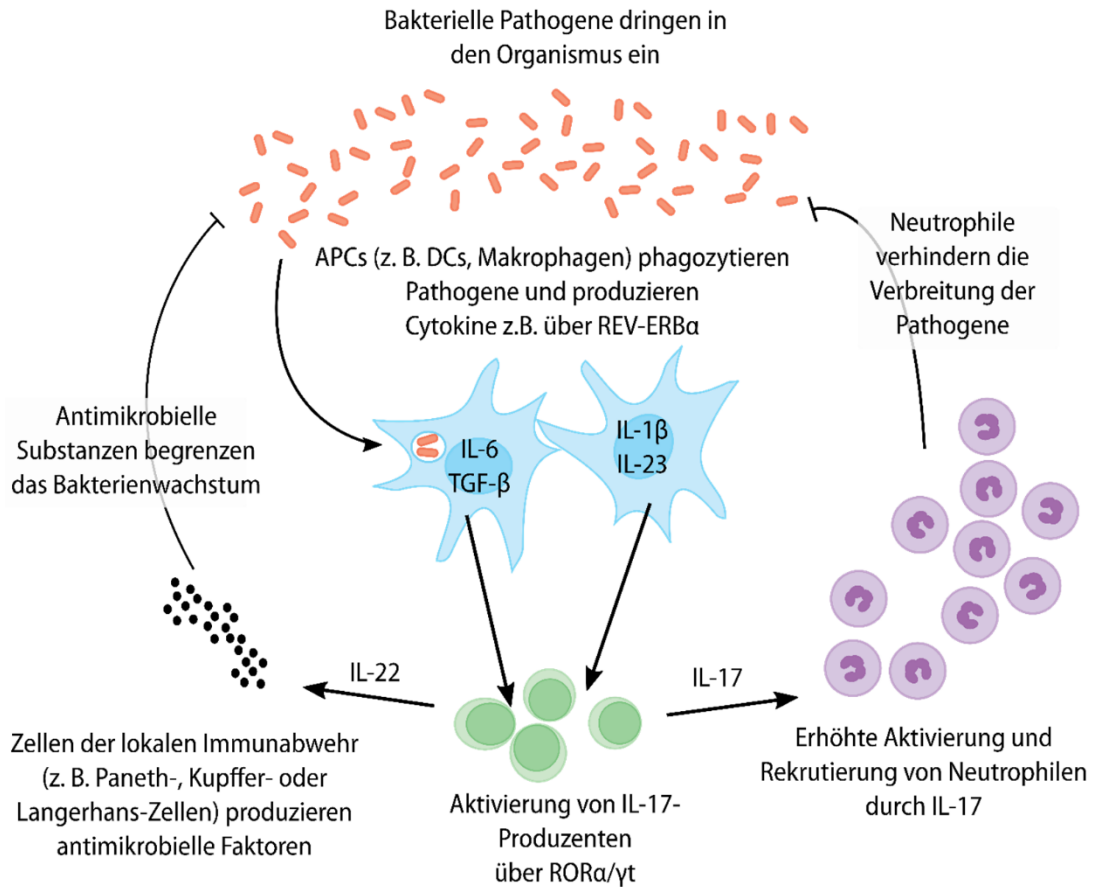


**Abb. 1-4: Polarisierung von Makrophagen in M1 und M2 über L-Arginin.**

Die Stimulation von Makrophagen mit IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und/oder LPS, das an die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) bindet, erhöht die Umsetzung von L-Arginin zu Stickstoffmonoxid und Citrullin durch die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase iNOS. Dies führt zu einer verstärkten Entzündung und einer Bekämpfung von Pathogenen mit reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS). Die Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen lockt zudem  $T_H1$ -Zellen an und die Makrophagenpopulation wurde daher mit M1 benannt. Die Interleukine IL-13 und IL-4 verstärken die Umsetzung von L-Arginin zu L-Ornithin durch das Enzym Arginase. Ornithin wird zu Prolin und Polyaminen und diese zur Phagozytose und Kollagensynthese verwendet. Diese Makrophagenpopulation wird M2 genannt und ist involviert in die Gewebereparatur.

Mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. verändert nach: *The immunobiology of schistosomiasis.*, Pearce und MacDonald, Nature reviews. Immunology, 2002.

berücksichtigt werden, dass es eine starke und oft eher unselektive Immunantwort induziert. Der M1-Polarisierung gegenüber steht der M2-Subtyp, der verstärkt phagozytiert, in Wundheilung und Gewebeumbau involviert ist und oft als immunregulatorisch bezeichnet wird. Er entsteht im IL-4- und IL-13-Milieu.<sup>230-232</sup> Ein wesentlicher Unterschied zwischen M1- und M2-Makrophagen betrifft den L-Arginin-Stoffwechsel: In M1-Makrophagen ist die *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) aktiv und



**Abb. 1-5: ROR/REV-ERB-abhängiger Abwehrmechanismus der angeborenen Immunantwort.**

Für die Immunabwehr an den Epithelien, den Grenzflächen vom Körper zur Umwelt, sind die Zellen der angeborenen Immunität besonders wichtig. Lokale immunreaktive Zellen wie Paneth-, Kupffer- oder Langerhanszellen produzieren anti-mikrobielle Faktoren, um das Bakterienwachstum einzudämmen. Antigenpräsentierende Zellen wie Dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen produzieren Cytokine, u.a. Interleukin-6, dessen Expression von REV-ERBa reguliert wird. Diese aktivieren T-Zellen zur Sekretion von IL-17, das wiederum Neutrophile anlockt und aktiviert. Makrophagen und Neutrophile bekämpfen die Pathogene mit Defensinen, Proteasen und reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) und phagozytieren sie.

Mit Genehmigung von Elsevier verändert nach: *Innate IL-17 and IL-22 responses to enteric bacterial pathogens*, Rubino et al., Trends in Immunology, 2012.

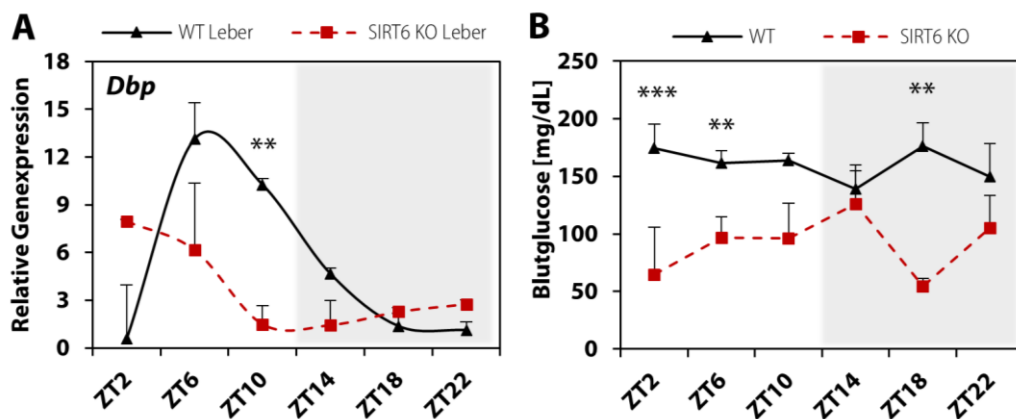
hydroxyliert L-Arginin, was in der Entstehung von Stickstoffmonoxid, einem der ROS, und Citrullin resultiert. In M2-Makrophagen spaltet die Arginase L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff. Ornithin wird weiter zu Prolin oder Polyaminen verstoffwechselt, die wiederum für die Zellproliferation und Kollagensynthese genutzt werden (vgl. Abb. 1-4).<sup>233,234</sup> In Abbildung 1-5 ist zusammenfassend das Zusammenspiel von Makrophagen, IL-17-

produzierenden T-Zellen und Neutrophilen gezeigt: Die lokale Immunabwehr ist der erste Verteidigungsposten gegen eindringende Pathogene. Immunaktive Zellen wie z.B. Kupffer-Zellen in der Leber,<sup>235</sup> Langerhans-Zellen in der Haut<sup>236</sup> oder Paneth-Zellen im Dünndarm,<sup>237</sup> die konstant in dem entsprechenden Gewebe vorkommen und nicht erst bei einer Entzündungsreaktion infiltrieren, produzieren gleich zu Beginn der Entzündungsreaktion antimikrobielle Faktoren, die das Bakterienwachstum eindämmen. Antigenpräsentierende Dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen wandern ins Gewebe ein und sekretieren proinflammatorische Cytokine wie IL-6, IL-23 und TGF- $\beta$ , die T-Zellen zur Produktion von IL-17 und IL-22 veranlassen. Durch diese werden wiederum Neutrophile angelockt und aktiviert, die über die Ausschüttung ihrer Granulae, dem *oxidative respiratory burst*, Pathogene abtöten, deren Überreste dann von den Makrophagen "gefressen" werden.<sup>238</sup> Ein Einfluss von SIRT6 auf die angeborene Immunantwort und besonders auf die beschriebene erste lokale Verteidigungslinie, im Englischen oft mit *host defense* bezeichnet, wurde noch nicht im Detail untersucht, obwohl die SIRT6-defizienten Mäuse deutliche Entzündungsreaktionen in Darm und Leber aufweisen.



## 2. Zielsetzung und Modellsysteme

Der degenerative Phänotyp in Mäusen, denen SIRT6 fehlt, lässt auf eine wichtige Funktion des Proteins im Organismus schließen. Die Suche nach Substraten, Interaktionspartnern und SIRT6-abhängigen Signalwegen könnte neue Erkenntnisse über die Funktion und Wirkungsweise von SIRT6 ans Licht bringen und Therapieansätze für SIRT6-assoziierte Krankheiten ermöglichen. Kerstin Selak zeigte im Rahmen ihrer Doktorarbeit Ergebnisse eines Microarrays von wildtypischen und SIRT6-defizienten primären murinen Hepatozyten, die einen Einfluss von SIRT6 auf die Circadiane Rhythmik vermuten ließen.<sup>239</sup> Dieser Befund konnte in meiner Diplomarbeit bestätigt werden: Das Fehlen von SIRT6 führte zu einer veränderten Expression mancher *Core Clock Genes*, die auch einen Einfluss auf die tageszeitabhängige Oszillation des metabolischen Faktors DBP, der u. a. die



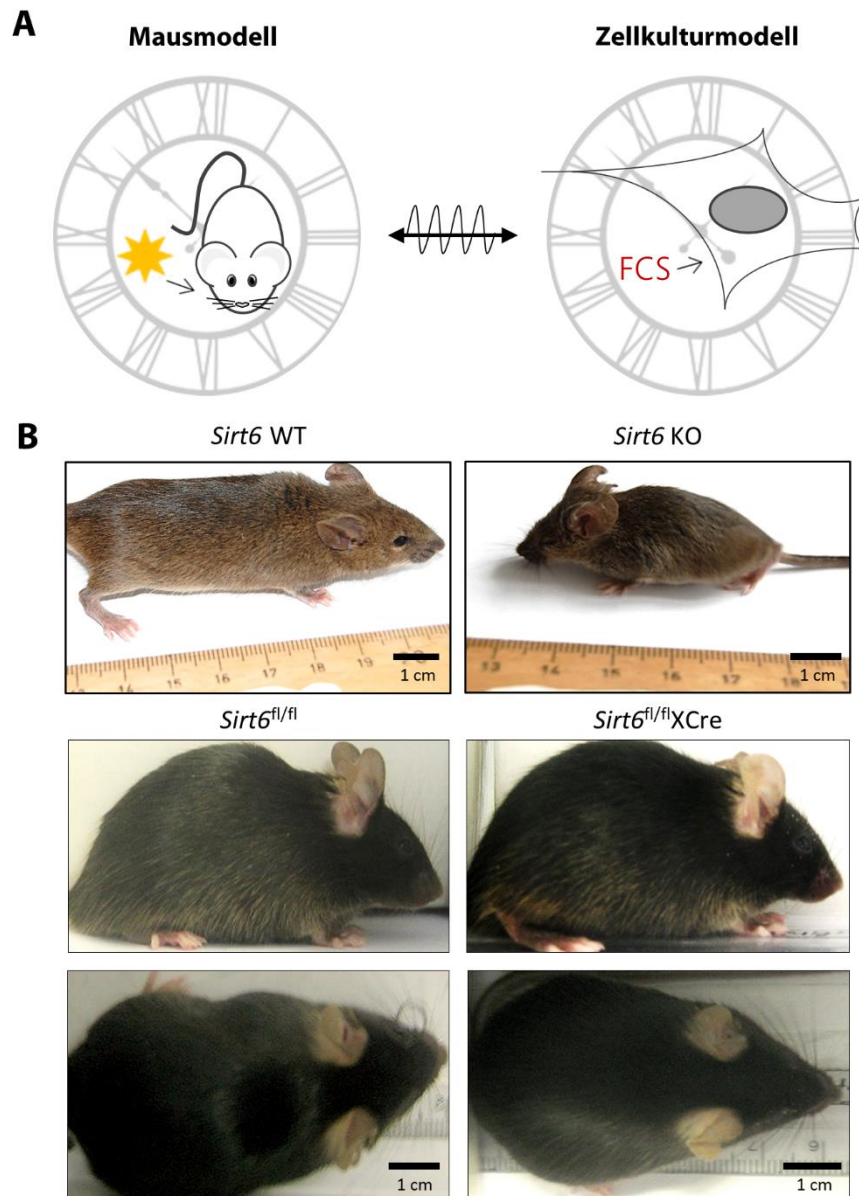
**Abb. 2-1: SIRT6 beeinflusst die Circadiane Rhythmik des Metabolismus.**

(A) Die Genexpression von *Dbp*, einem circadianen Stoffwechselregulator, war in der Leber von SIRT6-defizienten Mäusen verändert. Sie wurde in der Diplomarbeit mittels RT-PCR in Duplikaten untersucht und mit der Formel  $2^{-\Delta C_t}$  im Verhältnis zu *Rpl1* ausgewertet. Gezeigt ist die Darstellung der Mittelwerte (N=3) mit dem Standardfehler, \* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\* $p \leq 0,001$  nach Student. (B) Die Konzentration von Glucose im Blut war in den SIRT6-defizienten Mäusen nicht nur prinzipiell geringer, sondern zeigte auch eine circadiane Oszillation. Der tageszeitabhängige Verlauf scheint in den SIRT6-defizienten Mäusen invers zu den wildtypischen Werten zu sein. Gezeigt sind die Mittelwerte von  $N \geq 3$  Mäusen (außer WT ZT6: N=2) mit ihren Standardabweichungen.

Insulinsekretion reguliert, und der Blutglucose hatte (Abb. 2-1). Solche Störungen der Circadianen Rhythmik können zur Entstehung von Krebs und des metabolischen Syndroms beitragen, wie die Literatur zu epidemiologischen Studien an Schichtarbeitern und Flugpersonal belegt.

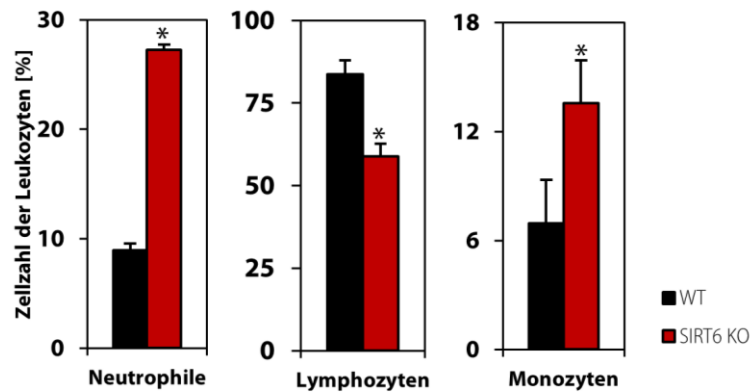
Ziel dieser Arbeit ist es daher die Verbindung von SIRT6, der Circadianen Rhythmik und dem pathologischen Phänotyp in der Leber der SIRT6 KO-Mäuse genauer zu studieren. Dazu sollte zunächst die Chronodisruption bestätigt werden und die epigenetische Genexpressionsregulation der CCGs durch SIRT6 in der Chromatin-Immünpräzipitation eruiert werden. Außerdem sollte die Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotorregionen der CCGs und ihr Aktivierungsstatus überprüft werden. So sollten z. B. die Expression, die posttranslationalen Modifikationen und die Konkurrenz von REV-ERBa und RORa am RORE studiert werden. Des Weiteren sollte der äußere Einfluss von Komponenten aus Nahrung und Hormonsystem wie z.B. NAD<sup>+</sup>, Retinsäure, Fettsäuren, Melatonin und Insulin auf die SIRT6-abhängige Rhythmik getestet werden. Da die CCGs zahlreiche zelluläre Prozesse regulieren, sind die Auswirkungen der Chronodisruption vielfältig. Es wurden zwei Bereiche gewählt, um mögliche Folgen einer SIRT6-basierten Chronodisruption zu untersuchen. Einerseits sollten die Veränderungen im angeborenen Immunsystem von SIRT6 KO-Mäusen, die auf der alterierenden RORa- und REV-ERBa-Expression gründen könnten, näher beleuchtet werden. Einen Ansatzpunkt dafür liefern die in der Diplomarbeit gewonnenen Ergebnisse, die eine Neutrophilie, eine Lymphopenie und eine Monozytose im Blut der SIRT6 KO-Mäuse zeigten (Abb. 2-3). Andererseits sollte die frühzeitige Alterung der SIRT6-defizienten Mäuse im Zusammenhang mit der Expression und Lokalisation von PER2 und CRY1 betrachtet werden.

Als Modellorgan wurde die Leber gewählt, da sie ein zentrales Organ des Stoffwechsels ist, aber auch Zellen des angeborenen Immunsystems enthält, die an den Abwehrreaktionen des Körpers gegen fremde Strukturen und Pathogene beteiligt sind. Es wurden drei verschiedene SIRT6-defiziente Mausmodelle verwendet (Abb. 2-2): 129-*Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup>-Mäuse, bei denen SIRT6 im ganzen Organismus fehlt, und zwei konditionale Mausstämme (B6-*Sirt6*<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup>), bei denen SIRT6 nur in bestimmten Zelltypen über das Cre-loxP-System deletiert ist. Desweiteren wurden die Hepatom- bzw. Hepatoblastomzellen HepG2, Hep3B und Hep55.1c genutzt.



**Abb. 2-2: Circadiane Studien in SIRT6 KO-Mausmodellen und Hepatomzellen.**

(A) Im circadianen Mausmodell wurde Licht als Zeitgeber verwendet: Die Mäuse waren stets zwischen 6 Uhr und 18 Uhr Licht ausgesetzt. Im Zellkulturmodell wurde ein Serumschock mit 50% FCS zur Synchronisation der Hepatozyten angewendet. (B) Als Mausmodelle dienten Mäuse mit systemischem SIRT6 KO (129-*Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup>) und Mäuse mit konditionalem, zelltypspezifischen KO (B6-*Sirt6*<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup>), z.B. in Makrophagen (LysMCre) oder Hepatozyten (AlbCre). Die komplett SIRT6-defizienten Mäuse zeigten den stark degenerativen Phänotyp, die konditionalen SIRT6 KO-Mäuse wiesen keine makroskopischen Unterschiede zu den Kontrollmäusen auf. Zudem wurden die primären murinen Hepatozyten der 129-*Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup>-Mäuse verwendet. Für die immunologischen Versuche wurden Knochenmarks- und Milzzellen aus diversen Mausmodellen isoliert.



**Abb. 2-3: Neutrophilie, Lymphopenie und Monzytose im Blut von SIRT6-defizienten Mäusen.**

Im Blut der SIRT6 KO-Mäuse waren signifikant weniger Lymphozyten, aber mehr Neutrophile und Monozyten als im Blut der wildtypischen Mäuse zu finden. Im Rahmen der Diplomarbeit wurde Blut jeweils dreier Mäuse je Genotyp und Geschlecht (N=3) im automatisierten Blutbildmessgerät Hemavet gemessen. Es ist der Mittelwert über drei Mäuse als prozentualer Anteil des jeweiligen Zelltyps an den Gesamtleukozyten mit seiner Standardabweichung dargestellt.

Den Mäusen mit systemischen SIRT6-Knockout wurde die Leber entnommen oder perfundiert. Die Leber von Mäusen mit einem Leber-spezifischen SIRT6-Knockout — hier liegt die Cre-Rekombinase unter dem Albuminpromotor — wurde zur Untersuchung einer altersabhängigen CCG-Expression verwendet. In diesen Modellen wurde eine stabile Circadiane Rhythmik durch den Zeitgeber Licht (von 6 Uhr bis 18 Uhr) gewährleistet. In der Zellkultur, d. h. bei primären Hepatozyten oder Hepatom-/Hepatoblastomzellen, wurde zur Synchronisierung auf einen Serumschock mit 50% FCS zurückgegriffen. Die mit Serumschock synchronisierten Zellkulturen zeigen zwar keine Tageszeitabhängigkeit mehr und sind nicht direkt mit den Leberproben aus der Maus zu vergleichen, ihre Generierung ermöglichte es aber, die Zellen zu behandeln und *in vitro*-Methoden wie z. B. den Proximitäts-Ligations-Assay durchzuführen. Weiterhin wurden Mäuse mit einem konditionalem SIRT6-Knockout in myeloiden Zellen verwendet, bei denen die Cre-Rekombinase unter dem LysM-Promotor liegt. Aus diesen Mäusen wurde Blut gewonnen sowie Knochenmarkszellen und Milzzellen isoliert. Diese Mäuse wurden nicht zu einer bestimmten Zeitgeber-Zeit präpariert, aber Mutante und Kontrolle möglichst zeitnah; die primären Zellkulturen wurden zeitgleich mit LPS oder Cytokinen stimuliert.

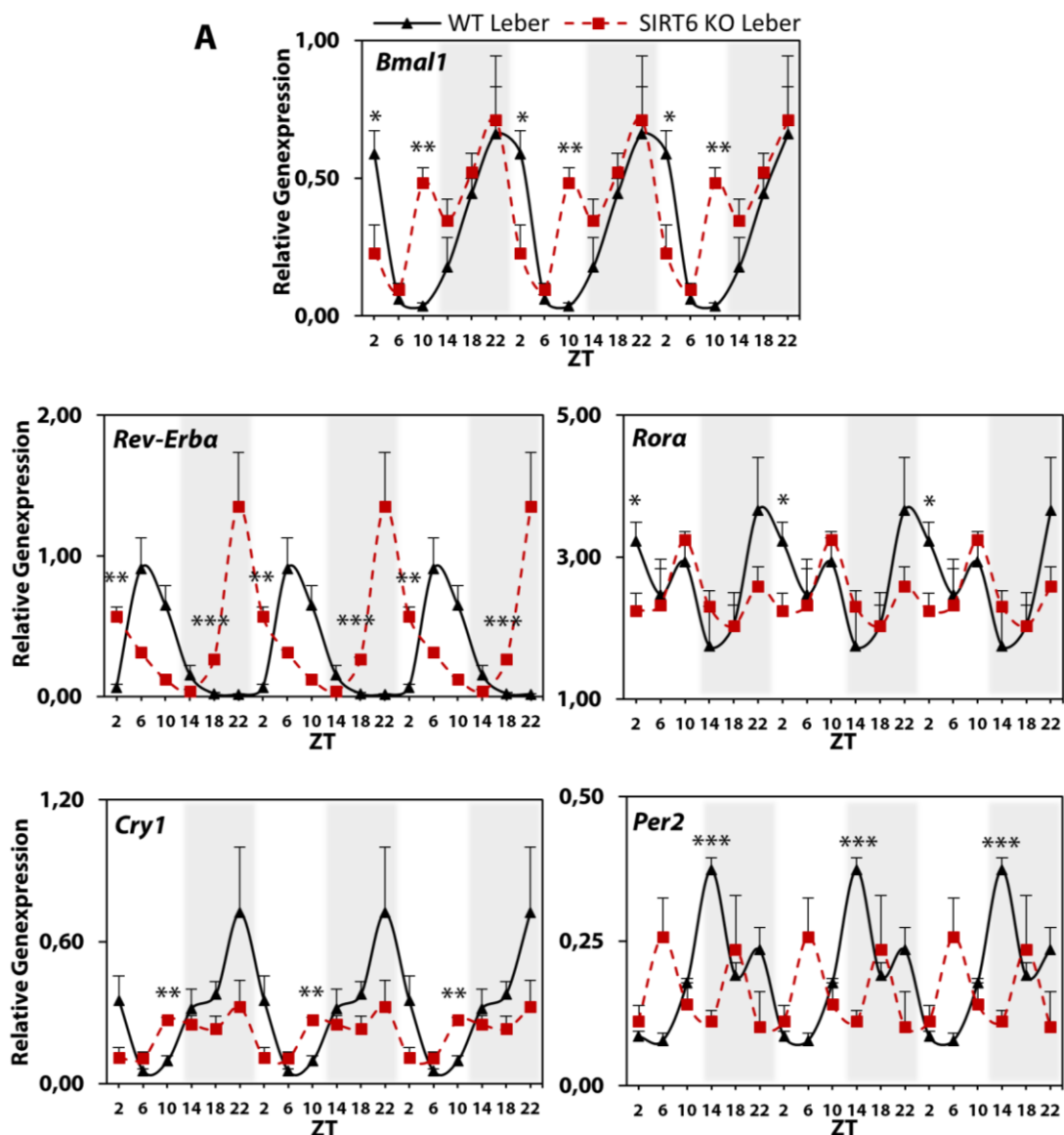


## 3. Ergebnisse

### 3.1. Epigenetische Regulation der Circadianen Rhythmik durch SIRT6

#### 3.1.1. SIRT6-Defizienz führt zur Chronodisruption

Der Einfluss von SIRT6 auf die Expression der circadianen Gene *Bmal1*, *Rev-Erba*, *Cry1* und *Per2* wurde bereits in der Diplomarbeit untersucht und beschrieben.<sup>240</sup> Es wurden Lebern aus dem Mausstamm 129-*Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup> zu den angegebenen Zeitgeber-Zeiten entnommen und die Genexpression mittels semi-quantitativer RT-PCR im Verhältnis zu *RPII* untersucht. Die Mäuse waren stets zwischen ZT0 (6 Uhr) und ZT12 (18 Uhr) dem Zeitgeber Licht ausgesetzt. Während der Doktorarbeit wurden die Erkenntnisse aus der Diplomarbeit um die Expression von *Rora* ergänzt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Daten aus der Diplomarbeit neu aufbereitet und sind zusammen mit *Rora* als konsekutive Darstellung gezeigt (**Abb. 3-1A**). Die Signifikanz der Daten wurde in dieser und allen weiteren relevanten Abbildungen über einen zweiseitigen, heteroskedastischen T-Test nach Student ermittelt. In den wildtypischen Mäusen hatte ***Bmal1*** ein Expressionsmaximum bei ZT22 je Periode. In der SIRT6-defizienten Leber gab es ebenso ein absolutes Maximum bei ZT22, aber auch ein zusätzliches relatives Maximum bei ZT10. Die Frequenz der oszillierenden Genexpression nahm also in den SIRT6 KO-Mäusen zu. ***Rev-Erba*** hatte im Wildtyp ein Maximum bei ZT6, in der SIRT6 KO-Maus hingegen eines bei ZT22. Die Frequenz und Wellenlänge blieben etwa gleich, aber es kam zu einer Phasenverschiebung von etwa 16 h. Die Expression in den KO-Mäusen war vergleichsweise höher. Während *Bmal1* und *Rev-Erba* im Wildtyp nur ein Maximum aufwiesen, gab es bei *Rora*, *Per2* und *Cry1* jeweils zwei Peaks. Die Expression von ***Rora*** in der wildtypischen Leber hatte ihr absolutes Maximum bei ZT22, ein relatives bei ZT10. Die SIRT6 KO-Leber wies dieselbe Phase und Frequenz auf, allerdings lag das Expressionsniveau bei ZT10 höher



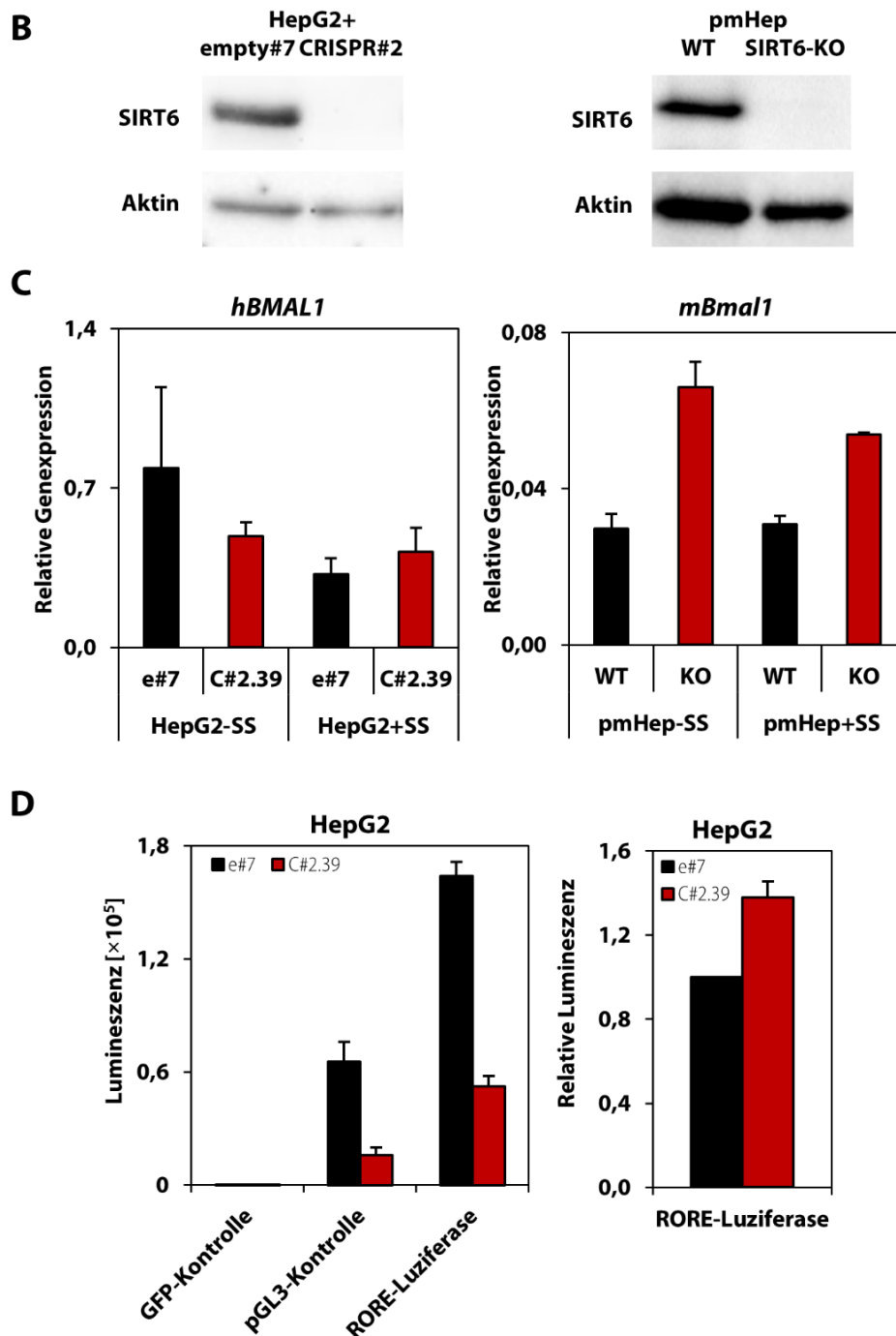
**Abb. 3-1 (A): Einfluss von SIRT6 auf die Genexpression der CCGs *Bmal1*, *Rev-Erba*, *Rora*, *Cry1* und *Per2*.**

(A) Signifikante Veränderung der Genexpression in der Leber von SIRT6-defizienten Mäusen im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern. Die Lebern wurden zu den angegebenen Zeitgeberzeiten entnommen (ZT0 entspricht 6 Uhr). Die Genexpression wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR in Duplikaten untersucht und mit der Formel  $2^{-\Delta Ct}$  im Verhältnis zu *RPII* ausgewertet. Gezeigt ist die konsekutive Darstellung der Mittelwerte (N=3, ZT2-22) mit dem Standardfehler; \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 nach Student. Außerhalb der Zeitgeberzeiten ZT14 bis ZT22 (grau hinterlegt) waren die Versuchstiere dem Zeitgeber Licht ausgesetzt. [Fortsetzung übernächste Seite]

als bei ZT22. Sowohl wildtypische als auch SIRT6-defiziente Mäuse wiesen ein absolutes Expressionsmaximum von *Cry1* zum Zeitpunkt ZT22 auf, die Expressionshöhe war allerdings in den SIRT6 KO-Mäusen geringer. Während die wildtypische Leber ein relatives Maximum bei ZT14 hatte, gab es in der SIRT6-defizienten Leber ein relatives Maximum bei ZT10, was in einer größeren Wellenlänge und einer leichten Phasenverschiebung im Vergleich zum Wildtyp resultierte. Die Expression von *Per2* zeigte im Wildtyp ein absolutes Maximum bei ZT14, ein relatives bei ZT22. In der SIRT6 KO-Leber wiesen die beiden Expressionsmaxima bei ZT6 und ZT18 eine ähnliche Expressionsstärke auf. Es kam — wie schon bei *Rev-Erba* — zu einer Phasenverschiebung von 16 h, die Wellenlänge blieb jedoch erhalten.

*Summa summarum* kann festgehalten werden, dass es in allen genannten Genen signifikante Veränderungen der Genexpression in der Leber von SIRT6-defizienten Mäusen im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern gab. Die gezeigten circadianen Gene verzeichneten in der wildtypischen Leber einen Anstieg der Expression in Abwesenheit des Zeitgebers Licht mit einem Expressionsmaximum bei ZT22 mit Ausnahme des transkriptionseinhibierenden *Rev-Erba*. Besonderes Interesse weckten *Bmal1*, dessen Expression eine Frequenzerhöhung durch ein zusätzliches Maximum bei SIRT6 KO aufwies, sowie *Rev-Erba* und *Per2*, die eine deutliche Phasenverschiebung bei SIRT6-Defizienz zeigten. Es soll daher im Weiteren vor allem auf *Rev-Erba* mit dem Antagonisten *Rora*, die die *Bmal1*-Expression regulieren, und *Per2* mit Interaktionspartner *Cry1*, die die Aktivität des BMAL-CLOCK-Komplexes beeinflussen, eingegangen werden.

Zur Etablierung eines Zellkulturmodells für die circadiane Genexpression wurden primäre murine Hepatozyten und die Klone der Hepatoblastomzelllinie HepG2 empty#7 (Kontrolle) und CRISPR#2.39 (SIRT6 KO) untersucht. Letztere wurden von Martin Ganas mittels CRISPR-Cas9 hergestellt. Die Zellen wurden mit einem Serumschock als Zeitgeber behandelt und zum Zeitpunkt ZT2 die *Bmal1*-Expression überprüft (**Abb. 3-1C**). Während in den primären Zellen mit und ohne Serumschock die *Bmal1*-Expression in den SIRT6-defizienten Zellen erhöht war, war die Expression in den HepG2-Zellen vor dem Serumschock im Kontrollklon höher, nach dem Serumschock allerdings im SIRT6 KO-Klon. Zudem wurde die Lumineszenz in den mit dem RORE(*Bmal*)-Luziferase-Konstrukt transfizierten HepG2-Zellen untersucht (**Abb. 3-1D**). Es zeigte sich, dass die absolute



**Abb. 3-1 (B-D): Einfluss von SIRT6 auf die Genexpression der CCGs *Bmal1*, *Rev-Erba*, *Rora*, *Cry1* und *Per2*.**

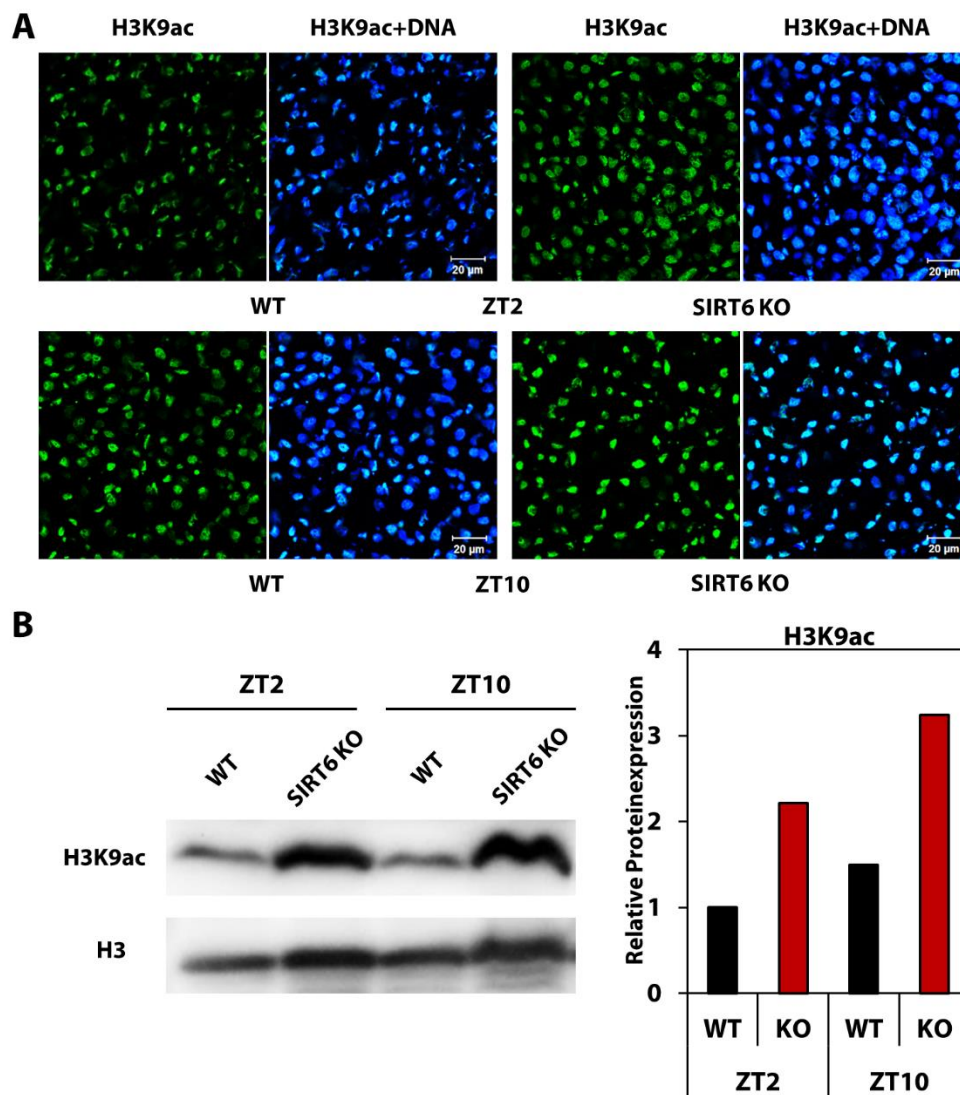
(B) Nachweis der SIRT6-Defizienz in dem HepG2-Klon CRISPR#2.39 und primären murinen Hepatozyten der SIRT6-defizienten Mäuse im Western Blot. Als Kontrolle dient der SIRT6-exprimierende HepG2-Klon empty#7 und wildtypische pmHep. Als Zeitgeber bei Zellen in Kultur wurde der Serumschock (SS) verwendet. (C) Die relative Genexpression von *BMAL1* zu *RPII* wurde zur Zeitgeber-Zeit ZT2 untersucht. Gezeigt sind der Mittelwert mit der Standardabweichung von einem aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten (N=3). (D) Das *RORE*-Luziferase-Reporterassay wurde mit dem HepG2-Klon e#7 und dem SIRT6-defizienten HepG2-Klon C#2.39 durchgeführt. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz diente die Fluoreszenzmessung von GFP-transfizierten Zellen, als Kontrolle der Lumineszenzmessung die Transfektion mit dem pGL3-Vektor. Die relative Lumineszenz wurde durch die Normierung auf den pGL3-Vektor und den Kontrollklon e#7 ermittelt. Das Experiment wurde in Duplikaten durchgeführt, gezeigt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichung.

Lumineszenz in den Kontrollzellen höher war. Wurde jedoch die Lumineszenz auf den Kontrollvektor pGL3 normiert, dessen Luziferasegen keinen RORE-Promotor vorgeschaltet hatte, lag die relative Lumineszenz in den SIRT6 KO-Zellen leicht höher und korrelierte mit der *BMAL1*-Expression in der RT-PCR. Es sollte berücksichtigt werden, dass bei einem Reporter-gen-Assay keine epigenetischen Einflüsse wie Acetylierung oder Methylierung an Histonen zum Tragen kommen. Da allerdings die Deacetylierung von Lysinrest 9 des Histons H3 (H3K9ac) eine der enzymatischen Reaktionen von SIRT6 ist, wurden die epigenetischen Einflüsse im Folgenden untersucht.

### 3.1.2. Epigenetische Veränderungen bei SIRT6-Defizienz

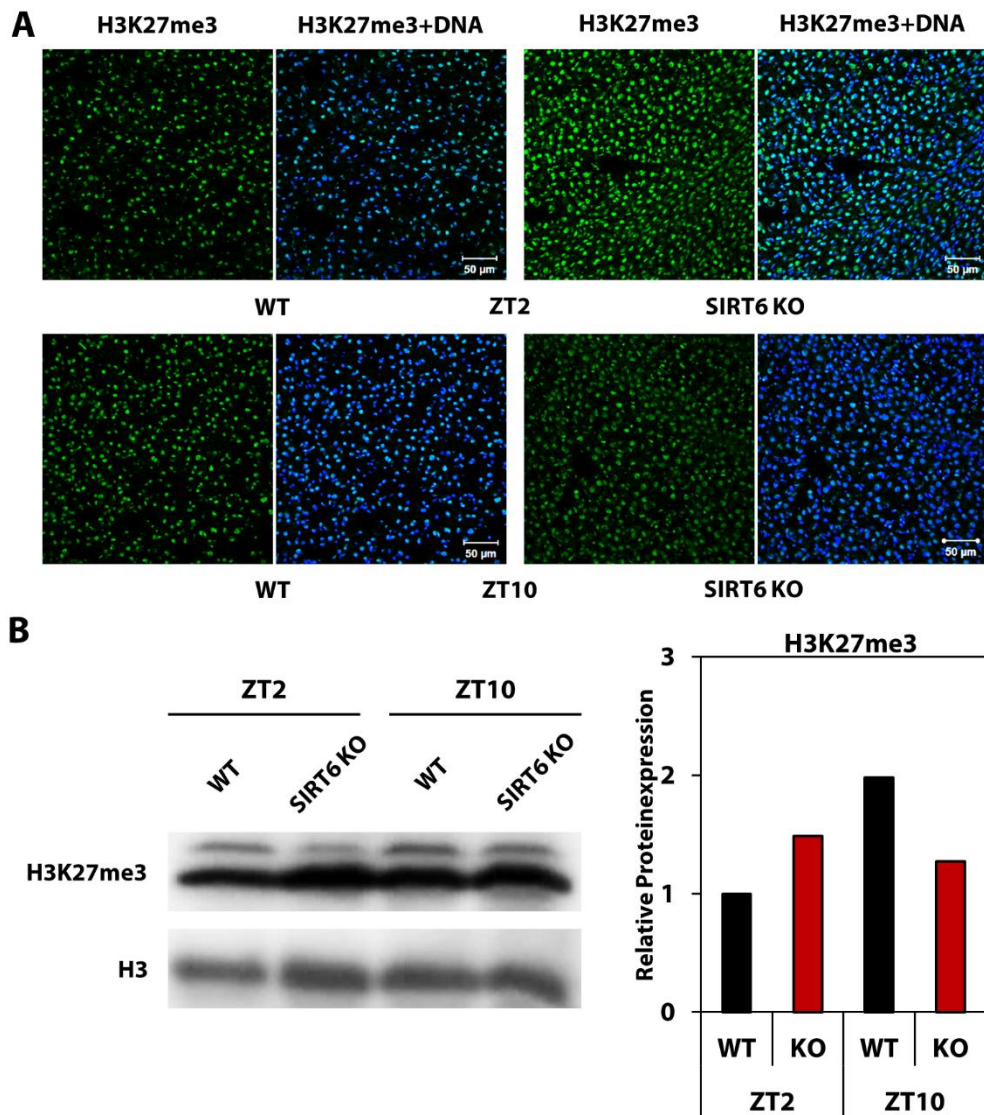
Zur Bestimmung der tageszeitabhängigen Acetylierung und Trimethylierung von Histon H3 in wildtypischen und SIRT6-defizienten Lebern wurden Gefrierschnitte angefertigt und mittels Immunfluoreszenzfärbung die genannten Histonmodifikationen detektiert (**Abb. 3-2+3A**). Zusätzlich wurde ein Gesamtleberlysate hergestellt und im Western Blot untersucht (**Abb. 3-2+3B**). Es wurden, entsprechend der signifikanten Änderungen der *Bmal1*-Expression in der Leber, die Zeitpunkte ZT2 und ZT10 ausgewählt. Bei dem SIRT6-Substrat H3K9ac gab es erwartungsgemäß einen Anstieg der Acetylierungsrate bei Fehlen von SIRT6. Außerdem war ein Anstieg der Acetylierung von ZT2 (8 Uhr) zu ZT10 (16 Uhr) zu beobachten. Die Unterschiede in der Trimethylierung von Lysinrest 27 des Histons H3 (H3K27me3) zwischen WT und SIRT6 KO waren nicht so deutlich zu erkennen, zeigten aber eine leichte Tendenz: Morgens (ZT2) war die Methylierungsrate in den SIRT6-defizienten Lebern höher, sank aber zum Abend (ZT10) hin ab, während die Rate im WT anstieg und abends über der der SIRT6 KO-Leber lag. Es wurden für die H3K27me3-Experimente ausschließlich männliche Mäuse verwendet, da die Histonmodifikation auch in der Stilllegung des X-Chromosoms in Weibchen eine Rolle spielt, die hier allerdings nicht untersucht werden sollte.

Neben dem „globalen“ Vorkommen der Histonmodifikationen wurden auch die Modifikationen der direkt an das ROR-Element (RORE) gebundenen Histone mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) untersucht (**Abb. 3-4A+B**). Die RORE der beiden CCGs *Bmal1* und *Rev-Erba* verhielten sich gleich, weshalb hier im Weiteren allgemein von RORE gesprochen wird. Die **H3K9-Acetylierung** stieg am RORE (**Abb. 3-4A**) deutlich von ZT2 nach ZT10 an, wie es auch schon im Western Blot aus Gesamtleberlysate zu erkennen



**Abb. 3-2: Acetylierung von Lysinrest 9 an Histon H3 in Abhängigkeit von SIRT6.**

(A) Immunfluoreszenzfärbung von H3K9ac in der Leber von wildtypischen und SIRT6-defizienten Mäusen. Es wurden Gefrierschnitte von jeweils drei Mäusen (N=3) erstellt und gefärbt, wobei immer eine wildtypische mit einer entsprechenden SIRT6-defizienten Leber auf einem Objektträger kombiniert wurde. Die Detektion der Farbstoffe AlexaFluor 488 und Hoechst 33342 erfolgte am LSM, als Kontrolle diente eine Färbung nur mit Zweitantikörper. (B) Das Acetylierungsmuster wurde zusätzlich im Western Blot aus lysiertem Lebergewebe untersucht und zeigte eine Abhängigkeit von der SIRT6-Expression. Die Proteinmenge wurde anhand der Chemilumineszenzreaktion quantifiziert (ChemiDoc-System und ImageLab-Software, Biorad). Gezeigt ist ein Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten (N=3). Die Proteinexpression wurde auf die wildtypische Leber zum Zeitpunkt ZT2 normiert, als Kontrolle diente Histon H3.

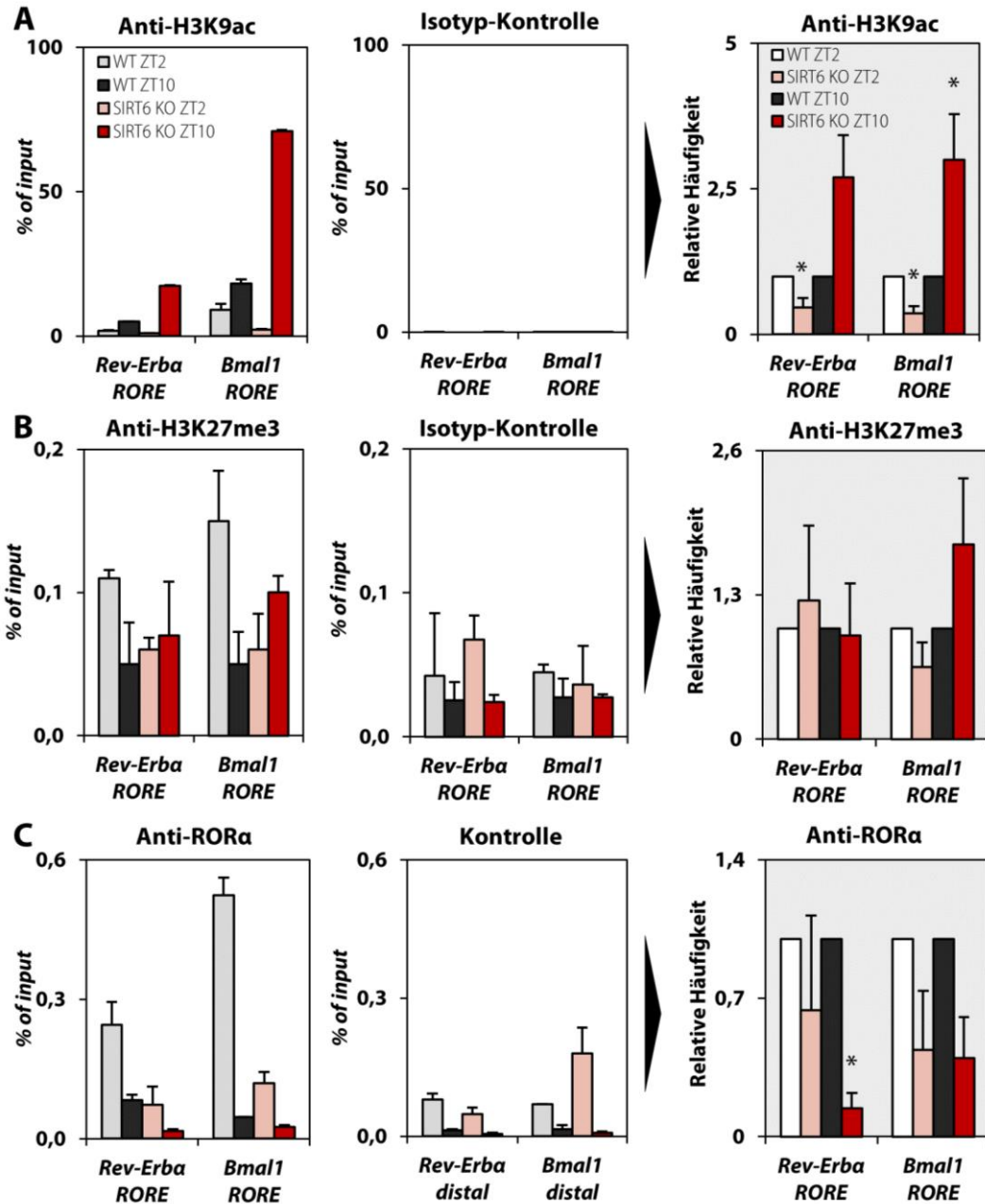


**Abb. 3-3: Trimethylierung von Lysinrest 27 an Histon H3 in Abhängigkeit von SIRT6.**

(A) Immunfluoreszenzfärbung von H3K27me3 in der Leber von wildtypischen und SIRT6-defizienten Mäusen. Es wurden Gefrierschnitte von jeweils drei Mäusen (N=3) erstellt und gefärbt, wobei immer eine wildtypische mit einer entsprechenden SIRT6-defizienten Leber auf einem Objektträger kombiniert wurde. Die Detektion der Farbstoffe AlexaFluor 488 und Hoechst 33342 erfolgte am LSM. (B) Das Trimethylierungsmuster wurde zusätzlich im Western Blot aus lysiertem Lebergewebe untersucht und zeigte eine leichte Abhängigkeit von Tageszeit und SIRT6-Expression. Die Proteinmenge wurde anhand der Chemilumineszenzreaktion quantifiziert (ChemiDoc-System und ImageLab-Software, Biorad). Gezeigt ist ein Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten (N=3), es wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Die Proteinexpression wurde auf die wildtypische Leber zum Zeitpunkt ZT2 normiert, als Kontrolle diente Histon H3.

war (**Abb. 3-2B**). Die drei unabhängigen ChIP-Experimente wurden auf den Wildtyp normiert und in der rechten Spalte der Abbildung 3-4 zusammengefasst. Im Verhältnis zum Wildtyp zeigte sich bei ZT2 überraschenderweise eine signifikante Reduktion der Acetylierung bei Fehlen der Deacetylase SIRT6. Während die Acetylierung am RORE bei ZT2 um mehr als die Hälfte absinkt, steigt sie in der SIRT6-defizienten Leber bei ZT10 auf das knapp dreifache des wildtypischen Wertes an. Die **H3K27-Trimethylierung** am RORE (**Abb. 3-4B**, linke Spalte) zeigte einen gegenläufigen Trend zur gesamten Trimethylierung von H3K27 (**Abb. 3-3B**): Im Wildtyp sank sie von ZT2 zu ZT10 ab, im SIRT6 KO stieg sie leicht an. Die Trimethylierung am RORE war in Relation zur Gesamtmenge recht gering und die Zusammenfassung dreier Experimente (rechte Spalte) ergab keine deutliche Änderung am *Rev-Erb $\alpha$* -RORE. Für das *Bmal1*-RORE zeigte die Chromatin-Immunpräzipitation eine leichte Verringerung bei ZT2 bzw. Erhöhung bei ZT10. Da über die Acetylierung und Methylierung von Histonen auch die transkriptionelle Aktivität gesteuert werden kann, wurde die Bindung der Transkriptionsfaktoren, die für den *Bmal1*-Promotor bekannt sind, nämlich *ROR $\alpha$*  als aktivierender und *REV-ERB $\alpha$*  als reprimierender Faktor, analysiert. Da die ChIP-Experimente mit *REV-ERB $\alpha$*  keine Ergebnisse lieferten, kann zur Promotorbindung von *REV-ERB $\alpha$*  keine Aussage getroffen werden. Für *ROR $\alpha$*  ergab sich unabhängig von der Tageszeit eine verminderte Bindung am RORE in der SIRT6-defizienten Leber (**Abb. 3-4C**). Da dies auf den ersten Blick in Widerspruch zu der erhöhten Acetylierung steht, die eigentlich die Transkription erleichtern sollte, wurde *ROR $\alpha$*  genauer studiert. Zur Überprüfung der Expression im Zellkulturmodell wurde die Expression von *ROR $\alpha$*  und *REV-ERB $\alpha$*  in den HepG2-Klonen e#7 und C#2.39 zum Zeitpunkt ZT2 nach dem Serumschock mit einer RT-PCR untersucht. Ebenso wurde die Proteinproduktion der beiden Faktoren in murinen Hepatozyten und in HepG2-Klonen mittels Western Blot überprüft. Die Genexpression lag für beide Faktoren bereits vor dem Serumschock in dem SIRT6 KO-Klon höher. Der Serumschock verstärkte die Genexpression von *ROR $\alpha$*  und *REV-ERB $\alpha$*  und forcierte die erhöhte Expression bei Fehlen von SIRT6 (**Abb. 3-5A**). Im Western Blot von *ROR $\alpha$*  zeigte sich eine Zunahme der Proteinmenge in SIRT6-defizienten Zellen unter Berücksichtigung der Aktin-Kontrolle (**Abb. 3-5B**). Das murine Protein wurde in primären Hepatozyten bei 55 kDa detektiert, das humane konnte in den HepG2-Zellen nicht nachgewiesen werden. Es wurde bei etwa 70 kDa erwartet. *REV-ERB $\alpha$*  konnte sowohl in murinen Proben bei 55kDa als auch in der

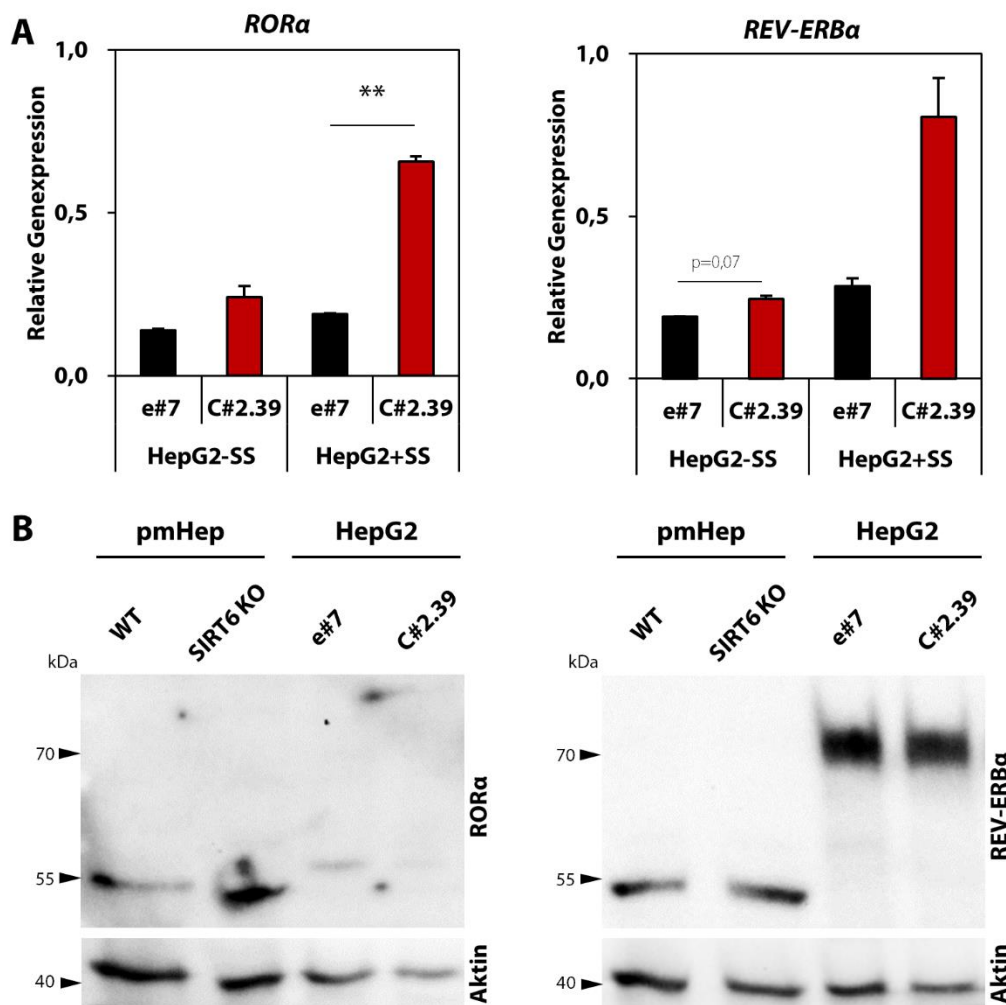




**Abb. 3-4: Histone modifikationen und Bindung des Transkriptionsfaktors RORa in der RORE-Promotorregion der CCGs *Bmal1* und *Rev-Erba* bei SIRT6-Defizienz.**

Mittels Chromatin-Immunpräzipitation wurde die Acetylierung (A) und Trimethylierung (B) des Histons H3 und die Bindung des Transkriptionsfaktors RORa (C) in der direkten Promotorumgebung der CCGs *Bmal1* und *Rev-Erba*, die beide ein RORE enthalten, untersucht. In der linken Spalte ist jeweils ein repräsentatives Experiment zu sehen (N=3 für Histone modifikationen, N=2 für RORa). Es zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung der präzipitierten Proteinmenge in Relation zur eingesetzten Gesamtproteinmenge (Input) in Prozent. In der mittleren Spalte ist die Kontrolle zu sehen—im Falle der Histone modifikationen eine IgG-Isotyp-Kontrolle, bei RORa wurde als Kontrolle ein distaler DNA-Abschnitt untersucht, der kein RORE enthält. In der rechten Spalte sind alle drei Experimente zusammengefasst und jeweils auf den wildtypischen Wert normiert (\*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 nach Student).

humanen Hepatoblastomzelllinie bei 70kDa detektiert werden. Im Vergleich zur Aktin-Kontrolle war seine Expression bei Fehlen von SIRT6 um das 1,5-fache erhöht.

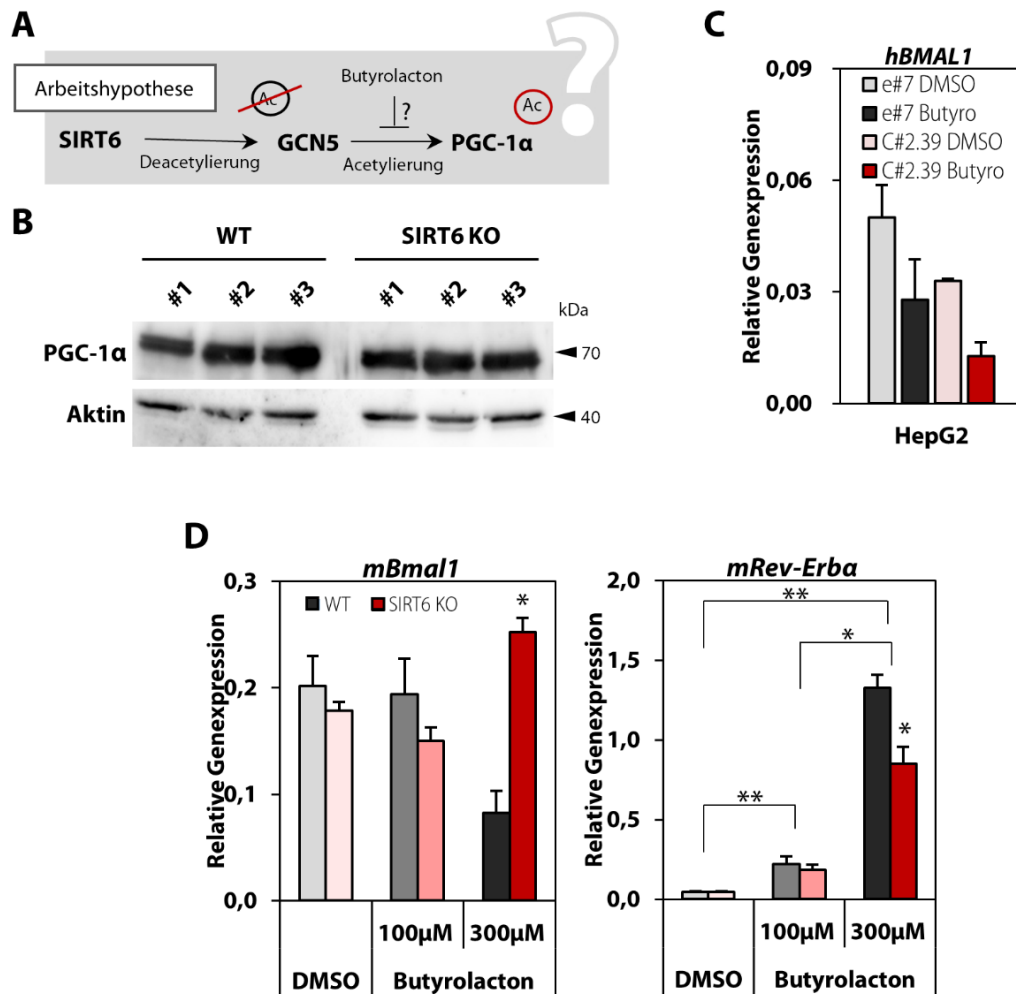


**Abb. 3-5: Expression von RORα und REV-ERBa in SIRT6 KO-Hepatoblastomzellen.**

(A) Analyse der Genexpression von RORα und REV-ERBa mittels RT-PCR im SIRT6 KO-Klon C#2.39 im Vergleich zum wildtypischen Klon e#7. Gezeigt ist der Mittelwert der PCR-Duplikate im Verhältnis zu RPII mit der Standardabweichung von einem aus drei unabhängigen Experimenten (N=3), \*p≤0,05 \*\*p≤0,01 \*\*\*p≤0,001 nach Student. (B) Zusätzlich wurde die Proteinexpression im Western Blot untersucht: Für humane Proben wurde ein Signal bei 70kDa erwartet, murine Proben ergaben ein Signal bei 55kDa. Bei RORα war in humanen Proben keine Detektion des Proteins möglich. Der Western Blot wurde mit Gesamtzelllysat durchgeführt, als Kontrolle wurde Aktin detektiert.

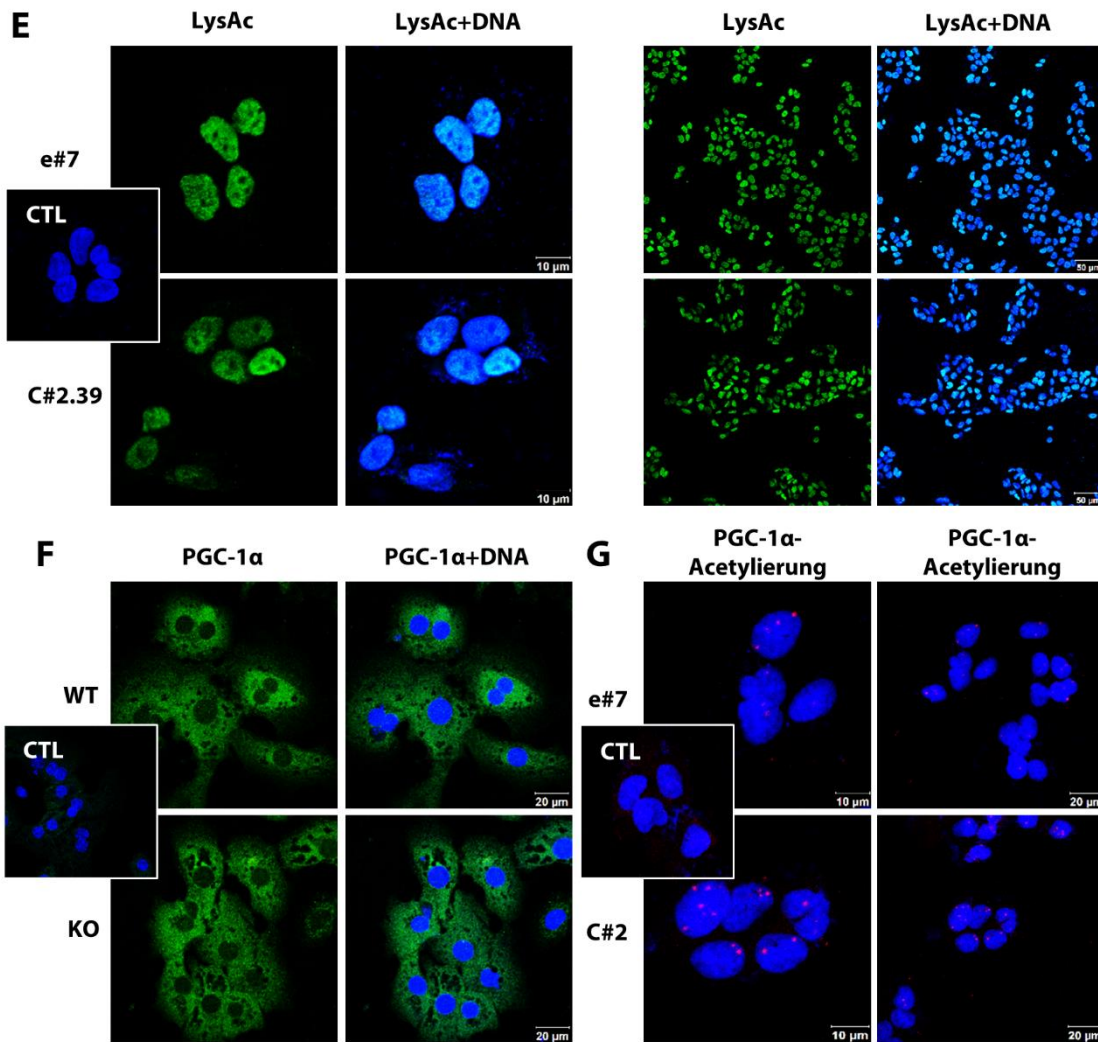
### 3.1.3. Posttranslationale Modifikationen von ROR $\alpha$ und PGC-1 $\alpha$

Weiterhin sollte der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen an ROR $\alpha$  und dessen Co-Aktivatoren PGC-1 $\alpha$  untersucht werden. Dazu wurden zwei Hypothesen geprüft: Zum einen die Deacetylierung von GCN5 durch SIRT6 und die damit verbundene Acetylierung und Inhibition von PGC-1 $\alpha$ , zum anderen die SIRT6-abhängige Methylierung von ROR $\alpha$  durch EZH2 und die Degradation des methylierten Proteins (**Abb. 3-6+7A**). Es wurde zunächst die Expression von **PGC-1 $\alpha$**  in der Leber der SIRT6 KO-Mäuse im Western Blot (**Abb. 3-6B**) bzw. in der Immunfluoreszenzfärbung von SIRT6-defizienten primären murinen Hepatozyten (**Abb. 3-6F**) untersucht. Die PGC-1 $\alpha$ -Expression war in beiden Fällen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Das Fehlen von PGC-1 $\alpha$  im Zellkern deckt sich nicht mit der Literatur und den folgenden Ergebnissen und könnte an einer unzureichenden Permeabilisierung der Kernmembran liegen. Es wurde nun in den HepG2-Zellen die Acetylierung von PGC-1 $\alpha$  in Abhängigkeit von SIRT6 untersucht. Während die Gesamtmenge an acetylierten Lysinresten in der Immunfluoreszenzfärbung in etwa gleich blieb (**Abb. 3-6E**), stieg die Acetylierung von PGC-1 $\alpha$  in SIRT6-defizienten HepG2-Zellen im Vergleich zum Kontrollklon an (**Abb. 3-6G**). Detektiert wurde die PGC-1 $\alpha$ -Acetylierung mit einem Proximitäts-Ligations-Assay mit anschließender Laser-Scanning-Mikroskopie. Die Hepatoblastomzellen wurden vor der Färbung mit einem Serumschock synchronisiert. Während in den SIRT6-defizienten Zellen (N=64) im Durchschnitt etwa zwei Signale je Zelle gefunden wurden, wies in den wildtypischen Zellen (N=58) nur knapp jede zweite ein Signal auf. Dies entspricht einer 4,8-fach erhöhten Acetylierungsrate. Mit Butyrolacton-3, das als GCN5-Inhibitor gehandelt wird, sollte nun untersucht werden, ob sich ein Einfluss auf die CCG-Expression ergibt. Dazu wurden HepG2-Klone (**Abb. 3-6C**) und primäre murine Hepatozyten (**Abb. 3-6D**) mit 100 oder 300  $\mu$ M des Inhibitors für 24 h behandelt. Die RNA der behandelten primären murinen Hepatozyten wurde von Shengyun Ma zur Verfügung gestellt. In den Hepatoblastomzellen sank die *BMAL1*-Expression unter Butyrolacton-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ab. Die Expression war in den SIRT6-defizienten Zellen niedriger als im Wildtyp, allerdings auch schon in der DMSO-Kontrolle. Wurde die *BMAL1*-Expression auf die DMSO-Kontrolle und den Wildtyp normiert, ergab sich eine Expressionsminderung von 30% bei SIRT6-Defizienz. In den primären Hepatozyten zeigte sich, dass eine niedrige Dosierung von 100  $\mu$ M Butyrolacton-3 keinen Effekt hat.



**Abb. 3-6 (A-D): Acetylierung von PGC-1α und Einfluss von Butyrolacton-3 auf die CCG-Expression in SIRT6-defizienten Hepatoblastomzellen.**

(A) Vereinfachtes Schema der von *Dominy et al.* vorgeschlagenen Aktivierung von GCN5 durch SIRT6 und der damit verbundenen Inaktivierung durch Acetylierung von PGC-1α als Arbeitshypothese. (B) Die Proteinkonzentration von PGC-1α im Western Blot war in der Leber von SIRT6 KO-Mäusen im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern nicht verändert. (C) Mit Butyrolacton-3 (Butyro, 300µM, 20h) behandelte HepG2-Zellen zeigten eine leicht verringerte Genexpression von *BMAL1*. Gezeigt ist der Mittelwert (N=2) mit der Standardabweichung. (D) In primären murinen Hepatozyten zeigte sich kein deutlicher Effekt bei der Behandlung mit 100µM Butyrolacton-3. Bei 300µM Butyrolacton-3 war für *Bmal1* ein divergierender, SIRT6-abhängiger Effekt zu sehen, für *Rev-Erba* eine deutliche Induktion der Genexpression. Die Genexpression wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR in Duplikaten untersucht und mit der Formel  $2^{-\Delta Ct}$  im Verhältnis zu *Rpl1* ausgewertet. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus zweien, \*p≤0,05 \*\*p≤0,01 \*\*\*p≤0,001 nach Student. [Fortsetzung nächste Seite]



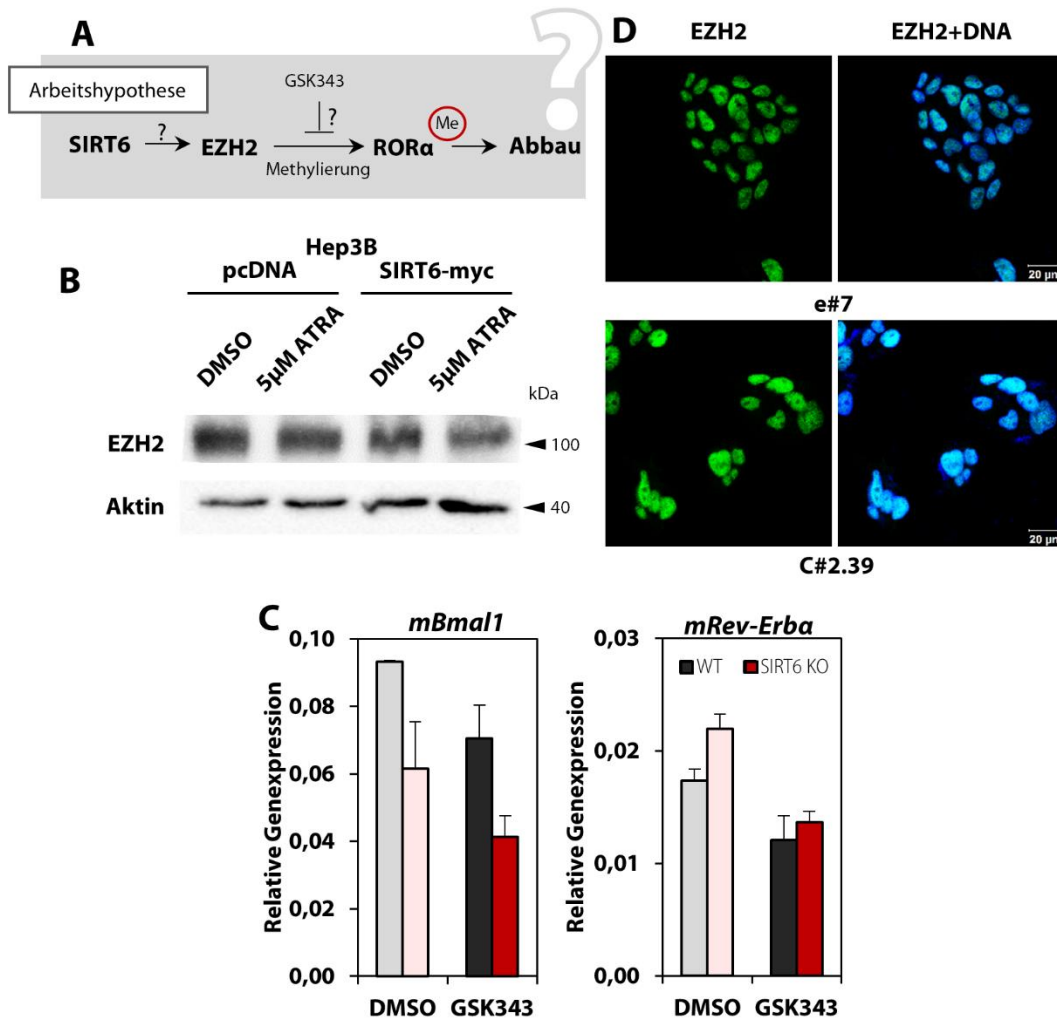
**Abb. 3-6 (E-G): Acetylierung von PGC-1α und Einfluss von Butyrolacton-3 auf die CCG-Expression in SIRT6-defizienten Hepatoblastomzellen.**

(E) Detektion von acetylierten Lysinresten mit Immunfluoreszenzfärbung im SIRT6-defizienten HepG2-Zellklon C#2.39 und Kontrollklon e#7. (F) Expression von PGC-1α in wildtypischen und SIRT6-defizienten primären murinen Hepatozyten. Die Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten im Chamberslide, als Kontrolle diente eine Färbung ohne Erstantikörper (CTL). Die DNA wurde mit Hoechst 33342 gefärbt. (G) Im Proximitäts-Ligations-Assay wurde die Acetylierung von PGC-1α in Abhängigkeit von SIRT6 in HepG2-Zellen untersucht. Als Kontrolle wurde der Assay nur mit einem Antikörper (PGC-1α) durchgeführt.

Eine Konzentration von 300 μM löste ein Absinken der *Bmal1*-Expression in wildtypischen Zellen, aber einen Anstieg in SIRT6 KO-Zellen aus, sodass die *Bmal1*-Expression unter Butyrolacton-Behandlung in den SIRT6-defizienten Zellen dreimal so hoch wie im Wildtyp war. Die Expression von *Rev-Erba* zeigte eine signifikante Antwort auf die Behandlung mit Butyrolacton-3. Die Expression war bei Behandlung mit 300 μM Butyrolacton in den

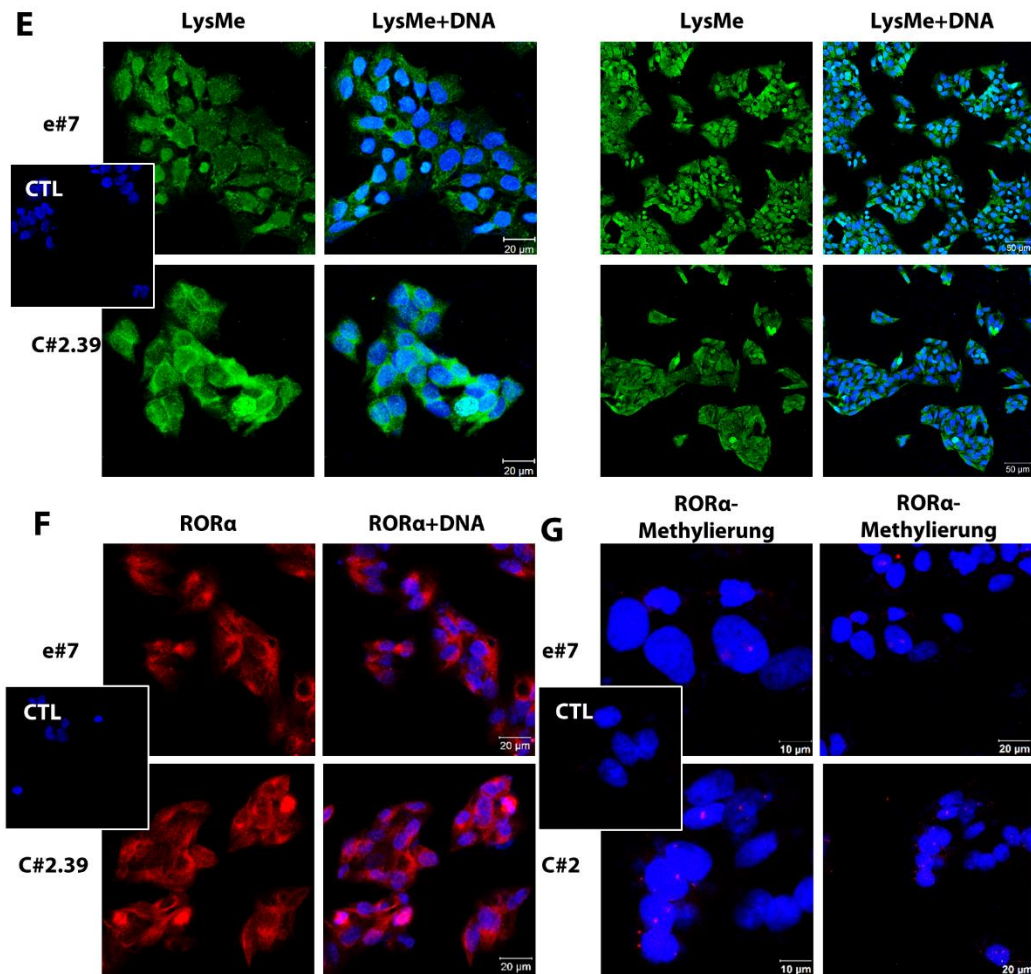
wildtypischen Zellen höher als in den SIRT6 KO-Zellen, was mit der erhöhten Acetylierung und der verringerten Aktivität von PGC-1 $\alpha$  aus dem Proximitäts-Ligations-Assay korrelieren würde. Da REV-ERB $\alpha$  die BMAL1-Expression reprimiert, könnte der leicht stimulierende Effekt von Butyrolacton-3 auf die *Bmal1*-Expression von der verminderten *Rev-Erba*-Expression in SIRT6-defizienten Zellen herrühren.

Für die Untersuchung der zweiten Hypothese zur Modifikation von ROR $\alpha$  durch **EZH2** wurde zunächst dessen Expression mittels Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung analysiert (**Abb. 3-7**). Beide Methoden zeigten eine leichte Zunahme der EZH2-Proteinexpression bei einer geringeren SIRT6-Expression. So war im Western Blot von Hep3B-Zellen eine leichte Reduktion der EZH2-Proteinkonzentration zu erkennen, wenn SIRT6 überexprimiert wurde (**Abb. 3-7B**). Die Zugabe von all-trans Retinsäure (ATRA) führte zu einer weiteren Abnahme. Die Immunfluoreszenzfärbung von EZH2 in SIRT6-defizienten HepG2-Zellen war etwas stärker als in den Kontrollzellen (**Abb. 3-7D**). Es wurden daraufhin die Gesamtmenge an Mono- und Dimethylierungen von Lysinresten sowie die ROR $\alpha$ -Expression in HepG2-Zellen untersucht. Die entsprechenden Immunfluoreszenzfärbungen ergaben eine unveränderte Methylierungsrate in SIRT6-defizienten Zellen und auch die ROR $\alpha$ -Expression blieb in etwa gleich (**Abb. 3-7E+F**). Daraufhin wurde ein Proximitäts-Ligations-Assay von ROR $\alpha$  und mono-/dimethylierten Lysinresten ebenfalls in HepG2-Zellen durchgeführt, welcher eine erhöhte Methylierungsrate in SIRT6-defizienten Zellen offenlegte (**Abb. 3-7G**). Während im Durchschnitt etwa 1,3 Signale je SIRT6-defizienter Zelle (N=63) auftraten, wies nur jede dritte Wildtypzelle (N=63) ein Signal auf. Dies ergibt eine 4,3-fach erhöhte Methylierungsrate von ROR $\alpha$  in SIRT6-defizienten Zellen. Es sollte daraufhin der Einfluss von EZH2 auf die CCG-Expression untersucht werden. Wurden primäre murine Hepatozyten mit GSK343, einem potentiellen EZH2-Inhibitor, behandelt, sank die Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle leicht ab. Die Expression von *Bmal1* war in SIRT6-defizienten etwas niedriger als in den wildtypischen Zellen, die von *Rev-Erba* etwas höher — allerdings auch in der DMSO-Kontrolle. Wurden die Werte auf die DMSO-Kontrolle und den Wildtyp normiert, war die Expression der CCGs in den SIRT6-defizienten Zellen tendenziell verringert.



**Abb. 3-7 (A-D): Proteinexpression von EZH2 in SIRT6-defizienten Hepatozyten und die Methylierung von ROR $\alpha$ .**

(A) Vereinfachtes Schema zur Methylierung von ROR $\alpha$  durch EZH2, die zur Degradation des Proteins führt, als Arbeitshypothese (verändert nach Lee et al.). Die Expression von EZH2 wurde im Vergleich zur Kontrolle in SIRT6-überexprimierenden Hep3B-Zellen im Western Blot (B) und in SIRT6-defizienten HepG2 in der Immunfluoreszenzfärbung (D) studiert. Die Zugabe von 5µM ATRA für 24h zeigte eine leichte Verminderung der EZH2-Expression. (C) Mit GSK343 (1µM, 48h) behandelte pmHep zeigten eine veränderte Genexpression von *BMAL1* und *REV-ERB $\alpha$* . Die RNA wurde von Shengyun Ma zur Verfügung gestellt. [Fortsetzung nächste Seite]



**Abb. 3-7 (E-G): Proteinexpression von EZH2 in SIRT6-defizienten Hepatozyten und die Methylierung von RORα.**

Detektion von methylierten Lysinresten (E) und RORα (F) in SIRT6-defizienten HepG2-Zellen (C#2.39) im Vergleich zu den Kontrollzellen (e#7). Die Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten im Chamberslide, als Kontrolle diente eine Färbung ohne Erstantikörper (CTL). (G) Im Proximitäts-Ligations-Assay wurde die Methylierung von RORα in SIRT6-defizienten HepG2-Zellen untersucht. Als Kontrolle (CTL) wurde der Assay nur mit dem RORα-Antikörper durchgeführt.

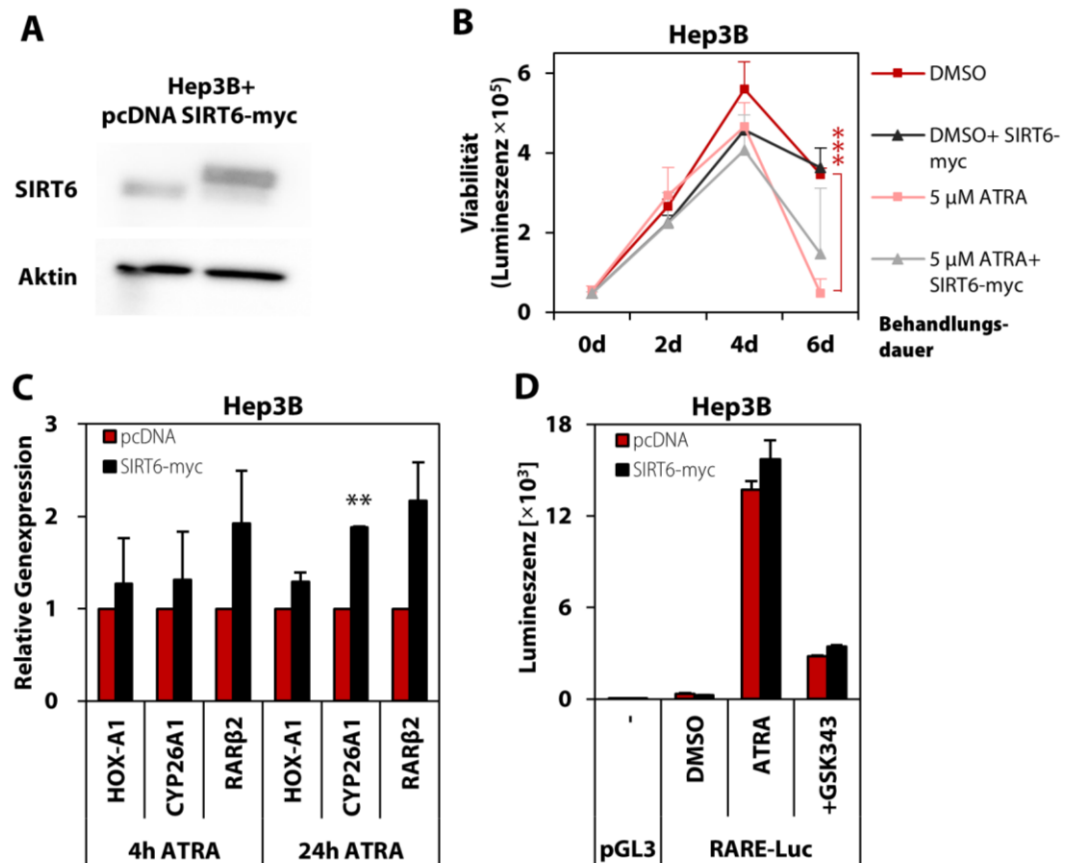
### 3.1.4. Einfluss äußerer Faktoren auf die Circadiane Rhythmik

Das Enzym EZH2 ist nicht nur für die Monomethylierung von RORα bekannt,<sup>195</sup> sondern auch als enzymatisch-aktiver Bestandteil des *Polycomb-Repressive-Complex 2* (PRC2). Der PRC2 ist für die Trimethylierung von Lysinrest 27 an Histon H3 verantwortlich, z.B. am RAR-Element, das in der Promotorregion ATRA-sensitiver Gene liegt. Wie bereits in der Einleitung erklärt ist der PRC2 an das RARE gebunden, solange kein ATRA vorhanden ist. Bindet ATRA an das RXR-RAR-Heterodimer, löst sich der PRC2 und die Transkription



der entsprechenden Gene startet.<sup>194</sup> In Abbildung 3-7B wurde bereits gezeigt, dass die Expression von EZH2 bei ATRA-Behandlung in Hep3B-Zellen leicht abnimmt. Hier sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss **ATRA** auf das Überleben der Hepatomzellen hat und wie die Expression der RARE-enhaltenden Gene sich in Abhängigkeit von SIRT6, EZH2 und ATRA verhält. Hep3B-Zellen, die mit 5  $\mu$ M ATRA über sechs Tage behandelt wurden, zeigten zunächst ein Zellwachstum, das in den behandelten Zellen geringer war als in den Kontrollzellen (**Abb. 3-8**). An Tag 6 war die Zellviabilität unabhängig der Konditionen reduziert. Bei den mit ATRA behandelten Hep3B-Zellen (rosa) sank die Viabilität jedoch auf nur 14% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (rot). Durch eine Überexpression von SIRT6 konnte die Zellviabilität unter ATRA-Behandlung (grau) auf 41% der Kontrolle (schwarz) gehalten werden (**Abb. 3-8B**). Die Expression der ATRA-abhängigen Gene *HOX-A1*, *CYP26A1* und *RAR $\beta$ 2* stieg unter ATRA-Behandlung erwartungsgemäß an und war in dem SIRT6-überexprimierenden Hep3B-Klon im Vergleich zum pcDNA-Kontrollklon nach Inkubation mit ATRA für 4 h oder 24 h erhöht (**Abb. 3-8C**). Die Expression von *HOX-A1* und *CYP26A1* stieg etwa auf das 1,3-fache, die Expression von *RAR $\beta$ 2* hatte sich sogar verdoppelt. Im RARE-Luziferase-Reportergen-Assay zeigte sich ebenfalls eine deutliche Steigerung der Transkriptionsrate bei Behandlung der Zellen mit ATRA (**Abb. 3-8D**). Wie bei der Expression von *HOX-A1* und *CYP26A1* war die transkriptionelle Aktivität am RARE in SIRT6-überexprimierenden Zellen im Reportergen-Assay etwa auf das 1,3-fache gestiegen. Wurden die Hep3B-Zellen zusätzlich zur Stimulation mit ATRA mit GSK343 behandelt, sank die transkriptionelle Aktivität des RARE gemessen in Lumineszenz drastisch ab. Sie blieb in den SIRT6-überexprimierenden Zellen aber leicht erhöht, sodass keine SIRT6-Abhängigkeit vorzuliegen schien (**Abb. 3-8D**).

Da ATRA als oxidiertes Derivat des Retinols (Vitamin A<sub>1</sub>) nicht nur an das RXR-RAR-Heterodimer bindet, sondern auch an ROR $\alpha$ , sollte der Einfluss von Komponenten aus Nahrungsaufnahme und Stoffwechsel auf die Circadiane Rhythmik weiter untersucht werden. So konnte festgestellt werden, dass eine Behandlung der Hepatoblastomzellen mit ATRA zu einer Reduktion der *BMAL1*-Expression führte (**Abb. 3-9**). Der SIRT6-abhängige Effekt der Retinsäure auf die Expression von *BMAL1* in den HepG2-Klonen war jedoch nur gering: Um etwa 10% sank die Expression in den SIRT6-defizienten Zellen im



**Abb. 3-8: Expression von Retinsäure(ATRA)-assoziierten Genen und ATRA-abhängige Zellviabilität von Hepatomzellen bei SIRT6-Überexpression.**

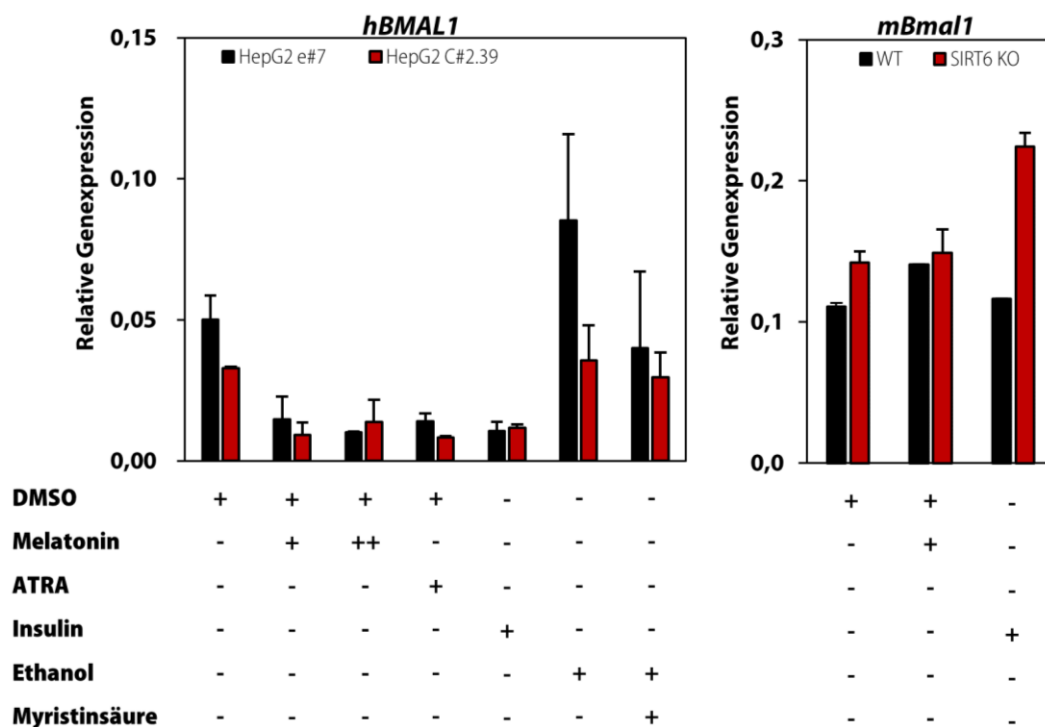
(A) Nachweis der SIRT6-Überexpression von stabil transfizierten Hep3B-Zellen im Western Blot. (B) Die Überlebensrate der Hep3B-Zellen wurde mit einem lumineszenzbasierten Zellviabilitätsassay in Abhängigkeit von SIRT6 und ATRA durchgeführt. Der Versuch wurde zweimal in Quadruplikaten durchgeführt (N=2); es wurde jeden Tag mit frischem Medium auf ein Versuchsvolumen von etwa 100 $\mu$ L aufgefüllt. (C) Die Genexpression ATRA-assoziiierter Gene wie *HOX-A1*, *CYP26A1* und *RAR $\beta$ 2* wurde in SIRT6-überexprimierenden Zellen mit zwei unterschiedlichen Induktionszeiten durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte der PCR-Duplikate mit ihrer Standardabweichung von einem aus N=3 (4h) bzw. N=2 (24h) Experimenten, \* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\* $p \leq 0,001$  nach Student. (D) Im *RARE*-Luziferase-Reportergenassay wurde die Promotoraktivität in den SIRT6-überexprimierenden, mit ATRA (5 $\mu$ M, 24h) und GSK343 (1 $\mu$ M, 24h) behandelten Zellen genauer betrachtet. Die Experimente wurde in Duplikaten durchgeführt, gezeigt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichung von einem Experiment aus vieren. Als Kontrolle diente der pGL3-Vektor.

Verhältnis zum Wildtyp und normiert auf die DMSO-Kontrolle. Aus der Diplomarbeit war außerdem bekannt, dass die Expression von *Dbp*, ein oszillierendes metabolisches Gen, das u. a. die Insulinsekretion reguliert, in den SIRT6-defizienten Mäusen signifikant dereguliert ist (Abb. 2-1A). So liegt die Expression in den SIRT6 KO-Mäusen verringert und phasisch

verschoben vor. Ebenfalls bekannt war die Oszillation der Blutglucose, die in den wildtypischen Mäusen ihre Maxima zu den Zeitpunkten ZT2 und ZT18 hatte und sich in den SIRT6-defizienten Mäusen genau invers verhielt – mit einem deutlich geringeren Durchschnittswert (**Abb. 2-1B**). Es lag daher nahe, ein besonderes Augenmerk auf den Einfluss des **Insulin-Melatonin-Gleichgewichts** auf die Expression der CCGs zu legen. Dazu wurden die genannten HepG2-Klone sowie primäre murine Hepatozyten mit entweder 50  $\mu\text{M}$  Melatonin oder 0,5  $\mu\text{M}$  Insulin für 4 h behandelt (**Abb. 3-9**). In den Hepatoblastomzellen reduzierte die Behandlung die Genexpression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, in den primären Hepatozyten nicht. Melatonin löste eine leichte Expressionsabnahme bei SIRT6-Defizienz aus, während die mit Insulin behandelten Zellen eine tendenziell erhöhte Expression in SIRT6-defizienten Zellen aufwiesen. Zusätzlich wurden Zellen mit einer Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  Melatonin für 20 h behandelt. Es ergab sich ein konzentrations- und SIRT6-abhängiger Effekt von Melatonin auf die *BMAL1*-Expression in Hepatozyten: Die geringere, eher physiologischere Konzentration induzierte eine leichte Verringerung der Genexpression in SIRT6-defizienten Hepatozyten, während die deutlich höhere Konzentration mit längerer Behandlungszeit zu einem Anstieg der *BMAL1*-Expression bei SIRT6-Defizienz führte (**Abb. 3-9**). Des Weiteren wurde der Einfluss einer freien Fettsäure untersucht, da Fettsäuren SIRT6 aktivieren.<sup>39</sup> Die Behandlung mit Myristinsäure ließ die *BMAL1*-Expression in SIRT6-defizienten Zellen auf das 1,8-fache des Wildtyps ansteigen, normierte man sie auf die Werte der Ethanolkontrolle.

### **3.1.5. Expression der Per2- und Cry1-Expression in Altersabhängigkeit**

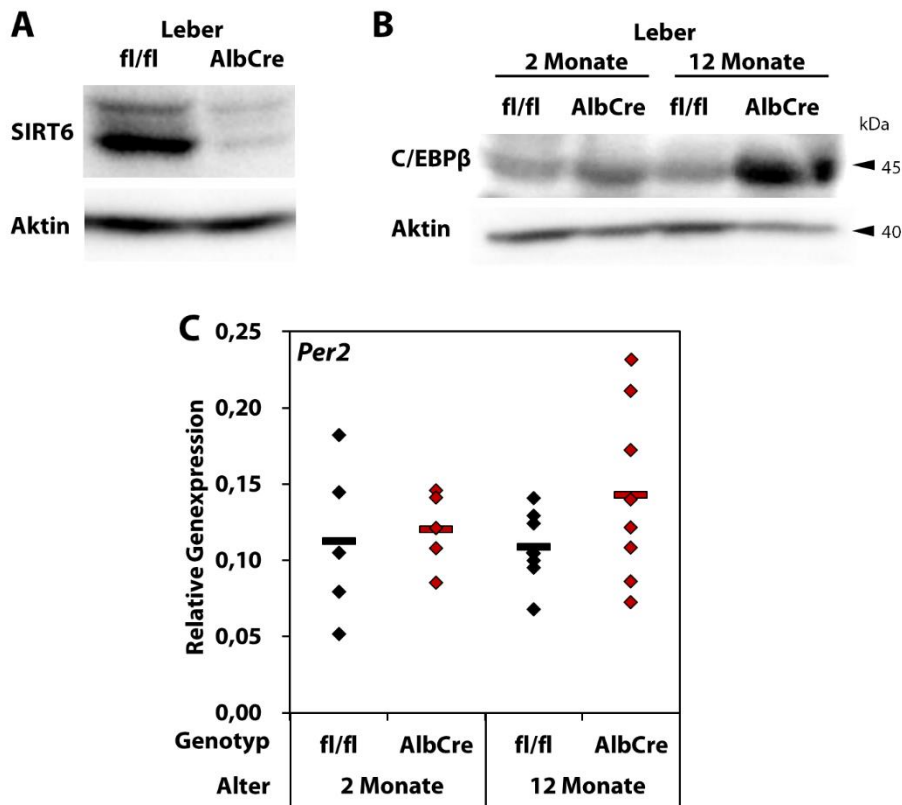
Viele Einflüsse von äußeren Faktoren und Stoffwechselmetaboliten auf die Circadiane Rhythmik sind altersabhängig. Es sollten daher die Expression der CCGs und die Auswirkungen der Chronodisruption bei SIRT6-Defizienz unter Berücksichtigung des Alters untersucht werden. Dazu wurde mit konditionalen *Sirt6<sup>fl/fl</sup>XAlbCre*-Mäusen gearbeitet, die keine verkürzte Lebensdauer wie die 129-*Sirt6<sup>tm1Fwa</sup>/J*-Mäuse haben. Es wurden Mäuse im Alter von 2 und 12 Monaten verwendet, die Leber wurde zum Zeitpunkt ZT10 entnommen. Zunächst wurde das Protein **C/EBP $\beta$**  im Western Blot aus Leberlysaten untersucht. Dieses spielt eine Rolle in der Differenzierung von myeloiden Zellen, aber auch in der Autophagie, die als entscheidender Regulator der Alterung verstanden wird. In den



**Abb. 3-9: Einfluss metabolischer Faktoren auf die BMAL1-Expression in Abhängigkeit von SIRT6.**

Behandlung von Hepatoblastomzellen und primären murinen Hepatozyten mit Melatonin, Insulin, ATRA oder Myristinsäure gefolgt von der Analyse der *BMAL1*-Genexpression zum Zeitpunkt ZT2 im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO bzw. Ethanol. Die *BMAL1*-Expression wurde nach einer vierstündigen Behandlung mit 10µM ATRA oder 50µM (+) bzw. 2000µM Melatonin für 20h (++) in SIRT6-defizienten Zellen und Kontrollzellen bestimmt. Zudem wurde die Expression bei der vierstündigen Behandlung mit 0,5µM Insulin und bei der Kultivierung der Zellen mit 25µM Myristinsäure für zwei Tage per RT-PCR im Verhältnis zu *RPII* ermittelt. Gezeigt sind für die HepG2-Zellen die Mittelwerte der biologischen Replikate (N=2), für die primären Hepatozyten die technischen Duplikate.

SIRT6-defizienten Lebern der 2 Monate alten Mäuse war die Expression von C/EBPβ leicht erhöht, in den 12 Monate alten SIRT6-defizienten Lebern deutlich verstärkt (**Abb. 3-10B**). Da es Hinweise auf einen Einfluss von **PER2** auf die Autophagie gibt,<sup>168</sup> wurde auch die *Per2*-Expression in den 2 und 12 Monate alten Mäusen zum Zeitpunkt ZT10 untersucht. Es zeigte sich eine tendenziell stärkere Expression in den 12 Monate alten im Vergleich zu den 2 Monate alten *Sirt6<sup>fl/fl</sup>XAlbCre*-Mäusen (**Abb. 3-10C**).

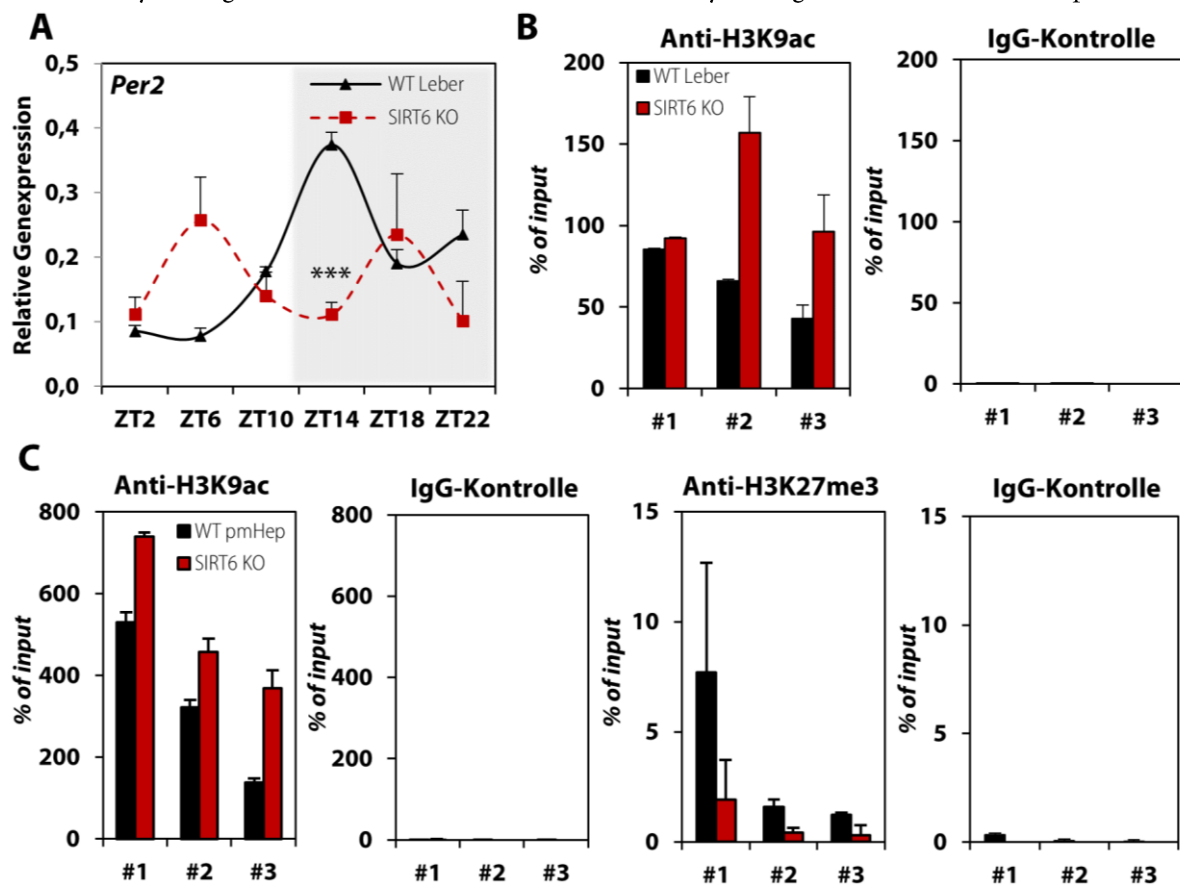


**Abb. 3-10: Expression von *Per2* und C/EBPβ in der SIRT6-defizienten Leber von 2 und 12 Monate alten Mäusen.**

(A) Nachweis der SIRT6-Defizienz im Western Blot von Mäusen mit konditionalem SIRT6 KO in der Leber (*Sirt6<sup>fl/fl</sup>XAlbCre*). (B) Die Überprüfung der C/EBPβ-Proteinexpression erfolgte in der SIRT6-defizienten Leber von 2 bzw. 12 Monate alten Mäusen. Für den Western Blot (N=2) wurde ein Lysat aus zum Zeitpunkt ZT10 entnommenem Lebergewebe der Mäuse verwendet und C/EBPβ bei 45kDa detektiert. Als Kontrolle diente Aktin. (C) Die *Per2*-Expression wurde zum Zeitpunkt ZT10 in den Lebern der 12 Monate alten Mäuse im Vergleich zur Kontrolle studiert. Die Genexpression wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR in Duplikaten untersucht und mit der Formel  $2^{-\Delta Ct}$  im Verhältnis zu *RPII* ausgewertet. Gezeigt ist die Verteilung der einzelnen Messwerte.

Eine detaillierte Betrachtung der *Per2*-Expressionsregulation erfolgte in den 129-*Sirt6<sup>tm1Fwa</sup>/J*-Mäusen. In Abbildung 3-11A ist aus Gründen der Übersichtlichkeit die *Per2*-Expression in der Leber der wildtypischen und der SIRT6 KO-Mäuse erneut – diesmal nicht konsekutiv – dargestellt (vgl. Abb. 3-1). Die Untersuchung der Histonmodifikation H3K9ac am *Per2*-Promotor in der Leber zum Zeitpunkt ZT10 mittels Chromatin-Immunpräzipitation ergab eine erhöhte Acetylierung in drei von drei Experimenten (Abb. 3-11B). Zusätzlich wurden die Histonmodifikationen H3K9ac und H3K27me3 am *Per2*-Promotor zum Zeitpunkt ZT2 nach dem Serumschock in primären murinen

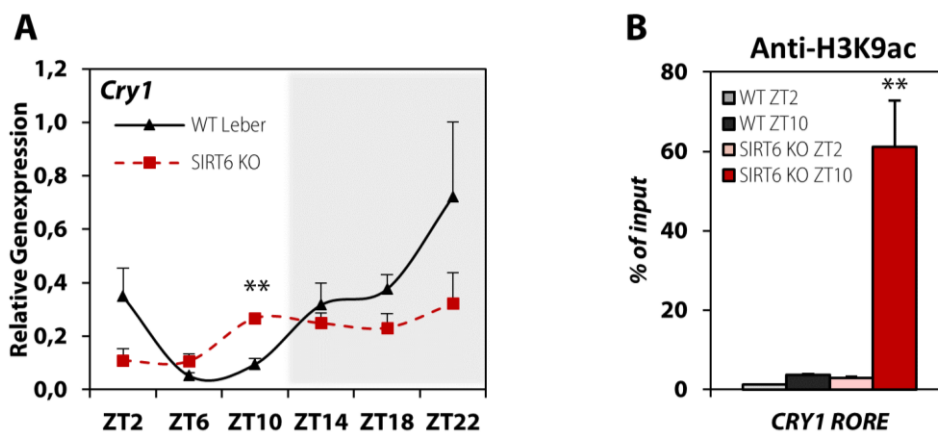
Hepatozyten analysiert. Die Chromatin-Immunpräzipitation zeigte einen Anstieg der H3K9-Acetylierung sowie eine deutliche Verminderung der H3K27-Trimethylierung (Abb. 3-11C). Da die *Per2*-Expression u. a. von **CRY1** und MYBBP1a reguliert wird, wurde auch die *Cry1*-Expression in der Mausleber untersucht (Abb. 3-12): In der nicht-konsekutiven Darstellung ist erneut die signifikant erhöhte Expression in der SIRT6 KO-Leber bei ZT10 zu erkennen (vgl. Abb. 3-1). Bei ZT2 hingegen ist die Expression in der SIRT6-defizienten Leber im Vergleich zum Wildtyp verringert. Zu diesen Zeitpunkten ergaben sich in der Chromatin-Immunpräzipitation eine nahezu unveränderte Acetylierung bei ZT2, aber eine 16-fach erhöhte Acetylierung von H3K9ac zum Zeitpunkt



**Abb. 3-11: Histonmodifikationen am Promotor von *Per2* in Abhängigkeit von SIRT6.**

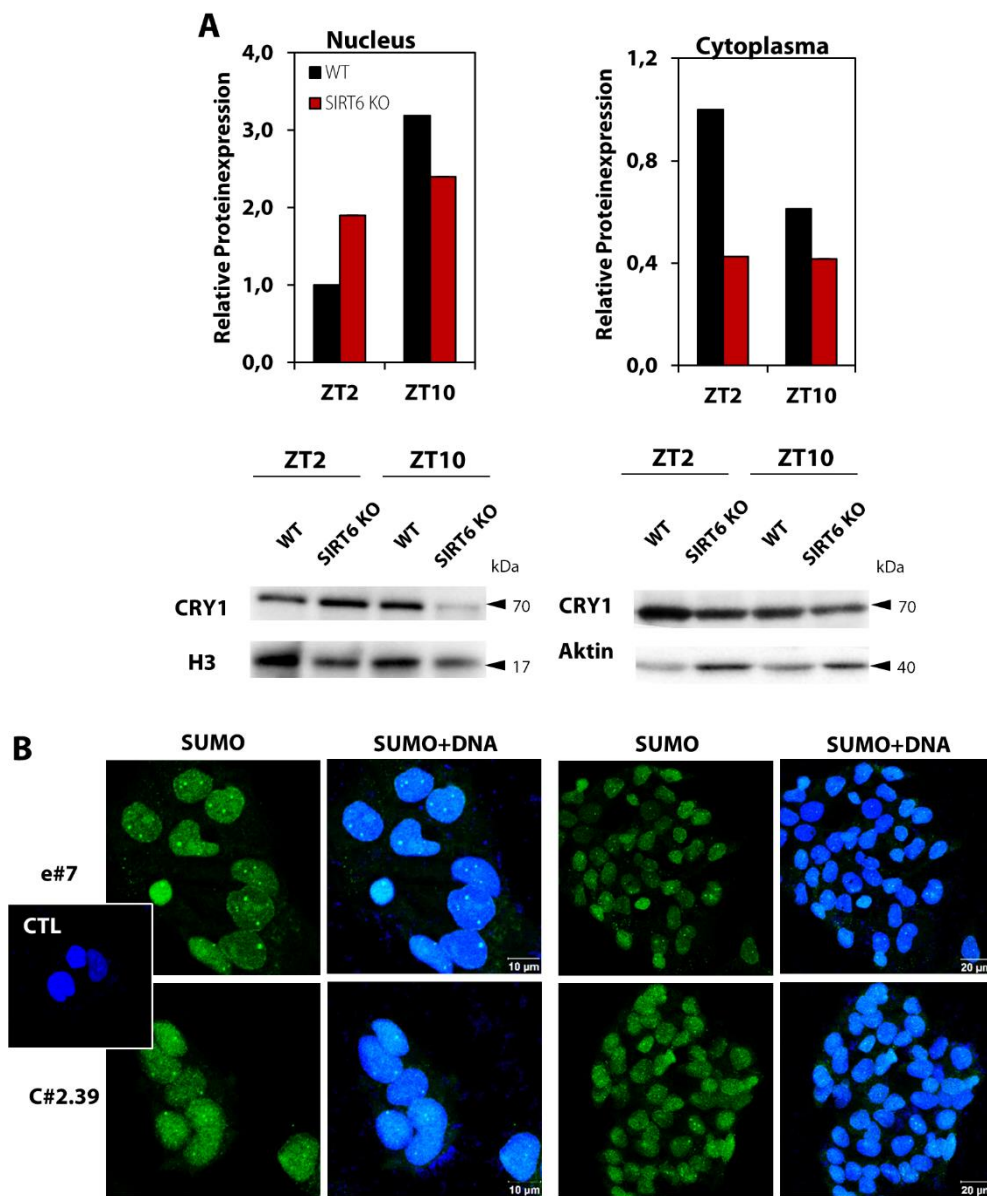
(A) Nicht-konsequente Darstellung der *Per2*-Expression in der Leber von wildtypischen und SIRT6-defizienten Mäusen (vgl. Abb.3- 1). (B) Chromatin-Immunpräzipitationen aus der Leber dieser Mäuse (N=3) zur Untersuchung der Acetylierung von H3K9 am Promotor von *Per2* bei Fehlen von SIRT6 zum Zeitpunkt ZT10. (C) Die Untersuchung der Histonmodifikationen in primären murinen Hepatozyten (N=3) bei ZT2 nach dem Serumschock ergaben eine veränderte Acetylierung von H3K9 und Trimethylierung von H3K27 in allen drei SIRT6-defizienten Lebern im Vergleich zum Wildtyp. Als Kontrolle wurde die Immunpräzipitation mit einer IgG-Isotyp-Kontrolle durchgeführt.

ZT10 (**Abb. 3-12B**). Dies deckte sich mit der erhöhten Expression zu dieser Tageszeit. Die Interaktion von MYBBP1a und CRY1 konnte in einem ersten Versuch bestätigt werden, zeigte allerdings keine SIRT6-Abhängigkeit. Bezüglich der Regulation der *Per2*-Expression durch CRY1 spielt allerdings nicht nur die *Cry1*-Expression, sondern auch die Lokalisation des Faktors eine Rolle. Es wurden daher Lebern der Zeitpunkte ZT2 und ZT10 lysiert, wobei mit unterschiedlich starken Reagenzien in Cytoplasma und Nucleus aufgetrennt wurde. Von diesen Proben wurde ein CRY1-Western Blot angefertigt, der in Nucleus und Cytoplasma ein tageszeitabhängiges Vorkommen von CRY1 in den wildtypischen Lebern zeigte (**Abb. 3-13A**). In den SIRT6-defizienten Lebern waren die Unterschiede deutlich verringert, es schien keine Abhängigkeit vom Zeitgeber vorzuliegen. Die Konzentration des Proteins war zudem im Cytoplasma der SIRT6-defizienten Lebern deutlich verringert, was auf eine Deregulierung in der Proteinlokalisierung hinweisen könnte. Es wurde daher eine Immunfluoreszenzfärbung des Lokalisationsregulators SUMO in HepG2-Zellen angefertigt (**Abb. 3-13B**). Diese zeigte eine definiertere SUMO-Lokalisation in den Kontrollzellen, während in den SIRT6-defizienten Zellen die Verteilung von SUMO über den Zellkern etwas diffuser war.



**Abb. 3-12: Histonmodifikationen am Promotor von *Cry1* in der SIRT6-defizienten Leber.**

(A) Nicht-konsequente Darstellung der *Cry1*-Expression in der Leber von wildtypischen und SIRT6-defizienten Mäusen (vgl. Abb. 3-1). (B) Chromatin-Immunpräzipitationen aus der Leber dieser Mäuse zeigten eine veränderte Acetylierung von H3K9 am Promotor von *Cry1* bei Fehlen von SIRT6. Gezeigt ist ein Experiment aus dreien (N=3) mit der Standardabweichung zu den Zeiten ZT2 und ZT10. Als Kontrolle wurde die Immunpräzipitation mit einer IgG-Isotyp-Kontrolle durchgeführt.



**Abb. 3-13: Tageszeitabhängige Lokalisation von CRY1 in Nucleus und Cytoplasma in der SIRT6-defizienten Leber.**

(A) Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Nucleus und Cytoplasma wurde Mausleber der Zeitpunkte ZT2 und ZT10 mit dem NE-PER-Kit aufgetrennt und die CRY1-Expression im Western Blot untersucht. Die Proteinmenge wurde anhand der Chemilumineszenzreaktion quantifiziert (ChemiDoc-System und ImageLab-Software, Biorad). Gezeigt ist ein Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten (N=3). Die Proteinexpression wurde auf die wildtypische Leber zum Zeitpunkt ZT2 normiert, als Kontrolle diente Aktin für die Cytoplasmafraktion und Histon H3 für die Kernfraktion. (B) Lokalisation von SUMO, einem Regulator des Kerntransports, in der Immunfluoreszenzfärbung von SIRT6-defizienten HepG2-Zellen (ZT2 nach Serumschock) und dem Kontrollklon. Die Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten im Chamberslide, als Kontrolle diente eine Färbung ohne Erstantikörper (CTL).

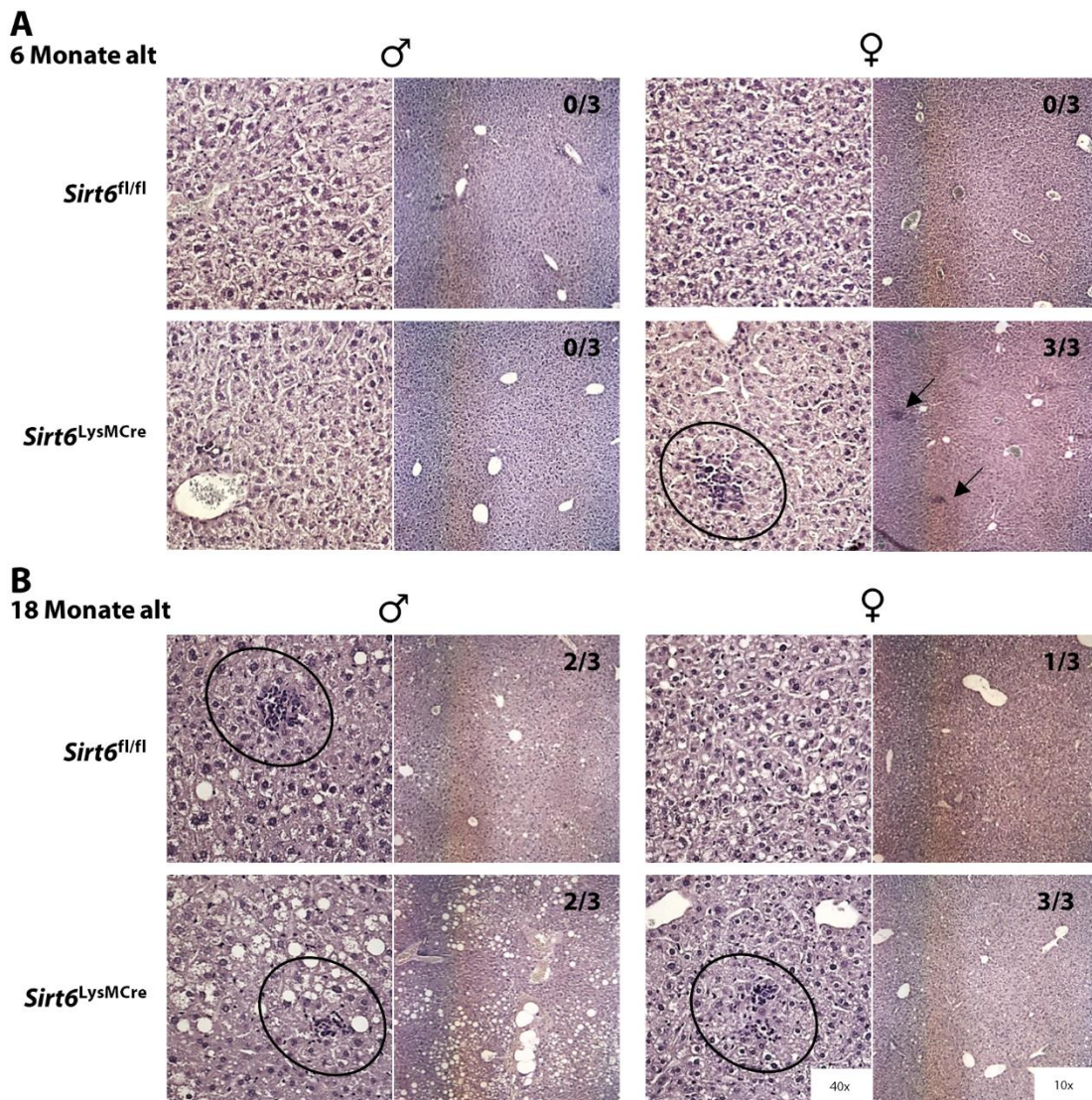


Zusammenfassend ergaben sich eine deutliche Chronodisruption, veränderte epigenetische Marker sowie Modifikationen am zentralen Transkriptionsfaktor ROR $\alpha$  im Falle der SIRT6-Defizienz. Als mögliche Stellgröße konnten metabolische Einflüsse durch Retinsäure und das Insulin-Melatonin-Gleichgewicht herausgearbeitet werden. Zudem zeigte sich im Falle der SIRT6-Defizienz eine erhöhte Proteinexpression von C/EBP $\beta$ , die mit dem Alter anstieg. Die Expression des CCGs *Per2* stieg ebenfalls mit dem Alter und der SIRT6-Defizienz an; seine circadiane Expression wurde möglicherweise über epigenetische Veränderungen am Promotor bei Fehlen von SIRT6 reguliert. Ebenso könnte die veränderte Lokalisation von CRY1 die transkriptionelle Aktivität am *Per2*-Promotor beeinflussen. Durch die große Bandbreite an Wirkungsbereichen der CCGs ergaben sich zahlreiche Möglichkeiten die Konsequenzen der durch SIRT6-Defizienz verursachten Chronodisruption zu analysieren. Nachdem nun zunächst die molekularen Ursachen der Chronodisruption untersucht wurden, soll im Folgenden die Modulation der Immunantwort durch ROR $\alpha$  und REV-ERB $\alpha$  näher beleuchtet werden.

### 3.2. Einfluss der CCGs auf die Differenzierung von Immunzellen

#### 3.2.1. CD11b<sup>+</sup>-Zellen in der SIRT6 KO-Leber

Die CCGs ROR $\alpha$  und REV-ERB $\alpha$  sind in die Differenzierung von Immunzellen involviert. Verändert SIRT6 die Expression der CCGs, ist auch ein Effekt auf CCG-regulierte Gene im Immunsystem zu erwarten. Dies könnte wiederum die Differenzierung und Funktionalität von Immunzellen und damit die Immunantwort beeinflussen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde neben dem Mausstamm 129-*Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup> der konditionale Stamm B6-*Sirt6*<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup> verwendet. So standen Mäuse mit spezifischem SIRT6 KO in myeloiden Zellen (*Sirt6*<sup>fl/fl</sup>XLysMCre) zur Verfügung, die nicht den stark degenerativen Phänotyp der SIRT6 KO-Mäuse zeigten und eine größere Zellausbeute sowie altersabhängige Studien ermöglichten. Zunächst wurde die Leber auf eine Infiltration oder Akkumulation von Immunzellen überprüft. Dazu wurden die Lebern dieser Mäuse entnommen, in Paraffin fixiert und in Gewebeschnitten mit einer **Hämatoxilin-Eosin**-Lösung die Zellkerne blau und das Cytoplasma rosa gefärbt. Die Analyse von jeweils drei weiblichen und männlichen Mäusen des Genotyps *Sirt6*<sup>fl/fl</sup> und *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>XLysMCre ergaben eine Akkumulation von Zellen in drei von drei sechs Monate alten weiblichen Mäusen während die Kontrollmäuse und die männlichen Mäuse keinerlei Ansammlungen aufwiesen (**Abb. 3-14**). Bei den 18



**Abb. 3-14: Histologie der Leber von Mäusen mit SIRT6-Deletion in myeloiden Zellen.**

Untersucht wurden die Lebern 6 (A) und 18 (B) Monate alter, männlicher und weiblicher konditionaler SIRT6 KO-Mäuse (*Sirt6<sup>LysMCre</sup>*) und der Kontrollmäuse (*Sirt6<sup>fl/fl</sup>*) mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Es wurden Gewebeschnitte von jeweils drei Mäusen (N=3) erstellt und gefärbt, wobei immer eine wildtypische mit einer entsprechenden Leber der SIRT6-defizienten Mäuse auf einem Objektträger kombiniert wurde. Die Aufnahmen erfolgten am Durchlichtmikroskop, die Markierungen weisen auf Zellansammlungen in den Lebern hin.

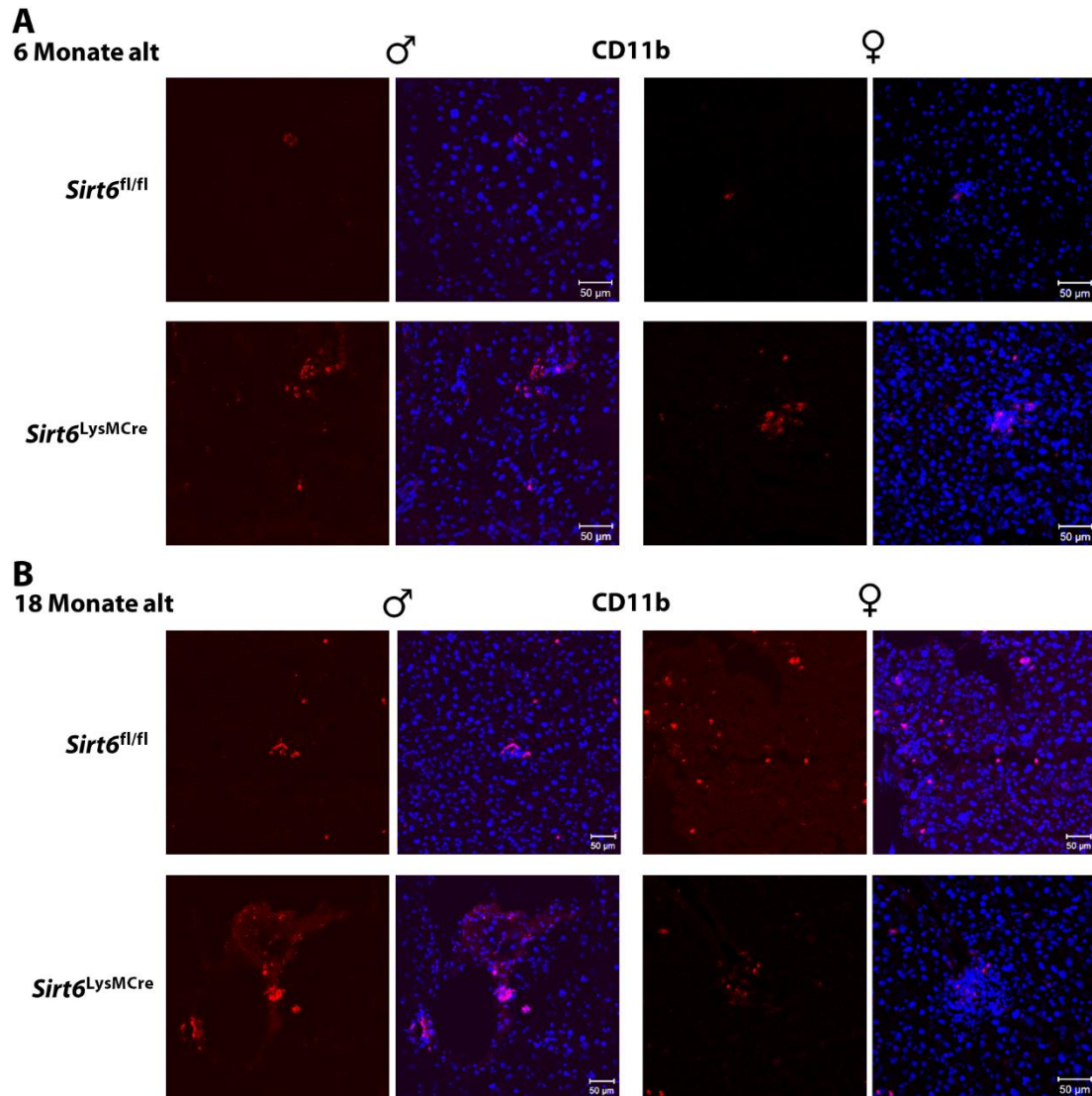
Monate alten Tieren gab es auch bei einer von drei weiblichen bzw. zwei von drei männlichen Kontrollmäusen Zellfoci, allerdings waren die Lebern der *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*X*LysMCre*-Mäuse weiterhin stärker infiltriert und stärker degradiert. Besonders in den Männchen schienen nekrotische Zellen und Fetteinlagerungen in der Leber erkennbar zu sein. Um

eine genauere Aussage über die veränderte Struktur und Morphologie dieser Lebern treffen zu können, müssten weitere Färbungen wie z. B. eine Ölrot O-Färbung durchgeführt werden. Die Akkumulation von Zellen in der Leber entstand einzig durch das Fehlen von SIRT6 in myeloiden Zellen, da die Leber in allen untersuchten Mäusen in Bezug auf die SIRT6-Expression wildtypisch war.

Daher wurden zur genaueren Charakterisierung dieser Zellen Gefrierschnitte aus Lebergewebe erstellt und in der Immunfluoreszenzfärbung der Oberflächenmarker CD11b, ein Integrin, das auf der Oberfläche von myeloiden Zellen exprimiert wird, detektiert (**Abb. 3-15**). Es konnte ein vermehrtes Vorkommen von **CD11b<sup>+</sup>-Zellen in der Leber** der *Sirt6<sup>fl/fl</sup>XLysMCre*-Mäuse festgestellt werden. Auffällig war, dass die CD11b<sup>+</sup>-Zellen, wie schon die Immunzellen in der HE-Färbung, in Foci, einer Akkumulation von Hoechstgefärbten Zellkernen, organisiert waren. Besonders in den sechs Monate alten Mäusen war der Unterschied zu den Kontrollmäusen deutlich: Die Zahl und Größe der Foci war in den *Sirt6<sup>fl/fl</sup>XLysMCre*-Lebern erhöht. Allerdings waren auch bei den 18 Monate alten Mäusen in den *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen CD11b<sup>+</sup>-Zellansammlungen zu erkennen. Die Zahl der CD11b<sup>+</sup>-Zellen schien also mit dem Alter zuzunehmen.

### **3.2.2. Neutrophilie, Lymphopenie und Monozytose bei SIRT6 KO**

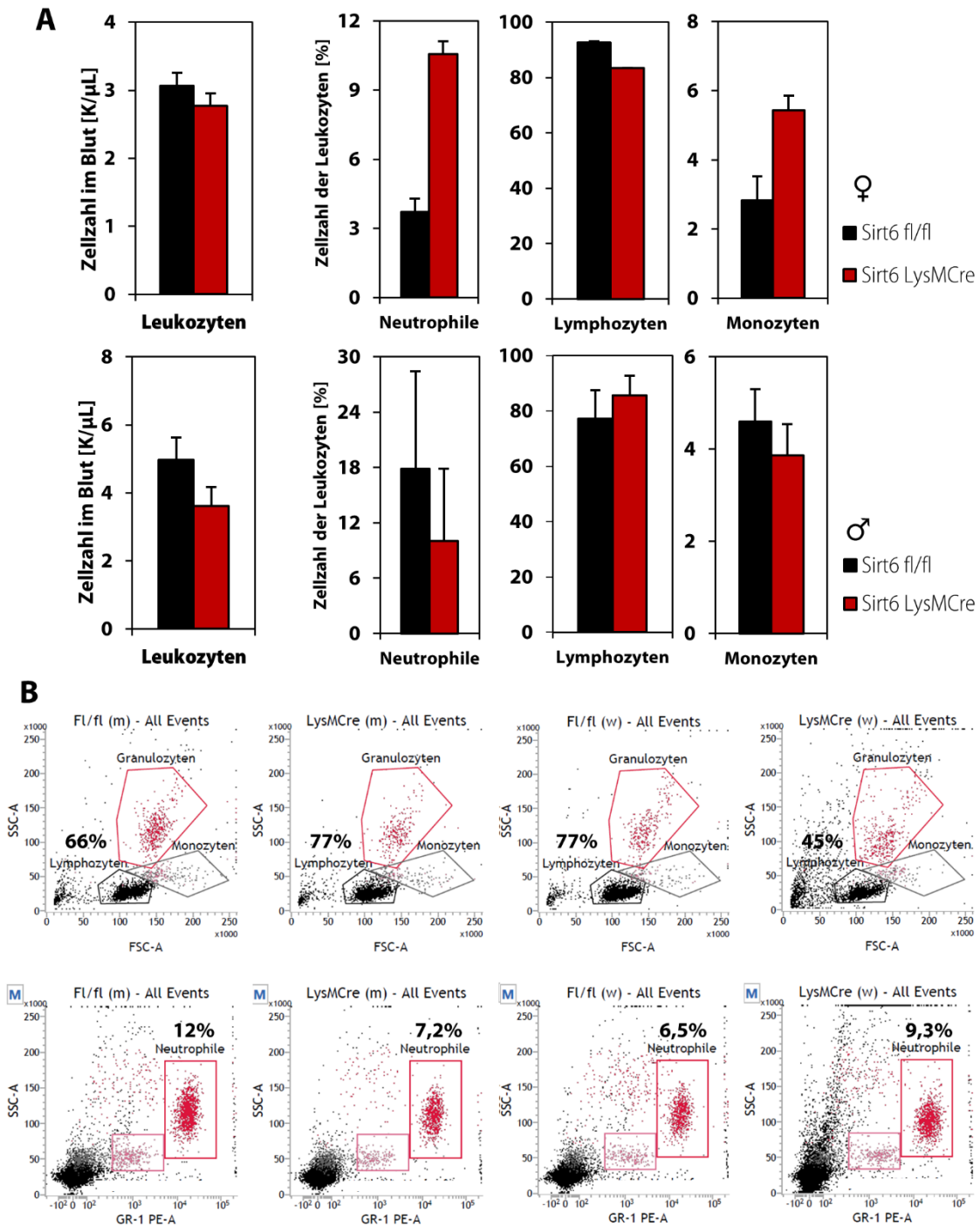
Zur weiteren Charakterisierung der Auswirkungen des konditionalen SIRT6 Knockouts in myeloiden Zellen wurde eine Messung des **Blutbildes** durchgeführt. Das EDTA-Vollblut jeweils dreier drei Monate alter weiblicher und männlicher *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*- und *Sirt6<sup>fl/fl</sup>XLysMCre*-Mäuse wurde am automatischen Blutbildmessgerät Hemavet gemessen (**Abb. 3-16A**) oder mit spezifischen Oberflächenmarkern gefärbt und anschließend im Durchflusscytometer detektiert (**Abb. 3-16B**). Die Messungen ergaben eine verringerte Anzahl an Leukozyten im Blut der *Sirt6<sup>fl/fl</sup>XLysMCre*-Mäuse. Zudem fand sich bei den weiblichen Mäusen eine deutliche Neutrophilie, eine Lymphopenie und eine Monozytose. Diese Ergebnisse konnten mit der Durchflusscytometrie bestätigt werden, beispielsweise durch Färbung von GR-1 oder CD11b, die in hohem Maße als Oberflächenmarker auf Neutrophilen exprimiert werden. Bei den männlichen Mäusen verhielt sich die Verteilung der Leukozytenpopulationen genau invers zu den Weibchen. Auf Grund der deutlichen Neutrophilie im Blut der Weibchen wurde auch die **Milz** auf eine erhöhte Zahl an Neutrophilen überprüft. Die Mäuse und ihre Milzen wurden zunächst gewogen



**Abb. 3-15: Nachweis von CD11b<sup>+</sup>-Zellen in der Leber von Mäusen mit konditionalem SIRT6 KO in myeloiden Zelltypen.**

Untersucht wurden die Lebern 6 (A) und 18 (B) Monate alter männlicher und weiblicher konditionaler SIRT6 KO-Mäuse (*Sirt6*<sup>LysMCre</sup>) und der Kontrollmäuse (*Sirt6*<sup>fl/fl</sup>) mittels Immunfluoreszenzfärbung des Oberflächenmarkers CD11b. Es wurden Gewebeschnitte von jeweils drei Mäusen (N=3) erstellt und gefärbt, wobei immer eine wildtypische mit einer entsprechenden Leber der SIRT6-defizienten Mäuse auf einem Objektträger kombiniert wurde. Die Detektion der Farbstoffe AlexaFluor 555 und Hoechst 33342 erfolgte am LSM, als Kontrolle diente eine Färbung ohne Erstantikörper.

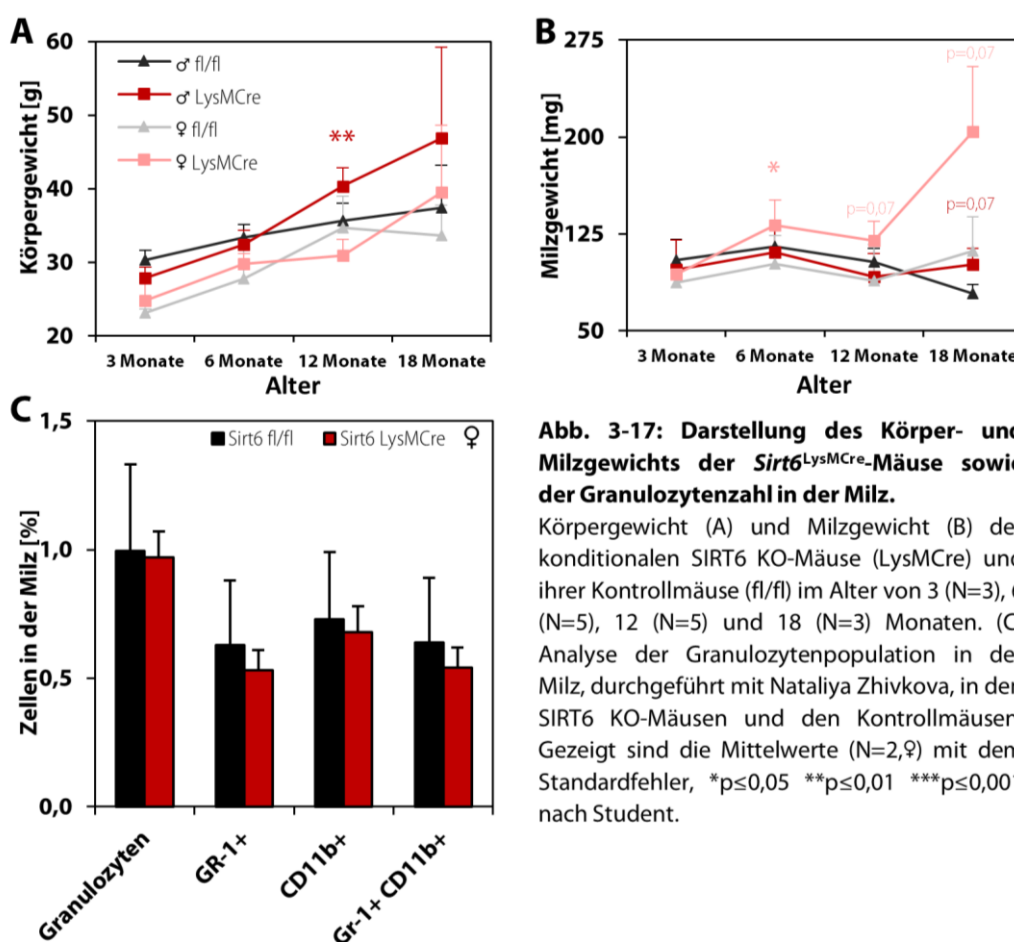
(Abb. 3-17A): Im Allgemeinen stieg das Gewicht der Mäuse mit dem Alter an, wobei in den *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>- und *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>XLysMCre-Weibchen keine deutlichen Gewichtsunterschiede festgestellt wurden. Die *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>XLysMCre-Männchen zeigten allerdings einen stärkeren Anstieg als die Kontrollmäuse. Das Gewicht der Milz unterschied sich in weiblichen



**Abb. 3-16: Bestimmung der Leukozytenzahl im Blut von Mäusen mit spezifischem SIRT6 KO in myeloiden Zelltypen.**

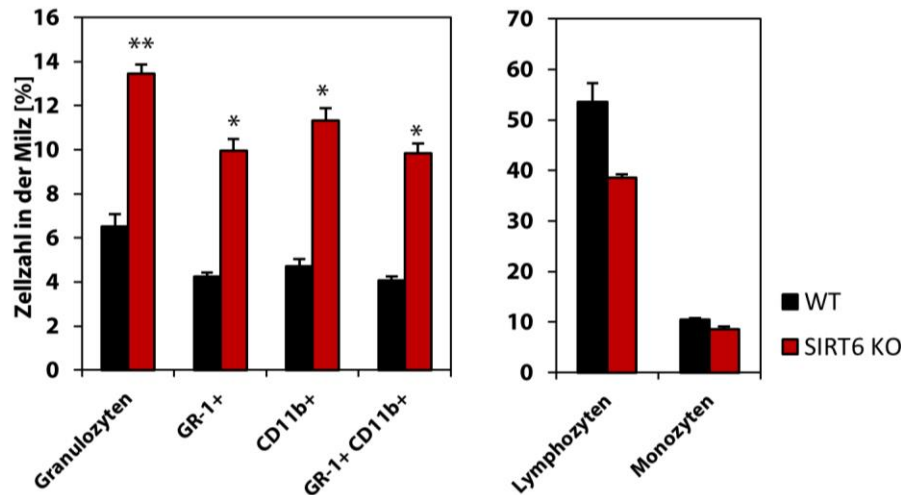
Blut jeweils dreier Mäuse je Genotyp und Geschlecht (N=3) wurde im automatisierten Blutbildmessgerät Hemavet gemessen (A) oder in einem weiteren Versuch nach Immunfluoreszenzfärbung des Neutrophilen-spezifischen Markers GR-1 im Durchflusszytometer (B) ausgewertet. Für die automatisierte Messung ist der Mittelwert über drei Mäuse als Leukozytenzahl je Mikroliter bzw. prozentualer Anteil des jeweiligen Zelltyps an den Leukozyten mit seiner Standardabweichung dargestellt. Aus der Durchflusszytometrie wurde eine repräsentative Messung aus dreien ausgewählt, die prozentuale Angabe bezieht sich auf alle detektierten Signale (All Events).

*Sirt6<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen kaum von männlichen *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*- und *Sirt6<sup>fl/fl</sup>LysMCre*- Mäusen. In den weiblichen *Sirt6<sup>fl/fl</sup>LysMCre*-Mäusen jedoch war das Milzgewicht signifikant erhöht (**Abb. 3-17B**). Die Analyse der Granulozytenpopulation — insbesondere der Neutrophilen — in der Milz von drei Monate alten Weibchen ergab keine Änderung bei SIRT6-Defizienz in myeloiden Zellen (**Abb. 3-17C**). Da viele Effekte in den Mäusen mit einem systemischen SIRT6 Knockout stärker ausgeprägt sind, wurde die Blutbildmessung aus der Diplomarbeit hinzugezogen und ebenfalls eine Bestimmung der Granulozytenzahl in der Milz in den 129-*Sirt6<sup>tm1Fwa</sup>/J*-Mäusen durchgeführt. Es war bereits eine Neutrophilie, Lymphopenie und Monozytose im Blut der SIRT6-defizienten Mäuse bekannt (**Abb. 2-3**). Zudem zeigten die SIRT6-defizienten Milzen im Gegensatz zu den konditionalen Mäusen eine deutliche Zunahme der GR-1<sup>+</sup>-, CD11b<sup>+</sup>- und doppelt-positiver Zellen (**Abb. 3-18**). Die Zahl an Lymphozyten und Monozyten war im Vergleich zum Wildtyp gesunken.



**Abb. 3-17: Darstellung des Körper- und Milzgewichts der *Sirt6<sup>LysMCre</sup>*-Mäuse sowie der Granulozytenzahl in der Milz.**

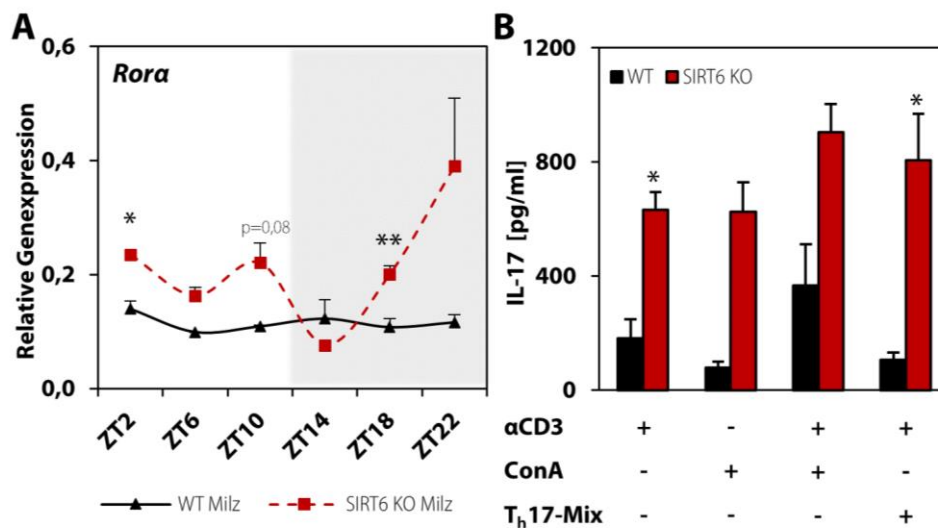
Körpergewicht (A) und Milzgewicht (B) der konditionalen SIRT6 KO-Mäuse (*LysMCre*) und ihrer Kontrollmäuse (*fl/fl*) im Alter von 3 (N=3), 6 (N=5), 12 (N=5) und 18 (N=3) Monaten. (C) Analyse der Granulozytenpopulation in der Milz, durchgeführt mit Nataliya Zhivkova, in den SIRT6 KO-Mäusen und den Kontrollmäusen. Gezeigt sind die Mittelwerte (N=2,♀) mit dem Standardfehler, \*p≤0,05 \*\*p≤0,01 \*\*\*p≤0,001 nach Student.



**Abb. 3-18: Untersuchung der Leukozytenpopulationen in der Milz der 129-Sirt6<sup>tm1Fwa</sup>/J-Mäuse.**

Analyse der Immunzellpopulationen der Milz mittels Durchflusszytometrie in Wildtypmäusen und SIRT6 KO-Mäusen. Untersucht wurde besonders die Granulozytenpopulation auf CD11b-positive und GR-1-positive Zellen. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Nataliya Zhivkova durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte (N=2) mit ihrem Standardfehler, \*p≤0,05 \*\*p≤0,01 \*\*\*p≤0,001 nach Student.

Mögliche Ursachen für die Neutrophilie bei Fehlen von SIRT6 könnten in der verstärkten Bildung und Reifung von Neutrophilen liegen, aber auch in veränderter Apoptosesensitivität und vermindertem Abbau. Diese Fragestellungen bearbeitet Nataliya Zhivkova in ihrem Projekt. Experimente, die die Milz betreffen, wurden in Zusammenarbeit mit ihr durchgeführt. In dieser Arbeit soll stattdessen eine veränderte Freisetzung von Neutrophilen ins Gewebe untersucht werden. Interleukin-17 stimuliert die **Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen**. Es wird von T<sub>h</sub>17-Zellen oder Zellen der angeborenen Immunantwort sekretiert, deren wichtigste Transkriptionsfaktoren ROR $\gamma$ t und ROR $\alpha$  sind.<sup>213</sup> Es wurde daher die tageszeitabhängige Genexpression von ROR $\alpha$  in der Milz überprüft. Diese zeigte einen konstanten Verlauf in wildtypischen Mäusen, aber eine erhöhte und oszillierende Expression in SIRT6-defizienten Mäusen mit signifikanten Unterschieden bei ZT2 und ZT18 (**Abb. 3-19**). Wurden Milzzellen *in vitro* mit  $\alpha$ CD3 und/oder ConA stimuliert, sekretierten die SIRT6-defizienten Zellen signifikant mehr IL-17. Dies war auch der Fall bei der Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu T<sub>h</sub>17-Zellen durch Zugabe von  $\alpha$ CD3, IL-6, TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ IL-4,  $\alpha$ IFN- $\gamma$ , IL-2 und  $\alpha$ CD28 — hier als T<sub>h</sub>17-Mix bezeichnet. Dazu wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit magnetischer Zellseparation (MACS, Miltenyi Biotec) isoliert, stimuliert und ein ELISA zur Messung der Cytokinsekretion durchgeführt.



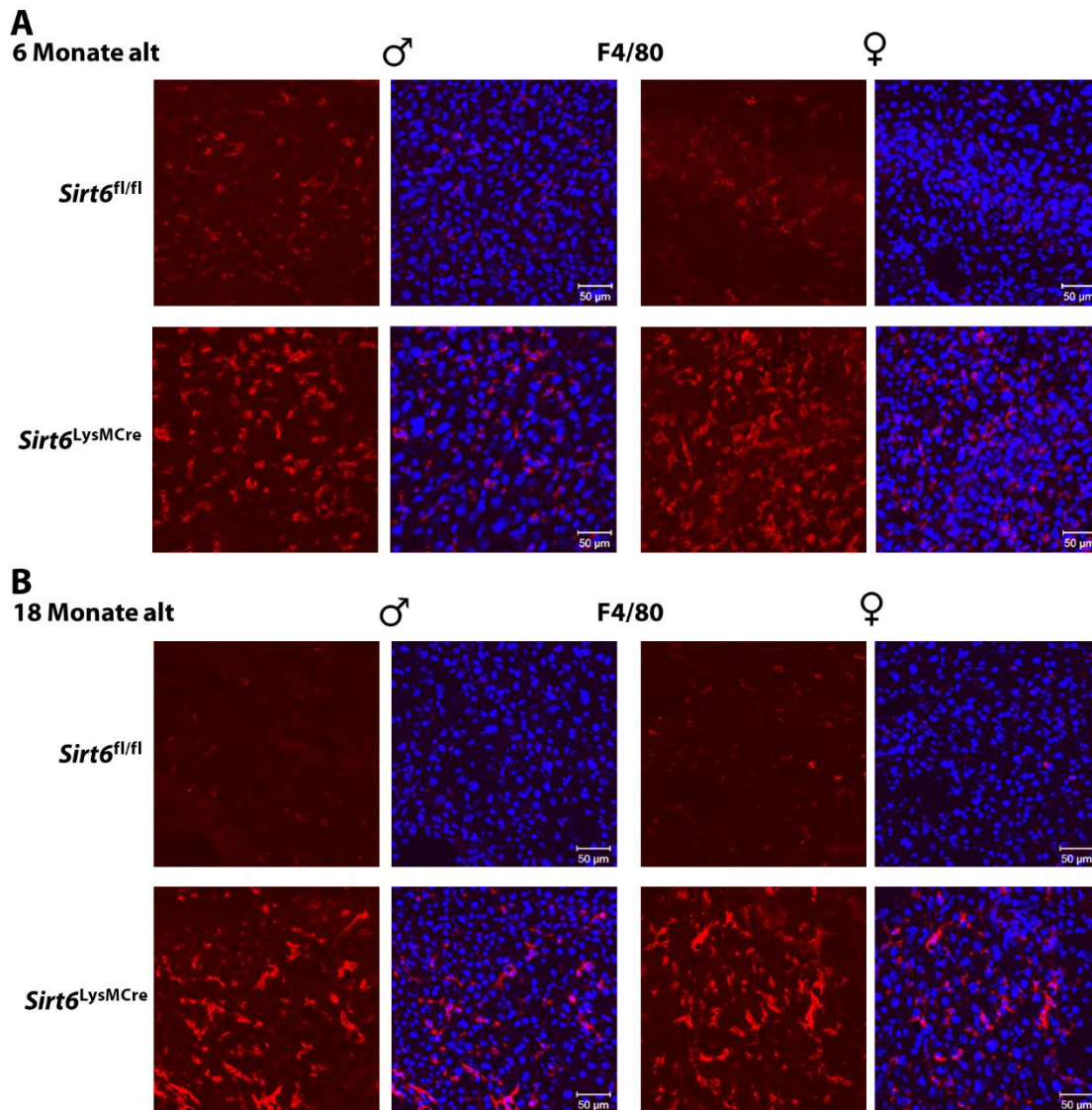
**Abb. 3-19: Einfluss der SIRT6-Defizienz auf die *Rora*-Expression und die Interleukin-17-Sekretion von Milzzellen.**

(A) Untersuchung der *RORA*-Genexpression in der Milz von SIRT6-defizienten Mäusen im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern. Die Genexpression wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR in Duplikaten untersucht und mit der Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  im Verhältnis zu RPII ausgewertet. Gezeigt ist der Mittelwert (N=3) mit dem Standardfehler. (B) Isolierte Milzzellen wurden mit  $\alpha$ CD3 und/oder ConA stimuliert oder es wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus der Milz isoliert und mit IL-6, TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ IL-4,  $\alpha$ IFN- $\gamma$ , IL-2,  $\alpha$ CD3 und  $\alpha$ CD28 (**T<sub>h</sub>17-Mix**) stimuliert. In allen Fällen wurde die Sekretion von IL-17 im ELISA ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte von N=2 Mäusen mit dem Standardfehler; \*p $\leq$ 0,05 \*\*p $\leq$ 0,01 \*\*\*p $\leq$ 0,001 nach Student. Für die CD4<sup>+</sup>-Zellisolation wurden die Zellen der beiden Mäuse vereinigt. Die veränderte IL-17-Sekretion konnte in weiteren Versuchen bestätigt werden. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Nataliya Zhivkova durchgeführt.

### 3.2.3. F4/80<sup>+</sup>-Zellen in der SIRT6 KO-Leber

Neben den Neutrophilen sollte ein weiterer Typ der myeloiden Zellen betrachtet werden, die Makrophagen. Der in der Leber residierende Subtyp der Makrophagen wird als Kupffer-Zellen bezeichnet. Dazu wurde zunächst eine Immunfluoreszenzfärbung von Lebergewebeschnitten jeweils dreier weiblicher und männlicher *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>- und *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>XLysMCre-Mäuse im Alter von 6 und 18 Monaten mit dem Makrophagen-spezifischen Oberflächenmarker F4/80 durchgeführt. Sie ergab ein schwaches Signal in den *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>-Mäusen und eine deutlich stärkere Färbung in den *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>XLysMCre-Mäusen unabhängig vom Geschlecht (Abb. 3-20). Zudem schien in den wildtypischen Lebern die Zahl an **F4/80-positiven Zellen** mit dem Alter abzunehmen, während die Signalintensität in den Mäusen mit konditionalem Knockout in den älteren Mäusen höher war. Die





**Abb. 3-20: Nachweis von F4/80<sup>+</sup>-Zellen in der Leber von Mäusen mit spezifischem SIRT6 KO in myeloiden Zelltypen.**

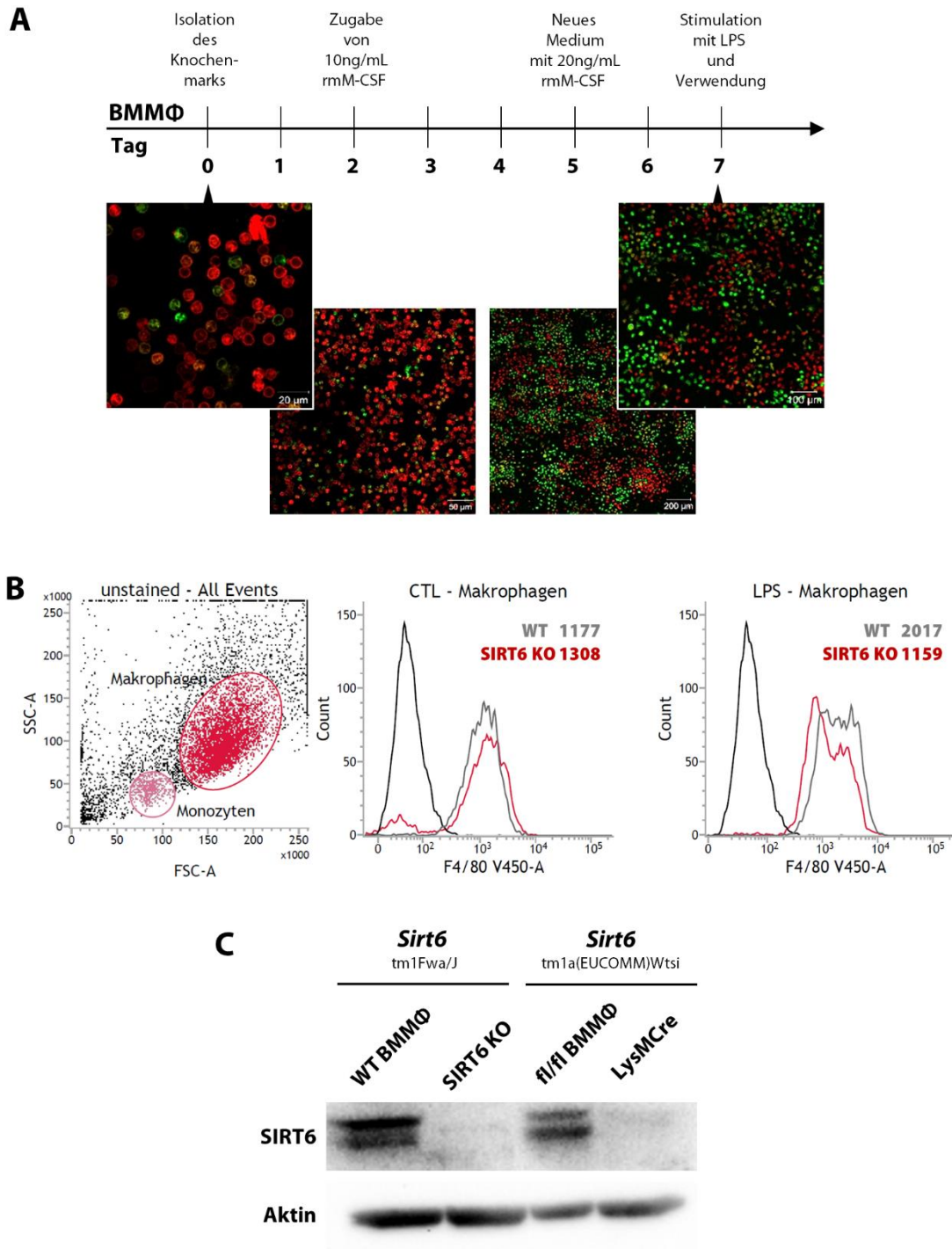
Untersucht wurden die Lebern 6 und 18 Monate alter männlicher und weiblicher konditionaler SIRT6 KO-Mäuse (*Sirt6<sup>LysMCre</sup>*) und der Kontrollmäuse (*Sirt6<sup>fl/fl</sup>*) mittels Immunfluoreszenzfärbung des Makrophagen-spezifischen Oberflächenmarkers F4/80. Es wurden Gewebeschnitte von jeweils drei Mäusen (N=3) erstellt und gefärbt, wobei immer eine wildtypische mit einer entsprechenden Leber der SIRT6-defizienten Mäuse auf einem Objektträger kombiniert wurde. Die Detektion der Farbstoffe AlexaFluor 555 und Hoechst 33342 erfolgte am LSM, als Kontrolle diente eine Färbung ohne Erstantikörper.

verstärkte Färbung kann für eine erhöhte Makrophagenzahl in der Leber, aber auch für eine stärkere Expression des F4/80-Rezeptors auf den bereits vorhandenen Kupffer-Zellen sprechen. Im Gegensatz zu den CD11b<sup>+</sup>-Zellen, waren die F4/80<sup>+</sup>-Zellen erwartungsgemäß

gleichmäßig über das Lebergewebe verteilt. Um eine genauere Aussage über die Unterschiede in Differenzierung, Aktivierung und Migration von Makrophagen in Abhängigkeit von SIRT6 treffen zu können, wurden Makrophagen aus Knochenmarkszellen generiert (**BMMΦ**). Dazu wurde Knochenmark aus *Femur* und *Tibia* der Mäuse gewonnen und für sieben Tage mit dem rekombinanten murinen Makrophagenkolonie-stimulierenden Faktor (rmM-CSF) kultiviert. Die Differenzierung von Knochenmarkszellen in Suspension zu adhärenen BMMΦ wurde zunächst an ActB-ttd-TomatoXLYsMCre-Mäusen überprüft, bei denen alle Zellen rot fluoreszieren, die ausdifferenzierten myeloiden Zellen jedoch grün (**Abb. 3-21A**). Im Folgenden wurde mit dem Mausstamm 129-*Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup> und dem konditionalen Stamm B6-*Sirt6*<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup> gearbeitet und der SIRT6 KO in myeloiden Zellen nachgewiesen. Der Western Blot von BMMΦ aus systemischen und konditionalen SIRT6 KO-Mäusen zeigte den Verlust des SIRT6-Proteins (**Abb. 3-21C**). Die Differenzierung der Zellen zu Makrophagen wurde außerdem durch die Expression des Oberflächenmarkers F4/80 bestätigt (**Abb. 3-21B**). Die SIRT6-defizienten Zellen exprimierten F4/80 etwas stärker, was mit der Immunfluoreszenzfärbung der Leberschnitte korrelierte. Wurden die Zellen mit 10 ng/mL LPS stimuliert, erhöhte dies die F4/80-Expression im Wildtyp, allerdings nicht in SIRT6 KO-Zellen. Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Bestandteil der Bakterienmembran, der an den *Toll-like receptor* TLR4 auf der Oberfläche von myeloiden Zellen bindet und eine recht starke Reaktivität des angeborenen Immunsystems auslöst.<sup>241</sup> So induzierte es die Expression von CD86, CD40 und CD11c sowie die Sekretion von IL-10 und IL-12p40 in BMMΦ (**Abb. 3-22**). Die Expression der Aktivierungsmarker CD86 und CD40 war in den SIRT6-defizienten Zellen erhöht, ebenso wie die Sekretion von IL-10 und IL-12p40; der Oberflächenrezeptor CD11c war jedoch verringert. Diese ersten Ergebnisse, die eine erhöhte Aktivierung der Makrophagen bei Fehlen von SIRT6 zeigten, wurden in Makrophagen der *Sirt6*<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup>-Mäuse genauer beleuchtet.

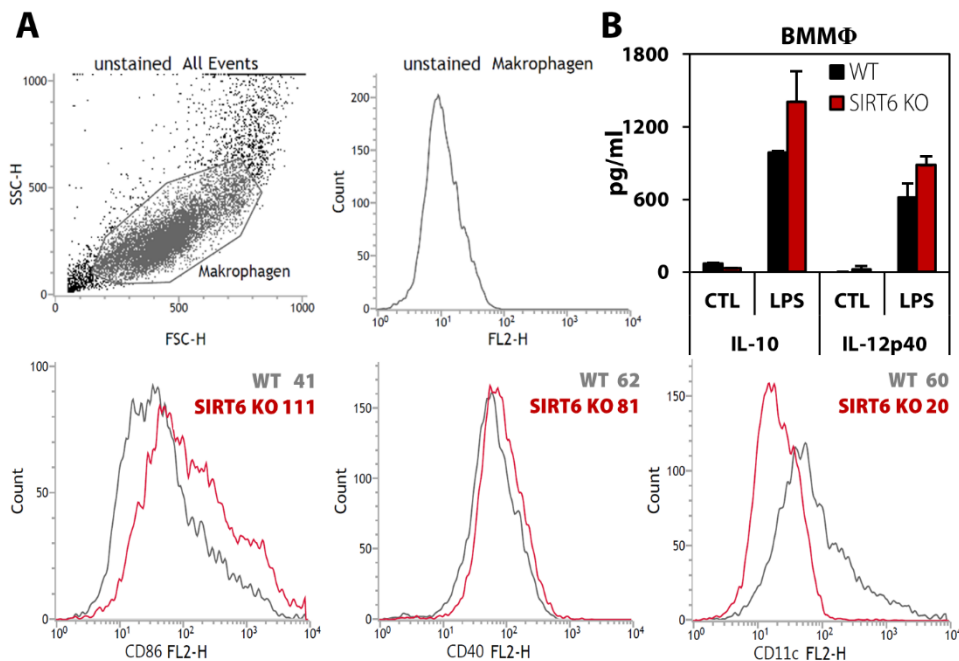
#### **3.2.4. Veränderte Polarisierung in SIRT6-defizienten BMMΦ**

Die Knochenmarkszellen aus den drei Monate alten *Sirt6*<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup>-Mäusen wurden ebenfalls mit rmM-CSF kultiviert und am siebten Tag mit 10 ng/mL LPS für 4 h stimuliert. Aus den Zellen wurde RNA isoliert und die Expression verschiedener Marker untersucht. Zunächst wurde die Expression von **Rev-Erbα** und **IL-10** genauer betrachtet. REV-ERBa



**Abb. 3-21: Generierung von Knochenmarksmakrophagen (BMMΦ) aus konditionalen SIRT6 KO-Mäusen.**

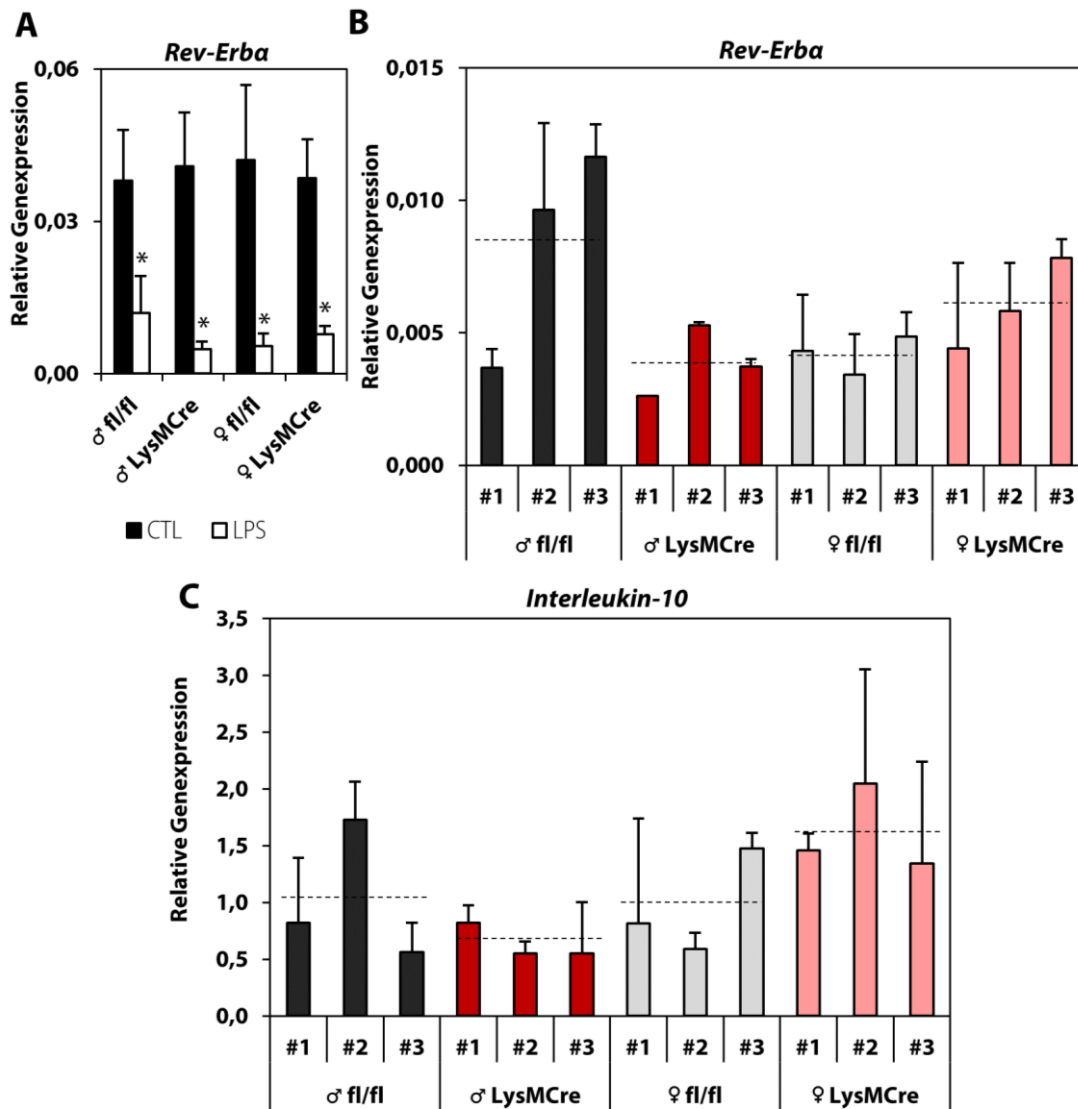
(A) Kultivierung von Knochenmarkszellen der ActB-td-TomatoXLysMCre-Mäuse zu Beginn (0 Tage) und nach siebentägiger Behandlung mit rmM-CSF (7 Tage), das den LysM-Promotor aktiviert. Die Detektion erfolgte am LSM. (B) Die Knochenmarkszellen der *Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup>-Mäuse wurden exemplarisch nach siebentägiger Behandlung mit rmM-CSF (CTL) und zusätzlich nach vierstündiger LPS-Stimulation im Durchflusszytometer auf den Makrophagenmarker F4/80 untersucht. Als Kontrolle dienten ungefärbte Zellen (*schwarz*). (C) Nachweis der SIRT6-Defizienz im Western Blot von BMMΦ aus den systemischen SIRT6 KO-Mäusen (*Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup>) und den konditionalen, myeloid-spezifischen SIRT6 KO-Mäusen (*Sirt6*<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup>).



**Abb. 3-22: Expression von Makrophagen-spezifischen Oberflächenmarkern und Cytokinsekretion in SIRT6-defizienten Knochenmarksmakrophagen (BMMΦ) nach LPS-Behandlung.**

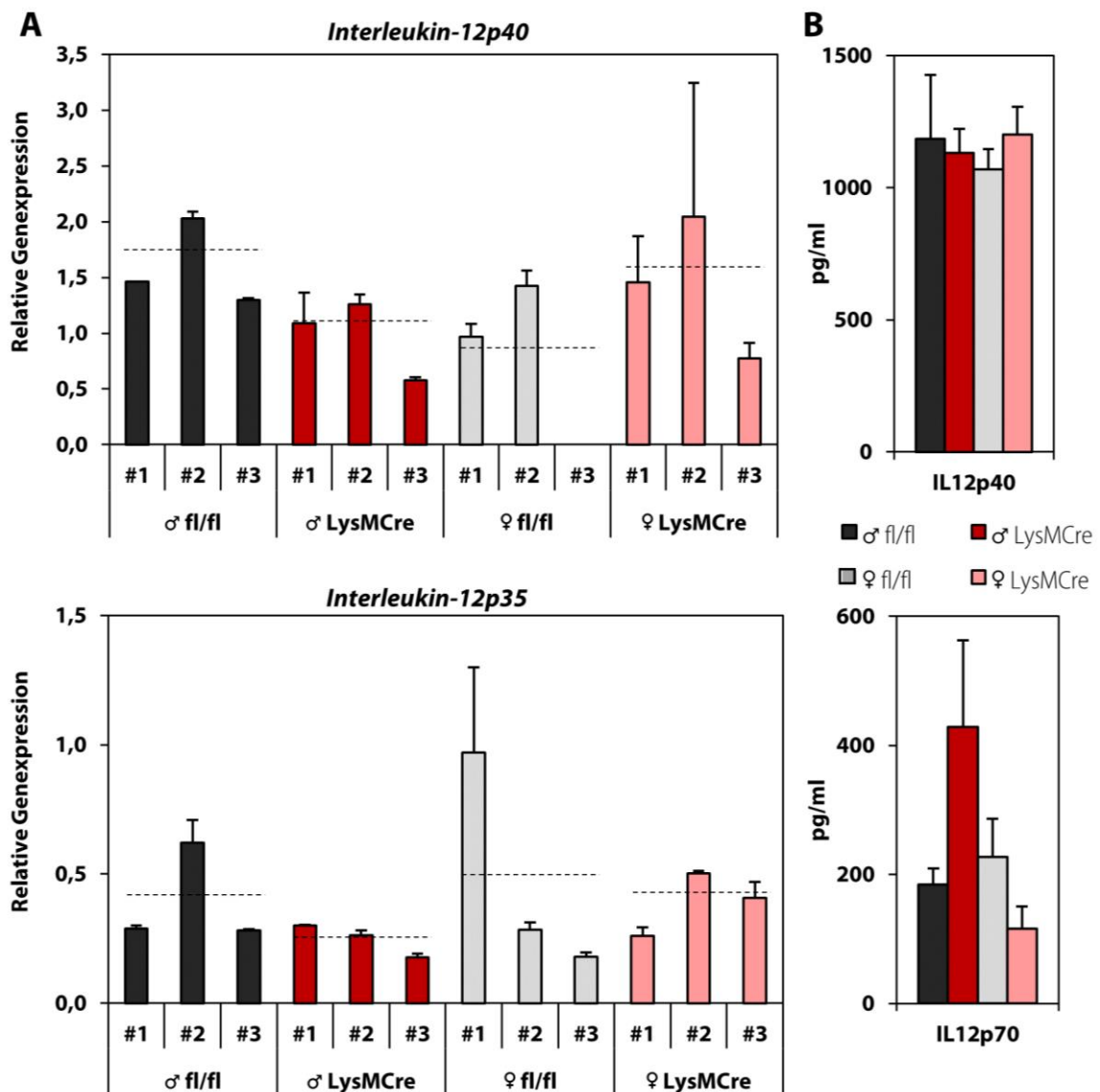
(A) Knochenmarksmakrophagen der *Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup>-Mäuse wurden nach vierstündiger LPS-Stimulation im Durchflusszytometer auf die Oberflächenmarker CD86, CD40 und CD11c untersucht. Der Median zeigt die Expression von CD86, CD40 und CD11c an. Als Kontrolle dienten ungefärbte Zellen (*unstained*), das Versuchsergebnis wurde noch nicht reproduziert. (B) Die Behandlung mit LPS induzierte weiterhin eine erhöhte Cytokinsekretion der BMMΦ in das Zellkulturmedium im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (CTL). Die Konzentration der Cytokine wurde mit einem ELISA in Duplikaten ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung von einem aus drei Experimenten.

wirkt reprimierend auf die Transkription von IL-10. Während die Sekretion von IL-10 in den SIRT6-defizienten Zellen unter LPS-Stimulation höher war (vgl. Abb 3-22B), sank die *Rev-Erba*-Expression unabhängig von Geschlecht und Genotyp stark ab (Abb. 3-23A). Vor der Behandlung mit LPS gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen BMMΦ aus weiblichen und männlichen *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>- und *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>XLysMCre-Mäusen. Nach der Behandlung mit LPS zeigte sich in den Männchen eine leichte Reduktion der Expression bei Fehlen von SIRT6, bei den Weibchen hingegen ein Anstieg. Ebenso verhielt sich die IL-10-Expression (Abb. 3-23B). Interleukin 10 gehört zu den antiinflammatorischen Cytokinen, die aggressive Immunabwehrreaktionen eindämmen.<sup>242-244</sup> Das Interleukin IL-12p70 gehört wiederum zu den proinflammatorischen Cytokinen, die die Abwehr von Krankheitserregern vorantreiben. Es ist ein Heterodimer und setzt sich aus den Untereinheiten **IL-12p40** und **IL-12p35** zusammen. Die IL-12p40-Untereinheit wiederum



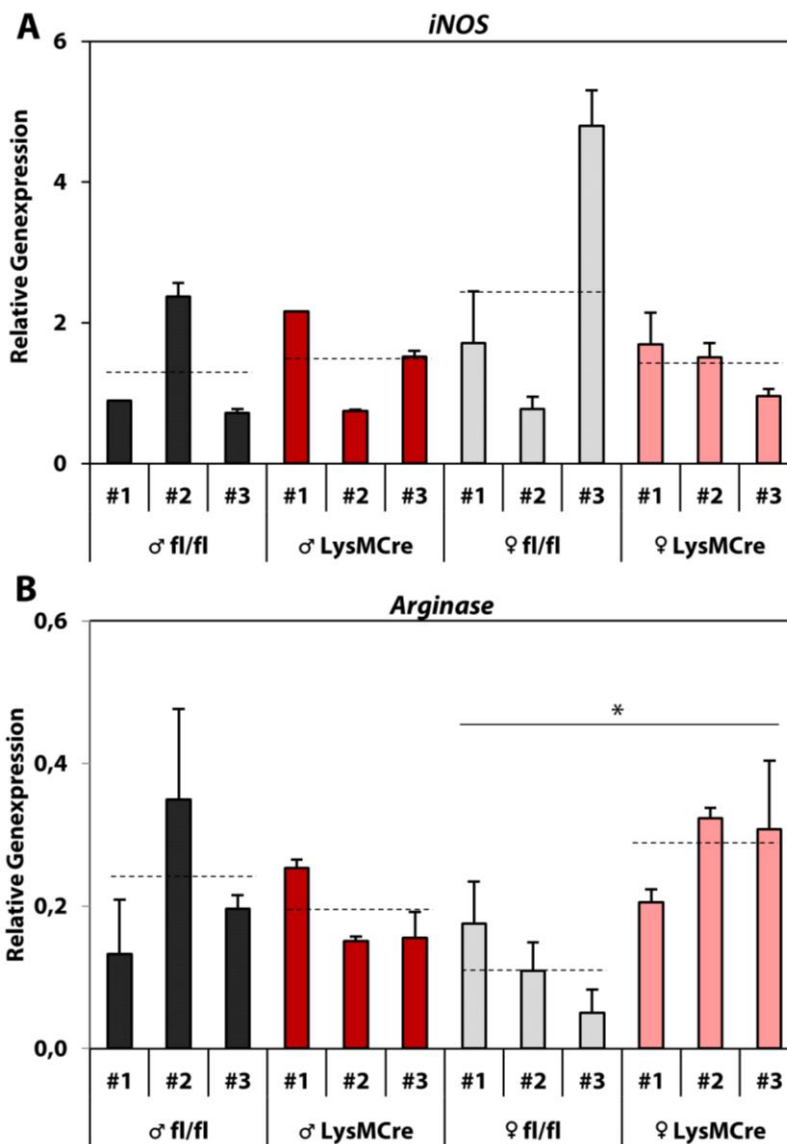
**Abb. 3-23: *Rev-Erba*- und *IL-10*-Expression in SIRT6-defizienten und wildtypischen Knochenmarksmakrophagen (BMMΦ) nach LPS-Behandlung.**

Es wurden BMMΦ aus drei Mäusen (N=3, 3 Monate alt) je Geschlecht und Genotyp generiert und für 4h mit 10ng/mL LPS behandelt. Die Genexpression wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR in Duplikaten untersucht und mit der Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  im Verhältnis zu *RPII* ausgewertet. (A) *Rev-Erba*-Expression vor und nach Behandlung mit LPS (4h, 10ng/mL). Gezeigt sind die Mittelwerte der drei Mäuse mit der Standardabweichung; \* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\* $p \leq 0,001$  nach Student. Nach LPS-Behandlung waren die *Rev-Erba*-Expression (B) und die Expression von *IL-10* (C) in den männlichen und weiblichen SIRT6-defizienten BMMΦ verändert. Gezeigt sind die Mittelwerte der technischen Duplikate jeder Maus mit der Standardabweichung. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert an.



**Abb. 3-24: Expression und Sekretion von IL12p40 und IL12p70 durch Knochenmarksmakrophagen (BMMΦ) konditionaler SIRT6 KO-Mäuse nach LPS-Behandlung.**

(A) Es wurden BMMΦ aus drei Mäusen (N=3) je Geschlecht und Genotyp generiert und für 4h mit 10ng/mL LPS behandelt. Die Genexpression von *IL-12p40* und *IL-12p35* wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR in Duplikaten untersucht und mit der Formel  $2^{-\Delta Ct}$  im Verhältnis zu *RPII* ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte der technischen Duplikate jeder Maus mit der Standardabweichung. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert an. (B) Die Cytokinsekretion wurde mittels ELISA im Blutserum 12 Monate alter Mäuse untersucht. Dazu wurde das Serum von drei Mäusen bei IL-12p40 (N=3) bzw. zwei Mäusen bei IL-12p70 (N=2) untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte der Mäuse mit dem Standardfehler.



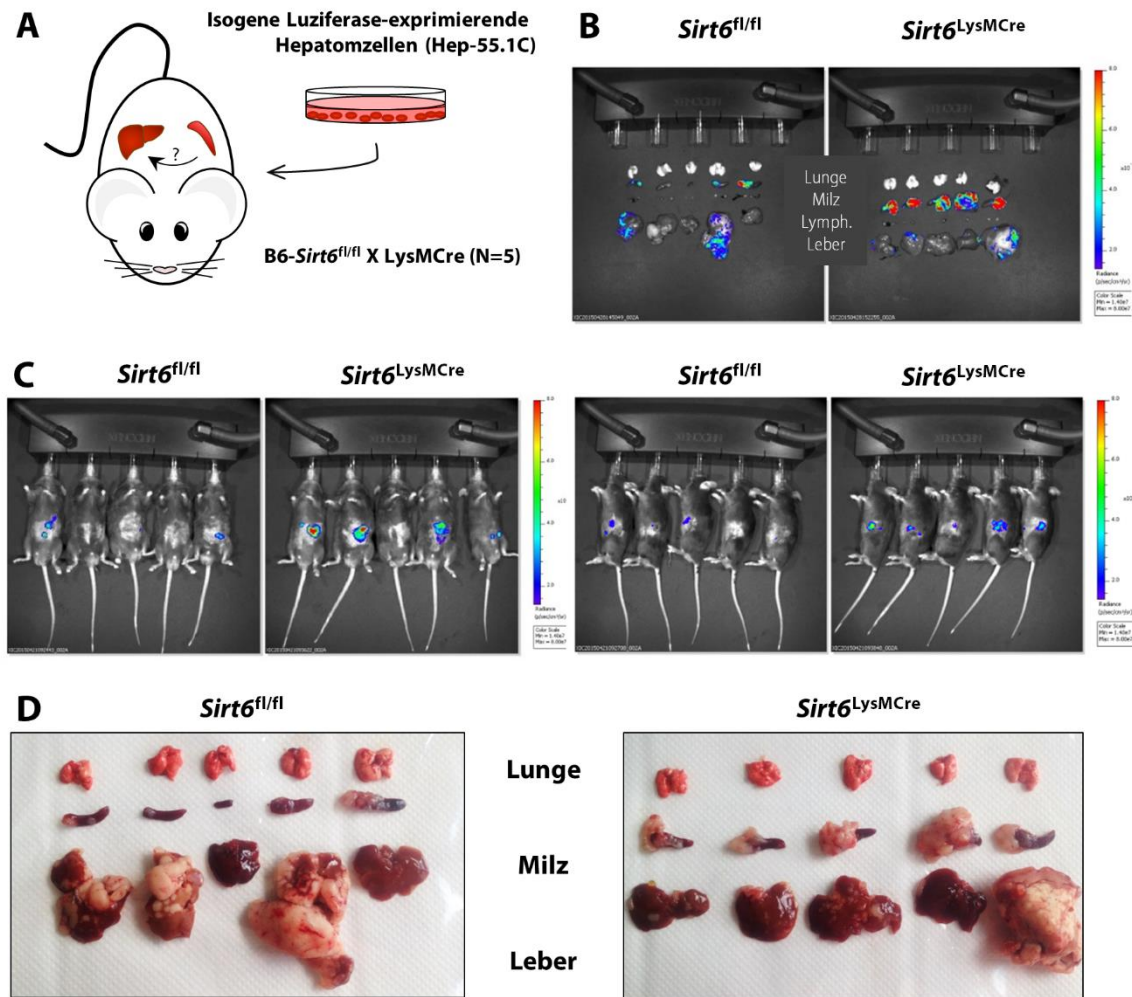
**Abb. 3-25: Analyse der Makrophagenpolarisierungsmarker *iNOS* und *Arginase* in Abhängigkeit von *SIRT6*.**

Es wurden BMM $\Phi$  aus drei Mäusen (N=3) je Geschlecht und Genotyp generiert und für 4h mit 10ng/mL LPS behandelt. Die Genexpression wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR in Duplikaten untersucht und mit der Formel  $2^{-\Delta Ct}$  im Verhältnis zu *RPII* ausgewertet. Die Expression der (A) induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (*iNOS*) verhielt sich invers zur Expression der (B) *Arginase*.

kann sich als dysfunktionales Homodimer zusammenlagern, das den Rezeptor blockt und damit indirekt antiinflammatorisch wirkt.<sup>228,229</sup> Die Expression der IL-12p40–Untereinheit war in den Männchen bei SIRT6-Defizienz vermindert, in den Weibchen erhöht (**Abb. 3-24A**). Sie entsprach damit tendenziell der Expression des antiinflammatorischen IL-10. Die IL-12p35–Untereinheit war in den *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*XLysMCre-Männchen ebenfalls geringer exprimiert, in den *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*XLysMCre-Weibchen aber leicht höher. Die Expression in der RT-PCR glich in etwa der Cytokinkonzentration im Serum zwölf Monate alter Mäuse. Vergleicht man die IL-12p40– und IL-12p70–Konzentration im ELISA, verhalten sich IL-12p70 und IL-12p40 exakt invers: Während das pro-inflammatorische IL-12p70 in den *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*XLysMCre-Männchen stark erhöht ist, ist es im Serum der *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*XLysMCre-Weibchen vermindert (**Abb. 3-24B**). Für IL-12p40 ergab sich ein leichtes Absinken der Cytokinsekretion in den *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*XLysMCre-Männchen, ein leichter Anstieg bei den *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*XLysMCre-Weibchen. Die Diskrepanz zwischen der Genexpression von IL-12p35 und der IL-12p70–Serumkonzentration in den Männchen, könnte am unterschiedlichen Alter der Tiere liegen. Die Sekretion von Cytokinen kann von der Polarisierung der Makrophagen abhängen. Es wurde daher die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (**iNOS**), die besonders in M1-Makrophagen exprimiert wird, und deren Gegenspieler **Arginase** untersucht. Die Expression der Arginase lag in den *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*XLysMCre-Weibchen signifikant erhöht vor, in den *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*XLysMCre-Männchen etwas erniedrigt (**Abb. 3-25**). Die Expression von iNOS verhielt sich erwartungsgemäß gegenläufig.

Zusammenfassend konnte eine erhöhte Zahl an CD11b<sup>+</sup>- und F4/80<sup>+</sup>-Immunzellen, also myeloiden Zellen, in der Leber von *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*XLysMCre-Mäusen gefunden werden. Die Neutrophilie, Lymphopenie und Monozytose in den weiblichen *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*XLysMCre-Mäusen und den Mäusen mit systemischem SIRT6 KO deutet auf eine Verschiebung der Immunantwort von lymphoiden Zellen zu myeloiden Zellen hin. Bei genauerer Betrachtung der Makrophagenpopulation fiel in den weiblichen Mäusen bei Fehlen von SIRT6 das leicht veränderte Expressionsprofil, hin zu einem antiinflammatorischen Phänotypen und einer M2-Polarisierung, auf. Die Polarisierung zu M2-Makrophagen und die damit verbundene antiinflammatorische, gewebeprotective Wirkung können mit einer Tumortoleranz einhergehen.





**Abb. 3-26: Isotransplantation der Hepatomzelllinie Hep-55.1c in die Milz von konditionalen SIRT6 KO-Mäuse ( $B6-Sirt6^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ ).**

(A) Isogene Luziferase-exprimierende Hepatomzellen (Hep-55.1c) wurden in Zusammenarbeit mit Henry Alizor und Nataliya Zhivkova in die Milz der jeweils fünf männlichen konditionalen SIRT6 KO-Mäuse und der Kontrollmäuse (N=5, 2-3 Monate alt) gespritzt und die Infiltration dieser in die Leber untersucht. (B) Nach 32 Tagen wurden folgende Organe der Mäuse entnommen und auf die Lumineszenz der Hep-55.1c überprüft: Leber, Lunge, Milz und Lymphknoten (Lymph.). (C) Die Lumineszenz wurde bereits nach 25 Tagen bei der *in vivo*-Messung untersucht. (D) Die entnommenen Organe wurden zudem auch im Lichtbild aufgenommen.

Auf der Basis dieser Ergebnisse zu Neutrophilie und Makrophagenpolarisierung und der Ergebnisse aus dem Projekt von Nataliya Zhivkova sollte in einem Isotransplantationsversuch die Tumortoleranz von Mäusen mit SIRT6-defizienten myeloiden Zellen eruiert werden. Es wurden zusammen mit Henry Alizor und Nataliya Zhivkova Luziferase-exprimierende murine Hepatomzellen (Hep55.1c) in die Milz von jeweils fünf männlichen drei Monate alten *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*- und *Sirt6<sup>fl/fl</sup>XLysMCre*-Mäusen transplantiert und das Tumorwachstum nach 4, 18, 25 und 32 Tagen detektiert (**Abb. 3-26A+C**). Dazu wurde den Mäusen Luziferin gespritzt und die Biolumineszenz gemessen. An Tag 32 wurden die Mäuse nach der Messung präpariert und es wurden Leber, Milz, Lymphknoten und Lunge entnommen und auf Hep55.1c-Zellen untersucht (**Abb. 3-26B**). Zusätzlich wurden die Organe als Lichtbild aufgenommen (**Abb. 3-26D**). Es war deutlich zu erkennen, dass in den *Sirt6<sup>fl/fl</sup>XLysMCre*-Mäusen die Hepatomzellen mehr in der Milz verblieben und weniger in die Leber wanderten als in den *Sirt6<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen. Lunge und Lymphknoten waren im Makroskopischen nicht befallen. Aussagen zur tumoriziden Aktivität von SIRT6-defizienten myeloiden Zellen in den *Sirt6<sup>fl/fl</sup>XLysMCre*-Männchen können also nur gewebespezifisch getroffen werden.

## 4. Diskussion

### 4.1. Sirtuine als epigenetische Stellschrauben der Circadianen Rhythmik

#### 4.1.1. Veränderte Histonmodifikationen am RORE

Die Ergebnisse in Abbildung 3-1 zeigen eine signifikant veränderte Expression der CCGs *Bmal1*, *Cry1*, *Per2*, *Rev-Erb $\alpha$*  und *Rora* in der Mausleber bei SIRT6-Defizienz. Circadiane Gene, die keine signifikante Änderung aufwiesen, aber — vor allem zum Zeitpunkt ZT2 — eine tendenzielle Veränderung bei SIRT6-Defizienz zeigten, waren *Cry2*, *Per1* und *Per3*, deren Expression in SIRT6 KO-Lebern bei ZT2 etwas erhöht war, und *Clock*, dessen Expression für ZT2 im Wildtyp höher lag.<sup>240</sup> Bei allen Genen handelte es sich nicht um einen Verlust der Expression oder eine einheitliche Verschiebung, sondern um eine genabhängige **Veränderung der Expressionsamplitude, -phase oder -frequenz**. Da SIRT6 eine Histondeacetylasefunktion besitzt, lag eine Analyse der Histonacetylierung an der Promotorregion der CCGs nahe. Einige CCGs weisen sowohl ein RORE als auch eine E-Box auf, was dem Körper eine Feinjustierung der Circadianen Rhythmik und — bei Ausfall einer der Promotorregionen — eine Kompensation ermöglichen könnte. Es wurde die RORE-Sequenz, die in der Promotorregion von *Bmal1* und *Rev-Erb $\alpha$*  liegt,<sup>140</sup> gewählt und die Acetylierung von H3K9 als aktivierender Histonmarker und im Vergleich die Trimethylierung von H3K27 als inhibierender Histonmarker an dieser Stelle zu den Zeitpunkten ZT2 und ZT10 untersucht. Es ergab sich für beide Gene eine Reduktion der H3K9-Acetylierung am RORE in SIRT6 KO-Lebern bei ZT2, aber eine deutlich verstärkte Acetylierung bei ZT10 (Abb. 3-4). Dies war zunächst aus zwei Gründen überraschend. Zum einen da BMAL1 ein transkriptionsaktivierender Faktor ist und REV-ERB $\alpha$  ein transkriptionshemmender Faktor ist, deren Expression gegenläufig oszilliert (Abb. 3-1) und an deren RORE-Sequenzen dennoch ein ähnliches Histonmodifikationsmuster zu

finden war. Eine Erklärung dafür wäre, dass die Histonacetylierung zunächst nur die Chromatinstruktur öffnet und damit die Bindung von aktivierenden und inhibierenden Transkriptionsfaktoren, von Methyltransferasen und Histon(de)acetylasen ermöglicht; sie allein sagt noch nichts über die tatsächliche transkriptionelle Aktivität am Locus aus. So war z. B. die Trimethylierung an Histon H3 bei SIRT6-Knockout am *Bmal1*- und *Rev-Erb $\alpha$* -RORE tendenziell invers, d. h. in den SIRT6-defizienten Lebern am *Rev-Erb $\alpha$* -RORE bei ZT2 leicht erhöht, bei ZT10 etwas erniedrigt, während am *Bmal1*-RORE die Trimethylierung bei ZT2 erhöht und bei ZT10 verringert war. Dies könnte ein Auslöser für die unterschiedliche Expression sein. Zum anderen mag es überraschend sein, dass die Histonacetylierung zum Zeitpunkt ZT2 abnahm — bei Fehlen der Histondeacetylase SIRT6. Ein Grund dafür könnte sein, dass SIRT6 nicht die einzige Histondeacetylase am Promotor der CCGs ist. Masri *et al.* zeigte die **Aufgabenteilung der Sirtuine SIRT1 und SIRT6**, die beide die Expression oszillierender Gene regulieren: SIRT1 vorzugsweise am Tag, SIRT6 verstärkt in der Nacht.<sup>12</sup> Die Zahl an Signalwegen, die von beiden Sirtuinen beeinflusst werden, und Proteinen, die für eine Interaktion mit SIRT1 *und* SIRT6 bekannt sind, unterstützt diese Vermutung.<sup>27</sup> Da beide NAD<sup>+</sup>-abhängig sind, eine ähnliche Lokalisation und enzymatische Aktivität haben, könnte die Entscheidung, ob SIRT1 oder SIRT6 gebunden wird, von äußeren (Co-)Faktoren und Signalen wie der Tageszeit abhängen. Beispiele für Proteine, die mit beiden Sirtuinen in Zusammenhang gebracht werden, wären nicht nur die CCGs<sup>11,12</sup> und H3K9<sup>40,245</sup> sondern u. a. auch GCN5 und PGC-1 $\alpha$ ,<sup>55</sup> NF- $\kappa$ B<sup>60,246</sup> und HIF-1 $\alpha$ .<sup>54,247</sup>

#### **4.1.2. Posttranslationale Modifikationen von PGC-1 $\alpha$ und ROR $\alpha$**

Des Weiteren wurde die Bindung des transkriptionsaktivierenden Faktors ROR $\alpha$  am RORE von *Bmal1* und *Rev-Erb $\alpha$*  überprüft. Es zeigte sich eine tageszeitunabhängige Verminderung der Bindung in SIRT6-defizienten Mäusen, obwohl die erhöhte Acetylierung am RORE bei ZT10 eine Bindung erleichtern sollte und die Expression von BMAL1 zu diesem Zeitpunkt in den SIRT6 KO-Mäusen deutlich erhöht war (Abb. 3-1 (A) und 3-4). Die erhöhte Expression trotz verringerter ROR $\alpha$ -Bindung lässt auf weitere transkriptionsaktivierende Faktoren in SIRT6 KO-Mäusen schließen. Gründe für eine verringerte Bindung trotz euchromatischer Verhältnisse könnten eine verringerte (i) **Expression**, die (ii) **Kompetition** mit REV-ERB $\alpha$  am RORE sowie inhibierende

(iii) **Modifikationen von ROR $\alpha$**  oder seinem Co-Aktivatoren PGC-1 $\alpha$  sein. (i) Die Expression von *Rora* war in der SIRT6 KO-Leber bei ZT2 niedriger als in der wildtypischen Leber, was eine Erklärung für die geringere Bindung zu diesem Zeitpunkt sein könnte (Abb. 3-1). Zum Zeitpunkt ZT10 war die *Rora*-Expression allerdings in den SIRT6 KO-Lebern höher; es muss also einen anderen Grund für die verminderte Bindung bei ZT10 geben. (ii) Da die ChIP-Experimente mit REV-ERB $\alpha$  keine Ergebnisse lieferten, kann zur Konkurrenz keine Aussage getroffen werden. Allerdings ist die Expression von *Rev-Erba* in der SIRT6-defizienten Mausleber zum Zeitpunkt ZT10 deutlich verringert, was eine starke Konkurrenz mit ROR $\alpha$  unwahrscheinlich macht (Abb. 3-1). (iii) Die Detektion der Modifikationen von **Coaktivator PGC-1 $\alpha$**  durch GCN5 und von ROR $\alpha$  durch EZH2 wurden in Hepatoblastomzellen durchgeführt (Abb. 3-6+7). Auch kultivierte Zellen wiesen eine CCG-Expressionsänderung auf: Auch wenn keine Tageszeitabhängigkeit bestimmt werden konnte, war die Expression von BMAL1, REV-ERB $\alpha$  und ROR $\alpha$  in synchronisierten primären murinen Hepatozyten und HepG2-Zellen bei SIRT6-Defizienz erhöht (Abb. 3-1B-D und 3-5). Die BMAL1-Expression stimmte mit der Lumineszenzmessung des Luziferase-Reportergen-Assays überein, bei dem das Luziferase-Gen unter dem BMAL1-Promotor lag. Da bei einem Reportergen-Assay das Plasmid transient in die Zelle eingeführt und nicht ins Genom eingebaut wird, nehmen epigenetische Faktoren keinen Einfluss auf die Reporterexpression. Epigenetische Veränderungen konnten also nicht allein die Ursache für die Chronodisruption sein. Der Serumshock schien in den SIRT6-defizienten Hepatozyten eine allgemeine Induktion der CCG-Expression auszulösen. Er ermöglichte die Verwendung von Hepatozyten für *in vitro*-Versuche zum Studium der ROR $\alpha$ - und PGC-1 $\alpha$ -Modifikationen. Laut Dominy *et al.* deacetyliert SIRT6 GCN5 und erhöht damit dessen enzymatische Aktivität, was wiederum zu einer verminderten PGC-1 $\alpha$ -Acetylierung führt und dessen transkriptions-aktivierende Tätigkeit senkt.<sup>55</sup> Fehlt SIRT6 ist also zu vermuten, dass PGC-1 $\alpha$  ROR $\alpha$  verstärkt aktiviert und die Transkription von ROR $\alpha$ -regulierten Genen ansteigt. Dies könnte die erhöhte BMAL-Expression in serumgeschockten, SIRT6-defizienten Hepatozyten erklären. Die Proteinexpression von PGC-1 $\alpha$  zeigte keine SIRT6-Abhängigkeit, ein Proximitäts-Ligations-Assay von PGC-1 $\alpha$  und acetyliertem Lysin ergab allerdings eine erhöhte Acetylierung von PGC-1 $\alpha$  in SIRT6 KO-Zellen (Abb. 3-6), was der von Dominy *et al.* aufgestellten These widerspricht. Die Inhibition von GCN5 durch Butyrolacton-3 in

primären murinen Hepatozyten führte zu einem signifikanten Anstieg der *Rev-Erbα*-Expression sowohl in wildtypischen als auch in SIRT6-defizienten Zellen, aber nicht zu der erhöhten Expression von *Bmal1*. Die Expression von *Rev-Erbα* war unter Behandlung mit Butyrolacton-3 in den SIRT6-defizienten Zellen geringer als in den wildtypischen Zellen, während die *Bmal1*-Expression in den SIRT6-defizienten Zellen unter gleichen Konditionen höher lag als im Wildtyp. Würde man aufgrund des starken Effekts der Butyrolactonbehandlung davon ausgehen, dass die GCN5-Inhibition hauptsächlich auf die *Rev-Erbα*-Expression wirkt und die leichte Expressionsänderung von *Bmal1* ausschließlich eine Folge davon ist, deckt sich die verminderte Expression bei Fehlen von SIRT6 mit der erhöhten, inhibierenden PGC-1α-Acetylierung. Es sollte allerdings berücksichtigt werden, dass hier weder die Inhibition von GCN5 durch Butyrolacton-3 noch der Zusammenhang von GCN5 und PGC-1α validiert, sondern aus der Literatur übernommen wurde. Ein wichtiger nächster Schritt wäre daher die Behandlung der Zellen mit Butyrolacton-3 und die anschließende Bestimmung der Acetylierung von PGC-1α im Proximitäts-Ligations-Assay. Der geringe Effekt von Butyrolacton-3 in den HepG2-Zellen könnten an der Entartung der Hepatoblastomzellen in einigen Signalwegen liegen. Diese Ergebnisse sind allerdings vorläufig und müssen zum Teil noch validiert werden.

#### **4.1.3. Retinsäure als Modulator der CCGs über EZH2**

Der **PRC2 mit Untereinheit EZH2** ist wie die Sirtuine an der Modifikation von Histonen und der epigenetischen Transkriptionsregulation beteiligt. Zusammen mit den Komponenten des PRC2 trimethyliert es Histon H3 an Lysinrest 27 z. B. in der Promotorregion der Retinsäure-abhängigen Gene *RARβ2*, *HOX-A1* und *CYP26A1*, die eine RARE-Sequenz enthält.<sup>194</sup> Außerdem monomethyliert es RORα und markiert es damit für den proteasomalen Abbau.<sup>195</sup> Die Expression von EZH2 war tendenziell in den SIRT6-defizienten Hepatozyten erhöht, seine Expression sank unter Retinsäurebehandlung leicht ab (Abb. 3-7B), was einen Rückkopplungsmechanismus darstellen könnte. Der Proximitäts-Ligations-Assay von RORα und monomethylierten Lysinresten ergab eine Zunahme der RORα-Methylierung, die mit der erhöhten EZH2-Expression korrelierte. Die Proteinexpression von RORα zeigte einen leichten Anstieg von wildtypischen zu SIRT6 KO-Zellen; die Genexpression von RORα war erhöht und könnte ein Hinweis auf den Ausgleich des vermehrten Abbaus sein. Wurden primäre Hepatozyten mit GSK343, einem Inhibitor für EZH2, behandelt, zeigte die Expression der CCGs nur eine geringfügige

SIRT6-Abhängigkeit. Behandelte man Hepatomzellen mit ATRA stieg die Expression der **Retinsäure-assoziierten Gene** erwartungsgemäß an — in den SIRT6-überexprimierenden Zellen stärker als in der Kontrolle (Abb. 3-8), was mit der geringeren EZH2-Expression und der daraus resultierenden verminderten H3K27-Trimethylierung in Verbindung stehen könnte. Die Induktion der RARE-enthaltenden Gene durch ATRA konnte auch im Reporter-gen-Assay nachgewiesen werden, in dem sich auch eine leicht erhöhte Lumineszenz in SIRT6-überexprimierenden Zellen zeigte. Die zusätzliche Inhibition von EZH2 mit GSK343 ließ die Genexpression wie schon bei den CCGs absinken und zeigte ebenfalls keine SIRT6-Abhängigkeit. Die verringerte Promotoraktivität bei Inhibition von EZH2 ist nicht schlüssig, weitere Experimente z. B. genauere Analysen der Histonmodifikationen an den charakteristischen Promotorsequenzen sind notwendig. Zudem wurde die Inhibition von EZH2 durch GSK343 nicht überprüft. Wie in der Einleitung erwähnt, wird Retinsäure in der Krebstherapie verwendet.<sup>193</sup> Hier wurde die Tumorzidität an Hepatomzellen mit und ohne SIRT6-Überexpression getestet und zeigte nach sechstägiger Behandlung einen lethalen Effekt, der durch die SIRT6-Überexpression vermindert werden konnte. Die Verbindung der Sirtuine zu EZH2 und dem PRC2 ist noch nicht geklärt. Das Sirtuin-abhängige Gleichgewicht von Hetero- und Euchromatin durch Histondeacetylierung und -acetylierung könnte sowohl die Expression von EZH2 als auch die Zugänglichkeit der DNA für die Histontrimethylierung durch EZH2 beeinflussen. Des Weiteren könnten die Sirtuine direkt mit EZH2 interagieren und es modifizieren. Bisher ist z. B. eine Acylierung von EZH2 mit N-Acetylglucosamin durch die *O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase* (OGT) bekannt, die EZH2 stabilisiert und die Trimethylierung an H3K27 erhöht.<sup>248</sup> Eine Acylierung von EZH2 durch Sirtuine wäre daher ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

## **4.2. Chronische Entzündungen als mögliche Folge der SIRT6-bedingten Chronodisruption**

### **4.2.1. Immunologischer Alterungsphänotyp bei SIRT6 KO**

Die Chronodisruption bei Fehlen von SIRT6 wirkte sich auch auf den Metabolismus aus. So zeigte z. B. *Dbp* eine signifikant veränderte Oszillation in der Leber von SIRT6 KO-Mäusen (Abb. 2-1). Möglicherweise führt dies zu einer Änderung der circadianen Insulinproduktion, die nach Allaman-Pillet *et al.* in der Entstehung von Diabetes

resultieren könnte. Denn interessanterweise verlieren auch Patienten mit Diabetes Typ 2 die tageszeitabhängige Expression von Insulin.<sup>115</sup> DBP reguliert zudem die Expression von *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)/hypoxia inducible factor-1  $\beta$*  (HIF-1 $\beta$ ), das mit HIF-1 $\alpha$  zusammen den hypoxischen Zustand einer Zelle detektiert, und dessen Expression mit der Dysfunktion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas und somit der Entstehung von Diabetes zusammenhängen könnte.<sup>249</sup> Eine Verbindung zwischen Diabetes und der Insulinsekretion — in engem Zusammenhang mit der Melatoninproduktion — sehen auch Peschke *et al.* Sie beschreiben, dass die Insulinsekretion zu Beginn einer Diabetes Typ 2-Erkrankung steigt, während der Melatoninspiegel absinkt, es sich hingegen bei Diabetes Typ 1 genau umgekehrt verhielt.<sup>109</sup> **Insulin und Melatonin** zeigten in dieser Arbeit einen leichten SIRT6-abhängigen Einfluss auf die Expression von BMAL1 in Hepatozyten (Abb. 3-9). Passend dazu wies der Blutzucker der untersuchten Mäuse eine Tageszeitabhängigkeit auf und verhielt sich in den SIRT6-defizienten Mäusen exakt invers zu den wildtypischen Tieren. Sirtuine scheinen also möglicherweise eine Rolle in der Entstehung von Diabetes mellitus zu spielen.<sup>250</sup>

Seit einiger Zeit wird vermutet, dass die Pathogenese von Diabetes Typ 2 aus einer inadäquaten **Reaktivität des angeborenen Immunsystems** resultiert.<sup>251</sup> Die Studien dieser Arbeit in Mäusen mit systemischem SIRT6 Knockout und konditionalem SIRT6 Knockout in Makrophagen zeigten eine Verschiebung der Immunzellpopulationen von lymphoiden Zellen zu myeloiden Zellen. Dies äußerte sich beispielsweise in einer Neutrophilie, einer Lymphopenie und einer Monozytose im Blut der Mäuse (Abb. 2-3 und 3-16). Dies entspricht einer verstärkten Reaktivität des angeborenen Immunsystems auf Kosten des adaptiven Immunsystems und wird oft mit **chronischen Entzündungen** und Alterung assoziiert.<sup>252</sup> Auch das verstärkte Vorkommen von CD11b<sup>+</sup>- und F4/80<sup>+</sup>-Zellen in der Leber der 6 Monate alten konditionalen SIRT6-Mäuse weist auf eine chronische Entzündung, eine frühzeitige Verlagerung der Immunzellpopulationen und einen „**progeroid-immunologischen Phänotyp**“ hin, da in den Kontrollmäusen erst die 18 Monate alten Mäuse eine Akkumulation von Immunzellen in der Leber aufwiesen (Abb. 3-15 und 3-20).

#### **4.2.2. M2-Polarisierung von SIRT6 KO-Makrophagen**

Eine genauere Untersuchung der myeloiden Zellen zeigte in weiblichen Mäusen eine tendenzielle **Polarisierung der Makrophagen** in M2-Makrophagen, die eher



immunregulatorisch als inflammatorisch wirken und vermehrt bei chronischen Entzündungen auftreten.<sup>231</sup> Die Feststellung der Polarisierung der Makrophagen erfolgte aufgrund der Genexpression von iNOS und Arginase (Abb. 3-25), die von HIF-1 $\alpha$  resp. HIF-2 $\alpha$  kontrolliert wird.<sup>253</sup> Die M1-Polarisierung wird durch die iNOS-Expression ausgelöst, die in der Ausschüttung von Stickstoffmonoxid und proinflammatorischer Cytokine resultiert, während die Arginaseexpression in die gewebeprotective M2-Richtung polarisiert (Abb. 1-4). Es waren daher folgende Cytokine von besonderem Interesse: IL12p40, da es mit IL-12p35 ein proinflammatorisches IL-12(p70) bildet, aber auch als antagonistisches Homodimer und in Verbindung mit p19 als proinflammatorisches IL-23 wirken kann.<sup>228,254</sup> Die Expression von IL-12p40 ist circadian und wird vermutlich durch **REV-ERB $\alpha$**  reguliert.<sup>224</sup> Weiterhin ist IL-10 interessant, da es eine Rolle als immunregulatorischer Gegenpol zum proinflammatorischen IL-12p70 spielt und ebenfalls eine REV-ERB $\alpha$ -Bindestelle im Promotor besitzt.<sup>225</sup> Unter LPS-Stimulation sank die Expression des transkriptionsinhibierenden REV-ERB $\alpha$  in Knochenmarksmakrophagen ab und die Cytokinsekretion stieg als Reaktion auf das Lipopolysaccharid, das eine bakterielle Infektion simuliert, an (Abb. 3-23). Die SIRT6-defizienten Zellen sekretierten mehr IL-10 und IL-12p40 als die wildtypischen Zellen. In den konditionalen Mäusen verhielt es sich in den Weibchen wie in den Mäusen mit systemischem SIRT6-Knockout. Die Expression und Sekretion von IL-12p35 verhielt sich hier invers zu der von IL-12p40 (Abb. 3-24). Die männlichen Mäuse verhielten sich tendenziell gegenläufig zu den Weibchen — die Ursache hierfür bleibt herauszufinden. Zur Verdeutlichung der erhaltenen Ergebnisse müssten die entsprechenden Versuche mit einer größeren Zahl an Mäusen wiederholt werden.

Zudem konnte eine erhöhte **IL-17-Sekretion von Milzzellen** bei Stimulation mit Concanavalin A oder durch die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu T<sub>h</sub>17-Zellen bei Fehlen von SIRT6 festgestellt werden (Abb. 3-19). Die Differenzierung von T<sub>h</sub>17-Zellen wird von **ROR $\alpha$**  reguliert, dessen Expression in SIRT6-defizienten Milzzellen deutlich erhöht und fluktuierend vorlag. Das Gewicht der Milz war in den Weibchen bei konditionalem Knockout von SIRT6 in Makrophagen erhöht (Abb. 3-17). Dies könnte in Zusammenhang mit Stress und einer erhöhten Corticosteroidausschüttung der Nebenniere stehen.<sup>255</sup> Die Sekretion von Corticosteroiden folgt einem Circadianen

Rhythmus und beeinflusst u.a. auch das Immunsystem.<sup>96</sup> Beide Populationen, IL-17–produzierende T-Zellen sowie IL-23–produzierende Makrophagen, könnten eine **Neutrophilenrekrutierung** und dadurch eine Neutrophilie und Infiltration ins Gewebe verursachen.<sup>256</sup> Im Zusammenhang mit den genannten Zelltypen wird auch eine Funktion in der Tumorentstehung und -bekämpfung diskutiert. Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) und Neutrophile (TAN) gehören zum Mikromilieu eines Tumors und haben trotz ihrer Funktion in der Immunabwehr nicht gezwungenermaßen einen tumoriziden Effekt. Wie bei vielen Faktoren im Immunsystem sind die Mechanismen komplex und nicht einseitig: TANs können Tumorzellen über ROS abtöten, allerdings können ROS auch mutagen wirken und die Entartung begünstigen. TAM sind eher M2-polarisiert und sekretieren sowohl IL-10 als auch immunregulatorische Faktoren. Außerdem erleichtern sie den Gewebeumbau und die Angiogenese. Dieser gewebeprotective Charakter der Zellen ist hilfreich um eine lebensbedrohliche Entzündungsreaktion einzudämmen, wirkt aber keineswegs tumorizid.<sup>257</sup> Zur Untersuchung der **Tumorizität der myeloiden Zellen** mit und ohne SIRT6 auf Basis der Daten dieser Arbeit und der Arbeit von Nataliya Zhivkova wurde ein Isotransplantationsversuch durchgeführt (Abb. 3-26). Die transplantierten Zellen wanderten in den Kontrollmäusen in die Leber ein und bildeten dort Tumore aus, während sie in den Mäusen mit SIRT6 Knockout in myeloiden Zellen stärker in der Milz verblieben. Eventuell hindert der leicht proinflammatorische Phänotyp in den konditionalen SIRT6-defizienten Männchen die Hepatomzellen an deren Relokalisierung, doch um eine genauere Aussage treffen zu können, müssten unterstützende Experimente wie ein Serum-Cytokin-Array und die Untersuchung der befallenen Organe z. B. durch (Immunfluoreszenz-)Färbung durchgeführt werden.

#### **4.2.3. Frühzeitige Alterung bei Fehlen von SIRT6 und bei Chronodisruption**

Sirtuine bilden also eine Brücke von der Circadianen Rhythmik zum Immunsystem und zum Metabolismus. Ihre enzymatische Aktivität wird wiederum von metabolischen Faktoren wie NAD<sup>+</sup> und freien Fettsäuren reguliert, die auch die Circadiane Rhythmik beeinflussen. So verändert eine fettreiche Diät die Circadiane Rhythmik in Mäusen.<sup>258</sup> Die Gabe von Myristinsäure zeigte jedoch in einem ersten Versuch nur einen leichten Einfluss auf die SIRT6-abhängige BMAL1-Expression (Abb. 3-9). Umgekehrt induziert *Fasting* bzw. *Calorie Restriktion* eine verstärkte Sirtuinaktivität und verlängert die Lebensdauer des Organismus.<sup>26</sup> Die Verschiebung von lymphoider zu myeloider Immunantwort ist ein

klassisches Charakteristikum des Alterungsprozesses. Außerdem gehören dazu u.a. die Verkrümmung des Rückgrats, z.B. eine Lordokyphose, eine verringerte subkutane Fettmasse und ein erhöhtes Krebsrisiko. Trifft man diese Merkmale bei jungen Säugern an, spricht man von einem progeroiden Phänotypen. Bei Fehlen der Sirtuine 1, 6 und 7 kommt es zu einer teils drastischen **Verkürzung der Lebensdauer** und bei SIRT6 Knockout zu einem progeroiden Syndrom.<sup>28</sup> Wie bereits in der Einleitung beschrieben handelt es sich dabei um einen Alterungsphänotyp in jungen Mäusen mit Verkrümmung der Wirbelsäule, weniger subkutanem Fett, chronischen Entzündungen und erhöhtem Krebsrisiko, der dem Phänotyp von BMAL1-defizienten Mäusen ähnelt. Eine intakte Circadiane Rhythmik steht auch in Zusammenhang mit einer funktionierenden Autophagie, die als Entsorgungs- und Recyclingsmaschinerie einen Anti-Aging-Effekt hat.<sup>161,166</sup> Als mögliche Regulatoren der circadianen Autophagie gelten PER2 und C/EBP $\beta$ .<sup>167,168</sup>

#### **4.2.4. Erhöhte PER2- und C/EBP $\beta$ -Expression im SIRT6 KO-Modell**

Die Untersuchung der Proteinexpression von **C/EBP $\beta$**  zeigte eine verstärkte Expression in der SIRT6-defizienten Leber und seine Expression war bei Fehlen von SIRT6 im Alter erhöht (Abb. 3-10B). Möglicherweise ist die erhöhte Expression eine Reaktion des Organismus auf eine unzureichende Autophagie, die durch die verstärkte C/EBP $\beta$ -Expression aktiviert werden soll. Einen Hinweis darauf könnte die in der Arbeitsgruppe durchgeführte Färbung von p62 in den primären murinen Hepatozyten der SIRT6 KO-Mäuse geben. In den SIRT6 KO-Zellen kam es zu einer Akkumulation von p62, was ein Zeichen für eine unzureichende Autophagie sein kann.<sup>259</sup> Auch die Genexpression von PER2 im Tagesverlauf hatte in den drei bis vier Wochen alten SIRT6 KO-Mäusen eine signifikante Änderung gezeigt. Nun sollte die Expression in Abhängigkeit des Alters der Mäuse getestet werden. Dazu wurden konditionale, Leber-spezifische SIRT6-defiziente Mäuse im Alter von etwa 2-3 und 12 Monaten zum Zeitpunkt ZT10 untersucht. Bei den drei Wochen alten Mäusen mit systemischem Knockout war die Expression zu diesem Zeitpunkt in Wildtyp und Mutante gleich, in den zwei Monate alten Mäusen war bereits ein leichter Anstieg der Genexpression in den SIRT6-defizienten Lebern zu verzeichnen. Bei den zwölf Monate alten Mäusen stieg die Expression in den Knockout-Lebern weiter an, während sie in den wildtypischen Lebern konstant blieb (Abb. 3-10C). Zur Evaluierung der **Expressionsregulation von PER2** durch SIRT6 wurden wie schon für BMAL1 und

REV-ERBa die Histonmodifikationen am PER2-Promotor zum Zeitpunkt ZT10 untersucht. Sowohl im Lebergewebe zum Zeitpunkt ZT10 als auch in primären Hepatozyten nach dem Serumschock war die H3K9-Acetylierung in drei von drei SIRT6-defizienten Proben erhöht, die H3K27-Trimethylierung war dagegen deutlich vermindert (Abb. 3-11). Interessant wäre es daher, eine Promotorstudie in den konditionalen Mäusen in Abhängigkeit des Alters durchzuführen, die möglicherweise Aufschluss über die Entstehung des progeroiden Phänotyps bei Chronodisruption geben könnte

#### **4.2.5. Regulation der PER2-Expression durch CRY1 und MYBBP1a**

Das CCG PER2 bildet mit **CRY1** einen Komplex, der wiederum den CLOCK:BMAL-Komplex inhibiert.<sup>137</sup> In den wildtypischen Mäusen ist die Expression von CRY1 und PER2 recht deckend, mit zwei Maxima jeweils bei ZT14 und ZT22 (Abb. 3-1). In den SIRT6 KO-Mäusen ist die Expression der Interaktionspartner phasenverschoben, sodass eine Komplexbildung und damit eine Inhibition des CLOCK:BMAL-Komplexes möglicherweise erschwert ist. Allerdings ist CRY1 nicht nur der Interaktionspartner von PER2, sondern reguliert auch dessen Expression über einen Komplex mit MYBBP1a, für das eine direkte Interaktion mit SIRT6 nachgewiesen wurde.<sup>180</sup> Diese direkte Interaktion konnte in einem ersten Immunpräzipitationsversuch in HepG2-Zellen bestätigt werden, zeigte allerdings keine Abhängigkeit von SIRT6 und muss noch reproduziert werden. Die Genexpression von CRY1 selbst war in SIRT6-defizienten Lebern verändert und die stark erhöhte H3K9-Acetylierung am CRY1-RORE deckte sich mit der erhöhten Genexpression in SIRT6 KO-Lebern zum Zeitpunkt ZT10 (Abb. 3-12). Weiterhin wurde die Proteinexpression und -lokalisierung von CRY1 untersucht. Da die CCGs zwischen Nukleus und Cytoplasma pendeln, kann auch ihre Lokalisation einen Einfluss auf die circadiane Transkription haben. CRY1 zeigte in den wildtypischen Lebern eine deutliche **tageszeitabhängige Lokalisation**: Zum Zeitpunkt ZT2 befand es sich vermehrt im Cytoplasma, zum Zeitpunkt ZT10 verstärkt im Zellkern. In den Lebern der SIRT6 KO-Mäuse schien es nur eine geringe Tageszeitabhängigkeit der CRY1-Lokalisation zu geben: Im Cytoplasma war die Proteinkonzentration zu beiden Zeitpunkten etwa gleich, im Nukleus stieg sie von ZT2 zu ZT10 minimal an (Abb. 3-13). Es wurden daher SIRT6-defiziente Hepatomzellen und ihre Kontrollzellen auf die Lokalisation des Kerntransportmarkers SUMO untersucht. Eine SUMOylierung kann durch die Familie der *Protein inhibitor of activated STAT* (PIAS) erfolgen.<sup>260</sup> Ein Mitglied der Familie, PIAS1, ist

ein potentieller Interaktionspartner von SIRT6.<sup>180</sup> Circadiane Gene, die bekanntermaßen SUMOyliert werden sind ROR $\alpha$ <sup>261</sup> und BMAL1,<sup>262</sup> was in beiden Fällen zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität führt. Die Verteilung von SUMO im Zellkern schien in den SIRT6-defizienten Zellen diffuser als in den Kontrollzellen. Dies könnte für eine veränderte Lokalisierung SUMO-gebundener Proteine bei Fehlen von SIRT6 sprechen. Zusammenfassend könnte also eine Interaktion von SIRT6 mit CRY1 und MYBBP1a für die veränderte PER2-Expression bei Fehlen von SIRT6 verantwortlich sein und somit einen Einfluss auf die gesamte Circadiane Rhythmik und den Mausphänotyp ausüben.

### 4.3. Weitergehende Interpretationen und Hypothesen

Die *Core Clock Genes* ROR $\alpha$  und REV-ERB $\alpha$  konnten in dieser Arbeit als mögliche SIRT6-abhängige Modulatoren des Immunsystems beschrieben werden und könnten einen Einfluss von SIRT6 in chronischen Entzündungen und immunologischen Alterungsprozessen nahelegen. Eine detaillierte Aufklärung der beschriebenen Mechanismen könnte Aufschluss über die Entstehung von Krankheiten geben und dadurch Wege für Therapieansätze eröffnen.

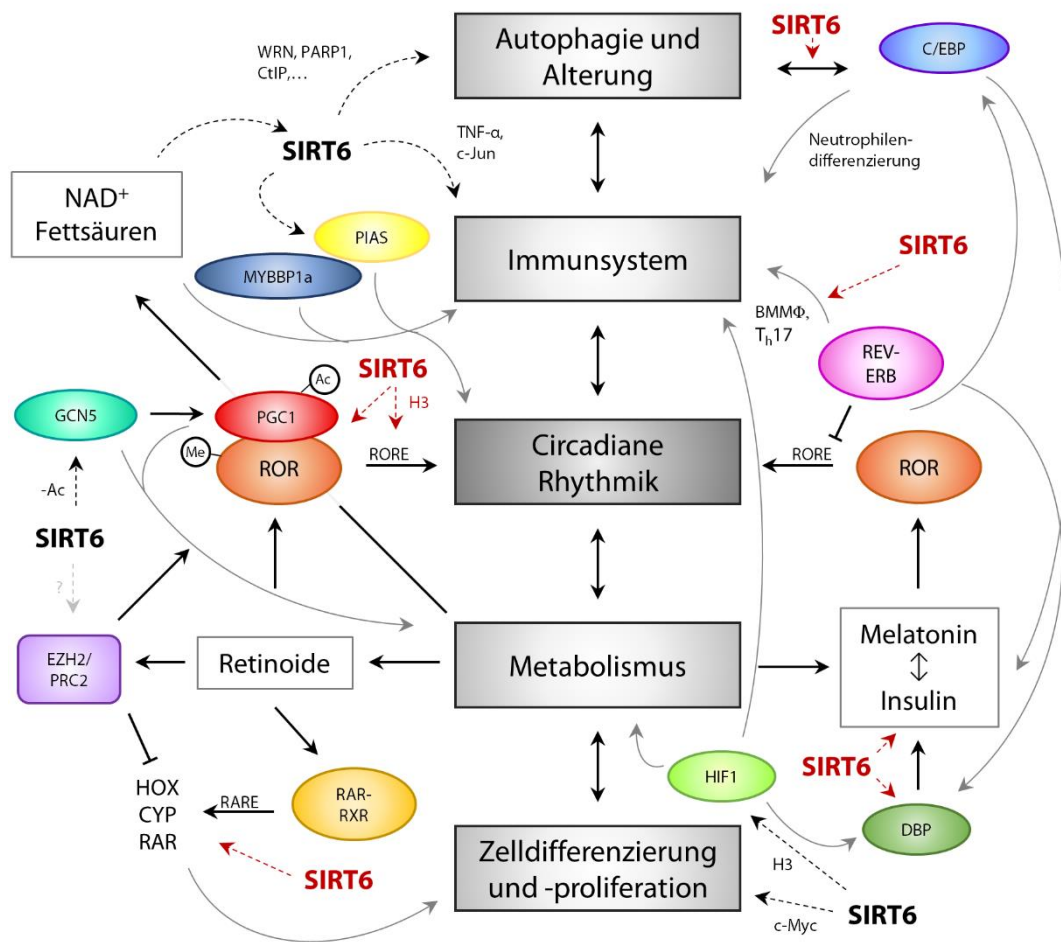
Weitere Ansatzpunkte für mechanistische Untersuchungen zur Aufklärung des degenerativen SIRT6 KO-Phänotyps könnten auch C/EBP $\beta$ , HIFs und Melatonin darstellen. Alle drei Faktoren besitzen wie die Circadiane Rhythmik ein breites Spektrum an Einflussmöglichkeiten auf Signalwege und die Genexpression. So ist C/EBP $\beta$  nicht nur wie oben genannt in die Circadiane Rhythmik und Autophagie involviert, sondern wird u. a. von IL-17 aktiviert, wodurch es zum einen eine Funktion in der Differenzierung von Neutrophilen ausübt,<sup>165,263</sup> zum anderen eine Aktivierung von Metalloproteinasen nach sich zieht und damit eine Fibrose verursachen kann.<sup>215</sup> Zudem bindet C/EBP $\beta$  an den Insulin-Promotor<sup>264</sup> und beeinflusst die Insulinsensitivität<sup>265</sup> sowie die Entstehung von Diabetes mellitus.<sup>266</sup> Weiterhin induziert es die PPAR $\gamma$ -Expression und die Adipogenese.<sup>164</sup> Die Familie der HIF-Proteine spielt ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese von Diabetes<sup>249</sup> und in der Regulation des Immunsystems. Sie beeinflussen das Verhältnis von T<sub>h</sub>17- und T<sub>reg</sub>-Zellen,<sup>267</sup> die Polarisierung von Makrophagen<sup>253</sup> und die Reaktivität anderer myeloider Zellen der angeborenen Immunantwort.<sup>268</sup> Sie konkurrieren zudem mit SIRT6 am Promotor glykolytischer Gene<sup>54</sup> und werden daher mit der Tumorgenese und dem

Tumorstoffwechsel in Verbindung gebracht.<sup>62,269</sup> Des Weiteren wurden Bindestellen für HIFs in der Promotorregion der CCGs gefunden<sup>146</sup> und hypoxischer Stress induzierte eine verstärkte ROR $\alpha$ -Expression in Hepatozyten.<sup>270</sup> Außerdem wurde eine direkte Interaktion von HIFs mit BMAL1 gezeigt.<sup>134</sup> Ein weiterer interessanter Faktor ist **Melatonin**, auf dessen Einfluss in Metabolismus, Autophagie, Epigenetik, Circadiane Rhythmik, Alterung und Krebsentstehung bereits Jenwitheesuk *et al.*<sup>271</sup> und Jung-Hynes *et al.*<sup>272</sup> eingegangen sind. Von letzteren wird bezüglich eines direkten Zusammenhangs von Sirtuinen, Melatonin und der Circadianen Rhythmik spekuliert. Interessanterweise bestehen auch viele Verbindungen zwischen dem SIRT6 KO-Phänotyp und dem **mTOR**-Signalweg, der u. a. von Insulin und TNF- $\alpha$  aktiviert wird. Er beinhaltet weiterhin NF- $\kappa$ B, PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$  und die HIF-Familie und beeinflusst dadurch Autophagie, Metabolismus und Zellwachstum.<sup>273</sup> Somit wäre mTOR ein weiterer Ansatzpunkt zur molekularbiologischen Ergründung der Ursache für die vielseitigen Auswirkungen der SIRT6-Defizienz.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Sirtuin 6 reguliert als ubiquitäre Deacetylase und ADP-Ribosyltransferase ein breites Spektrum an zellulären, vor allem epigenetischen Prozessen. Sein Fehlen induziert daher einen stark degenerativen, progeroiden Phänotyp in der Maus. Die SIRT6-defizienten Mäuse weisen eine verringerte Lebensdauer von nur wenigen Wochen sowie u.a. eine Kyphose, Osteopenie, Kolitis, Hypoglykämie, Fettleber und Lymphopenie auf. In dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen von SIRT6, die zu diesem Phänotyp führen könnten, genauer untersucht werden. Dazu wurde der Fokus auf die Circadiane Rhythmik gelegt, die die Transkription von etwa 10% des Genoms koordiniert und deren Fehlfunktion somit eine Vielzahl an Konsequenzen nach sich ziehen kann. So wurde z.B. ein erhöhtes Risiko zur Entstehung von Krebs und dem metabolischen Syndrom sowohl im chronodisruptiven Mausmodell als auch bei Schichtarbeitern oder Flugpersonal gefunden.

Die Expressionsanalyse der *Core Clock and Clock Controlled Genes* (CCGs), der Sturerelemente der Circadianen Rhythmik, ergab eine signifikante Chronodisruption mit Änderungen der Expressionsphase, -frequenz oder -amplitude in der Leber von SIRT6-defizienten Mäusen. Mittels Chromatin-Immunpräzipitation konnte in dieser Arbeit weiterhin gezeigt werden, dass bei Fehlen von SIRT6 die Histonmodifikationen am RORE, einer Bindestelle für Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion mancher CCGs, verändert und die Bindung des transkriptionsaktivierenden Faktors ROR $\alpha$  verringert sind. Es wurden daher posttranslationale Modifikationen von ROR $\alpha$  durch EZH2 und von Coaktivator PGC-1 $\alpha$  durch GCN5 in HepG2-Zellen untersucht. Im Proximitäts-Ligations-Assay stellte sich bei Fehlen von SIRT6 eine erhöhte Acetylierung und damit Inaktivierung von PGC-1 $\alpha$  sowie eine vermehrte Methylierung von ROR $\alpha$ , die zur Degradation führen soll, heraus. Beides könnten Gründe für eine verringerte ROR $\alpha$ -Bindung am RORE und eine veränderte Circadiane Rhythmik sein. Der Kernrezeptor ROR $\alpha$  und Antagonist REV-ERB $\alpha$  beeinflussen auch die Differenzierung und Cytokinsekretion von Immunzellen, was einen Grundstein für die chronische



Einflussbereiche von SIRT6 belegt in der Literatur (**SIRT6**), dieser Arbeit (**SIRT6**)

**Abb. 5-1: Zusammenspiel der Circadianen Rhythmik mit dem Metabolismus, der Zellproliferation und -differenzierung, dem Immunsystem und Alterungsprozessen.**

Laut Literatur beeinflusst SIRT6 (in der Abbildung gekennzeichnet als **SIRT6**) über die Genom- und Telomerstabilität die Zellalterung, über c-Myc die Zellproliferation und über TNF-α und c-Jun das Immunsystem. Als direkte Interaktionspartner wurden PIAS, MYBBP1a und GCN5 belegt; letzteres wird von SIRT6 deacetyliert. Dadurch erhöht sich die Acetylierung von PGC-1α und die Gluconeogenese nimmt ab. Zudem inhibiert es durch Konkurrenz mit HIF-1α und Deacetylierung von H3 am Promotor glykolytischer Gene die Glykolyse. Die enzymatische Aktivität von SIRT6 selbst wird durch NAD<sup>+</sup> und freie Fettsäuren reguliert. Eine Interaktion von SIRT6 mit dem CLOCK:BMAL1-Komplex konnte bereits aufgedeckt werden. In dieser Arbeit wurde allerdings auch eine Veränderung der Histonacetylierung am RORE sowie der posttranslationalen Modifikationen von RORα und PGC-1α durch SIRT6 gezeigt (in der Abbildung gekennzeichnet als **SIRT6**). Zudem veränderte eine SIRT6-Defizienz die Immunzellendifferenzierung und Reaktivität und die Expression von C/EBPβ — möglicherweise über die veränderte Circadiane Rhythmik. Es beeinflusste weiterhin die circadiane Blutglucose und die Expression des oszillierenden metabolischen Faktors DBP. Eine Stimulation mit Retinsäure machte den Einfluss von SIRT6 auf die Expression der Gene mit RAR-Element deutlich.



Entzündung — mit einer Neutrophilie, Lymphopenie und Monozytose, einer erhöhten Zahl von myeloiden Zellen in der Leber sowie einer M2-Polarisierung von Makrophagen — in den SIRT6 KO-Mäusen bilden könnte. Die chronische Entzündung, die Chronodisruption und die erhöhte Tumorigenese in Mäusen, denen SIRT6 oder CCGs fehlen, lassen eine Ähnlichkeit zu Alterungsprozessen erkennen. Es wurde daher die Entwicklung der circadianen Genexpression in Abhängigkeit von SIRT6 in jungen und alten Mäusen untersucht. Sie zeigte einen Anstieg des CCGs PER2 in der Leber der 12 Monate alten SIRT6-defizienten Mäuse. Die Regulation der PER2-Expression könnte über einen SIRT6-abhängigen CRY1:MYBBP1a-Komplex erfolgen. Diese Ergebnisse verweisen auf eine Regulierung der Circadianen Rhythmik durch SIRT6 mit weitreichenden Folgen und könnten eine wissenschaftliche Grundlage zum Verständnis von Krankheitsentstehung und zur Entwicklung entsprechender Therapien ermöglichen.

In Abbildung 5-1 ist das für diese Arbeit relevante Netzwerk von zellulären Prozessen und Interaktionen — ausgehend von der Circadianen Rhythmik — dargestellt. Zusätzlich zeigt es auf, welche Versuchsansätze noch verfolgt werden sollten. Eine Fortführung der Untersuchung der Modifikationen und Interaktionen von ROR $\alpha$  wäre vielversprechend. So könnte z.B. eine direkte Interaktion von ROR $\alpha$  und SIRT6 überprüft werden, die aus technischen Gründen bisher nicht erfolgreich war. Auch die SUMOylierung von ROR $\alpha$  durch PIAS und die Validierung der bisherigen Ergebnisse zu den posttranslationalen Modifikationen könnte von Bedeutung sein. Vor allem die Verbindung von SIRT6 zu GCN5 und dessen Acetylierung sowie von SIRT6 zu EZH2 sollte genauer studiert werden. Ebenso wäre eine Promotorstudie am RARE inklusive der Histonmodifikationen interessant. Besonders wichtig wäre ein Melatonin- und/oder Insulin-ELISA der circadianen Mäuseren, der die Verbindung von SCN und Leber, von endogener und exogener Rhythmik, von Metabolismus und circadianen Prozessen bilden könnte. Die Ursachen und Folgen der Neutrophilie in SIRT6-defizienten Mäusen ist bereits Gegenstand von Folgeprojekten, die Nataliya Zhivkova bearbeitet. Bezüglich der Polarisierung von Makrophagen wäre eine Untersuchung der Arginase-Expressionsregulation interessant sowie die Analyse der physiologischen Folgen der Polarisierungsänderung wie Fibrose und Tumorentstehung. Zur Bestätigung der Polarisierungstendenzen könnte ein Griess-Assay durchgeführt werden, der die Entstehung von Stickstoffmonoxid quantifiziert. Da im konditionalen Mausmodell die Männchen sich anders verhielten als die Weibchen wäre die Wiederholung des Allotransplantationsversuches mit weiblichen Mäusen von Vorteil. Die

Studien zur CCG-abhängigen Alterung könnten durch einen Western Blot des Autophagiemarkers *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3) gestützt werden. Es verbleiben also noch einige vielversprechende Versuchsansätze, die zu einer genaueren Aufklärung der Folgen der SIRT6-Defizienz und der Chronodisruption auf den Organismus beitragen könnten.

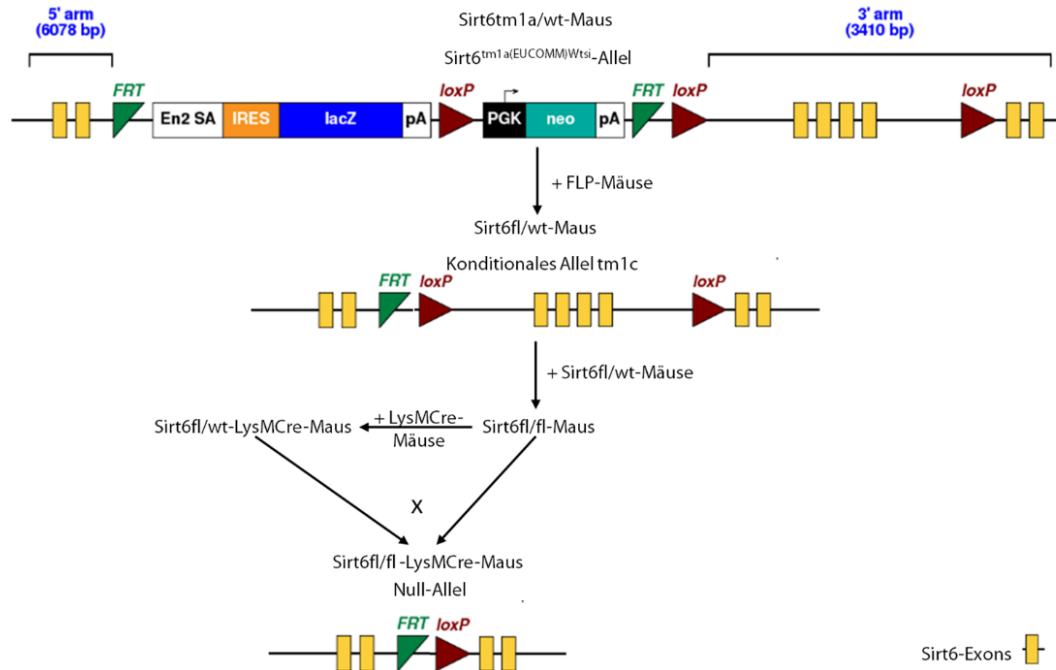
## 6. Material und Methoden

### 6.1. Versuchstierhaltung und -zucht

#### 6.1.1. Zucht der 129-*Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup>- und B6-*Sirt6*<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup>-Mäuse

Der Mausstamm 129-*Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup>, mit dem vorwiegend gearbeitet wurde, wurde von *The Jackson Laboratory Cancer Center* bezogen. Die SIRT6-Genexpression in diesen Mäusen wurde durch das Einfügen des *lacZ*-Gens nach 21 bp in Exon 1 des *SIRT6*<sup>tm1Fwa</sup>-Allels unterbunden, indem Exon 1 bis 6 dabei durch homologe Rekombination ersetzt wurden. Für die Versuchsansätze wurde stets auf männliche und weibliche homozygot defiziente Mäuse zurückgegriffen. Homozygot wildtypische Mäuse dienten als Kontrolle. Zur Zucht wurden Mäuse verwendet, die in diesem Gen heterozygot waren, sodass nach Mendel in der nächsten Generation sowohl heterozygote Mäuse für die weitere Zucht als auch homozygot wildtypische und homozygot mutante Mäuse für die Versuchsansätze entstanden. Es wurde je ein Männchen mit ein oder zwei Weibchen gepaart. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter immer gleichen Bedingungen in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE): Käfige wurden mit bis zu fünf Mäusen besetzt, zweimal je Woche wurden alle Käfige, Wasser und Trockenfutter (ad libitum) ausgetauscht. Das Licht war von 6 Uhr bis 18 Uhr angeschaltet; Tageslicht gelangte nicht in die Räume der Einrichtung. Die Mäuse wurden nach 21 Tagen von den Eltern und nach Geschlecht getrennt und es wurden Ohrbiopsien zur Genotypisierung genommen. Mit dem Mausstamm 129-*Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup> konnten viele Versuche durchgeführt werden, doch erschwerte der frühe Tod bei SIRT6-Defizienz die Versuchsplanung und das Beobachten von Spätfolgen. Daher wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Kerstin Selak für Leber und Immunsystem konditionale Knockout-Mäuse gezüchtet. Zur Zucht der Mäuse wurden embryonale Stammzellen mit BL6-Hintergrund und dem mutierten Allel *Sirt6*<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup> von EUCOMM (*European Conditional Mouse Mutagenesis Program*)

bezogen. Für die Versuche dieser Arbeit waren vor allen Dingen die Mäuse mit konditionalem Knockout in myeloiden Zellen relevant. Die Zucht erfolgte nach dem nachfolgenden Schema (Abb.6-1).



**Abb. 6-1: Kreuzungsschema der konditionalen SIRT6-defizienten Mäuse.**

In der ZVTE wurden aus Stammzellen mit tm1a-Allel heterozygote Chimären hergestellt, die mit FLP-Mäusen gekreuzt wurden. Dabei wurde die Promotor-Kassette herausgeschnitten und das konditionale tm1c-Allel entstand. Die heterozygoten Mäuse wurden untereinander gepaart, um homozygote *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>-Mäuse zu erhalten, die wiederum mit LysMCre-Mäusen gepaart wurden. Die *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>XLysMCre-Maus war die gewünschte Maus mit einem spezifischen konditionalen SIRT6-Knockout in myeloiden Zellen.

Verändert nach: [http://www.mousephenotype.org/data/alleles/MGI:1354161/tm1a\(EUCOMM\)Wtsi](http://www.mousephenotype.org/data/alleles/MGI:1354161/tm1a(EUCOMM)Wtsi) (26.03.16 10:35).

Die ES von EUCOMM wurden in der ZVTE in Embryonen weißer Mäuse implantiert, sodass *Sirt6*<sup>tm1a/wt</sup>-heterozygote Chimäre entstanden. Diese wurden mit heterozygoten FLP-Mäusen des Stammes BL6.SJL-Tg(ACTFLPe)9205Dym gekreuzt, deren FLP-Gen unter dem Aktin-Promotor liegt und die von der Arbeitsgruppe Waisman zur Verfügung gestellt wurden. Es entstanden nach Mendel rein wildtypische Mäuse, SIRT6- und FLP-heterozygote und die gewünschten FLP-positiven *Sirt6*<sup>fl/wt</sup>-Mäuse, in denen durch die Expression von FLP die Promotor-Kassette (L1L2\_Pgk\_P-Kassette) an den FRT-Stellen herausgeschnitten wurde und das konditionale tm1c-Allel verblieb. Um das FLP-Transgen

zu eliminieren, wurden die FLP-positiven *Sirt6*<sup>FL/wt</sup>-Mäuse mit BL6-Mäusen zurückgekreuzt, sodass unter anderem FLP-negative *Sirt6*<sup>FL/wt</sup>-Mäuse erhalten wurden. Diese wurden wiederum untereinander gepaart, um in der folgenden Generation *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>-Mäuse zu ergeben. Die *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>-Mäuse wurden mit LysMCre-Mäusen gekreuzt, da Cre an loxP schneidet und damit die *Sirt6*-Exons 3 bis 6 entfernt werden konnten — in diesem Falle spezifisch in myeloiden Zellen. Aus dieser Paarung entwickelten sich ausschließlich LysMCre-positive *Sirt6*<sup>FL/wt</sup>-Mäuse. Diese Mäuse wurden mit den *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>-Mäusen gepaart und folgende Genotypen entstanden: LysMCre-positive *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>-Mäuse, die die gewünschten konditionalen SIRT6 KO-Mäuse darstellten, LysMCre-negative *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>-Mäuse, die als Kontrollmäuse dienten, sowie LysMCre-positive *Sirt6*<sup>FL/wt</sup>- und LysMCre-negative *Sirt6*<sup>FL/wt</sup>-Mäuse. In Abbildung 6-1 ist ein vereinfachtes Kreuzungsschema dargestellt. Es ist auf den konditionalen Knockout in Hepatozyten (AlbCre-Mäuse) und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (CD4Cre-Mäuse) übertragbar.

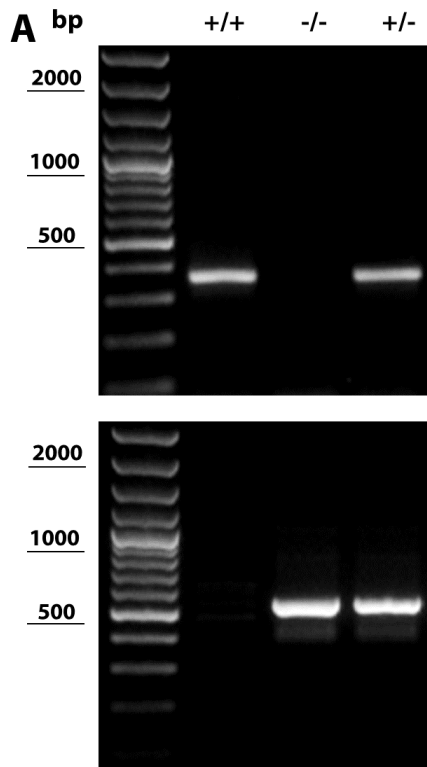
### 6.1.2. Genotypisierung der Versuchstiere

Die Differenzierung zwischen den verschiedenen Genotypen erfolgte über den Verdau von Ohr- oder Schwanzbiopsien, der Amplifikation mittels PCR und der Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese. Die Biopsien wurden in 100 µl Willi-Puffer — 100 mM TRIS(Roth)-HCl(Merck) (pH 8,0), 10 mM Ethylendiamintetraacetat-di-Natrium-di-hydrat (EDTA, pH 8,0) (AppliChem), 200 mM NaCl (Roth), 1% Natriumdodecylsulfat (SDS, Sigma Aldrich) in dH<sub>2</sub>O — mit 5 µl Proteinase K (AppliChem, 10 mg/mL in dH<sub>2</sub>O) über Nacht bei 55°C verdaut. Die Proteinase K wurde bei 99°C 10 min inaktiviert und 250 µl destilliertes Wasser hinzugegeben. Die Lysate wurden bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C 20 min zentrifugiert. Es wurde vorsichtig 1 µl entnommen und zu 18 µl Taq DNA Polymerase 1.1X Master Mix red (Ampliqon A/S) und je 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 pmol in H<sub>2</sub>O) hinzugefügt. Der Vorwärtsprimer „common“ wurde für beide Allele der 129-*Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup>-Mäuse verwendet, während als Rückwärtsprimer je ein spezifischer Primer für das Wildtypallel oder das mutante Allel verwendet wurde. Die DNA wurde mittels PCR (MyCycler, Bio-Rad) amplifiziert: Die Hitzeaktivierung erfolgte bei 94°C für 5 min, dann folgten 38 Zyklen von Denaturierung (30 s bei 94°C), Hybridisierung (40 s bei 56°C oder 60°C) und die Extension (45 s bei 72°C). Im Laufe der PCR entstand je nach Rückwärtsprimer bei einer Hybridisierungstemperatur von 60°C ein Produkt von 500 bp (wildtypisch) oder bei 56°C von 380 bp (mutant). Mäuse mit beiden Produkten waren

heterozygot, Mäuse mit nur einem Produkt homozygot (**Abb. 6-2**). Bei der Genotypisierung der konditionalen Knockout-Mäuse wurden Flox-, Cre- und *Sirt6*-Primer verwendet. Der Verlauf war hier: 4 min 94°C zur Hitzeaktivierung, dann 35 Zyklen mit 30 s bei 94°C zur Denaturierung, 45 s bei der primerspezifischen Temperatur zur Hybridisierung und 35 s bei 72°C zur Extension. Die Proben wurden nach der PCR 1:6 mit Probenpuffer — 0,2% Bromphenolblau (Merck), 30% Glycerol (Roth), 100 mM EDTA (pH 8,0) in dH<sub>2</sub>O — versetzt und über ein 1%iges Agarosegel (Starpure Agarose, Starlab) in TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer — 100 mM TRIS (pH 8,0), 100 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (AppliChem), 2,5 mM EDTA (pH 8,0) in dH<sub>2</sub>O — mit je 0,1 µg/mL Ethidiumbromid (Sigma Aldrich) aufgetrennt (Electrophoresis Power Supply E455/861, Consort und Horizontal-Elektrophoresekammern von Biometra bzw. ThermoFisher Scientific). Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht in einem Geldokumentationssystem mit Dunkelhaube (DH-30/32) von Biostep und unter Verwendung der Software ProBiostep ArgusX1 abgelichtet. Die Größe der spezifischen Banden konnte anhand eines Größenstandards (GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, ThermoFisher Scientific) festgestellt werden.

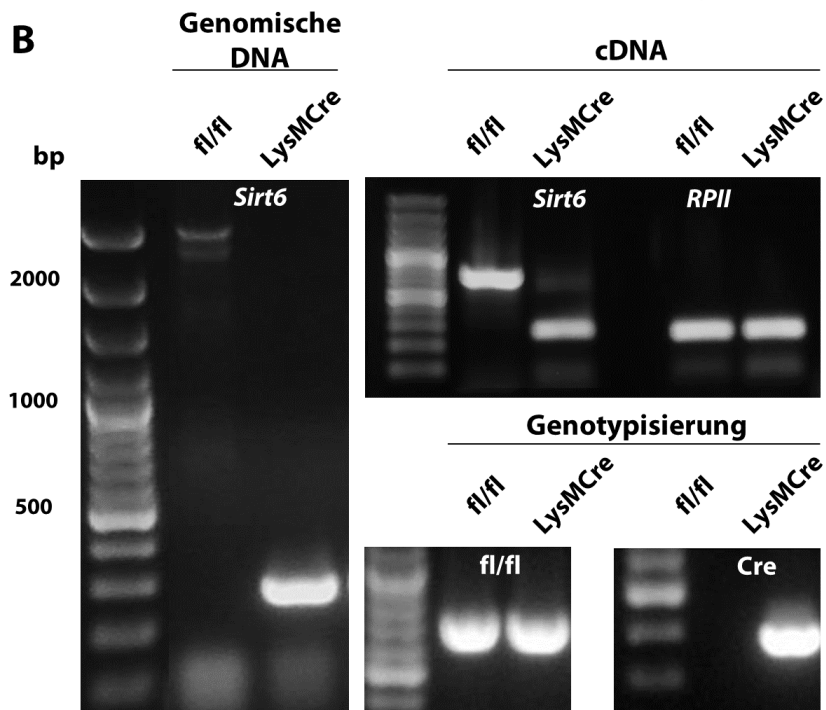
**Tabelle 6-1: Liste der Genotypisierungsprimer.**

Primernamen		Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Hybridisierungstemperatur
oIMR5970 („common“)	f	GTGTGATTGGTAGAGAGGCACGT	56-60°C
oIMR5971 („mutant“)	r	GCAATAGCATCACAAATTTTAC	56°C
oIMR5972 („wildtyp“)	r	GTGCATCTCAATGGTGCAGTG	60°C
Flox	f	CTCCACTTGCCCAAGGATCAG	65°C
	r	CGAAGGTGGTGTCAAACCTTGGG	
Cre	f	ACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCT	60°C
	r	ACCGTCAGTACGTGAGATATCTT	
Sirt6 (genomisch)	f	CTCCACTTGCCCAAGGATCAG	57°C
	r	ACATGAACTGATGGCGAGCTC	
Sirt6 (cDNA)	f	CACTGAAGACTAAGCTTGCTG	57°C
	r	AGGTTGACAATGACCAGACG	



**Abb. 6-2: Genotypisierung und Nachweis des SIRT6 KO in 129-Sirt6<sup>tm1Fwa/J</sup>- und Sirt6<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup>-Mäusen.**

(A) In der PCR der 129-Sirt6<sup>tm1Fwa/J</sup>-Proben entstanden ein spezifisches Wildtyp(+/-) und Knockout(-/-)-Produkt aus den jeweiligen Allelen bei 500 bzw. 380 bp. Mäuse mit beiden Produkten waren heterozygot(+/-), Mäuse mit einem Produkt homozygot. (B) In der genomischen DNA konnte der Verlust der Exons 3-6 in den Sirt6<sup>LysMCre</sup>-Mäusen nachgewiesen werden: Während die Sirt6<sup>fl/fl</sup>-Mäuse das vollständige Produkt mit über 2kbp aufwiesen, war das Produkt der Sirt6<sup>LysMCre</sup>-Mäuse auf 300bp reduziert. Ebenso konnte eine von 925bp auf 505bp verkürzte SIRT6-cDNA nachgewiesen werden. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch das Überprüfen der Expression der Cre-Rekombinase mit 370bp in Kombination mit dem Vorhandensein der beiden loxP-Seiten (fl/fl, 686bp).



Der *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>-Genotyp ergab ein Produkt von 686 bp, der LysMCre-Genotyp von 370 bp. Das verkürzte und damit dysfunktionale *Sirt6*-Gen der *Sirt6*<sup>fl/fl</sup>XLysMCre-Mäuse konnte in BMMΦ mittels spezifischer Primer bei 300 bp detektiert werden (Abb. 6-2). Für den SIRT6 KO-Nachweis in LysMCre-Makrophagen wurde zusätzlich zur Verkürzung des Gens in der genomischen DNA, die verkürzte mRNA und die Defizienz auf Proteinebene nachgewiesen (vgl. Abb. 3-21). Die Primer wurden alle von Eurofins Genomics bezogen und sind speziell für murine Proben. Es wurde immer ein Vorwärtsprimer (forward) und ein Rückwärtsprimer (reverse) verwendet.

### **6.1.3. Durchführung eines Isotransplantationsversuchs**

Der Transplantationsversuch wurde im Rahmen dieses Projektes und des Projektes von Nataliya Zhivkova zur Neutrophilendifferenzierung durchgeführt. Die Versuchsplanung und -überwachung erfolgte durch Susanne und Dennis Strand. Die Mauszucht und -genotypisierung wurde von mir ausgeführt, die Zellkultur der Hep55.1c von Henry Alizor. Die Operation wurde von Henry Alizor mit meiner Assistenz durchgeführt. Die postoperative Versorgung der Mäuse erfolgte durch mich, Henry Alizor und Nataliya Zhivkova. Die Biolumineszenz-Messung *in* und *ex vivo* wurde in Kooperation mit Marc Holzmann aus der Arbeitsgruppe Sahin durchgeführt. Für die Isotransplantation wurden eine Million Luziferase-exprimierende murine Hepatomzellen (Hep-55.1c) in 30 µL PBS in die Milz der mit Isofluran betäubten *Sirt6*<sup>LysMCre</sup>-Mäuse und der Kontrollmäuse *Sirt6*<sup>fl/fl</sup> injiziert. Für die Lumineszenzmessung 4, 18, 25 und 32 Tage nach der Injektion wurde den Mäusen jeweils 200 µL Luziferin (0,1 mg/mL) appliziert und nach 10 min für 1 s, 10 s und 30 s die Lumineszenz in der betäubten Maus detektiert. Bei der Mauspräparation durch mich, Henry Alizor, Nataliya Zhivkova und Marc Holzmann am Tag 32 wurden Leber, Lunge, Milz und Leistenlymphknoten entnommen und ebenfalls die Lumineszenz detektiert bzw. ein Lichtbild aufgenommen. Die entnommenen Organe wurden von Nataliya Zhivkova und Henry Alizor weiter untersucht, z.B. wurden Gewebeschnitte und -färbungen angefertigt.

## **6.2. Mauspräparation und Zellkultur**

### **6.2.1. Mauspräparation**

Zur Organ- und Zellgewinnung wurden Mauspräparationen durchgeführt. Die *Sirt6*<sup>tm1Fwa</sup>-Mäuse wurden im Alter von 21 bis 23 Tagen präpariert, bei den konditionalen SIRT6 KO-



Mäusen ist das Alter in der jeweiligen Versuchsbeschreibung angegeben. Dazu wurden je nach Gewicht der Maus 150-300  $\mu\text{L}$  eines Ketamin-Rompun-Gemisches (5 mL Ketamin, Hameln pharmaceuticals, mit 0,8 mL Rompun, Bayer Healthcare) den Mäusen intraperitoneal injiziert und die Maus nach Abnahme der Pfotenreflexe mit dem Präparierbesteck geöffnet. Es wurde zunächst Blut mittels Spritze mit Kanüle der Größe 26G direkt aus dem Herzen gewonnen und gegebenenfalls der Blutglucosewert mit dem Accu-Check Sensor (Roche Diagnostics) bestimmt. Nach Bedarf wurden etwa 50-100  $\mu\text{l}$  in Kalium-EDTA-Röhrchen (Sarstedt) überführt und zur Blutbildbestimmung am Hemavet 950 (DiaSys Greiner, AG Kindler) oder BD FACSVerser (BD Biosciences) verwendet. Die restliche Blutmenge wurde in Mikrozentrifugengefäße gegeben, 30 min bei Raumtemperatur gerinnen gelassen, dann eventuell im Kühlschrank aufbewahrt bis die Präparation beendet war und 20 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und für weitere Untersuchungen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach der Blutentnahme wurden die weiteren Organe — meist Leber und Milz, nach Bedarf auch Thymus, Lunge, Darm sowie Femur und Tibia — entnommen und in flüssigem Stickstoff (Linde AG, anschließend  $-80^{\circ}\text{C}$ ) oder phosphatgepuffertem Paraformaldehyd (Roti-Histofix 4%, Roth) konserviert.

### **6.2.2. Isolation der Milzzellen**

Zur Isolation der Milzzellen wurde unter einer Sterilbank gearbeitet. Die Milzen wurden in Zelltrenner-Mikrosieben (40  $\mu\text{m}$ , Nylon, BD Biosciences) auf 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und mit Spritzenkolben zerstoßen. Die im Zelltrenner befindlichen Zellen wurden mit RPMI (ThermoFisher Scientific) in das Zentrifugenröhrchen gespült. Das Medium mit den Zellen wurde 10 min bei 500xg und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in 2 mL Erythrozytenlysepuffer — 155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (AppliChem), 10 mM  $\text{KHCO}_3$  (AppliChem), 0,1 mM EDTA in  $\text{dH}_2\text{O}$  — suspendiert. Nach 2 min wurde die Erythrozytenlyse mit 20 mL Medium gestoppt und erneut zentrifugiert (5 min, 500xg,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Zum Entfernen des Milzfettes wurden die Zellen in 10 mL Medium aufgenommen und sehr langsam im nahezu Waagrechten aus der 10 mL-Einmalpipette abgelassen — Fett setzte sich an der Pipettenwand ab. Die Zellzahl wurde mittels Zellzähler (Roche Innovatis/Schärfe System Casy TTC Cell Counter & Analyser System) bestimmt und die Milzzellen je nach Bedarf mit sterilem PBS (Sigma Aldrich) gewaschen und in kleinen Mengen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konserviert, in Zellkulturplatten mit 48 Vertiefungen ausgesät oder für

die FACSVerse-Analyse gefärbt. Für die Stimulation mit anti-mouse-CD3 ( $\alpha$ CD3, BD Biosciences) oder Concanavalin A (ConA C2010, Sigma Aldrich) wurden eine Million der gesamten Milzzellen in 500  $\mu$ l RPMI mit 10% FCS (Fetal Calf Serum, Merck Millipore), 1% P/S (Penicillin/Streptomycin, ThermoFisher Scientific), 1% L-Glutamin (ThermoFisher Scientific, 200 mM) in unbehandelte Kulturplatten gegeben und mit 10  $\mu$ g/mL  $\alpha$ CD3 bzw. 1,5  $\mu$ g/mL ConA für 72h behandelt. Für die physiologische  $T_H17$ -Induktion wurden  $CD4^+$ -T-Zellen mit dem *CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II* (MACS, Miltenyi Biotec) aus den Gesamtmilzzellen isoliert. Die Reinheit wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Davon wurden zwei Millionen je mL in eine über Nacht bei Raumtemperatur mit 10  $\mu$ g/mL  $\alpha$ CD3 inkubierte Zellkulturplatte gegeben und mit 20 ng/mL rekombinantem murinem IL-6 (R&D Systems), 2,5 ng/mL rekombinantem humanem TGF- $\beta$  (R&D Systems), 10  $\mu$ g/mL anti-mouse IL-4 (BioLegend) und 10  $\mu$ g/mL anti-mouse IFN $\gamma$  (eBiosciences) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für fünf bis sieben Tage kultiviert. Am dritten Tag wurden 10  $\mu$ g/mL anti-mouse CD28 (BD Biosciences) und 100 U/mL humanes IL-2 (Proleukin, Novartis) zugegeben.

### **6.2.3. Generierung vonBMM $\Phi$**

Zur Generierung von Makrophagen wurden Knochenmarkszellen aus Femur und Tibia gewonnen. Dazu wurden die Beine aus der Maus präpariert, in Isopropanol geschwenkt und von Muskelgewebe befreit. Die Gelenke an den Knochenenden wurden entfernt und das Knochenmark mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle der Größe 25G in eine Petrischale mit DMEM/F12 (Sigma Aldrich) gespült. Zur Vereinzelnung wurden die Knochenmarkszellen durch ein Zelltrenner-Mikrosieb in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach der Zentrifugation (5 min, 500xg, 4°C) wurde das Medium dekantiert und die Zellen für 2 min in 2 mL Erythrozytenlysepuffer aufgenommen. Die Lyse wurde mit 20 mL Medium gestoppt und die Zellen in DMEM/F12 mit 1% P/S, 1% Glutamin, 1% HEPES (Sigma Aldrich, 1 M) und 10% FCS aufgenommen. Es wurden 2-3 Mio. Zellen in 2 mL in einer Kulturplatte mit 6 Kavitäten ausgesät und mit 20 ng/mL rmM-CSF (R&D systems) zu BMM $\Phi$  differenziert. Nach zwei Tagen wurde 1 mL Medium mit 10 ng/mL rmM-CSF zugegeben, nach fünf Tagen das Medium durch neues Medium mit 20 ng/mL rmM-CSF ersetzt. Nach sieben Tagen sind die Makrophagen vollständig differenziert gewesen und wurden entweder mit Accutase (GE Healthcare Life Sciences) abgelöst oder mit 10 ng/mL Lipopolysaccharid (aus *Escherichia coli* O26:B6, Sigma Aldrich) für 4h stimuliert und anschließend für die RNA-Isolation geerntet.

#### 6.2.4. Gewinnung von Hepatozyten

Primäre Maushepatozyten wurden mittels Leberperfusion gewonnen, die von Henry Alizer durchgeföhrt wurde. Dazu wurde die Maus mit einem Ketamin-Rompun-Gemisch narkotisiert und unter der Sterilbank der Bauchraum geöffnet. Ein Bindfaden wurde unter der Pfortader (*vena portae*) durchgeföhrt, eine Kanüle in die Ader eingeföhrt und mit dem Bindfaden fixiert. Mittels einer Pumpe wurde zunächst etwa 50 mL eines auf 37°C vorgewärmten, sterilen Waschpuffers — 140 mM NaCl, 7 mM KCl, 10 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES, pH 7,4) — durch die Pfortader und die Leber gespült. Die untere Hohlvene (*vena cava inferior*) wurde durchtrennt, um einen Abfluss zu ermöglichen. Nun wurden ebenfalls 50 mL des 37°C warmen, sterilen Kollagenase-Puffers — 67 mM NaCl, 7 mM KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM HEPES, 0.05% Kollagenase (Serva, pH 7,6) — durch die Leber geleitet, wobei das „störende“ Bindegewebe durch die Kollagenase verdaut wurde. Die Leber wurde herausgeschnitten und in eine Kulturschale mit Puffer — 140 mM NaCl, 7 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES (pH 7.4) — gegeben. In diesem Puffer wurden die Leberzellen durch schütteln und schwenken, gegebenenfalls auch mithilfe von Pinzetten, homogenisiert und die Zellsuspension durch ein steriles Gazetuch filtriert. Die Zellen wurden für 5 min bei 150xg und 4°C ohne Bremse zentrifugiert, gewaschen und ausplattiert. Die primären murinen Hepatozyten wurden in DMEM-Medium (Sigma Aldrich), supplementiert mit 1% P/S, 1% Glutamin, 1% HEPES, 1% Natriumpyruvat (Merck Millipore, 100 mM) und 10% FCS, kultiviert.<sup>274</sup>

#### 6.2.5. Zellkultur von Hepatom- und Hepatoblastomzellen

Zur molekularbiologischen Analyse wurden immortale Zellkulturen verwendet, da sie stetig humanes Zellmaterial zur Verfügung stellten. Der Klon pCMV6-SIRT6-myc (Klon #10) und der Kontrollklon pcDNA3.1(+) der verwendeten humanen Hepatomzelllinie Hep3B wurden von Kerstin Selak mittels stabiler Transfektion erstellt. Sie wurden in Advanced MEM mit 1% P/S, 1% Glutamin, 1% HEPES und 10% FCS gehalten, zur Selektion wurde G418-BC sulfate (Merck Millipore) verwendet. Die HepG2-Klone empty#7 und CRISPR#2.39 wurden von Martin Ganas mittels CRISPR-Cas9 im Rahmen seiner Promotion hergestellt. Sie wurden in DMEM mit 1% P/S, 1% Glutamin, 1% HEPES und 10% FCS kultiviert. Für die Versuche zur Circadianen Rhythmik wurden die Zellen mit einem Serumschock behandelt.<sup>275</sup> Dazu wurden sie zunächst für 2 h in 1% FCS-

haltigem Medium kultiviert, bevor sie für weitere 2 h in 50 % FCS-haltigem Medium inkubiert wurden. Dies ergab für alle Versuche im Zellkulturmodell eine Zeitgeber-Zeit ZT2. Es wurden für die Behandlung mit verschiedenen Stimuli primäre murine Hepatozyten verwendet oder je 200.000 bzw. 350.000 HepG2-Zellen in Platten mit 12 bzw. 6 Kavitäten ausgesät und mit den Reagenzien in Tabelle 6-2 in biologischen Duplikaten inkubiert. Zur Kontrolle wurde jeweils das höchste verwendete Volumen von DMSO oder Ethanol hinzugefügt. Die Myristinsäure wurde mit 10 mg/mL fettsäurefreiem BSA (Sigma-Aldrich) als Träger in Medium ohne FCS zu den Zellen gegeben. Danach erfolgte der Serumschock.

**Tabelle 6-2: Reagenzien zur Stimulation von Hepatoblastomzellen mit ihrer Konzentration und der Behandlungsdauer.**

Reagenz	Hersteller	Konzentration	Lösemittel	Dauer
Melatonin	Sigma Aldrich	50 $\mu$ M bzw. 2000 $\mu$ M	DMSO	4 h bzw. 20 h
ATRA	Sigma Aldrich	5 $\mu$ M oder 10 $\mu$ M	DMSO	4 h
Huminsulin	Lilly	0,5 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O	4 h
Butyrolacton-3	abcam	100 $\mu$ M oder 300 $\mu$ M	DMSO	20 h
Myristinsäure	Cayman Chemical	25 $\mu$ M	Ethanol	48 h
GSK343	Sigma Aldrich	1 $\mu$ M	DMSO	48 h

#### 6.2.6. Zellviabilitätsassay

Zur Analyse der Zellviabilität wurde der chemilumineszenzbasierte Assay CellTiter-Glo von Promega verwendet. Dazu wurden Zellen in einer 96-Kavitäten-Platte ausgesät und für 4 h mit 5  $\mu$ M trans-Retinsäure (ATRA R2625, Sigma Aldrich) oder DMSO behandelt. Zu den Zellen mit 100  $\mu$ L Medium je Kavität wurden jeweils 25  $\mu$ L des CellTiter-Glo pipettiert und zur Zellyse für 2 min unter Schütteln inkubiert. Zur Stabilisierung des Lumineszenzsignals wurde die Platte daraufhin für 10 min bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubiert. Je Probe wurden 85  $\mu$ L in eine weiße 96-Kavitäten-Platte überführt und am Fluoro-Luminometer (Infinite M200, Software: i-control, Tecan) die Lumineszenz gemessen. Die Lumineszenz gibt über eine Luziferase-katalysierte, ATP-abhängige Oxidation von Luziferin zu OxyLuziferin die Menge an ATP an. Da ATP ein kurzlebiges Molekül ist, korreliert seine Menge mit der Anzahl lebender Zellen.

## 6.3. Bildgebende Methoden

### 6.3.1. Herstellung und Färbung von Paraffinschnitten

Die eingefrorenen oder in Paraformaldehyd fixierten Mausorgane wurden u. a. für Färbungen verwendet. Dazu wurden je nach gewünschter Färbemethode Paraffin- oder Gefrierschnitte hergestellt. Für Paraffinschnitte wurden die Organe mindestens 48h in Roti-Histofix fixiert und etwa 6h mit Leitungswasser und zweimal kurz mit destilliertem Wasser gewaschen, um dann eine aufsteigende Ethanolreihe mit anschließendem Isopropanol (AppliChem) zu durchlaufen (Rotationsparaffinierer TP1020 von Leica) und nach einer Xylolwäsche bis zum Einbetten in flüssiges Paraffin (Roth) getaucht. Durch die Gewebeeinfiltration des Paraffins sind die Organe auch bei Raumtemperatur lange halt- und nutzbar. Zum Schneiden wurden sie in dem Leica-Einbettssystem EG1150 in Paraffinblöcke eingebettet und in das Leica-Rotationsmikrotom RM2255 eingespannt. Zunächst wurden Grobschnitte, dann Feinschnitte bei 4 µm erstellt, die auf einem 42°C warmen Wasserbad (HI1210, Leica) geglättet und auf Polylysin-Objektträger (Superfrost Plus, ThermoFisher Scientific) gezogen wurden. Um adhäriertes Wasser zu entfernen wurden die Objektträger mit den Organen über Nacht bei 42°C getrocknet. Paraffinschnitte eignen sich für eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE) oder eine Sirius Rot-Färbung (SR). Dazu wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert: Die Objektträger wurden für zweimal 5 min in Xylol (AppliChem) gestellt, dann einer abfallenden Alkoholreihe mit Ethanol (AppliChem) — von 100% bis 70% jeweils 3 min — unterzogen und schließlich in destilliertem Wasser gespült. Der Objektträger wurde für 1 min mit Hämatoxilin (Mayers Hämalaunlösung, Merck) gefärbt, unter Leitungswasser mindestens 10 min „gebläut“ und 1 min in destilliertes Wasser gestellt. Beim Bläuen oder Differenzieren sorgt das Eisen im Wasser für eine Farbänderung des roten Hämatoxilins ins Blaue. Bei der HE-Färbung folgte eine 2 minütige Färbung in Eosin G-Lösung (0,5% wässrig, Merck) und eine aufsteigende Alkoholreihe von 70-100% für je 1 min. Abschließend wurde der Objektträger in Xylol getaucht und mit Entellan (Merck) eingedeckt. Um eine vermehrte Kollagenbildung im Lebergewebe untersuchen und damit Rückschlüsse auf eine mögliche Leberfibrose ziehen zu können, wurde eine Sirius Rot-Färbung durchgeführt. Dazu wurde der Organschnitt nach der Hämatoxillinfärbung für 1 h mit einer 1,2%igen Sirius Rot (DirectRed80)-Pikrinsäurelösung gefärbt, zweimal kurz in Essigsäure getaucht und nach der aufsteigenden

Alkoholreihe mit Entellan eingedeckt. Die histologischen Färbungen wurden am Axioskop 2 MOT Plus (Carl Zeiss AG) mit Hilfe der Software SPOT Advanced aufgenommen.

### **6.3.2. Herstellung und Färbung von Gefrierschnitten**

Gefrierschnitte wurden am Cryotom CM 1900 (Leica) erstellt, indem die tiefgefrorenen Organe mit Tissue-Tek O.C.T.-Einbettmedium (Sakura Finitek) an den Probenhaltern fixiert und mit Leica-Messern 5 µm dicke Schnitte durchgeführt wurden. Die Gefrierschnitte eignen sich für Ölrot-O-Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen. Die Gefrierschnitte wurden kurz in 60% Isopropanol, dann für 20 min in die Certistain Ölrot-O-Lösung (C.I.26125, Merck) gehalten. Die Objektträger wurden wieder kurz in 60% Isopropanol überführt und mit destilliertem Wasser gespült. Für 5 min wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt und erneut mit destilliertem Wasser gespült. Zum Bläuen wurden die Objektträger für 5 min unter laufendes Leitungswasser gestellt und anschließend mit Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingedeckt. Für eine Immunfluoreszenzfärbung wurden die Gefrierschnitte mit 4%igem Paraformaldehyd (16% PFA, Methanolfrei, Roth) für 15 min fixiert, mit PBS — 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl (Merck), 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Roth), 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) in dH<sub>2</sub>O — gewaschen und es wurde wie bei den Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen fortgefahren. Dazu wurden die Objektträger mit dem Dako-Pen, einem Fettstift, an den Rändern für wässrige Lösungen abgedichtet, sodass die Block-, Wasch- oder Antikörperlösungen vorsichtig aufgetropft werden konnten und auf dem Objektträger verblieben.

### **6.3.3. Immunfluoreszenzfärbung**

Zellen in Zellkulturplatten („8er Chamberslides“, BD Biosciences) und Gefrierschnitte auf Polylysin-Objektträgern wurden zunächst fixiert: Je nach Antikörper mit 100-200 µL eines Aceton-Methanol-Gemisches (AppliChem, 1:1, -20°C) für 2 min oder 20 min mit 4%igem PFA bei Raumtemperatur. Es wurde mit PBS gewaschen und die Probe für intrazelluläre Färbungen mit 100-200 µl 0,2% Saponin (quillaja bark, Sigma Aldrich) in PBS für 15 min bei Raumtemperatur bedeckt, um die Zellen zu permeabilisieren. Im Anschluss wurden mit 100-200 µl Blocklösung (PBS mit 3% Albumin Fraktion V (BSA, Serva) und 0,1% Triton X-100 von Sigma Aldrich) freie Proteinbindungsstellen abgedeckt und dann für 60 min bei Raumtemperatur mit dem Erstantikörper in Blocklösung inkubiert. Die Konzentration des Antikörpers entsprach entweder den Empfehlungen des Herstellers oder betrug 1:200. Es

wurde dreimal mit PBST (PBS mit 0,1% Tween 20, Roth) gewaschen und der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper 1:500 in Blocklösung sowie Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific) 1:5000 für 60 min im Dunkeln zugefügt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST und einmaligem Waschen mit dH<sub>2</sub>O wurden die Zellen mit Aqua Poly/Mount-Einbettmedium (Polysciences Europe) und einem Deckglas (Menzel-Gläser, ThermoFisher Scientific) eingedeckt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden am Laserscanning-Mikroskop LSM710 (Carl Zeiss AG) mit Hilfe der ZEN-Software (Carl Zeiss AG) aufgenommen.

**Tabelle 6-3: Liste der für die Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Antikörper.**

Zielstruktur	Hersteller	Spezies
Acetyl-Histon H3 (Lys9)	Cell Signaling Technology	Kaninchen
Acetyl-Lysin	Abcam	Maus
CD11b	BD	Ratte
EZH2	Cell Signaling Technology	Kaninchen
F4/80	eBioscience	Ratte
Methyl-Histon H3 (Lys27)	Active motif	Kaninchen
Methyl-Lysin (mono-, di-)	Abcam	Kaninchen
PGC-1 $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology	Kaninchen
ROR $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology	Ziege
SUMO	Cell Signaling Technology	Kaninchen
Alexa Fluor-488	ThermoFisher Scientific	Anti-Kaninchen
Alexa Fluor-488	ThermoFisher Scientific	Anti-Maus
Alexa Fluor-555	ThermoFisher Scientific	Anti-Ziege
Alexa Fluor-555	ThermoFisher Scientific	Anti-Ratte

#### 6.3.4. Proximitäts-Ligations-Assay

Um eine Protein-Protein-Interaktion auf Basis der Immunfluoreszenzfärbung zu untersuchen, wurde ein Proximitäts-Ligations-Assay (PLA) durchgeführt. Dazu wurden hier ausschließlich die Hepatoblastomzellen in Chamberslides verwendet und wie oben beschrieben fixiert und permeabilisiert. Alle weiteren Schritte wurden unter Verwendung und nach Anleitung von *Duolink-Kit* (OLINK Biosciences/Sigma-Aldrich) ausgeführt.

### 6.3.5. Durchflusscytometrie

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Oberflächenrezeptoren der Milz- und Knochenmarkszellen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 200 µL der Antikörperverdünnungen (1:200) in PBS für 15 min bei Raumtemperatur oder für 30 min bei 4°C inkubiert. Für die Bestimmung der Zelltypen im Blut wurden die Antikörper direkt in 100 µL des EDTA-Vollblutes gegeben (1:200, 15 min) und danach mit 300 µL FACSLyse (BD Biosciences) die Erythrozyten entfernt. Die Zellen wurden nach der Färbung mit PBS gewaschen und mit 2% PFA fixiert. Die Messung erfolgte mit dem Durchflusscytometer FACSVerser, die Auswertung mit der Software FACSSuite von BD Biosciences. Da Makrophagen zur Bindung und Phagozytose von Antikörper-gebundenen Pathogenen Fc-Rezeptoren exprimieren, empfiehlt es sich einen FcR-Block (Miltenyi Biotec) vor der Immunfärbung durchzuführen.

**Tabelle 6-4: Liste der für die Durchflusscytometrie verwendeten Antikörper mit den entsprechenden Fluorochromen.**

Zielstruktur	Hersteller	Fluorochrom
CD4	BD	PE
CD11b	BD	APC
CD11c	eBioscience	APC
CD40	BioLegend	FITC
CD86	eBioscience	PE
F4/80	BioLegend	BV421
GR-1	BD	PE

### 6.3.6. Cytokinkonzentrationsbestimmung mittels ELISA

Die Interleukin-Sekretion wurde mit dem entsprechenden *mouse-ELISA DuoSet-Kit* (R&D Systems) für IL-17 oder *BD OptEIA mouse-ELISA-Kit* (BD Biosciences) für IL-10, IL-12p40 und IL-12p70 überprüft. Es wurden NUNC-Maxisorp-Platten mit 96 Kavitäten verwendet und für jede Probe sowie für die Standardreihe Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Absorption wurde bei 450 nm und 570 nm mit dem multimodalen Lesegerät (Infinite M200, Software: i-control, Tecan) bestimmt und anhand der Standardreihe die Cytokinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt.



## 6.4. Molekularbiologische Methoden

### 6.4.1. Proteingewinnung und -konzentrationsbestimmung

Für den Western Blot wurden Zellen oder gefrorene Organstücke in RIPA-Puffer — 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Natriumdeoxycholat (Sigma Aldrich), 1% Triton X-100 und 0,1% SDS — lysiert. Es wurden 175  $\mu$ L je Kavität einer 6-Kavitäten-Platte oder 10  $\mu$ L je mg Gewebe verwendet und teilweise die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay quantitativ bestimmt. Dazu wurden 50  $\mu$ L verdünntes Lysat mit 200  $\mu$ L Roti-Nanoquant (Roth, 1:5 in Wasser) in unbeschichtete Kulturplatten gegeben und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur die Absorption bei 590 nm und 450 nm am Fluoroluminometer gemessen. Durch Abgleich mit dem BSA-Standard konnte die Proteinkonzentration im Lysat bestimmt werden. Alternativ konnten die *NE-PER-Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (ThermoFisher Scientific) zur Lyse verwendet werden, indem durch unterschiedlich starke Reagenzien nukleäre und cytoplasmatische Proteine getrennt wurden. Zur Proteinbestimmung wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung — 1,25 g Coomassie (Sigma Aldrich), 200 mL Methanol, 50 mL Essigsäure (AppliChem), *ad* 500 mL mit dH<sub>2</sub>O — durchgeführt, da durch die verwendeten Detergenzien ein Bradford-Assay nicht möglich war. Proteaseinhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail, Roche) wurden prinzipiell zugegeben, Phosphataseinhibitoren (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail, Roche) nur nach Bedarf. Die Proben wurden 1:2 mit Ladepuffer — 40 mL 10% SDS, 10 mL 1 M TRIS (pH 6,8), 10 mL  $\beta$ -Mercaptoethanol (Merck), 20 mL Glycerol (Roth), 2,2 mg Bromphenolblau, *ad* 100 mL mit dH<sub>2</sub>O — versetzt, 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. Tabelle 6-5). Als Größenstandard diente der PageRuler Prestained Protein Ladder von ThermoFisher Scientific. Für Proteine unter 30 kDa wurden 15%ige Gele, für Proteine bis 100 kDa 10%ige und über 100 kDa 8%ige Gele in der *Mini-Vertical Gel Electrophoresis Unit* von Hoefer verwendet. Je Gel wurde im Bereich des Sammelgels eine Stromstärke von 20 mA angelegt, im Trenngel von 30 mA bzw. etwa 130 V (Electrophoresis Power Supply EPS601, Amersham Pharmacia Biotech). Im Allgemeinen war die Elektrophoresezeit auf 1,5 h festgesetzt, konnte aber je nach zu analysierendem Protein und Laufverhalten verkürzt oder verlängert werden.

**Tabelle 6-5: Inhaltsangaben für die SDS-Gele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen und für die Elektrophorese-Puffer.**

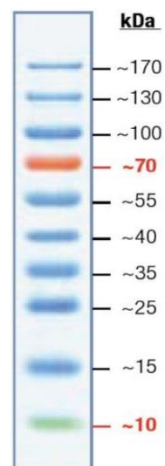
Sammelgel (4 St.) für SDS-PAGE	12,7 mL dH <sub>2</sub> O, 4 mL 0,6 M TRIS pH 6,8, 200 µL 10% SDS, 100 µL 10% APS (AppliChem), 3 mL 30% Acrylamid-bis (Merck), 10 µL Tetramethylethylendiamin (TEMED, Roth)
Trenngel (10%, 4 St.) für SDS-PAGE	18,1 mL dH <sub>2</sub> O, 8 mL 1,8 M TRIS pH 8,8, 400 µL 10% SDS, 200 µL 10% APS, 8 µL TEMED, 13,3 mL 30% Acrylamid-bis
Trenngel (15%, 4 St.) für SDS-PAGE	11,5 mL dH <sub>2</sub> O, 8 mL 1,8 M TRIS pH 8,8, 400 µL 10% SDS, 200 µL 10% APS, 8 µL TEMED, 20,0 mL 30% Acrylamid-bis
Trenngel (8%, 4 St.) für SDS-PAGE	20,8 mL dH <sub>2</sub> O, 8 mL 1,8 M TRIS pH 8,8, 400 µL 10% SDS, 200 µL 10% APS, 8 µL TEMED, 10,7 mL 30% Acrylamid-bis
TG-Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM TRIS, 192 mM Glycin (Roth), 1% SDS in dH <sub>2</sub> O
TG-Laufpuffer für Western Blot	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20% Methanol in dH <sub>2</sub> O

#### 6.4.2. Western Blot

Nach der Auftrennung wurde das Gel mit einer PVDF-Membran (Immobilon P Membrane, Merck Millipore) im eigentlichen „Western Blot“ erneut Spannung ausgesetzt, diesmal allerdings horizontal in der *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* von Bio-Rad. Für 1,5 h wurde eine Spannung von 130 V und/oder eine Stromstärke von 350 mA angelegt. Die Proteine wurden dadurch auf die Membran transferiert. Um weitere Proteinbindungen zu vermeiden, wurde die Membran nach dem Transfer 30-60 min unter Schütteln bei Raumtemperatur in I-Block — 100 mL 10xPBS, 2 g I-Block (Tropix, ThermoFisher Scientific), 1 mL Tween 20, ad 1 l mit dH<sub>2</sub>O — inkubiert. Anschließend wurde sie in einem Zentrifugenröhrchen mit 5 mL I-Block und Erstantikörper, wenn vom Hersteller nicht anders angegeben im Verhältnis 1:1000, über Nacht auf einem Rollschüttler bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 5 min mit PBST gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem speziesspezifischen Zweitantikörper

**Tabelle 6-6: Liste der im Western Blot verwendeten primären Antikörper.**

Zielstruktur	Hersteller	Spezies
Acetyl-Histon H3 (Lys9)	Active Motif	Kanninchen
C/EBP $\beta$	Santa Cruz Biotechnology	Kanninchen
CRY1	Santa Cruz Biotechnology	Kanninchen
EZH2	Cell Signaling Technology	Kanninchen
Histon H3	Cell Signaling Technology	Kanninchen
MYBBP1a	Santa Cruz Biotechnology	Ziege
PGC-1 $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology	Kanninchen
REV-ERB $\alpha$	Cell Signaling Technology	Kanninchen
ROR $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology	Ziege
SIRT6 (human, #2590)	Cell Signaling Technology	Kanninchen
SIRT6 (murin, #12486)	Cell Signaling Technology	Kanninchen
Trimethyl-Histon H3 (Lys27)	Active Motif	Kanninchen

**Abb. 6-3: Größenstandard für die SDS-PAGE: PageRuler Prestained Protein Ladder von ThermoFisher Scientific.**

Der Größenstandard wurde als Referenz neben den Proben auf das Gel für die SDS-PAGE aufgetragen und auf die PVDF-Membran transferiert, sodass die Größe des mit Antikörperdetektierten Proteins überprüft werden konnte.

(1:15000 in I-Block) inkubiert. Alle Zweitantikörper wurden von Sigma Aldrich bezogen und waren an das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt. Es wurde dreimal mit PBST gewaschen und zweimal mit Assay-Puffer — 10.6 g Diethanolamin (Tropix, ThermoFisher Scientific), 500 µL 2 M MgCl<sub>2</sub> (Merck), *ad* 1 L mit dH<sub>2</sub>O (pH 9,5 mit HCl) — für 5 min, bevor die Membran für 10 min in Assay-Puffer mit Nitroblock (1:200, Tropix, ThermoFisher Scientific) gegeben wurde. Anschließend wurde sie für 5 min in CDP-Star-Substratlösung (1:1000 in Assay-Puffer, Tropix, ThermoFisher Scientific) gelegt. Die Detektion erfolgte im Chemidoc XRS Imaging System und mit der Image Lab Software (Bio-Rad). Zur Aufbewahrung wurde die Membran in PBST gewaschen und getrocknet. Als Ladekontrolle wurde Histon H3 oder Aktin verwendet. Der Aktin (I-19)-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology war direkt mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und wurde mit dem *SuperSignal Western Blot Enhancer-Kit* (ThermoFisher Scientific) detektiert.

#### 6.4.3. Semiquantitative Real-Time PCR (RT-PCR)

Weiterhin wurden Zellen und gefrorene Gewebestücke zur Isolation von mRNA mit dem *Absolutely RNA Miniprep-Kit* (Agilent Technologies) oder dem *peqGOLD RNApure* (PEQLAB Biotechnologie) benötigt. Das *peqGOLD RNApure* wurde für die RNA-Isolation aus den Knochenmarksmakrophagen und den behandelten HepG2-Zellen (vgl. Tabelle 6-2) verwendet. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde im Spektralphotometer NanoDrop-1000 (ThermoFisher Scientific) bei 260 nm für die Absorption der Nukleinsäurebasen und bei 280 nm für Proteinverunreinigungen gemessen. Es wurde jeweils 1 µl der Probe zur Messung verwendet; als Referenz galt der Elutionspuffer (Agilent Technologies) oder Wasser (PEQLAB Biotechnologie).

**Tabelle 6-7: Liste der Primer für die RT-PCR.**

Primernamen		Oligonukleotidsequenz 5'→3'
<i>mBmal1</i>	f	TGGAGAAGGTGGCCCAAAGAG
	r	GCGTACTTGTGATGTTTCAGCGG
<i>mRev-Erbα</i>	f	CGGCAAGGCAACACCAAGAATG
	r	ACGATGCAAAGCGCACCATCAG
<i>mRora</i>	f	CACCGTGTACTTTGACGGGA
	r	GCGATCCGCTGACATCAGTA

Primername		Oligonukleotidsequenz 5'→3'
<i>mCry1</i>	f	ACCATGCTGAGGCAAGCAGAC
	r	TTCCCGCTGCTGCTACAACCTC
<i>mPer2</i>	f	ATCTCCAGGCGGTGTTGAAG
	r	GCAGTAACACAGCCTGTCAC
<i>mDbp</i>	f	AAGCAGCCAAGAGGTCGAGAG
	r	CGTGAAAGCACACAGCACGGTAG
<i>mIL10</i>	f	CTGCTCTAACTGACTGGCAT
	r	GGAGTCGGTTAGCAGTATGT
<i>mIL12p40</i>	f	AAATTACTCCGGACGGTTCA
	r	CTGGCAGGACACTGGAATACT
<i>mIL12p35</i>	f	CCCTTGCCCTCCTAAACCA
	r	CTAAGACACCTGGCAGGTCCA
<i>miNOS</i>	f	ACTTCCTGGACATTACGACC
	r	GGAGCTGATGGAGTAGTAGC
<i>mArginase</i>	f	GGAAGAGACCTTCAGCTACC
	r	GTACTCTTCACCTCCTCTGC
<i>mRPII</i>	f	CGACGAGGACATGCAATATG
	r	CGGCTCTTCAACTTCTCCAC
<i>hBMAL1</i>	f	CTGATGCCTCTTCTCCAGG
	r	ACAGCCATTGCTGCCTCATC
<i>hREV-ERB<math>\alpha</math></i>	f	CATGGAGAATTCCGCTTCGG
	r	CAGCAGCTTCTCGGAATGC
<i>hROR<math>\alpha</math></i>	f	CTTCTTTCCCTACTGTTTCGTTTC
	r	GCAGGTTTCCAGATGCGATT
<i>hCYP26A1</i>	f	TTCGAGGAAATGACCCGCAA
	r	CGAATGTTCTGCTCGATGCG
<i>hHOX-A1</i>	f	TCACTACCAAGCAGCTCACG
	r	CGGAGAGATGGGCAAGAGAC
<i>hRAR<math>\beta</math>2</i>	f	AATTACCCTGCTGAAGGCCG
	r	GCTGGTTGGCAAAGGTGAAC
<i>hRPII</i>	f	GCACCACGTCCACTGACA
	r	GTGCGGCTGCTTCCATAA

Dazu wurde für die Expression der CCGs in der Mausleber ein Mastermix aus 12,5 µl Maxima-Puffer, 10 µl Wasser, 1 µl Primer-Verdünnung (1:25 in H<sub>2</sub>O nf, entspricht 4 µM) und 0,5 µl Rox (1:100 in H<sub>2</sub>O nf) je Probe angesetzt. Es wurden 24 µl in eine weiße 96-Kavitäten-Platte pipettiert, die cDNA 1:3 verdünnt (entspricht 16,7 ng/µL) und, außer in der Negativkontrolle, 1 µl je Kavität zugefügt. Von jeder Probe wurde die cDNA-Konzentration der verschiedenen CCGs sowie die RNA-Polymerase II (RPII) als Referenz in einer Doppelbestimmung im Mx300P qPCR System (Stratagene, Agilent Technologies) gemessen. Die qRT-PCRs wurden mit folgendem Verlauf getätigt: 10 min bei 95°C zur Hitzeaktivierung, dann je 50 Zyklen mit 35 s bei 95°C zur Denaturierung, 45 s bei der primerspezifischen Temperatur zur Hybridisierung und 40 s bei 72°C zur Extension. Alle weiteren qRT-PCRs wurden mit dem CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) durchgeführt, das kein Rox benötigt, sodass dieses durch 0,5 µL Wasser ersetzt wurde. Die qRT-PCRs wurden mit folgendem Verlauf getätigt: 10 min bei 95°C zur Hitzeaktivierung, dann je 42 Zyklen mit 30 s bei 95°C zur Denaturierung, 40 s bei 56°C zur Hybridisierung und 30 s bei 72°C zur Extension. Als Kontrolle der Primerspezifität wurde eine Schmelzkurve erstellt. Zur Auswertung wurden die Daten aus der MxPro Software bzw. dem Bio-Rad CFX Manager in Excel (Microsoft 2010) exportiert und nach der Formel  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  die Genexpression im Verhältnis zu RPII berechnet.<sup>276,277</sup>

#### **6.4.4. Immunpräzipitation**

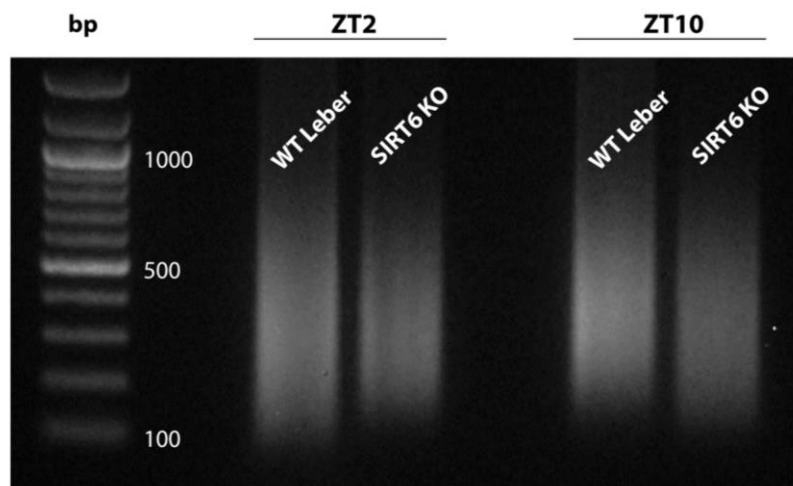
Als Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen und von Proteinen mit der DNA in Promotorregionen wurden (Chromatin-)Immunpräzipitationen verwendet. Für die Immunpräzipitation wurden je Ansatz etwa 15 Mio Zellen mit PBS gewaschen um Mediumrückstände zu entfernen und in 1 mL IP-Lysepuffer — 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA (Roth) und 2 mM EDTA mit Proteaseinhibitoren — für 10 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde für 5 min bei 4°C und 14.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und das Pellet in 200 µL Complete digestion buffer mit 0,5 µL PMSF (100 mM) und 1 µL Protease inhibitor cocktail (PIC) aus dem *Nuclear Complex CoIP-Kit* (Active motif) aufgenommen. Es wurden 1 µL Enzymatic Shearing Cocktail (Active motif) zugefügt, auf dem Vortex gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 4 µL EDTA (0,5 M, Active motif) gestoppt und die Probe für 10 min bei 4°C und 14.000xg zentrifugiert. Währenddessen wurden 60 µL Protein A/G-Agarose (Roche) dreimal mit 500 µL IP low salt wash buffer

(Active motif) gewaschen. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde mit dem ersten Überstand vereinigt, 75  $\mu$ L als „Input“ abgenommen und für 5 min bei 99°C gekocht. Die verbliebene Menge wurde gleichmäßig auf zwei Gefäße mit Agarose aufgeteilt und mit 1-2  $\mu$ g Antikörper bzw. Kontrollantikörper versetzt (vgl. Tabelle 6-6). Die Proben wurden über Nacht bei 4°C in einem Rotationsmischer inkubiert und die Proteine am nächsten Morgen nach dreimaligem Waschen mit IP low salt wash buffer mit etwa 75  $\mu$ L Ladepuffer eluiert. Nach dem Aufkochen (5 min, 99°C) wurden die Proben im Western Blot analysiert.

#### **6.4.5. Chromatin-Immunpräzipitation**

Bei der Chromatin-Immunpräzipitation von adhären Zellen wurden diese in der Kulturschale zunächst durch Zugabe von methanolfreiem PFA ins Medium (Endkonzentration 1%) unter Schütteln fixiert, um die Protein-DNA-Bindung für die folgenden Schritte zu stabilisieren („cross-linking“). Die Zellen wurden nach 10 min mit PBS gewaschen und die Fixierung für 5 min mit einer Glycinlösung (Active motif) gestoppt. Die Zellen wurden wieder mit PBS gewaschen und mit 0,5 mM PMSF in PBS bedeckt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig von der Kulturplatte gelöst und für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bei -80°C eingefroren oder mit ChIP-Lysepuffer — 1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM TRIS (pH 8,0), Protease inhibitor cocktail (PIC, Active motif) — lysiert. Je 10 Millionen Zellen wurde 1 mL Lysepuffer verwendet. Sollte Lebergewebe für die Chromatin-Immunpräzipitation verwendet werden, wurden 30 mg dessen zunächst mit einem elektrischen Homogenisator (POLYTRON PT1200E, Kinematica) in 500  $\mu$ L PBS homogenisiert. Es wurden 500  $\mu$ L 2% PFA zugegeben und alles für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Probe bei 3000xg für 5 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 1 mL Glycinlösung hinzugefügt. Nach erneuter 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln wurde bei 3000xg für 5 min bei 4°C zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Auch hierbei konnte das Pellet weggefroren oder mit 1 mL ChIP-Lysepuffer lysiert werden. Dazu wurde das Lysat 15 min auf Eis gestellt und mehrfach gevortext. Die DNA wurde nun mit Ultraschall fragmentiert (M220 Focused-ultrasonicator von Covaris, AG Zechner: 75 Watt, Duty factor 10, 200 Zyklen für 15 min bei 7°C) und die Größe der DNA-Fragmente überprüft. Dazu wurde die Probe zentrifugiert (maximale Geschwindigkeit, 10 min, 4°C) und die Konzentration der DNA im Überstand mit dem NanoDrop-Spektrometer bestimmt. Aus dem Überstand wurden 25  $\mu$ L für die Scherkontrolle entnommen und mit

1  $\mu\text{L}$  RNase A (10 mg/mL, ThermoFischer Scientific) für 30 min bei 37°C und anschließend mit 0,5  $\mu\text{L}$  Proteinase K (20 mg/mL, Thermo Scientific) über Nacht bei 65°C inkubiert. Die Kontrolle wurde mit dem *QIAquick PCR Purification-Kit* (Qiagen) aufgereinigt, wobei die DNA mit 20  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O eluiert wurde. Etwa 600 ng DNA wurden je Probe mit Ladebuffer (mit Orange G, da Bromphenolblau bei etwa 300 bp migriert) versetzt und über ein 1%iges Ethidiumbromid-Agarose-Gel aufgetrennt (vgl. „Genotypisierung“). Es wurde ein TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer — 40 mM TRIS (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 20 mM Essigsäure (Roth) in H<sub>2</sub>O — verwendet.



**Abb. 6-4: Größe der DNA-Fragmente nach dem Scheren des Chromatins für die Chromatin-Immünpräzipitation.**

Die DNA, die für die Chromatin-Immünpräzipitation verwendet wurde, wurde mittels Ultraschall (Covaris, AG Zechner) auf eine Größe von 200bp bis 700bp geschert. Die Größe der Fragmente wurde für jedes ChIP-Experiment überprüft; gezeigt ist ein Beispiel.

Wenn die Größe der DNA-Fragmente zwischen 200 bp bis 700 bp lag (Abb. 6-4), wurden 80  $\mu\text{g}$  DNA für einen Histon-ChIP oder 250  $\mu\text{g}$  DNA für einen Transkriptionsfaktoren-ChIP mit ChIP-Waschpuffer — 20 mM TRIS (pH 8,0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, PIC — auf 1 mL aufgefüllt. Es wurden 60  $\mu\text{L}$  Agarose-A/G-Beads dreimal mit je 500  $\mu\text{L}$  ChIP-Waschpuffer gewaschen und mit der Probe für 1 h bei 4°C im Rotationsmischer inkubiert. Dieser Schritt sollte unspezifisch bindende DNA und Proteine entfernen. Durch Zentrifugation (3000xg, 1 min) wurden die Agarose-Beads am Gefäßboden gesammelt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 25  $\mu\text{L}$  davon zum Überprüfen der Einsatzmenge (Input) abgenommen und bei 4°C



aufbewahrt. Der Rest wurde mit dem entsprechenden Antikörper bzw. Kontrollantikörper über Nacht bei 4°C im Rotationsmischer inkubiert. Es wurden die Antikörper H3K9ac (Active motif, 39137), H3K27me3 (Active motif, 39155) und ROR $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, sc-6062) verwendet. Als Kontrolle dienten Normal Rabbit IgG (Cell signaling) oder Normal Goat IgG (Peprotech). Am nächsten Morgen wurde der Protein-Antikörper-DNA-Komplex zu 60  $\mu$ L gewaschenen Agarose-Beads gegeben und erneut für 2-3 h im Rotationsmischer inkubiert. Die Probe wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen, die Agarose-Beads für 5 min mit 500  $\mu$ L kaltem LowSalt-Waschpuffer — 20 mM TRIS (pH 8,0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 1% Triton X-100 — im Rotationsmischer gewaschen. Der Waschschriff wurde mit HighSalt-Waschpuffer (wie LowSalt-Waschpuffer nur mit 500 mM NaCl), Lithiumchlorid-Waschpuffer — 10 mM TRIS (pH 8,0), 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40 (IGEPAL, Sigma Aldrich), 1% Natriumdeoxycholat — und zweimal mit TRIS-EDTA-Waschpuffer — 10 mM TRIS (pH 8,0), 1 mM EDTA — wiederholt. Dann wurde der Protein-Antikörper-DNA-Komplex mit Elutionspuffer von den Agarose-Beads eluiert, indem 100  $\mu$ L auf 37°C vorgewärmter Elutionspuffer zugegeben und für mindestens 15 min bei 1250 rpm geschüttelt wurden. Die Probe wurde zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Agarose-Beads erneut mit 100  $\mu$ L Elutionspuffer — 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS— geschüttelt. Zu den 200  $\mu$ L Eluat wurden 8  $\mu$ L 5 M NaCl pipettiert und über Nacht bei 65°C geschüttelt (950 rpm), um die Protein-DNA-Bindung zu lösen („reverse cross-linking“). Für die 25  $\mu$ L Input wurden 2  $\mu$ L NaCl-Lösung verwendet. Am nächsten Morgen wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt, mit je 1  $\mu$ L DNase freier RNase A versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 0,5  $\mu$ L Proteinase K zugefügt und 1 h bei 42°C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden wurden die Proben für 20 min auf 67°C erhitzt und die DNA mit dem *QIAquick PCR Purification-Kit* aufgereinigt. Die DNA wurde mit 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O nf eluiert. Davon wurden für die RT-PCR 2  $\mu$ L für ein Reaktionsvolumen von 25  $\mu$ L verwendet (siehe auch: „RT-PCR“). Da für die Input-DNA nur ein vierzigstel der Gesamtprobe (25  $\mu$ L aus 1 mL) verwendet wurde, wurde die Input-DNA für die RT-PCR 1:10 verdünnt, zur Normalisierung verwendet und die erhaltenen Werte der ChIP-Proben wurden vierfach genommen (entspricht „% of input“).

**Tabelle 6-8: Liste der Primer für die ChIP-PCR.<sup>140</sup>**

Primernamen		Oligonukleotidsequenz 5'→3'
<i>Bmal1</i> -RORE	f	GGATTGGTTCGAAAGTAGGTTAG
	r	GGTAAACAGGCACCTCCGTC
<i>Rev-Erbα</i> -RORE	f	GTAGACTACAAATCCCAACAATCCTG
	r	TGGAGCAGGTACCATGTGATTC
<i>Cry1</i> -RORE	f	TCAGTAGCAGTGGGATTATGTTGTATC
	r	ACATGTAGTAACTTCCTTATGCCACTTC
<i>Bmal1 distal</i>	f	GCCTGCCTCTTGGAGGATG
	r	GGCATCTGGCACTGAGGAG
<i>Rev-Erbα distal</i>	f	CATGGTGCTACTGTGTAAGGTGTGT
	r	CACAGGCGTGCACTCCATAG
<i>Cry1 distal</i>	f	CCAGCCTTGTCTACAGAGTAAGTTC
	r	GAGAACAGAACTACAGAACTAACAACACTGTG
<i>Per2</i> -Promotor	f	GGCCGTCCTATTTGCCCTCAAG
	r	GCGAGTAGGCTCGTCCACTTC
<i>Gapdh</i> -Promotor	f	GTATGACTCCACTCACGGCAAAT
	r	GTCTCGCTCCTGGAAGATGGT

#### 6.4.6. Klonierung eines Reportergenplasmids

Für ein Luziferase-Reportergen-Assay wurde das Plasmid pABpuro-BluF<sup>278</sup> von Steve Brown (Addgene #46824) bestellt, dessen funktionelle RORE-Luziferase(*firefly*)-Einheit in einen Vektor mit Blau-Weiß-Selektion (pBS) eingebaut werden sollte. Mit einer Plastikimpföse wurden die Bakterien auf Antibiotikumsplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden Monoklonen in eine Über-Tag-Kultur überführt. Die Über-Tag-Kultur bestand aus 3 mL autoklaviertem LB-Medium — 10 g Trypton (Tryptic Soy Broth, Fluka), 5 g Hefeextrakt (AppliChem), 10 g NaCl, *ad* 1 L mit dH<sub>2</sub>O (pH 7,4) — mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 mg/L Ampicillin, AppliChem) und wurde etwa 6h bei 37°C und 245rpm inkubiert. Abends wurde sie in 25 mL LB-Medium für eine Über-Nacht-Kultur im Erlenmeyerkolben aufgenommen. Aus dieser Über-Nacht-Kultur wurde 1 mL für einen Glycerolstock (20%) entnommen und mit der restlichen Kultur eine Plasmidpräparation mit dem *QIAfilter Midi-Kit* (Qiagen) durchgeführt. Das bei der „Midipräp“ erhaltene Plasmid wurde bei -20°C aufbewahrt. Um

die RORE-Luziferase-Einheit in den pBS-Vektor einbauen zu können, mussten Plasmid und Vektor zunächst geschnitten und dann miteinander ligiert werden: Zur Restriktion wurden 1 µg DNA mit 2 µL 10xRestriktionspuffer (angepasst an das Restriktionsenzym), 0,2 µL Acetyl-BSA (1 mg/mL, Promega) mit H<sub>2</sub>O auf 19,5 µL aufgefüllt und gemischt. Dazu wurden 0,5 µL der Restriktionsenzyme SmaI und BamHI (Promega) pipettiert und nacheinander für 1-4 h bei der enzymespezifischen Temperatur (25°C für SmaI und 37°C für BamHI) inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde 20min bei 65°C inaktiviert und über eine Agarosegelelektrophorese mit TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer im Vergleich zum unverdauten Plasmid überprüft. Das restringierten Plasmid sowie die entsprechende Insertbande wurden mit dem *QIAquick Gel Extraction-Kit* (Qiagen) aus dem Gel extrahiert. Die Insert-Konzentration wurde mit dem NanoDrop-Spektrometer bestimmt und als Kontrolle erneut auf einem Agarosegel im Vergleich zum pBS-Vektor (1:10 verdünnt) aufgetragen. Das reine, lineare Insert (0,06 pmol) — hier die RORE-Luziferase-Einheit — wurde 3:1 mit dem linearisierten pBS-Vektor (0,02 pmol) und 1 µL T4-Ligase (New England Biolabs) sowie 2 µL 10xLigationspuffer bei 16°C über Nacht inkubiert. Ein Ligationsansatz ohne Insert diente als Vektor-Religationskontrolle. Um die Religationsrate zu verringern können Insert ODER Vektor dephosphoryliert werden.

#### **6.4.7. Transformation**

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* (XL1-blue) auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz dazugegeben und gemischt. Die Zellen wurden zunächst für 10 min auf Eis, dann für 2,5 min bei 42°C und schließlich 3-5 min wieder auf Eis inkubiert. Dann wurde 1 mL 37°C warmes SOC-Medium (*Super Optimal Broth with Glucose*, New England Biolabs) hinzugefügt und die Bakteriensuspension für 1 h bei 37°C und 254 rpm geschüttelt. Aus dieser wurden 50-250 µL auf einer LB-Agar-Platte — 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agarose (BactoAgar, BD Biosciences), ad 1 L mit dH<sub>2</sub>O mit 100 mg/L Ampicillin — ausgestrichen. Im Fall des Blau-Weiß-Selektionsvektors wurde die Platte zunächst bei 37°C angewärmt und dann gleichmäßig mit 50-100 µL Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, 100 mM in H<sub>2</sub>O, AppliChem) und 50 µL 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal, 20 mg/mL in DMF, BioVectra) bestrichen. Bis zum Ausplattieren der Zellen wurden sie weiter vorgewärmt und getrocknet. Die ausgestrichene Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 15 blaue Kolonien

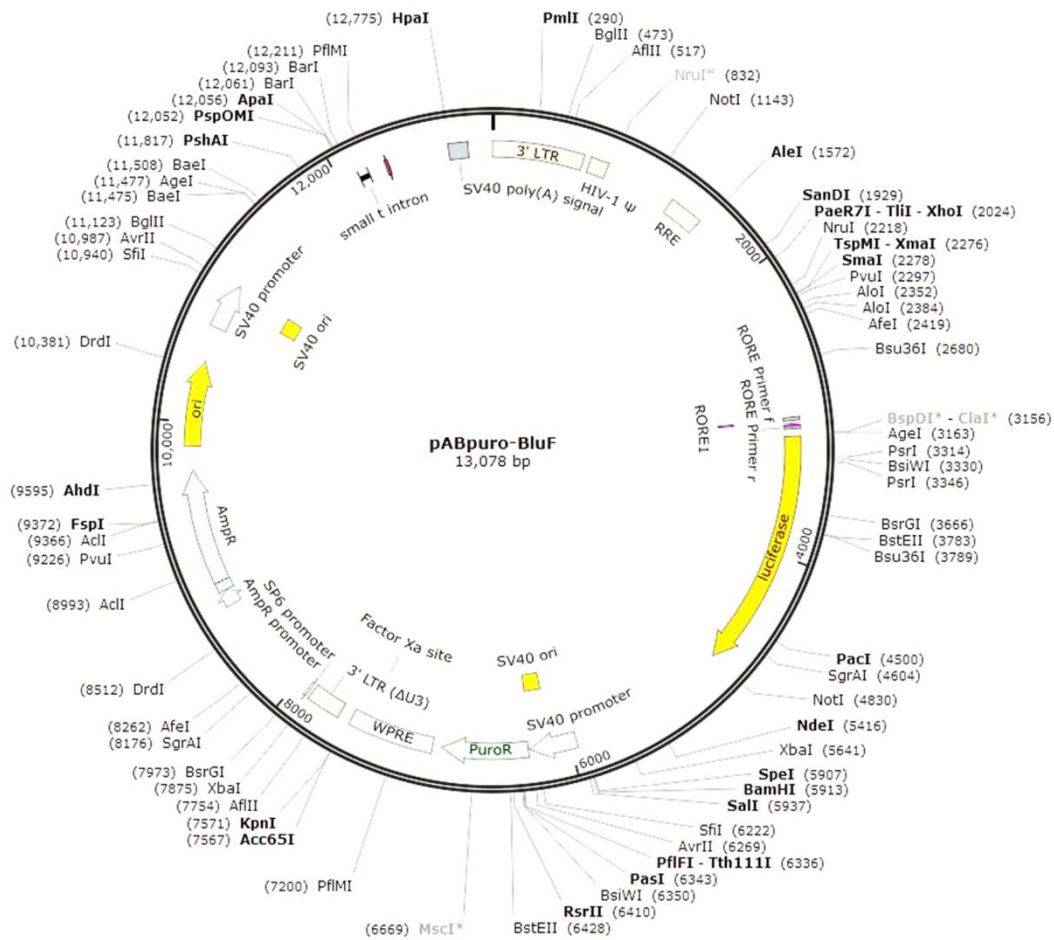
mit einer sterilen Pipettenspitze in 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  *in vitro* solubilisiert und 2  $\mu\text{L}$  davon für eine Kontroll-PCR, 8  $\mu\text{L}$  für eine Über-Nacht-Kultur verwendet.

#### **6.4.8. Transfektion von Hepatozyten**

Da die Klonierung nicht erfolgreich war, wurde das Luziferase-Reportergen-Assay mit dem ursprünglichen Plasmid durchgeführt (Abb. 6-5). Dazu wurde es mittels Lipofektion in Zellkulturzellen eingeführt. Die Zellen wurden in 12-Kavitäten-Platten kultiviert und für die Transfektion das reduzierte Medium OptiMEM (ThermoFisher Scientific) ohne Serum verwendet. Je Kavität wurden 100  $\mu\text{L}$  OptiMEM mit 1  $\mu\text{g}$  DNA und 1  $\mu\text{L}$  PLUS Reagent (ThermoFisher Scientific) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, schließlich 2,5  $\mu\text{L}$  Lipofectamine LTX (ThermoFisher Scientific) zugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Diese 100  $\mu\text{L}$  Transfektionsansatz wurden zu den Zellen in OptiMEM getropft. Nach 4-6 h wurde das Medium gewechselt. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit einem GFP-Vektor transfiziert. Als Kontrolle der Luziferaseexpression wurde das pGL3-Plasmid verwendet. Die Transfektion mit dem pGL3-RARE-Luziferase-Reporter<sup>279</sup> von T. Michael Underhill (Addgene, #13458) erfolgte nach dem gleichen Protokoll. Alle Plasmide wurden als Bakterien-Stock von addgene erhalten.

#### **6.4.9. Luziferase-Reportergen-Assay**

Für das Luziferase-Assay wurden die Zellkulturzellen am Tag nach der Transfektion für 2 h mit Medium, das 2% FCS enthält, und anschließend für 2 h mit Medium, das 50% FCS enthält, kultiviert (vgl. „Serumschock“). Der Serumschock soll die Hepatoblastomzellen synchronisieren. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 150  $\mu\text{L}$  Reporter Lysis Buffer (1:5 in  $\text{H}_2\text{O}$ , Promega) je Kavität lysiert. Um die Lyse zu optimieren, wurden die Zellen bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach dem Auftauen der Proben auf einem Schüttler, wurden diese in Reaktionsgefäße transferiert und zentrifugiert (3000xg, 5 min). Je Probe wurden 20  $\mu\text{L}$  des Lysats in eine weiße 96-Kavitäten-Platte pipettiert und zunächst die Fluoreszenz zum Überprüfen der GFP-Expression gemessen. Dann erst wurden 60  $\mu\text{L}$  Luziferin (Promega) zugegeben. Da das Lumineszenzsignal nur etwa 1 min stabil bleibt, wurde es sofort nach der Substratzugabe im Fluoro-Luminometer detektiert. Zur Berechnung der Transkriptionsaktivität wurde die Lumineszenz anhand der Fluoreszenz normalisiert.



**Abb. 6-5: Karte des RORE-Luziferase-Plasmids pABpuro-BluF.**

Die Plasmidkarte zeigt das RORE-Luziferase-Konstrukt mit dem RORE-Element (lila) und der Luziferase (gelb). Es weist außerdem zur Selektion eine Ampicillinresistenz (AmpR) auf. Am äußeren Rand sind die Schnittstellen für die genannten Restriktionsenzyme vermerkt. Die Karte wurde mit der Software *SnapGene Viewer* erstellt.



## 7. Literatur

1. Abdel-Misih, S. R. Z. & Bloomston, M. Liver anatomy. *Surg. Clin. North Am.* **90**, 643–53 (2010).
2. Amitrano, L., Guardascione, M. a, Brancaccio, V. & Balzano, A. Coagulation disorders in liver disease. *Semin. Liver Dis.* **22**, 83–96 (2002).
3. Brauer, R. W., Pessotti, R. L. & Pizzolato, P. Isolated Rat Liver Preparation. Bile Production and Other Basic Properties. *Exp. Biol. Med.* **78**, 174–181 (1951).
4. Krebs, H. A. Some aspects of the regulation of fuel supply in omnivorous animals. *Adv. Enzyme Regul.* **10**, 397–420 (1972).
5. Hers, H. G. The control of glycogen metabolism in the liver. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 167–89 (1976).
6. Taylor, R. *et al.* Direct assessment of liver glycogen storage by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy and regulation of glucose homeostasis after a mixed meal in normal subjects. *J Clin* **97**, 126–132 (1996).
7. Percival, M. Phytonutrients & Detoxification. *Clin. Nutr. Insights* **5**, 8–11 (1997).
8. Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J. P. & Fallowfield, J. A. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 181–194 (2014).
9. Bugge, A. *et al.* Rev-erba and Rev-erbβ coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev.* **26**, 657–667 (2012).
10. Preitner, N. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell* **110**, 251–260 (2002).
11. Nakahata, Y. *et al.* The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-

- mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* **134**, 329–40 (2008).
12. Masri, S. *et al.* Partitioning Circadian Transcription by SIRT6 Leads to Segregated Control of Cellular Metabolism. *Cell* **158**, 659–672 (2014).
  13. Kim, H.-S. *et al.* Hepatic-Specific Disruption of SIRT6 in Mice Results in Fatty Liver Formation Due to Enhanced Glycolysis and Triglyceride Synthesis. *Cell Metab.* **12**, 224–236 (2010).
  14. Xiao, C. *et al.* Progression of chronic liver inflammation and fibrosis driven by activation of c-JUN signaling in Sirt6 mutant mice. *J. Biol. Chem.* **288**, 41903–41913 (2013).
  15. Marquardt, J. U. *et al.* Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology* **58**, 1054–64 (2013).
  16. Rine, J., Strathern, J. N., Hicks, J. B. & Herskowitz, I. A Suppressor of Mating-Type Locus Mutations in *Saccharomyces Cerevisiae*: Evidence for and Identification of Cryptic Mating-Type Loci. *Genetics* **93**, 877–901 (1979).
  17. Fritze, C. E., Verschuere, K., Strich, R. & Easton Esposito, R. Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *EMBO J.* **16**, 6495–6509 (1997).
  18. Smith, J. S. & Boeke, J. D. An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev.* **11**, 241–254 (1997).
  19. Bryk, M. *et al.* Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast. *Genes Dev.* **11**, 255–269 (1997).
  20. Kaeberlein, M., McVey, M. & Guarente, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **13**, 2570–2580 (1999).
  21. Landry, J. *et al.* The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 5807–5811 (2000).
  22. Smith, J. S. *et al.* A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 2–7 (2000).
  23. Tanner, K. G., Landry, J., Sternglanz, R. & Denu, J. M. Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique



- product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 14178–14182 (2000).
24. Frye, R. A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 793–8 (2000).
  25. Haigis, M. C. & Sinclair, D. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 253–295 (2010).
  26. Haigis, M. C. & Guarente, L. P. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* **20**, 2913–21 (2006).
  27. Nakagawa, T. & Guarente, L. Sirtuins at a glance. *J. Cell Sci.* **124**, 833–838 (2011).
  28. Finkel, T., Deng, C.-X. & Mostoslavsky, R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* **460**, 587–91 (2009).
  29. Hebbes, T. R., Thorne, A. W. & Crane-Robinson, C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* **7**, 1395–1402 (1988).
  30. Grunstein, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349–352 (1997).
  31. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457–63 (2004).
  32. Braunstein, M., Sobel, R. E., Allis, C. D., Turner, B. M. & Broach, J. R. Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4349–4356 (1996).
  33. Jing, H. & Lin, H. Sirtuins in Epigenetic Regulation. *Chem. Rev.* 2350–2375 (2015).
  34. Mostoslavsky, R. *et al.* Genomic Instability and Aging-like Phenotype in the Absence of Mammalian SIRT6. *Cell* **124**, 315–329 (2006).
  35. Pan, P. W. *et al.* Structure and biochemical functions of SIRT6. *J. Biol. Chem.* **286**, 14575–87 (2011).
  36. Min, L. *et al.* Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1203–11 (2012).
  37. Sharma, A. *et al.* The role of SIRT6 protein in aging and reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 18439–18447 (2013).

38. Ronnebaum, S. M., Wu, Y., McDonough, H. & Patterson, C. The ubiquitin ligase CHIP prevents SirT6 degradation through noncanonical ubiquitination. *Mol. Cell Biol.* **33**, 4461–72 (2013).
39. Feldman, J. L., Baeza, J. & Denu, J. M. Activation of the Protein Deacetylase SIRT6 by Long-chain Fatty Acids and Widespread Deacetylation by Mammalian Sirtuins. *J. Biol. Chem.* **288**, 31350–31356 (2013).
40. Michishita, E. *et al.* SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* **452**, 492–6 (2008).
41. Liszt, G., Ford, E., Kurtev, M. & Guarente, L. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **280**, 21313–20 (2005).
42. Gil, R., Barth, S., Kanfi, Y. & Cohen, H. Y. SIRT6 exhibits nucleosome-dependent deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.* **41**, 8537–8545 (2013).
43. Jiang, H. *et al.* SIRT6 regulates TNF- $\alpha$  secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature* **496**, 110–3 (2013).
44. Kugel, S. & Mostoslavsky, R. Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 72–81 (2014).
45. Michishita, E. *et al.* Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6. *Cell Cycle* **8**, 2664–6 (2009).
46. Cheng, W.-H., Muftuoglu, M. & Bohr, V. A. Werner syndrome protein: functions in the response to DNA damage and replication stress in S-phase. *Exp. Gerontol.* **42**, 871–8 (2007).
47. Chen, L. *et al.* WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair. *Aging Cell* **2**, 191–199 (2003).
48. Levy, M. Z., Allsopp, R. C., Futcher, A. B., Greider, C. W. & Harley, C. B. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* **225**, 951–960 (1992).
49. Mao, Z. *et al.* SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science* **332**, 1443–6 (2011).
50. Kaidi, A., Weinert, B., Choudhary, C. & Jackson, S. Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. *Science* **329**, 1348–1353 (2010).
51. McCord, R., Michishita, E. & Hong, T. SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging (Albany, NY)*. **1**,

- 109–121 (2009).
52. Toiber, D. *et al.* SIRT6 recruits SNF2H to sites of DNA breaks, preventing genomic instability through chromatin remodeling. *Mol. Cell* **51**, 454–468 (2013).
  53. Khanna, K. K. & Jackson, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* **27**, 247–254 (2001).
  54. Zhong, L. *et al.* The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell* **140**, 280–93 (2010).
  55. Dominy, J. E. *et al.* The deacetylase Sirt6 activates the acetyltransferase GCN5 and suppresses hepatic gluconeogenesis. *Mol. Cell* **48**, 900–13 (2012).
  56. Tao, R., Xiong, X., DePinho, R. a, Deng, C.-X. & Dong, X. C. Hepatic SREBP-2 and cholesterol biosynthesis are regulated by FoxO3 and Sirt6. *J. Lipid Res.* **54**, 2745–53 (2013).
  57. Yang, S. J. *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by rosiglitazone increases sirt6 expression and ameliorates hepatic steatosis in rats. *PLoS One* **6**, e17057 (2011).
  58. Kanfi, Y. *et al.* SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity. *Aging Cell* **9**, 162–173 (2010).
  59. Van Gool, F. *et al.* Intracellular NAD levels regulate tumor necrosis factor protein synthesis in a sirtuin-dependent manner. *Nat. Med.* **15**, 206–10 (2009).
  60. Kawahara, T. L. *et al.* SIRT6 Links Histone H3 Lysine 9 Deacetylation to NF-kB-Dependent Gene Expression and Organismal Life Span. *Cell* **136**, 62–74 (2009).
  61. Grimley, R. *et al.* Over expression of wild type or a catalytically dead mutant of Sirtuin 6 does not influence NFkB responses. *PLoS One* **7**, e39847 (2012).
  62. Sebastián, C. *et al.* The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell* **151**, 1185–99 (2012).
  63. Sundaresan, N. R. *et al.* The sirtuin SIRT6 blocks IGF-Akt signaling and development of cardiac hypertrophy by targeting c-Jun. *Nat. Med.* **18**, 1643–50 (2012).
  64. Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J. Gen. Physiol.* **8**, 519–30 (1927).

65. Lai, C.-C. *et al.* Altered expression of SIRT gene family in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* **34**, 1847–54 (2013).
66. Wang, J. C. *et al.* Histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology* **81**, 325–9 (2011).
67. Pittendrigh, C. S. On Temperature Independence in the Clock System Controlling Emergence Time in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **40**, 1018–1029 (1954).
68. Halberg, F. Chronobiology. *Annu. Rev. Physiol.* **31**, 675–726 (1969).
69. Lévi, F. *et al.* Circadian rhythms in circulating T lymphocyte subtypes and plasma testosterone, total and free cortisol in five healthy men. *Clin. Exp. Immunol.* **71**, 329–35 (1988).
70. Born, J., Lange, T., Hansen, K., Molle, M. & Fehm, H.-L. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J. Immunol.* **158**, 4454–4464 (1997).
71. Abo, T., Kawate, T., Itoh, K. & Kumagai, K. Studies on the bioperiodicity of the immune response. - Circadian rhythms of human T, B, and K cell traffic in the peripheral blood. *J. Immunol.* **126**, 1360–3 (1981).
72. Dunlap, J. Genetic and molecular analysis of circadian rhythms. *Annu. Rev. Genet.* 579–601 (1996).
73. Dunlap, J. C. Molecular bases for circadian clocks review. *Cell* **96**, 271–290 (1999).
74. Vitaterna, M. H. *et al.* Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* **264**, 719–25 (1994).
75. Honma, S. *et al.* Circadian Oscillation of BMAL1, a Partner of a Mammalian Clock Gene Clock, in Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**, 83–87 (1998).
76. Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski Jr., L. F. & Reppert, S. M. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* **19**, 1261–1269 (1997).
77. Hsu, D. S. *et al.* Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry* **35**, 13871–13877 (1996).
78. Panda, S., Hogenesch, J. B. & Kay, S. A. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417**, 329–335 (2002).

79. Akhtar, R. a. *et al.* Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr. Biol.* **12**, 540–550 (2002).
80. Panda, S. *et al.* Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**, 307–320 (2002).
81. Lowrey, P. L. & Takahashi, J. S. Mammalian Circadian Biology: Elucidating Genome-Wide Levels of Temporal Organization. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **5**, 407–441 (2004).
82. Storch, K.-F. *et al.* Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* **417**, 78–83 (2002).
83. Bellet, M. M. & Sassone-Corsi, P. Mammalian circadian clock and metabolism - the epigenetic link. *J. Cell Sci.* **123**, 3837–48 (2010).
84. Masri, S. & Sassone-Corsi, P. Plasticity and specificity of the circadian epigenome. *Nat. Neurosci.* **13**, 1324–1329 (2010).
85. Aguilar-Arnal, L. & Sassone-Corsi, P. The circadian epigenome: how metabolism talks to chromatin remodeling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 170–6 (2013).
86. Masri, S., Kinouchi, K. & Sassone-Corsi, P. Circadian clocks, epigenetics, and cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **27**, 50–56 (2015).
87. Doi, M., Hirayama, J. & Sassone-Corsi, P. Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* **125**, 497–508 (2006).
88. Etchegaray, J., Lee, C., Wade, P. & Reppert, S. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* **421**, 177–182 (2002).
89. Krivtsov, A. V. & Armstrong, S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 823–833 (2007).
90. Asher, G. *et al.* SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* **134**, 317–28 (2008).
91. Etchegaray, J. P. *et al.* The polycomb group protein EZH2 is required for mammalian circadian clock function. *J. Biol. Chem.* **281**, 21209–21215 (2006).
92. Nakahata, Y., Sahar, S. & Astarita, G. Circadian control of the NAD<sup>+</sup> salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* **654**, (2009).

93. Ramsey, K., Yoshino, J. & Brace, C. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis. *Science* **651**, (2009).
94. Koike, N. *et al.* Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science* **338**, 349–54 (2012).
95. Aschoff, J. Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften* **3**, (1953).
96. Moore, R. Y. & Eichler, V. B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* **42**, 201–206 (1972).
97. Stephan, F. K. & Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 1583–1586 (1972).
98. Gooley, J. J., Lu, J., Chou, T. C., Scammell, T. E. & Saper, C. B. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat. Neurosci.* **4**, 1165 (2001).
99. Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M. & Reppert, S. M. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* **14**, 697–706 (1995).
100. Reppert, S. M. & Weaver, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**, 935–41 (2002).
101. Reinke, H. & Asher, G. Circadian Clock Control of Liver Metabolic Functions. *Gastroenterology* 1–7 (2016).
102. Lewy, A. J., Wehr, T. A., Goodwin, F. K., Newsome, D. A. & Markey, S. P. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* **210**, 1267–9 (1980).
103. Cagnacci, A., Elliott, J. & Yen, S. Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **76**, 447–452 (1992).
104. Vriend, J. & Reiter, R. J. Melatonin feedback on clock genes : a theory involving the proteasome. *J. Pineal Res.* 1–11 (2015).
105. Reppert, S. M., Weaver, D. R. & Ebisawa, T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* **13**, 1177–1185 (1994).
106. Peschke, E. *et al.* Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J. Pineal*

- Res.* **28**, 156–164 (2000).
107. Anhê, G. F. *et al.* In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. *J. Neurochem.* **90**, 559–66 (2004).
  108. Peschke, E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J. Pineal Res.* 26–40 (2008).
  109. Peschke, E., Bähr, I. & Mühlbauer, E. Melatonin and Pancreatic Islets: Interrelationships between Melatonin, Insulin and Glucagon. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6981–7015 (2013).
  110. Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. & Menaker, M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* **291**, 490–493 (2001).
  111. Damiola, F. *et al.* Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* **14**, 2950–2961 (2000).
  112. Stratmann, M., Stadler, F., Tamanini, F., van der Horst, G. T. J. & Ripperger, J. Flexible phase adjustment of circadian albumin D site-binding protein (DBP) gene expression by CRYPTOCHROME1. *Genes Dev.* **24**, 1317–28 (2010).
  113. Ripperger, J., Shearman, L. P., Reppert, S. M. & Schibler, U. CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev.* **14**, 679–89 (2000).
  114. Wuarin, J. & Schibler, U. Expression of the liver-enriched transcriptional activator protein DBP follows a stringent circadian rhythm. *Cell* **63**, 1257–66 (1990).
  115. Allaman-Pillet, N. *et al.* Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* **226**, 59–66 (2004).
  116. Gachon, F., Olela, F. F., Schaad, O., Descombes, P. & Schibler, U. The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab.* **4**, 25–36 (2006).
  117. Erren, T. C. & Reiter, R. J. Defining chronodisruption. *J. Pineal Res.* **46**, 245–7 (2009).
  118. Bass, J. & Takahashi, J. S. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* **330**, 1349–54 (2010).
  119. Erren, T. C., Pape, H. G., Reiter, R. J. & Piekarski, C. Chronodisruption and cancer. *Naturwissenschaften* **95**, 367–82 (2008).

120. Hamilton, T. Influence of environmental light and melatonin upon mammary tumour induction. *Br. J. Surg.* **56**, 764–766 (1969).
121. Shah, P. N., Mhatre, M. C. & Kothari, L. S. Effect of melatonin on mammary carcinogenesis in intact and pinealectomized rats in varying photoperiods. *Cancer Res.* **44**, 3403–3407 (1984).
122. Stevens, R. G. Electric light causes cancer?: Surely you're joking, Mr. Stevens. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **682**, 1–6 (2009).
123. Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P. & Lee, C. The circadian gene *period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* **111**, 41–50 (2002).
124. Fu, L. & Lee, C. C. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 350–61 (2003).
125. Mormont, M. C. & Levi, F. Cancer chronotherapy: Principles, applications, and perspectives. *Cancer* **97**, 155–169 (2003).
126. Dulong, S., Ballesta, A., Okyar, A. & Lévi, F. Identification of Circadian Determinants of Cancer Chronotherapy through In Vitro Chronopharmacology and Mathematical Modeling. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 2154–64 (2015).
127. Aschoff, J. Circadian control of body temperature. *J. Therm. Biol.* **8**, 143–147 (1983).
128. Refinetti, R. & Menaker, M. The circadian rhythm of body temperature. *Physiol. Behav.* **51**, 613–637 (1992).
129. Green, C. B., Takahashi, J. S. & Bass, J. The Meter of Metabolism. *Cell* **134**, 728–742 (2008).
130. Asher, G. & Sassone-Corsi, P. Time for Food: The Intimate Interplay between Nutrition, Metabolism, and the Circadian Clock. *Cell* **161**, 84–92 (2015).
131. Guo, Y. -F. & Stein, P. K. Circadian rhythm in the cardiovascular system: chronocardiology. *Am. Heart J.* **145**, 779–786 (2003).
132. Mellow, M., Spoelstra, K. & Roenneberg, T. The circadian cycle: daily rhythms from behaviour to genes. *EMBO Rep.* **6**, 930–935 (2005).
133. Partch, C., Green, C. & Takahashi, J. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.* **24**, 90–99 (2014).



134. Hogenesch, J. B., Gu, Y. Z., Jain, S. J. & Bradfield, C. A. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 5474–5479 (1998).
135. Murre, C., McCaw, P. S. & Baltimore, D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**, 777–783 (1989).
136. Kume, K. *et al.* mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193–205 (1999).
137. Shearman, L. P. *et al.* Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**, 1013–1019 (2000).
138. Eide, E. J. *et al.* Control of Mammalian Circadian Rhythm by CKI  $\epsilon$  -Regulated Proteasome-Mediated PER2 Degradation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2795 – 2807 (2005).
139. Akashi, M. & Takumi, T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 441–8 (2005).
140. Takeda, Y., Jothi, R., Birault, V. & Jetten, A. M. ROR $\gamma$  directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets in vivo. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8519–35 (2012).
141. Yin, L. & Lazar, M. A. The orphan nuclear receptor Rev-erbalpha recruits the N-CoR/histone deacetylase 3 corepressor to regulate the circadian Bmal1 gene. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1452–9 (2005).
142. Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V. & Cermakian, N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J. Biol. Rhythms* **20**, 391–403 (2005).
143. Ripperger, J. Mapping of binding regions for the circadian regulators BMAL1 and CLOCK within the mouse Rev-erbalpha gene. *Chronobiol. Int.* **23**, 135–42 (2006).
144. Delerive, P., Chin, W. W. & Suen, C. S. Identification of Rev-erb(alpha) as a novel ROR(alpha) target gene. *J. Biol. Chem.* **277**, 35013–8 (2002).
145. Raspè, E. *et al.* Transcriptional regulation of human Rev-erbalpha gene expression by the orphan nuclear receptor retinoic acid-related orphan receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **277**, 49275–81 (2002).

146. Bozek, K. *et al.* Regulation of Clock-Controlled Genes in Mammals. *PLoS One* **4**, (2009).
147. Möller-Levet, C. S. *et al.* Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E1132–41 (2013).
148. Sack, R. L. *et al.* Circadian rhythm sleep disorders: part I, basic principles, shift work and jet lag disorders. An American Academy of Sleep Medicine review. *Sleep* **30**, 1460–1483 (2007).
149. Sack, R. L. *et al.* Circadian rhythm sleep disorders: part II, advanced sleep phase disorder, delayed sleep phase disorder, free-running disorder, and irregular sleep-wake rhythm. An American Academy of Sleep Medicine review. *Sleep* **30**, 1484–1501 (2007).
150. Turek, F. W. *et al.* Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice. *Science* **308**, 1043–1045 (2005).
151. Mormont, M. C. & Lévi, F. Circadian-system alterations during cancer processes: A review. *Int. J. Cancer* **70**, 241–247 (1997).
152. Bunger, M. K. *et al.* Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **103**, 1009–1017 (2000).
153. Kondratov, R. V., Kondratova, A., Gorbacheva, V. Y., Vykhovanets, O. V. & Antoch, M. P. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev.* **20**, 1868–1873 (2006).
154. Fraga, M. F. & Esteller, M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet.* **23**, 413–418 (2007).
155. Shaw, A. C., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A. & Lord, J. M. Aging of the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 507–513 (2010).
156. Gomez, C. R. *et al.* The aging innate immune system. *Curr Opin Immunol* **17**, 457–462 (2005).
157. Kovacs, E. J. *et al.* Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends Immunol.* **30**, 319–324 (2009).
158. Salminen, A. & Kaarniranta, K. NF-kappaB signaling in the aging process. *J. Clin. Immunol.* **29**, 397–405 (2009).

159. Adler, A. S. *et al.* Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF- $\kappa$ B activity. *Genes Dev.* 3244–3257 (2007).
160. Kawahara, T. L. *et al.* Dynamic chromatin localization of Sirt6 shapes stress- and aging-related transcriptional networks. *PLoS Genet.* 7, e1002153 (2011).
161. Rubinsztein, D. C., Mariño, G. & Kroemer, G. Autophagy and aging. *Cell* **146**, 682–695 (2011).
162. Madeo, F., Tavernarakis, N. & Kroemer, G. Can autophagy promote longevity? *Nat. Cell Biol.* **12**, 842–846 (2010).
163. Clarkson, R. W. E. *et al.* Early Responses of Trans-Activating Factors to Growth Hormone in Preadipocytes: Differential Regulation of CCAAT Enhancer-Binding Protein-beta (C/EBP beta) and C/EBP delta. *Mol. Endocrinol.* **9**, 108–120 (1995).
164. Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N. L. & Farmer, S. R. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev.* 2350–2363 (1995).
165. Bjerregaard, M. D., Jurlander, J., Klausen, P., Borregaard, N. & Cowland, J. B. The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow. *Blood* **101**, 4322–4332 (2003).
166. Ma, D., Li, S., Molusky, M. M. & Lin, J. D. Circadian autophagy rhythm: A link between clock and metabolism? *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 319–325 (2012).
167. Ma, D., Panda, S. & Lin, J. D. Temporal orchestration of circadian autophagy rhythm by C/EBP $\beta$ . *EMBO J.* **30**, 4642–4651 (2011).
168. Reinke, H. A conserved role for Period proteins in autophagy regulation. *Talk presented at the Institute of Molecular Biology, Mainz* (2015).
169. Hardin, P. E., Hall, J. C. & Rosbash, M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* **343**, 536–540 (1990).
170. Thresher, R. J. Role of Mouse Cryptochrome Blue-Light Photoreceptor in Circadian Photoresponses. *Science* **282**, 1490–1494 (1998).
171. Möller, A., Sagasser, S., Wiltschko, W. & Schierwater, B. Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: A possible transducer for the avian magnetic compass. *Naturwissenschaften* **91**, 585–588 (2004).

172. Schmalen, I. *et al.* Interaction of Circadian Clock Proteins CRY1 and PER2 Is Modulated by Zinc Binding and Disulfide Bond Formation. *Cell* **157**, 1203–1215 (2014).
173. Zwighaft, Z. *et al.* Circadian Clock Control by Polyamine Levels through a Mechanism that Declines with Age. *Cell Metab.* **22**, 874–885 (2015).
174. Gery, S., Virk, R. K., Chumakov, K., Yu, A. & Koeffler, H. P. The clock gene *Per2* links the circadian system to the estrogen receptor. *Oncogene* **26**, 7916–20 (2007).
175. Magill, J. C. *et al.* PER2 Controls Lipid Metabolism by Direct Regulation of PPAR $\gamma$ . *Cell Metab.* **3**, 1–19 (2010).
176. Zhang, E. E. *et al.* Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat. Med.* **16**, 1152–6 (2010).
177. Narasimamurthy, R. *et al.* Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 12662–12667 (2012).
178. Hara, Y. *et al.* Molecular characterization of Mybbp1a as a co-repressor on the *Period2* promoter. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1115–1126 (2009).
179. Yagita, K. *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein. *EMBO J.* **21**, 1301–1314 (2002).
180. Polyakova, O. *et al.* Identification of novel interacting partners of Sirtuin6. *PLoS One* **7**, e51555 (2012).
181. Lee, C., Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R., Loudon, a S. & Reppert, S. M. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* **107**, 855–67 (2001).
182. Gallego, M. & Virshup, D. M. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 139–148 (2007).
183. Melchior, F., Schergaut, M. & Pichler, A. SUMO: Ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 612–618 (2003).
184. Zhang, Z. *et al.* Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Res.* 580–590 (2004).
185. Khorasanizadeh, S. & Rastinejad, F. Nuclear-receptor interactions on DNA-

- response elements. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 384–90 (2001).
186. Shirai, H., Oishi, K. & Ishida, N. Bidirectional CLOCK/BMAL1-dependent circadian gene regulation by retinoic acid in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 387–391 (2006).
  187. Chambon, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**, 941–954 (1996).
  188. Abu-Abed, S. S. *et al.* Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor  $\gamma$  and retinoid X receptor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **273**, 2409–2415 (1998).
  189. Ozpolat, B., Mehta, K. & Lopez-Berestein, G. Regulation of a highly specific retinoic acid-4-hydroxylase (CYP26A1) enzyme and all-trans-retinoic acid metabolism in human intestinal, liver, endothelial, and acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk. Lymphoma* **46**, 1497–506 (2005).
  190. Mendelsohn, C., Ruberte, E., LeMeur, M., Morriss-Kay, G. & Chambon, P. Developmental analysis of the retinoic acid-inducible RAR-beta 2 promoter in transgenic animals. *Development* **113**, 723–34 (1991).
  191. Huang, D., Chen, S. W., Langston, A. W. & Gudas, L. J. A conserved retinoic acid responsive element in the murine Hoxb-1 gene is required for expression in the developing gut. *Development* **125**, 3235–3246 (1998).
  192. Faria, T. N., Mendelsohn, C., Chambon, P. & Gudas, L. J. The targeted disruption of both alleles of RAR $\beta$ 2 in F9 cells results in the loss of retinoic acid-associated growth arrest. *J. Biol. Chem.* **274**, 26783–26788 (1999).
  193. Tang, X.-H. & Gudas, L. J. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 345–64 (2011).
  194. Gillespie, R. F. & Gudas, L. J. Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells. *J. Mol. Biol.* **372**, 298–316 (2007).
  195. Lee, J. M. *et al.* EZH2 Generates a Methyl Degron that Is Recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 Ubiquitin Ligase Complex. *Mol. Cell* **48**, 572–586 (2012).
  196. Kallen, J. A. *et al.* X-ray structure of the hRORalpha LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of

- RORalpha. *Structure* **10**, 1697–1707 (2002).
197. Stehlin-Gaon, C. *et al.* All-trans retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR beta. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 820–5 (2003).
198. Carlberg, C. & Wiesenberg, I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J. Pineal Res.* **18**, 171–178 (1995).
199. Lardone, P. J. *et al.* Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J. Pineal Res.* **51**, 454–62 (2011).
200. Forman, B. M. *et al.* Cross-Talk among RORa1 and the Rev-erb Family of Orphan Nuclear Receptors. *Mol. Endocrinol.* 1253–1261 (1994).
201. Solt, L. a & Burris, T. P. Action of RORs and their ligands in (patho)physiology. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 619–27 (2012).
202. Jetten, A. M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* **7**, 1–32 (2009).
203. Liu, C., Li, S., Liu, T., Borjigin, J. & Lin, J. D. Transcriptional coactivator PGC-1alpha integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature* **447**, 477–81 (2007).
204. Rogers, P. M., Ying, L. & Burris, T. P. Relationship between circadian oscillations of Rev-erb alpha expression and intracellular levels of its ligand, heme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 955–958 (2008).
205. Burris, T. P. Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERBalpha and REV-ERBbeta are ligand-regulated components of the mammalian clock. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1509–20 (2008).
206. Duez, H. & Staels, B. Rev-erb-alpha: an integrator of circadian rhythms and metabolism. *J. Appl. Physiol.* **107**, 1972–80 (2009).
207. Haus, E. & Smolensky, M. H. *Biologic rhythms in the immune system. Chronobiology international* **16**, (1999).
208. Haus, E., Lakatua, D. J., Swoyer, J. & Sackett-Lundeen, L. Chronobiology in hematology and immunology. *Am. J. Anat.* **168**, 467–517 (1983).
209. Scheiermann, C., Kunisaki, Y. & Frenette, P. S. Circadian control of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 190–8 (2013).

210. Curtis, A. M., Bellet, M. M., Sassone-Corsi, P. & O'Neill, L. a J. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* **40**, 178–86 (2014).
211. He, Y. W., Deftos, M. L., Ojala, E. W. & Bevan, M. J. ROR $\gamma$  t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity* **9**, 797–806 (1998).
212. Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell* **126**, 1121–33 (2006).
213. Yang, X. O. *et al.* TH17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ . *Immunity* **28**, 29–39 (2008).
214. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123–32 (2005).
215. Cortez, D. M. *et al.* IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP- $\beta$ , NF- $\kappa$ B, and AP-1 activation. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **293**, H3356–H3365 (2007).
216. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 485–517 (2009).
217. Cua, D. J. & Tato, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 479–489 (2010).
218. Ye, P. *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* **194**, 519–27 (2001).
219. Michel, M., Keller, A. & Paget, C. Identification of an IL-17-producing NK1.1<sup>neg</sup> iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J. Exp. Med.* **204**, 0–6 (2007).
220. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 459–489 (2012).
221. Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231–4 (2006).
222. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation

- of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179–89 (2006).
223. Yu, X. *et al.* TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science* **342**, 727–30 (2013).
224. Gibbs, J. E. *et al.* The nuclear receptor REV-ERBa mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 582–587 (2012).
225. Chandra, V. *et al.* Human IL10 gene repression by Rev-erba ameliorates Mycobacterium tuberculosis clearance. *J. Biol. Chem.* **288**, 10692–702 (2013).
226. Sato, S. *et al.* A Circadian Clock Gene, Rev-erba, Modulates the Inflammatory Function of Macrophages through the Negative Regulation of Ccl2 Expression. *J. Immunol.* **192**, 407–17 (2014).
227. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. *Janeway Immunologie*. (Spektrum Akademischer Verlag, 2009).
228. Gillessen, S. *et al.* Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: A potent IL-12 antagonist. *Eur. J. Immunol.* **25**, 200–206 (1995).
229. Kaliriski, P., Vieira, P. L., Schuitemaker, J. H. N., De Jong, E. C. & Kapsenberg, M. L. Prostaglandin E2 is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* **97**, 3466–3469 (2001).
230. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35 (2003).
231. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).
232. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
233. Hesse, M. *et al.* Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Metabolism. *J. Immunol.* **167**, 6533–6544 (2001).
234. Pearce, E. J. & MacDonald, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 499–511 (2002).
235. Bilzer, M., Roggel, F. & Gerbes, A. L. Role of Kupffer cells in host defense and liver



- disease. *Liver Int.* **26**, 1175–1186 (2006).
236. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).
237. Bevins, C. L. Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity. *Biochem Soc Trans* **34**, 263–266 (2006).
238. Rubino, S. J., Geddes, K. & Girardin, S. E. Innate IL-17 and IL-22 responses to enteric bacterial pathogens. *Trends Immunol.* **33**, 112–118 (2012).
239. Selak, K. Untersuchung zellulärer Funktionen von SIRT6 in der Leber und seiner Rolle in tumorrelevanten Prozessen anhand verschiedener Knockout-Modelle. (Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2015).
240. Baus, K. Charakterisierung der Sirt6-abhängigen Circadianen Rhythmik in T-Zellen und Hepatozyten. (Johannes Gutenberg-Universität, 2012).
241. Lu, Y. C., Yeh, W. C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145–151 (2008).
242. Grütz, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 3–15 (2005).
243. Sabat, R. *et al.* Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 331–44 (2010).
244. Sabat, R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 315–24 (2010).
245. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeblerlein, M. & Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795–800 (2002).
246. Yeung, F. *et al.* Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* **23**, 2369–2380 (2004).
247. Leiser, S. F. & Kaeblerlein, M. A role for SIRT1 in the hypoxic response. *Mol. Cell* **38**, 779–80 (2010).
248. Chu, C.-S. C.-S. *et al.* O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 1355–1360 (2014).
249. Nakabayashi, H. *et al.* Clock-controlled output gene Dbp is a regulator of {Arnt/Hif-1 $\beta$ } gene expression in pancreatic islet  $\beta$ -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**,

- 370–375 (2013).
250. Kitada, M., Kume, S., Kanasaki, K., Takeda-Watanabe, A. & Koya, D. Sirtuins as Possible Drug Targets in Type 2 Diabetes. *Curr. Drug Targets* **14**, 622–636 (2013).
251. Pickup, J. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **27**, 813–823 (2004).
252. Tang, Q., Koh, L. K., Jiang, D. & Schwarz, H. CD137 ligand reverse signaling skews hematopoiesis towards myelopoiesis during aging. *Aging (Albany, NY)*. **5**, 643–52 (2013).
253. Takeda, N. *et al.* Differential activation and antagonistic function of HIF- $\alpha$  isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* **24**, 491–501 (2010).
254. Oppmann, B. *et al.* Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**, 715–725 (2000).
255. Tuli, J. S., Smith, J. A. & Morton, D. B. Corticosterone, adrenal and spleen weight in mice after tail bleeding, and its effect on nearby animals. *Lab. Anim.* **29**, 90–95 (1995).
256. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–75 (2013).
257. Galdiero, M. R., Garlanda, C., Jaillon, S., Marone, G. & Mantovani, A. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J. Cell. Physiol.* **228**, 1404–1412 (2013).
258. Kohsaka, A. *et al.* High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab.* **6**, 414–21 (2007).
259. Rusten, T. E. & Stenmark, H. P62, an Autophagy Hero or Culprit? *Nat. Cell Biol.* **12**, 207–209 (2010).
260. Palvimo, J. J. PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1405–8 (2007).
261. Hwang, E. J. *et al.* SUMOylation of ROR $\alpha$  potentiates transcriptional activation function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 513–7 (2009).
262. Cardone, L. *et al.* Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science* **309**, 1390–1394 (2005).

263. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657–70 (2010).
264. Melloul, D., Marshak, S. & Cerasi, E. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* **45**, 309–326 (2002).
265. Wang, L. *et al.* Increased insulin receptor substrate-1 and enhanced skeletal muscle insulin sensitivity in mice lacking CCAAT/enhancer-binding protein beta. *J. Biol. Chem.* **275**, 14173–14181 (2000).
266. Seufert, J., Weir, G. C. & Habener, J. F. Differential expression of the insulin gene transcriptional repressor CCAAT/enhancer-binding protein beta and transactivator islet duodenum homeobox-1 in rat pancreatic beta cells during the development of diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **101**, 2528–39 (1998).
267. Dang, E. V *et al.* Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **146**, 772–84 (2011).
268. Imtiyaz, H. Z. & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **345**, 105–120 (2010).
269. Denko, N. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat. Rev. Cancer* **8**, (2008).
270. Chauvet, C., Bois-Joyeux, B. & Danan, J. Retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR)  $\alpha$ 4 is the predominant isoform of the nuclear receptor ROR $\alpha$  in the liver and is up-regulated by hypoxia in HepG2. *Biochem. J* **456**, 449–456 (2002).
271. Jenwitheesuk, A., Nopparat, C., Mukda, S., Wongchitrat, P. & Govitrapong, P. Melatonin Regulates Aging and Neurodegeneration through Energy Metabolism, Epigenetics, Autophagy and Circadian Rhythm Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 16848–16884 (2014).
272. Jung-Hynes, B., Reiter, R. J. & Ahmad, N. Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. *J. Pineal Res.* **48**, 9–19 (2010).
273. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* **122**, 3589–3594 (2009).
274. Wolf, K. & Strand, S. Assessing the histone deacetylase activity of SIRT6 in primary murine hepatocytes via proximity ligation assay. *Methods Mol. Biol.* **accepted**, (2016).
275. Balsalobre, A., Damiola, F. & Schibler, U. A serum shock induces circadian gene

- expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**, 929–937 (1998).
276. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* **25**, 402–8 (2001).
277. Zhang, J. D., Ruschhaupt, M. & Biczok, R. ddCt method for qRT – PCR data analysis the ddCt Algorithm. *Bioconductor* 1–8 (2010).
278. Brown, S. A. *et al.* The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biol.* **3**, (2005).
279. Hoffman, L. M. *et al.* BMP action in skeletogenesis involves attenuation of retinoid signaling. *J. Cell Biol.* **174**, 101–113 (2006).

## 8. Anhang

### 8.1. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1-1: Pathogenese von Lebererkrankungen.
- Abb. 1-2: Übersicht über die Wirkungsweise der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Deacetylase Sirtuin 6.
- Abb. 1-3: Chronodisruption kann metabolisches Syndrom, Schlafstörungen und Krebs auslösen.
- Abb. 1-4: Polarisierung von Makrophagen in M1 und M2 über L-Arginin.
- Abb. 1-5: ROR/REV-ERB-abhängiger Abwehrmechanismus der angeborenen Immunantwort.
- Abb. 2-1: SIRT6 beeinflusst die Circadiane Rhythmik des Metabolismus.
- Abb. 2-2: Circadiane Studien in SIRT6 KO-Mausmodellen und Hepatomzellen.
- Abb. 2-3: Neutrophilie, Lymphopenie und Monozytose im Blut von SIRT6-defizienten Mäusen.
- Abb. 3-1: Einfluss von SIRT6 auf die Genexpression der CCGs *Bmal1*, *Rev-Erb $\alpha$* , *Rora*, *Cry1* und *Per2*.
- Abb. 3-2: Acetylierung von Lysinrest 9 an Histon H3 in Abhängigkeit von SIRT6.
- Abb. 3-3: Trimethylierung von Lysinrest 27 an Histon H3 in Abhängigkeit von SIRT6.
- Abb. 3-4: Histonmodifikationen und Bindung des Transkriptionsfaktors ROR $\alpha$  in der *RORE*-Promotorregion der CCGs *Bmal1* und *Rev-Erb $\alpha$*  bei SIRT6-Defizienz.
- Abb. 3-5: Expression von ROR $\alpha$  und REV-ERB $\alpha$  in SIRT6 KO-Hepatoblastomzellen.
- Abb. 3-6: Acetylierung von PGC-1 $\alpha$  und Einfluss von Butyrolacton-3 auf die CCG-Expression in SIRT6-defizienten Hepatoblastomzellen.
- Abb. 3-7: Proteinexpression von EZH2 in SIRT6-defizienten Hepatozyten und die Methylierung von ROR $\alpha$ .

- Abb. 3-8: Expression von Retinsäure(ATRA)-assoziierten Genen und ATRA-abhängige Zellviabilität von Hepatomzellen bei SIRT6-Überexpression .
- Abb. 3-9: Einfluss metabolischer Faktoren auf die BMAL1-Expression in Abhängigkeit von SIRT6.
- Abb. 3-10: Expression von *Per2* und C/EBP $\beta$  in der SIRT6-defizienten Leber von 2 und 12 Monate alten Mäusen.
- Abb. 3-11: Histonmodifikationen am Promotor von *Per2* in Abhängigkeit von SIRT6.
- Abb. 3-12: Histonmodifikationen am Promotor von *Cry1* in der SIRT6-defizienten Leber.
- Abb. 3-13: Tageszeitabhängige Lokalisation von CRY1 in Nucleus und Cytoplasma in der SIRT6-defizienten Leber.
- Abb. 3-14: Histologie der Leber von Mäusen mit SIRT6-Deletion in myeloiden Zellen.
- Abb. 3-15: Nachweis von CD11b<sup>+</sup>-Zellen in der Leber von Mäusen mit konditionalem SIRT6 KO in myeloiden Zelltypen.
- Abb. 3-16: Bestimmung der Leukozytenzahl im Blut von Mäusen mit spezifischem SIRT6 KO in myeloiden Zelltypen.
- Abb. 3-17: Darstellung des Körper- und Milzgewichts der *Sirt6*<sup>LysMCre</sup>-Mäuse sowie der Granulozytenzahl in der Milz.
- Abb. 3-18: Untersuchung der Leukozytenpopulationen in der Milz der 129-*Sirt6*<sup>tm1Fwa/J</sup>-Mäuse.
- Abb. 3-19: Einfluss der SIRT6-Defizienz auf die *Rora*-Expression und die Interleukin-17-Sekretion von Milzzellen.
- Abb. 3-20: Nachweis von F4/80<sup>+</sup>-Zellen in der Leber von Mäusen mit spezifischem SIRT6 KO in myeloiden Zelltypen.
- Abb. 3-21: Generierung von Knochenmarksmakrophagen (BMM $\Phi$ ) aus konditionalen SIRT6 KO-Mäusen.
- Abb. 3-22: Expression von Makrophagen-spezifischen Oberflächenmarkern und Cytokinsekretion in SIRT6-defizienten Knochenmarksmakrophagen (BMM $\Phi$ ) nach LPS-Behandlung.
- Abb. 3-23: *Rev-Erba*- und *IL-10*-Expression in SIRT6-defizienten und wildtypischen Knochenmarksmakrophagen (BMM $\Phi$ ) nach LPS-Behandlung.
- Abb. 3-24: Expression und Sekretion von IL12p40 und IL12p70 durch Knochenmarksmakrophagen (BMM $\Phi$ ) konditionaler SIRT6 KO-Mäuse nach LPS-Behandlung.

- Abb. 3-25: Analyse der Makrophagenpolarisierungsmarker iNOS und Arginase in Abhängigkeit von SIRT6.
- Abb. 3-26: Isotransplantation der Hepatomzelllinie Hep-55.1c in die Milz von konditionalen SIRT6 KO-Mäuse (B6-*Sirt6*<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup>).
- Abb. 5-1: Zusammenspiel der Circadianen Rhythmik mit dem Metabolismus, der Zellproliferation und -differenzierung, dem Immunsystem und Alterungsprozessen.
- Abb. 6-1: Kreuzungsschema der konditionalen SIRT6-defizienten Mäuse.
- Abb. 6-2: Genotypisierung und Nachweis des SIRT6 KO in 129-*Sirt6*<sup>tm1Fwa</sup>/J- und *Sirt6*<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup>- Mäusen.
- Abb. 6-3: Größenstandard für die SDS-PAGE: *PageRuler Prestained Protein Ladder* von ThermoFisher Scientific.
- Abb. 6-4: Größe der DNA-Fragmente nach dem Scheren des Chromatins für die Chromatin-Immunpräzipitation.
- Abb. 6-5: Karte des RORE-Luziferase-Plasmids pABpuro-BluF.





## 8.2. Abkürzungsverzeichnis

### A

---

A(M/D/T)P	Adenosin(mono/di/tri)phosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT(L)	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (like)</i>
ATRA	All-trans Retinsäure

### B

---

BMAL1	<i>Brain and Muscle ARNTL</i>
BMMΦ	Knochenmarksmakrophagen
BSA	Serumalbumin Fraktion V vom Rind

### C

---

CBP	CREB-Bindeprotein
CCG	Tageszeitkontrolliertes Gen
CCL	Chemokinligand
CD	Differenzierungsmuster auf Leukozyten
CDP	Dinatrium-4-chlor-3-(methoxyspiro-(1,2-dioxetan-3,2'-(5-chlor)tricyclo[3.3.1.1.]-decan-1,4yl)-phenylphosphat
C/EBP	<i>CCAAT-Enhancer-binding protein</i>
CHIP	<i>Carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CK	Caseinkinase
CLOCK	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
ConA	Concanavalin A
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRY	Kryptochrome Gene
CtIP	<i>C-terminal binding protein interacting protein</i>
CYP	Cytochrome

**D**

---

DBP	<i>D site of albumin promoter binding protein</i>
DC	Dendritische Zelle
DMEM(F12)	Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

**E**

---

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EUCOMM	Europäisches Programm für konditionale Mäuse
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>

**F**

---

F4/80,EMR1	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like</i>
FACS	Fuoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLP	Flippase
FoxO	<i>Forkhead-Box protein</i>
FRQ	Frequenzgene
FRT	Flippase Bindestelle

**G**

---

GADD45	<i>Growth arrest and DNA damage (inducible gene)</i>
GCN5L2	<i>General control of amino-acid synthesis</i>
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GR-1	<i>Granulocyte receptor marker 1</i>

**H**

---

H <sub>2</sub> O (d/nf)	Wasser (destilliert, nuklease-frei)
H3K	Lysinrest des Histons H3

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDAC	Histondeacetylase
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure <i>Hypoxia</i>
HIF	<i>inducible factor</i>
HOX	Homöobox-Gene
HSP	Hitzeschockprotein

---

**I**

---

IFN	Interferon
IGF	Insulin-Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid

---

**K**

---

KO	Knockout
----	----------

---

**L**

---

LKB1	Leberkinase B1
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
LSM	Laserscanning-Mikroskop
LPS	Lipopolysaccharid

---

**M**

---

MCP	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>
M-CSF	Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
MLL	<i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
MYBBP1a	<i>Myb-binding protein 1a</i>

**N**

---

NAD	Nikotinamidphosphoribosyltransferase
N-CoR	Nukleärer Rezeptor-Corepressor
NFIL3	<i>Nuclear factor interleukin 3 regulated</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung

**O**

---

OGT	<i>O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase</i>
-----	--

**P**

---

p53/300	Proteine, klassifiziert nach Molekulargewicht in kDa
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS(T)	Phosphatsalz-Puffer (mit Tween)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PER	Periodische Gene
PFA	Paraformaldehyd
PGC-1 $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STAT</i>
PLA	<i>Proximity ligation assay</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR- $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PRC	<i>Polycomb repressive complex</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid

**R**

---

RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
RARE	RAR/RXR-DNA-Bindungselement
REV-ERB	<i>Reverse orientation c-erb</i>
RIPA	Detergenzienhaltiger Lysepuffer

RNA	Ribonukleinsäure
ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i>
RORE	ROR-DNA-Bindungselement
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen
RPII	RNA-Polymerase 2
RPMI	Zellkulturmedium
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>

---

**S**

SCN	Suprachiasmatischer Nucleus
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sir2	<i>Silent information regulator</i>
SIRT	Sirtuine, Homologe von Sir2
SNF2H	<i>SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin, SMARCA5</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
STK11	Serin/Threonin-Kinase 11
SUMO	<i>Small ubiquitin-related modifier</i>

---

**T**

TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TAN	Tumorassoziierte Neutrophile
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylenethyldiamin
TGF- $\beta$	Tumor-Wachstumsfaktor
T <sub>h</sub> -Zellen	T-Helferzellen
TIM	<i>Timeless</i> Gene
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TTFL	<i>autoregulatory transcription translation negative feedback loop</i>

---

**W**

WRN	<i>Werner syndrome protein</i>
-----	--------------------------------

**X**

---

X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
-------	--

**Z**

---

ZT	Zeitgeber-Zeit
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung