

Untersuchung zellulärer Funktionen von
SIRT6 in der Leber und seiner Rolle
in tumorrelevanten Prozessen
anhand verschiedener *Knockout*-Modelle

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Kerstin Selak

Mainz, 2015

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 5. November 2015

Inhaltsverzeichnis

IV - VIII

1. Einleitung	1
1.1. <i>Sirtuin 6 (SIRT6)</i>	1
1.1.1. SIRT6 - ein Mitglied der Sirtuine	1
1.1.2. Lokalisation und enzymatische Funktionen	1
1.1.3. Regulation von Expression und Aktivität	2
1.1.4. Substrate und physikalische Interaktionen	3
1.1.5. Rolle in DNA-Reparatur und Genomstabilisierung	4
1.1.6. Rolle im Chromatin- <i>Remodeling</i>	5
1.1.7. Rolle in der Genexpressionsregulation	6
1.1.8. Rolle in der Stoffwechselregulation	7
1.1.8.1. Glukosehomöostase	8
1.1.8.2. Lipid- und Cholesterinstoffwechsel	10
1.1.8.3. Zirkadiane Regulation des Stoffwechsels	11
1.1.9. Rolle in inflammatorischen Prozessen	13
1.1.10. Rolle in Tumorentstehung und -progression	14
1.2. <i>Das Hepatozelluläre Karzinom</i>	17
1.2.1. Ätiologische und epidemiologische Aspekte	17
1.2.2. Genetische und epigenetische Veränderungen im HCC	18
1.2.3. Expression onkofetaler Gene	21
1.2.4. Umprogrammierung im Energiestoffwechsel	22
1.2.5. Krebsstammzelltheorie	23
1.3. <i>Zielsetzung</i>	24
2. Material und Methoden	26
2.1. <i>Material</i>	26
2.1.1. Geräte, Instrumente, Software und Verbrauchsgegenstände	26
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien	29
2.1.3. Spezielle Reagenzien, Kits und Assaysysteme	33
2.1.4. Antikörper	34
2.1.5. Oligonukleotid-Primer	35
2.1.6. Vektoren und Plasmide	35
2.1.7. Zelllinien	36
2.1.8. Mauslinien und transgene Stämme	36
2.2. <i>Methoden</i>	37
2.2.1. Methoden der Nucleinsäureanalytik	37
2.2.1.1. Quantifizierung von Nucleinsäuren in wässriger Lösung	37
2.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese	37
2.2.1.3. Vermehrung von Plasmid-DNA	38

2.2.1.4. Genotypisierung	40
2.2.1.5. Isolation von RNA	43
2.2.1.6. cDNA-Synthese	44
2.2.1.7. RT-PCR	45
2.2.1.8. Quantifizierung von <i>SIRT6</i> in humanen Tumorproben (Tissue Scan)	48
2.2.1.9. Microarray-Analysen	49
2.2.1.10. Quantifizierung der Menge an 5-Methylcytosin in genomischer DNA	49
2.2.2. Zellbiologische Methoden	50
2.2.2.1. Bestimmung der Zellzahl	50
2.2.2.2. Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien	51
2.2.2.3. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	51
2.2.2.4. Lipofektion von Zellen	52
2.2.2.5. Bestimmung der Zellviabilität	54
2.2.2.6. Zytotoxizitätsassays	54
2.2.2.7. Proliferationsassay	55
2.2.2.8. Zweidimensionaler (2D-) Koloniebildungs-Assay (Colony Formation Assay)	56
2.2.2.9. Primäre Hepatozyten	56
2.2.2.10. Primäre murine Milz- und Knochenmarkszellen	58
2.2.2.11. Messung der Glukoseaufnahme in Zellen (2-NBDG)	61
2.2.2.12. Durchflusszytometrie	62
2.2.2.13. Metabolische Analysen (OCR und ECAR)	62
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	63
2.2.3.1. Bradford-Test zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen	63
2.2.3.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	64
2.2.3.3. SDS-PAGE	64
2.2.3.4. Western Blot	67
2.2.3.5. Isolation <i>SIRT6</i> -spezifischer polyklonaler Antikörper aus Kaninchen-serum	70
2.2.3.6. Co-Immunpräzipitation von <i>SIRT6</i> -assoziierten Proteinkomplexen	72
2.2.4. Histologische Methoden	78
2.2.4.1. Fixierung von Zellen	78
2.2.4.2. Kryoschnitte am Kryostat	78
2.2.4.3. H/E-Färbung am Kryoschnitt	78
2.2.4.4. Ölrot O-Färbung am Kryoschnitt	79
2.2.4.5. Immunfluoreszenzfärbung	80
2.2.5. Arbeit mit Versuchstieren	81
2.2.5.1. Tierhaltung	81
2.2.5.2. Kennzeichnung und Entnahme von Biopsien	82
2.2.5.3. Genotypisierung	82
2.2.5.4. Transgen-Induktion mit Tamoxifen	82
2.2.5.5. Narkotisierung bei Mäusen	82
2.2.5.6. Entnahme von Blut und Organen	83
2.2.5.7. Messung des Glukosegehalts im Vollblut	83
2.2.5.8. Isolierung primärer muriner Hepatozyten	83

3. Ergebnisse	85
3.1. <i>Sirt6-Knockout in verschiedenen Mausmodellen</i>	85
3.1.1. Mausmodell mit konstitutiver, globaler Inaktivierung von <i>Sirt6</i>	85
3.1.1.1. Stammbeschreibung, Zucht und Genotypisierung	85
3.1.1.2. Nachweis des SIRT6-Proteins	86
3.1.2. Mausmodell mit konditionaler Inaktivierung von <i>Sirt6</i>	87
3.1.2.1. Embryonale Stammzellen mit Reporter-markiertem Allel zum konditionalen <i>Knockout</i> von <i>Sirt6</i>	87
3.1.2.2. Erzeugung chimärer Mäuse	88
3.1.2.3. Vererbung des Allels <i>Sirt6</i> ^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}	89
3.1.2.4. Erzeugung des Allels <i>Sirt6</i> ^{tm1c(EUCOMM)Wtsi} durch Elimination der Kasette L1L2_Pgk_P	91
3.1.2.5. Elimination des <i>Flp</i> -Transgens und Verifizierung der Keimbahntransmission des <i>Sirt6</i> -tm1c(flox) Allels	92
3.1.2.6. Erzeugung homozygoter <i>Sirt6</i> -flox/flox Tiere und weitere Zucht	94
3.1.2.7. Generierung verschiedener konditionaler <i>Sirt6-Knockout</i> -Stämme	95
3.1.2.7.1. Allgemeine Beschreibung des Vorgehens	95
3.1.2.7.2. Hepatozyten-spezifischer <i>Knockout</i> von <i>Sirt6</i>	96
3.1.2.7.3. Adipozyten-spezifischer <i>Knockout</i> von <i>Sirt6</i>	100
3.2. <i>Allgemeine phänotypische Merkmale Sirt6-defizienter Mäuse</i>	103
3.3. <i>Untersuchung der Rolle von SIRT6 im Stoffwechsel von Mäusen mit Sirt6-Defizienz</i>	104
3.3.1. Metabolische Analyse in Hepatozyten aus Mäusen mit konstitutivem <i>Sirt6-Knockout</i>	105
3.3.2. Untersuchung der Aufnahme von Glukose durch Hepatozyten aus Mäusen mit konstitutivem <i>Sirt6-Knockout</i>	112
3.3.3. Untersuchung des Phänotyps von Mäusen mit leberspezifischem <i>Sirt6-Knockout</i>	115
3.4. <i>Untersuchungen verschiedener Immunreaktionen in Mäusen mit konstitutivem Sirt6-Knockout</i>	116
3.4.1. Untersuchung der Sekretion von IL-16 und IL-17 durch Milzzellen in Reaktion auf Stimulation mit ConA	119
3.4.2. Untersuchung der Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen	120
3.5. <i>Untersuchung der Regulation der Genexpression in SIRT6-defizienten Zellen</i>	126
3.5.1. Untersuchung von Alterationen im Epigenom SIRT6-defizienter Hepatozyten	126
3.5.2. Genexpression in <i>Sirt6</i> -defizienten Hepatozyten	128
3.5.3. Regulation der zirkadianen Rhythmik bei SIRT6-Defizienz	133
3.5.3.1. <i>In vitro</i> Untersuchung der Expression von Faktoren der zirkadianen Uhr in Hepatozyten aus Mäusen mit konstitutivem <i>Sirt6-Knockout</i>	133
3.5.3.2. Untersuchung der Expression von Faktoren der zirkadianen Uhr in der Leber von Mäusen mit konstitutivem <i>Sirt6-Knockout</i>	134
3.5.4. Expression onkofetaler Gene in Abwesenheit von SIRT6	139

3.6. <i>Untersuchung der Expression von SIRT6 und von potentiell in ihrer Expression durch SIRT6 regulierten Faktoren in humanen malignen Erkrankungen</i>	142
3.6.1. <i>Untersuchung der Expression von SIRT6 in humanen Tumorerkrankungen</i>	142
3.6.2. <i>Expression von SIRT6 und von potentiell in ihrer Expression durch SIRT6 regulierten Faktoren im Hepatozellulären Karzinom (HCC) und humanen Hepatomzelllinien</i>	143
3.6.3. <i>Untersuchung einer möglichen Korrelation der Expression von SIRT6 und AFP in Hep3B Zellen</i>	144
3.6.4. <i>Untersuchung der Expression von Merkmalen des Krebsstammzellphänotyps in Abhängigkeit von der SIRT6-Expression</i>	147
3.6.5. <i>Einfluss von SIRT6 auf die Proliferation und 2D-Koloniebildung in humanen Hepatomzelllinien</i>	150
3.6.6. <i>Einfluss von SIRT6 auf die Apoptosesensitivität humaner Hepatomzelllinien</i>	151
3.7. <i>Identifikation von Interaktionspartnern von SIRT6 durch Co-Immünpräzipitation aus primären humanen Hepatozyten</i>	154
4. Diskussion	157
4.1. <i>Konsequenzen des Verlusts von SIRT6 im Mausmodell</i>	157
4.1.1. <i>Stoffwechsel</i>	157
4.1.1.1. <i>Anämie</i>	157
4.1.1.2. <i>Steatose</i>	158
4.1.1.3. <i>Veränderungen im Hepatozytenstoffwechsel</i>	158
4.1.1.4. <i>Hypoglykämie und erhöhter IGF-2 Spiegel</i>	161
4.1.1.5. <i>Körpergewicht und Glukosespiegel bei leberspezifischer SIRT6-Defizienz</i>	162
4.1.2. <i>Veränderungen in der Reifung dendritischer Zellen</i>	163
4.1.3. <i>Epigenom und Genexpression</i>	166
4.1.3.1. <i>Alterationen im Epigenom</i>	166
4.1.3.2. <i>Verändertes Profil der Genexpression</i>	167
4.1.3.3. <i>Deregulation der zellulären Uhr</i>	168
4.1.3.4. <i>Expression onkofetaler Gene</i>	169
4.2. <i>Expression von SIRT6 in humanen Tumorgeweben und Zelllinien</i>	170
4.3. <i>Analyse des Interaktoms von SIRT6 in Hepatozyten</i>	171
4.4. <i>Fazit und Ausblick</i>	172
Zusammenfassung	174
Anhang	176
Abbildungsverzeichnis	176
Abbildungsnachweis	180

Abkürzungsverzeichnis	181
Literaturverzeichnis	183
Eidesstattliche Erklärung	197
Danksagung	198
Lebenslauf	199
Veröffentlichungen	201

1. Einleitung

1.1. Sirtuin 6 (SIRT6)

1.1.1. SIRT6 - ein Mitglied der Sirtuine

Sirtuin 6 (SIRT6) ist ein Mitglied der Familie der Sirtuine, einer Gruppe von NAD⁺-abhängigen Deacetylasen bzw. Ribosyltransferasen. Sirtuine wurden benannt nach Sir2 (*Silent Information Regulator 2*), das in *Saccharomyces cerevisiae* in Abhängigkeit vom metabolischen Status der Zelle Einfluss auf Genexpression, DNA-Reparatur, DNA-Rekombination und Lebensdauer nimmt.^{1,2} Sirtuine sind stark konserviert und existieren sowohl in pro- als auch in eukaryotischen Organismen. In Säugetieren sind sieben Orthologe von Sir2 bekannt, genannt SIRT1-7, die sich in Funktion und zellulärer Lokalisation unterscheiden^{3,4}. Die Funktionen von Sirtuinen sind divers und reichen von der Regulation der Genexpression über die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität bis hin zur Regulation des Energiestoffwechsels – Prozesse, die eine Rolle in der Stressreaktion, Proliferation, Differenzierung, Kanzerogenese, Alterung und Langlebigkeit spielen.

1.1.2. Lokalisation und enzymatische Funktionen

SIRT6 wird ubiquitär exprimiert, mit den höchsten Proteinmengen in Muskel, Gehirn und Herz⁵. Es ist vornehmlich im Kern lokalisiert⁶, wo es über direkte Interaktion mit Nukleosomen mit Chromatin assoziiert⁷.

Schon seit längerer Zeit sind seine enzymatischen Funktionen der ADP-Ribosyltransferaseaktivität⁵ und NAD⁺-abhängigen Deacetylaseaktivität⁸ charakterisiert. Erst kürzlich wurde auch die Entfernung längerer Fettsäuren von Lysinresten (Demyristoylierung und Depalmitoylierung) als enzymatische Funktionen von SIRT6 beschrieben und im Zuge dessen seine bisher unbekannte Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum festgestellt⁹.

1.1.3. Regulation von Expression und Aktivität

Es gibt mehrere Hinweise darauf, wie die Expression und Aktivität von SIRT6 beeinflusst werden. Unter Nährstoffmangel wird die Expression von SIRT6 induziert^{10,11}. Diese Induktion wird direkt am *SIRT6*-Promotor durch Bindung eines Komplexes aus SIRT1, FOXO3a und NRF1 verursacht¹¹. Auch p53¹⁰ und c-Fos¹² beeinflussen die Expression von SIRT6 unabhängig vom Nährstoffstatus der Zelle positiv. Als negativer Regulator der Translation der *SIRT6*-mRNA sind die Micro-RNAs miR-33a und -b bekannt^{13,14}. Posttranslational kann SIRT6 über seine Stabilität reguliert werden. Die Ubiquitin-Ligase CHIP ubiquitiniert SIRT6 an Lysin-170 auf nicht-kanonische Weise, was zur Verlängerung seiner Halbwertszeit führt¹⁵.

SIRT6 bindet den Cofaktor NAD⁺ mit hoher Affinität, auch in Abwesenheit acetylierter Substrate. Diese Bindung von NAD⁺ erzeugt eine Änderung in der Struktur von SIRT6, die möglicherweise positiven Einfluss auf seine Aktivität nimmt und auf eine NAD⁺-Sensorfunktion von SIRT6 hindeutet¹⁶. Auch die direkte Bindung von SIRT6 an Nukleosomen führt zu einer Änderung seiner Konformation und erhöht damit seine Histon-Deacetylaseaktivität erheblich¹⁷, die *in vitro* an freien Histonen nur mit sehr niedriger Effizienz abläuft¹⁶. Steigernde Wirkung auf die SIRT6-Aktivität zeigen ebenfalls endogene langkettige Fettsäuren wie Linolsäure, Ölsäure oder Palmitinsäure. Diese Funktion könnte SIRT6 erlauben, auf den Status des Lipidmetabolismus zu reagieren¹⁸.

Eine zellzyklusabhängige Phosphorylierung von SIRT6 an den Positionen Thr294 und Ser303 wurde in HeLa-Zellen beschrieben, jedoch ist die Funktion dieser Modifikationen

bisher unbekannt¹⁹. Eine Phosphorylierung an Ser338 wurde kürzlich näher charakterisiert^{20,21}, sie soll eine Rolle in der Modulation verschiedener Interaktionen von SIRT6 spielen²⁰. In Zelllinien aus Mammakarzinomen wird dieses Serin 338 von AKT1 phosphoryliert, was zur Ubiquitinierung durch MDM2 und in Folge zur Degradation von SIRT6 führt²¹. Einige weitere evolutionär konservierte Phosphorylierungsstellen wurden in einem Proteomics-basierten Screening identifiziert²⁰, ihre Bedeutung ist allerdings noch nicht geklärt.

Als Inhibitor der Deacetylierungsreaktionen von Sirtuinen im Allgemeinen ist Nikotinamid (NAM) bekannt, das bei diesen Reaktionen entsteht und konzentrationsabhängig durch Interaktion mit dem intermediären Komplex aus Enzym, ADP-Ribose und acetyliertem Proteinsubstrat den weiteren Ablauf der Reaktion verhindert, wobei NAD⁺ regeneriert wird^{22,23}. Die Suche nach pharmazeutisch erzeugten Substanzen, mit denen die Aktivität der enzymatischen Funktionen von SIRT6 für therapeutische Zwecke moduliert werden könnte, war lange erfolglos, da es an einem adäquaten *in vitro* Hochdurchsatz-Screening fehlte²⁴. Als erste exogene Inhibitoren wurden Flavonoide identifiziert, die aus einem Pflanzenextrakt isoliert wurden²⁵, kürzlich wurden auch einige weitere Sirtuin-Modulatoren als wirksame Inhibitoren von SIRT6 identifiziert²⁶. Aktivierende Substanzen sind jedoch bisher nicht bekannt.

1.1.4. Substrate und physikalische Interaktionen

Neben acetylierten Histonsubstraten (Histon H3-Lysin^{98,27} und H3-Lysin^{56^{28,29}}) sind mittlerweile auch viele andere nicht-Histonsubstrate von SIRT6 bekannt²⁴. Abgesehen von der Fähigkeit, sich selbst intramolekular zu Mono-ADP-ribosylieren⁵, gilt als einziges Ribosylierungssubstrat von SIRT6 bisher PARP-1³⁰. Als erstes physiologisches Substrat für eine Deacylierung wurde TNF α beschrieben⁹.

Substrate und Interaktionspartner von SIRT6 sind in vielfältige zelluläre Prozesse involviert (Abbildung 1.1), von denen einige in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden. Viele weitere potentielle Bindungspartner von SIRT6 wurden bereits in ver-

schiedenen Untersuchungen seines Interaktoms identifiziert^{20,31,32}. Die Art und funktionale Bedeutung der Interaktionen wurden bisher nur für einzelne Faktoren näher charakterisiert, wie beispielsweise im Fall von G3BP1, einem Faktor der Stressantwort^{20,31}.

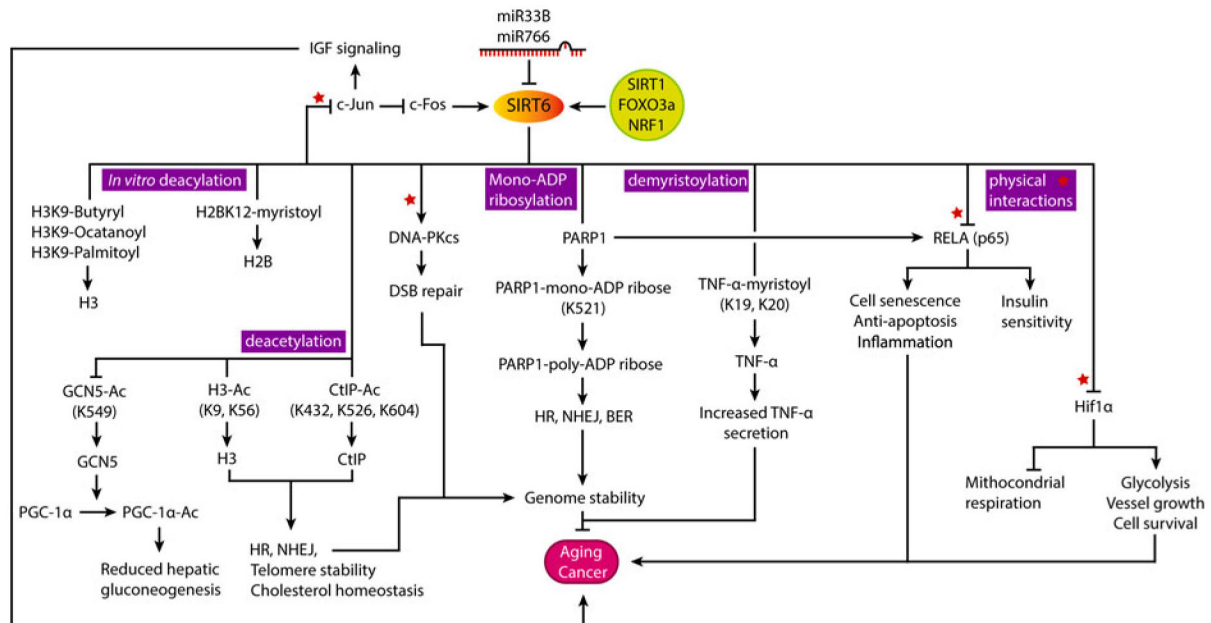


Abbildung 1.1: Bekannte Substrate und physikalische Interaktionen von SIRT6.

(Nachgedruckt aus: Gertler, A. A. & Cohen, H. Y.: SIRT6, a protein with many faces. *Biogerontology* 14, 629–39 (2013). Originaltitel der Abbildung: „Fig. 1 SIRT6’s known substrates and physical interactions.“ (S. 630). Copyright 2013, mit freundlicher Genehmigung von Springer Science and Business Media.²⁴)

1.1.5. Rolle in DNA-Reparatur und Genomstabilisierung

Sirt6-defiziente embryonale Stammzellen und Fibroblasten zeigen Chromosomenaberrationen wie Brüche und Translokationen, außerdem sind sie empfindlicher gegenüber DNA-Schädigung, die durch ionisierende Strahlung, alkylierende bzw. oxidierende Agenzien verursacht werden⁶. Neben einer Beeinflussung der Basenexzisionsreparatur (BER)⁶ wurde auch eine Beteiligung an der Doppelstrangbruchreparatur (DSB) sowohl durch die Verbindung nicht-homologer Enden (NHEJ, *Non-homologous end joining*) als auch Homologer Rekombination (HR) für SIRT6 nachgewiesen^{30,33–35}. Im Zusammenhang mit der

DSB-Reparatur durch NHEJ rekrutiert SIRT6 das Enzym DNA-PK durch direkte Interaktion mit seiner katalytischen Untereinheit DNA-PKcs und stabilisiert es am Chromatin nahe des Bruchs, wo es auch H3K9 deacetyliert⁷. Auch SNF2H, ein Chromatinremodellierendes Enzym, wird von SIRT6 zu DSBs rekrutiert, wo es auch zusätzlich H3K56 deacetyliert³⁵. Bei der DNA-Endresektion während der DSB-Reparatur durch HR spielt SIRT6 eine Rolle als Aktivator des DNA-Resektionsenzym CtIP durch dessen Deacetylierung³³. Die von SIRT6 katalysierte Mono-ADP-Ribosylierung von PARP-1 leitet dessen Aktivierung ein, die sich positiv auf die DNA-Reparatur sowohl durch BER als auch durch HR und NHEJ auswirkt. Die Aktivierung von PARP-1 durch SIRT6 erfolgt spezifisch unter oxidativem Stress³⁰. Auch in der Stabilisierung von Telomerstrukturen spielt SIRT6 eine entscheidende Rolle^{8,36}. An Telomeren ist SIRT6 durch die Deacetylierung von H3K9 für die stabile Assoziation der DNA-Helicase WRN verantwortlich⁸.

1.1.6. Rolle im Chromatin-*Remodeling*

Sirt6-defiziente Zellen zeigen eine auffällige Akkumulation der Histonmodifikation des acetylierten Lysin 9 (K9) am Histon H3. Da die Deacetylierung von H3K9 verbunden ist mit einer Kondensation von Chromatin und transkriptionaler Repression³⁷, lag für SIRT6 die Vermutung nahe, dass es eine Rolle als *Silencing*-Faktor in der Genexpression spielen könnte. Die Deacetylierung von H3K9 ist eine Funktion, die eine Rolle in vielen von SIRT6 regulierten Prozessen spielt, beispielsweise der DNA-Reparatur⁷, Telomerstabilisation während der DNA-Replikation⁸ oder Genexpressionsregulation^{38,39}.

Ein weiteres Histonsubstrat von SIRT6 ist acetyliertes H3K56, dessen Deacetylierung durch SIRT6 Zellzyklus-abhängig an Telomeren erfolgt²⁸ und ebenfalls Relevanz im Zusammenhang mit der Genomstabilität und DNA-Reparatur hat^{29,35}. SIRT6 rekrutiert im Zusammenhang mit DSBs das Chromatin-remodellierende Enzym SNF2H und nimmt damit indirekt weiteren Einfluss auf die Umgestaltung der Chromatinstruktur zur Erhöhung der Zugänglichkeit der DNA³⁵.

1.1.7. Rolle in der Genexpressionsregulation

In Abwesenheit von SIRT6 kommt es zu Veränderungen der Expression einer Vielzahl von Genen, deren Produkte an diversen zellulären Prozessen wie beispielsweise Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel, Immun- und Stressantwort, Differenzierung und DNA-Reparatur beteiligt sind^{11,40}. Einen ersten Hinweis auf den Mechanismus der Regulation der Genexpression durch SIRT6 lieferte seine Interaktion mit der Untereinheit RELA des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie die Deacetylierung von Histon H3-Lysin9 (H3K9) an RELA-gebundenen Promotoren und die damit verbundene Repression der Expression von NF- κ B gesteuerten Genen²⁷. In einer genomweiten Untersuchung der Assoziation von SIRT6 mit Promotoren während der zellulären Stressantwort konnte gezeigt werden, dass SIRT6 in Abhängigkeit von RELA zu einer Vielzahl von Promotoren NF- κ B gesteuerter Gene rekrutiert wird und damit das NF- κ B-gesteuerte Expressionsprogramm abschwächt. Durch diese stressinduzierte Relokalisation von SIRT6 können gleichzeitig andere, zuvor von SIRT6 reprimierte Gene stärker exprimiert werden, unter anderem Nfkb1a und Nfkb2, die ebenfalls eine Rolle im NF- κ B-Feedbackmechanismus spielen⁴¹.

Ähnlich wie NF- κ B beeinflusst auch der Transkriptionsfaktor Hif1 α die Expression vieler Gene. Es konnte nachgewiesen werden, dass in Abwesenheit von SIRT6 viele dieser Zielgene stärker exprimiert werden. Sowohl die Anwesenheit von SIRT6 an Promotoren solcher Gene sowie auch eine physikalische Interaktion von SIRT6 mit Hif1 α wurde festgestellt. In Abwesenheit von SIRT6 konnte zudem eine stärkere Acetylierung von H3K9 an den untersuchten Hif1 α -Zielgenen nachgewiesen werden³⁹.

Durch seine Funktion als Histon-Deacetylase an H3K9 bzw. H3K56 reprimiert SIRT6 auch die Expression von Zielgenen der Faktoren c-Myc⁴², c-Jun^{43,44} und FoxO3^{45,46} (siehe Abbildung 1.2).

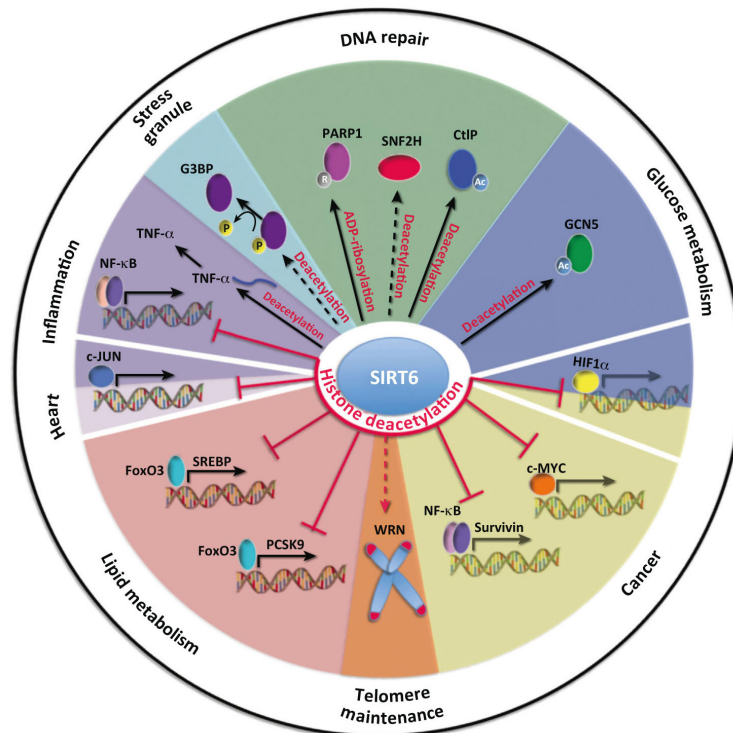


Abbildung 1.2: Zelluläre Funktionen von SIRT6 und deren Einfluss auf den Organismus und Erkrankungen. (Nachgedruckt aus: Kugel, S. & Mostoslavsky, R.: Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6. Trends Biochem. Sci. 39, 72–81 (2014). Copyright 2014, mit Erlaubnis von Elsevier.⁴⁷⁾)

1.1.8. Rolle in der Stoffwechselregulation

Sirt6-defiziente Mäuse scheinen bei der Geburt normal, entwickeln sich aber langsamer als wildtypische Geschwistertiere, was etwa 18-20 Tage nach der Geburt offensichtlich wird. Sie sind kleiner, haben oft die Augen geschlossen und wirken teilnahmslos (siehe Abbildung 1.3). Ein erniedrigter Spiegel von IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*), der Verlust von Unterhautfett und das stetige Absinken des Blutglukosespiegels deuten auf eine Deregulation in Stoffwechselprozessen in Abwesenheit von SIRT6 hin. Die meisten *Sirt6*-defizienten Mäuse sterben 21-30 Tage nach der Geburt⁶.

1.1.8.1. Glukosehomöostase

In SIRT6-defizienten Zellen wurde eine Steigerung der Expression von vielen an der Glykolyse beteiligten Enzymen festgestellt, die Zielgene des Transkriptionsfaktors Hif1 α sind³⁹. Hif1 α induziert die Expression dieser Gene unter Sauerstoff- oder Nährstoffmangel, um die Glykolyserate zu steigern und gleichzeitig die Rate der mitochondrialen Atmung zu drosseln^{48,49}. Diese Verlagerung auf einen anaeroben Stoffwechsel ist als Pasteur-Effekt bekannt⁵⁰.

SIRT6-defiziente embryonale Stammzellen und Fibroblasten zeigten sowohl eine erhöhte Glukoseaufnahme als auch einen verringerten Sauerstoffverbrauch sowie eine erhöhte Laktatproduktion.

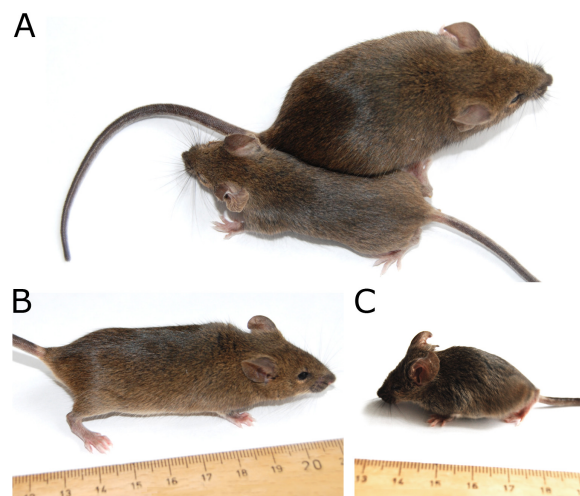


Abbildung 1.3: Äußere Erscheinung gleichaltriger Sirt6^{wt} und Sirt6^{ko} Mäuse. Mäuse des Stammes KO-Sirt6-Fwa wurden im Alter von 21 Tagen fotografiert. Es handelt sich um repräsentative Beispiele von Geschwistertieren aus demselben Wurf. **A** Direkter Vergleich beider Tiere; oben: Sirt6^{wt}; unten: Sirt6^{ko}. **B** Sirt6^{wt} Maus. **C** Sirt6^{ko} Maus.

Auf der Zelloberfläche war eine deutlich größere Menge des Glukosetransporter GLUT-1 nachweisbar, was eine höhere basale Glukoseaufnahme ermöglicht. Zudem war die Menge vieler Stoffwechselprodukte des Citratzyklus im Vergleich zu wildtypischen Zellen

verringert. SIRT6-defiziente Mäuse zeigten eine gesteigerte Glukoseaufnahme im braunen Fettgewebe sowie in Muskeln, was zur Hypoglykämie führt, jedoch nicht durch einen erhöhten Insulinspiegel verursacht wurde. Im Blut dieser Tiere waren im Vergleich zu wildtypischen Tieren erhöhte Laktatwerte messbar. Als Gründe für eine Verschiebung im Gleichgewicht von der mitochondrialen Respiration zur Glykolyse in Abwesenheit von SIRT6 wurde die gesteigerte Expression von die Glykolyse positiv beeinflussenden Genen wie *Ldh*, *Tpi*, *Pfk-1*, *Pdk1*, *Pdk4* sowie auch *Glut1* erkannt. Es konnte sowohl eine Bindung von SIRT6 an die Promotoren dieser Gene wie auch eine erhöhte Acetylierung von H3K9 in diesen Bereichen in Abwesenheit von SIRT6 nachgewiesen werden. In der Leber *Sirt6*-defizienter Tiere konnte auch eine erhöhte Expression von Genen der Enzyme der Glukoneogenese gemessen werden³⁹. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass SIRT6 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase sowie in der Regulation des Zellstoffwechsels spielt, die es durch die Regulation der Expression verschiedener Gene beeinflusst.

Durch gewebespezifischen *Knockout* von *Sirt6* konnte seine Rolle in Stoffwechselprozessen, vor allem anhand von sich erst über längere Zeit entwickelnden Phänotypen, näher untersucht werden. Ein metabolischer Phänotyp durch *Sirt6-Knockout* ist sowohl in Mäusen mit neuraler Inaktivierung von *Sirt6*⁵¹ als auch bei leberspezifischem¹¹ *Knockout* beschrieben worden. Im Falle der neuralen Inaktivierung von *Sirt6* zeigten die Mäuse zwar Blutglukosespiegel im Normbereich, jedoch waren die Spiegel der Wachstumshormone GH und IGF-1 erniedrigt und das Körperwachstum verlangsamt. Nach verspätetem Erreichen der normalen Körpergröße entwickelten die Tiere mit neuraler *Sirt6*-Defizienz Adipositas⁵¹. Auch bei Mäusen mit leberspezifischer Inaktivierung von *Sirt6* war keine Hypoglykämie zu beobachten. Der Verlust von SIRT6 führte jedoch zu einer Erhöhung der Expression glykolytischer Gene (*Gk*, *Lpk*)¹¹. In Mäusen, die SIRT6 überexprimieren, war sowohl eine erhöhte Glukosetoleranz als auch eine stärkere, durch Glukose stimulierte Insulinsekretion zu beobachten⁵².

In dem vorgeschlagenen Modell der Rolle von SIRT6 in der Glukoneogenese deacetyliert SIRT6 die Acetyltransferase GCN5, die über nachfolgende Schritte weiter aktiviert wird und wiederum PGC-1 α acetyliert, wodurch dieses nicht mehr als transkriptioneller Coak-

tivator für Gene der Gluconeogenese fungieren kann. So restringiert SIRT6 die Gluconeogenese, die in seiner Abwesenheit durch erhöhte Expression von Zielgenen von PGC-1 α wie *Pck1* und *G6pc* eine Steigerung erfährt und zu einer erhöhten hepatischen Glukoseproduktion führt⁵³. In einer anderen Studie wurde berichtet, dass eine negative Regulation der Gluconeogenese über verminderte Expression von *Pck1* und *G6pc* durch SIRT6 von FoxO-Transkriptionsfaktoren abhängt⁵⁴; ein Zusammenhang zwischen FoxO1 und PGC-1 α in der Regulation der Expression von Genen der Gluconeogenese ist bereits gut charakterisiert⁵⁵.

1.1.8.2. Lipid- und Cholesterinstoffwechsel

In SIRT6-defizienten Hepatozyten zeigte sich eine gesteigerte Triglyceridsynthese und reduzierte β -Oxidation, was eine phänotypische Ausbildung einer Fettleber, beginnend im Alter von 5-6 Monaten, zur Folge hatte. Diese Hepatozyten zeigten eine erhöhte Expression von Genen der Lipidsynthese (*Fat*, *Acc1*, *Fas*, *Elovl6*, *Scd1*), in deren Promotorregionen erhöhte Mengen an acetyliertem H3K9 in Abwesenheit von SIRT6 festgestellt werden konnten. Die Bindung von SIRT6 in den Promotorregionen dieser Gene konnte ebenfalls nachgewiesen werden. In Proben von humanen Fettlebern konnte zudem eine verringerte Expression von SIRT6 festgestellt werden¹¹.

In Mäusen, die SIRT6 überexprimieren, zeigte sich eine reduzierte Akkumulation von viszeralem Fett, ein verbessertes Blutfettprofil, erhöhte Glukosetoleranz und erhöhte Insulinsekretion unter einer stark fetthaltigen Diät. Zudem wurde eine verminderte Expression von bestimmten Zielgenen von PPAR γ (*Angptl4*, *Fabp4*) beobachtet, die an der Regulation der Lipidhomöostase beteiligt sind.⁵²

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Rosiglitazon eine erhöhte Expression von SIRT6, PGC-1 α und FoxO1 in der Leber bewirkt. Zudem reduzierte Rosiglitazon in Abhängigkeit von SIRT6 die Lipidakkumulation in Hepatozyten⁵⁶. Rosiglitazon wird als PPAR γ -Agonist für die Behandlung der Steatose eingesetzt und wirkt sich sensitivierend für Insulin bei Diabetes mellitus Typ II aus^{57,58}. Im Organismus bewirkt eine

Aktivierung von PPAR γ die Differenzierung von Adipozyten und damit eine Steigerung der Lipidspeicherung im Fettgewebe, was eine Reduktion von zirkulierenden Lipiden zur Folge hat und damit eine verringerte Aufnahme von Lipiden durch die Leber bewirkt⁵⁹. Der SIRT6-abhängige Effekt von Rosiglitazon in Hepatozyten wird einem positiven Einfluss von SIRT6 auf die Expression von FoxO1 und PGC-1 α sowie einer SIRT6-abhängigen Phosphorylierung von LKB-1 und AMPK zugeschrieben⁵⁶.

Auf den Spiegel von LDL-Cholesterin wirkt sich SIRT6 senkend aus, indem es gemeinsam mit FoxO3 die Expression des Gens *Pcsk9* hemmt. Dafür ist die Deacetylierung von H3K9 und H3K56 am Promotor dieses Gens durch SIRT6 entscheidend. In Abwesenheit von SIRT6 bewirkte eine erhöhte Menge von PCSK6 eine gesteigerte Degradation des LDL-Rezeptors in der Leber, was zu einem erhöhten LDL-Cholesterinspiegel führte. Eine Überexpression von SIRT6 führte zur Senkung von erhöhten LDL-Werten⁴⁶. Es wurde berichtet, dass SIRT6, ebenfalls in Abhängigkeit von FoxO3 und der Deacetylierung von H3K9 und H3K56, auch die Expression von SREBP1 und -2 reguliert, die eine Rolle in der Regulation der Cholesterinbiosynthese spielen. Zusätzlich vermindert SIRT6 die Spaltung dieser Faktoren in ihre aktive Form und aktiviert AMPK, das wiederum beide Faktoren durch Phosphorylierung inaktiviert¹⁴. Die aus den Intronregionen von *Srebp1* und -2 stammenden Micro-RNAs miR-33a bzw. -b wiederum reprimieren die mRNA von *Sirt6*^{13,14}.

Die Steigerungsfähigkeit der SIRT6-Aktivität durch freie, langkettige Fettsäuren weist darauf hin, dass SIRT6 eine Sensorfunktion im Lipidmetabolismus zukommt, die es zu einem zentralen Regulator dieses Stoffwechselzweiges machen könnte¹⁸.

1.1.8.3. Zirkadiane Regulation des Stoffwechsels

Die zelluläre Uhr ist ein Netzwerk aus transkriptionellen und translationalen Rückkopplungsschleifen, die sich in einem 24 Stunden-Rhythmus wiederholen („zirkadian“, Adj. von lat. *circa* „ringsum“, *dies* „Tag“)⁶⁰. Die zirkadiane Uhr steuert über die Genexpression wichtige Abläufe in Verhalten und Physiologie, unter anderem Schlaf- und Wachphasen,

Nahrungsaufnahme, Metabolismus, Körpertemperatur, Blutdruck, Hormonhaushalt, Glukosehomöostase und den Zellzyklus. Für Schlafstörungssyndrome, Herz-Kreislauferkrankungen, Depressionen, aber auch für Tumore sind Zusammenhänge mit zirkadianen Prozessen im Entstehung bzw. Verlauf der Erkrankungen bekannt^{61,62}. Die zirkadiane Uhr selbst wird als Tumorsuppressor eingestuft⁶³.

Der wichtigste Reiz für die zirkadiane Uhr ist das Licht, bzw. der Tag- und Nachtrhythmus. Dieser Reiz wird durch den zentralen Schrittmacher zirkadianer Mechanismen, dem Nucleus suprachiasmaticus (*suprachiasmatic nucleus*, SCN), der sich bei Säugetieren im ventralen Hypothalamus befindet, verarbeitet und an alle Gewebe des Körpers kommuniziert. In peripheren Geweben laufen, gesteuert vom SCN, die gleichen molekularen Uhrmechanismen ab⁶⁰. Die Kernkomponenten der zellulären Uhr, wie sie in Neuronen des SCN abläuft, sowie die Grundzüge der Expressions- und Regulationskreisläufe sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

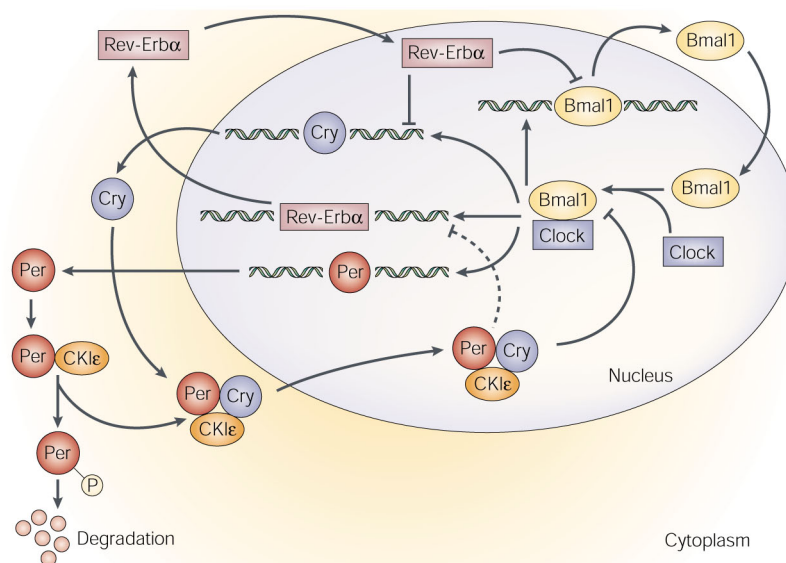


Abbildung 1.4: Regelsystem der zellulären zirkadianen Genexpressions-Uhr im SCN bei Säugetieren. Zirkadiane Rhythmen werden mit durch Rückkopplungsschleifen kontrollierte Expression der Gene der zentralen Komponenten der zellulären Uhr und deren Interaktionen erzeugt. Die Faktoren *Clock*, *Bmal1*, *Rev-Erbα*, *Cry*, *Per* und *CKIε* regulieren gegenseitig ihre Transkription, Translation und Degradation in einem regelmäßig wiederkehrenden Ablauf. Durchgezogene Linien zeigen direkte, gestrichelte Pfeile zeigen indirekte Regulation an. SCN=Nucleus suprachiasmaticus (*suprachiasmatic nucleus*). (Nachgedruckt aus: Fu, L. & Lee, C. C.: The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat. Rev. Cancer* 3, 350–61 (2003). Copyright 2003, mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd. ⁶³)

Erst kürzlich wurde eine Rolle von SIRT6 in der Regulation der zirkadianen Expression von Genen, die an der Regulation des Kohlenhydrat-, Lipid- und Cholesterinstoffwechsels beteiligt sind, nachgewiesen. SIRT6 interagiert sowohl mit CLOCK, BMAL1, dem Komplex aus beiden Faktoren, als auch mit SREBP-1, und reguliert deren rhythmische Rekrutierung zu Promotoren zahlreicher tageszeitabhängig exprimierter Gene.

Ein leberspezifischer *Sirt6-Knockout* führte zu einer Änderung in der Expression von 74 % aller in der Leber von oszillierender Aktivierung gesteuerten Genen (*Clock-Controlled Genes*, CCG) verglichen mit wildtypischen Tieren. Die veränderte Expression dieser Gene wirkte sich auf das Metabolom in Abwesenheit von SIRT6 aus, das vor allem durch ein verändertes Profil von Lipiden gekennzeichnet war⁶⁴. Abbildung 1.5 zeigt eine schematische Zusammenfassung der verschiedenen Rollen von SIRT6 und SIRT1 in der Expressionsregulation rhythmischer Gene.

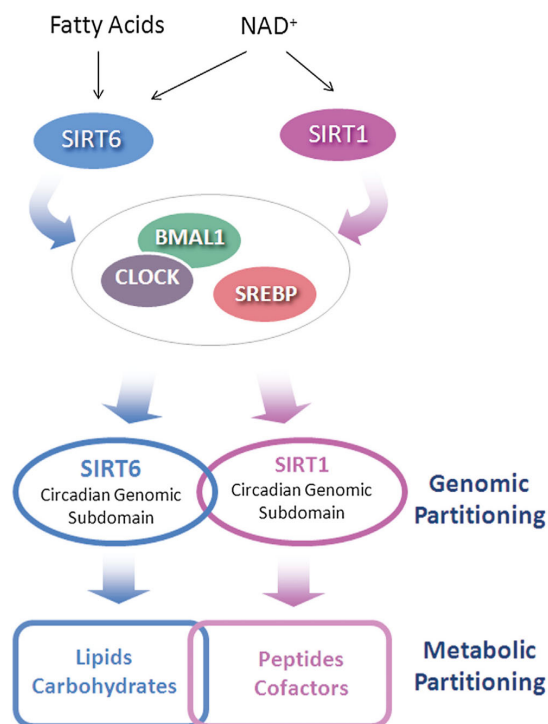


Abbildung 1.5: SIRT6- und SIRT1-abhängige zirkadiane Funktionen. Das Schema zeigt die unterschiedlichen Funktionen von SIRT6 und SIRT1 in der Kontrolle zirkadianer Genexpression und des Stoffwechsels. Verschiedene Kontrollmechanismen resultieren in SIRT6- und SIRT1-spezifischer Aufteilung des zirkadian regulierten Genoms, die mit verschiedenen metabolischen Phänotypen einhergeht. (Nachgedruckt aus: Masri, S. *et al.*: Partitioning Circadian Transcription by SIRT6 Leads to Segregated Control of Cellular Metabolism. *Cell* 158, 659–672 (2014). Copyright 2014, mit Erlaubnis von Elsevier. ⁶⁴)

Rolle in inflammatorischen Prozessen

Wie bereits im Abschnitt 1.1.7 beschrieben, hemmt SIRT6 die NF- κ B gesteuerte Genexpression, die beispielsweise in Antwort auf TNF α , zellulären Schaden und Stress inflammatorische Prozesse steuert^{27,41}. Chronische Aktivierung dieses Signalwegs fördert auf lange Sicht Seneszenz auf zellulärer Ebene sowie im gesamten Organismus⁶⁵.

In einer anderen Studie wurde berichtet, dass *Sirt6*-defiziente Mäuse, beginnend im Alter von zwei Monaten, eine chronische Leberentzündung entwickelten, die in eine Fibrose voranschritt. Es wurde gezeigt, dass für die Entwicklung dieses Phänotyps ein *Knockout* von *Sirt6* in T-Zellen und myeloiden Zellen ausreichte. SIRT6-defiziente Makrophagen zeigten erhöhte c-Jun-abhängige Expression der pro-inflammatorischen Faktoren MCP-1, IL-6 und TNF α , die durch eine fehlende Deacetylierung von H3K9 in Abwesenheit von SIRT6 an den entsprechenden Promotoren verursacht wurde⁴³.

Abgesehen von diesen anti-inflammatorischen Wirkungen von SIRT6 wurde berichtet, dass SIRT6 in Abhängigkeit von NAD⁺ die Translation von TNF α von seiner mRNA steigert, wobei der genaue Mechanismus dieser Beeinflussung noch nicht geklärt werden konnte⁶⁶. Zudem konnte gezeigt werden, dass SIRT6 die Abspaltung von Acyl-Resten von TNF α katalysiert und damit die Sekretion von TNF α durch Makrophagen fördert⁹.

Es liegen somit viele Hinweise darauf vor, dass SIRT6 auf verschiedene Weise und mit verschiedenen Auswirkungen sowohl die transkriptionelle⁴³ und translationale⁶⁶ Expression, Aktivierung und Sekretion von TNF α ⁹ sowie auch durch TNF α gesteuerte Prozesse wie den NF- κ B-Signalweg^{27,41} beeinflusst.

1.1.9. Rolle in Tumorentstehung und -progression

Aufgrund seiner vielfältigen zellulären Funktionen liegt die Vermutung nahe, dass SIRT6 eine Rolle in der Tumorentstehung bzw. -suppression spielen könnte. Schon bei der Lokalisation des humanen *Sirt6*-Gens in der Chromosomenregion 19p13.3 fiel auf, dass dies eine Region ist, die in vielen malignen Erkrankungen, vor allem akuten Leukämien, mutiert

oder deletiert ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass SIRT6 im Zusammenhang maligner Erkrankungen entweder komplett fehlen, dysfunktional oder nicht regulierbar sein könnte, wurde somit als relativ hoch eingeschätzt⁶⁷.

In einer Studie mit mehreren Tumorzelllinien führte eine Überexpression von SIRT6 zur Induktion von Apoptose in Tumorzellen, jedoch nicht in gesunden Zellen. Als Grundlage für den SIRT6-vermittelten Zelltod wurde seine ADP-Ribosyltransferaseaktivität sowie die Aktivierung von p53- und p73-abhängigen Signalwegen ermittelt⁶⁸. Einen ersten Hinweis auf einen Mechanismus der Wirkung von SIRT6 als Tumorsuppressor lieferten Min und Kollegen. In einem DEN-basierten Mausmodell der Initiation des hepatozellulären Karzinoms war in frühen Stadien der Transformation eine c-Jun-vermittelte Hemmung der SIRT6-Expression zu beobachten, die wiederum zu einer Steigerung der Expression von Survivin (*Birc5*) führte, die unter normalen Umständen durch SIRT6-vermittelte Deacetylierung von H3K9 und damit verminderter Aktivität von NF- κ B am *Survivin*-Promotor gehemmt wird. Dieser Mechanismus erlaubt den durch DEN geschädigten Zellen, während der Tumorentstehung der Apoptose zu entgehen. In dieser Studie wurde c-Fos als Aktivator der Transkription von SIRT6 identifiziert, zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von c-Fos durch c-Jun reprimiert wird.

In einer weiteren Studie wurde ermittelt, dass der Verlust von SIRT6 ausreicht, um die Tumorentstehung zu initiieren, und zwar durch die Auswirkungen einer Umprogrammierung des Zellstoffwechsels, die zu einer erhöhten Aufnahme von Glukose und einer Steigerung der Glykolyse unter aeroben Bedingungen führt⁴². Diese Umprogrammierung basiert teilweise auf der fehlenden Repression Hif1 α -kontrollierter Gene (*Ldh*, *Tpi*, *Pfk-1*, *Pdk1*, *Pdk4*, *Glut1*)³⁹, sowie auf dem Verlust der neu identifizierten Co-Repression c-Myc-gesteuerter Gene durch SIRT6. Diese c-Myc-kontrollierten Gene sind involviert in der Ribosomenbiogenese sowie im Glutaminmetabolismus. In den Untersuchungen wurde die Notwendigkeit einer parallelen Expression von Onkogenen sowie einer aberranten Aktivierung von Signalwegen, die Proliferation und Überleben fördern, für den Mechanismus der Tumorentstehung durch Verlust von SIRT6 ausgeschlossen, jedoch konnte die Inaktivierung von SIRT6 bereits transformierten Zellen einen weiteren Wachstumsvorteil verschaffen. Durch Inhibition der Glykolyse in SIRT6-defizienten Zellen konnte die Tumorentstehung

unterbunden werden und auch der *Knockdown* von *c-Myc* konnte das Tumorstwachstum hemmen, was darauf hindeutet, dass sowohl *Hif1 α* - als auch *c-Myc*-kontrollierte Genexpression in der Transformation durch Verlust von *SIRT6* eine entscheidende Rolle spielen (Abbildung 1.6).

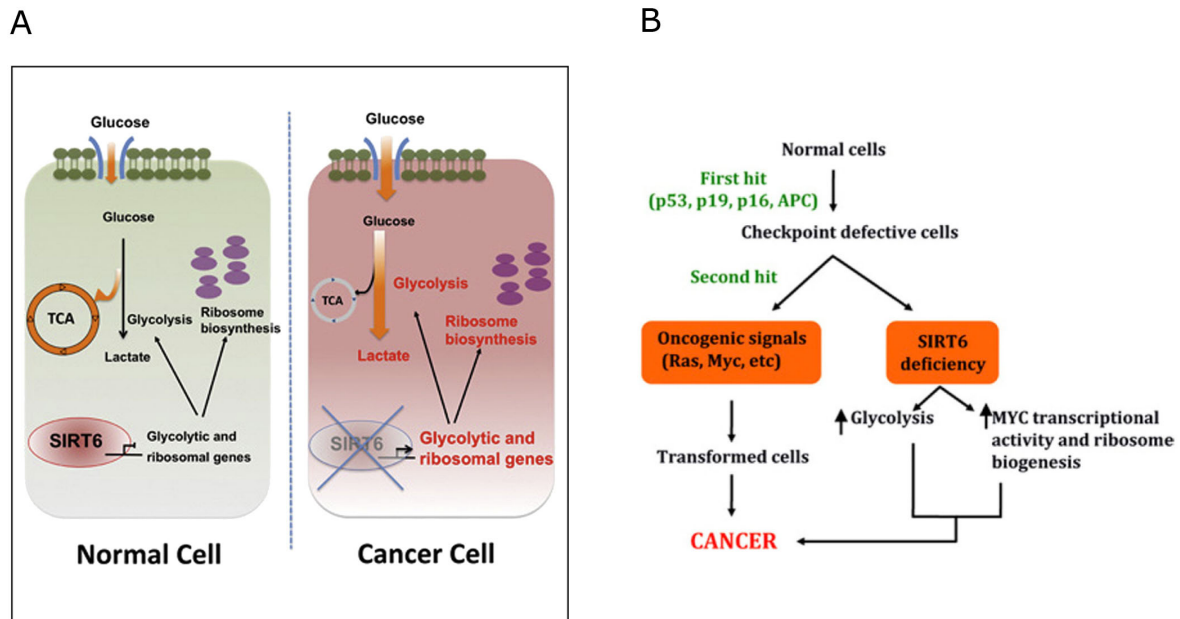


Abbildung 1.6: Modell der Rolle von SIRT6 in Tumorentstehung und -progression. **A** Regulation von Glukoseaufnahme, Glykolyse und Ribosomenbiosynthese mit und ohne SIRT6: In gesunden Zellen (links) reguliert SIRT6 die Expression von Genen der Glykolyse und Ribosomenbiosynthese auf ein normales Maß. Produkte der Glykolyse fließen zu einem großen Teil in den Citratzyklus (*Tri-carboxylic Acid Cycle* = TCA cycle). In durch Verlust von SIRT6 transformierten Zellen (rechts) wird durch eine erhöhte Expression dieser Gene die Glukoseaufnahme sowie die Glykolyse unter aeroben Bedingungen gesteigert. Anstatt in den Citratzyklus einzugehen, werden die Produkte der Glykolyse vermehrt in Laktat umgewandelt. Zusätzlich werden mehr Ribosomen synthetisiert. **B** Von Sebastià *et al.* vorgeschlagene Rolle von SIRT6 in der Tumorentstehung. (Nachgeruckt aus: Sebastià, C. *et al.*: The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell* 151, 1185–99 (2012). (A): Graphical Abstract ([http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(12\)01351-7](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(12)01351-7)). Copyright 2012, mit Erlaubnis von Elsevier. ⁴²)

In einem murinen *in vivo*-Modell der Kolonadenomatose führte der *Knockout* von *SIRT6* zu einem Anstieg in Anzahl, Größe und Grad von Adenomen, die zudem auch eine erhöhte Glukoseaufnahme und Expression glykolytischer Gene aufwiesen. Die Inhibition

der Glykolyse identifizierte diesen Prozess als maßgeblich für die Entstehung der aggressiveren Adenome in Abwesenheit von SIRT6.

Zusätzlich wurde durch Datenbankanalysen ermittelt, dass *SIRT6* in 20 % aller humanen Tumore deletiert ist, und zwar bereits in frühen Stadien. Auch in Tumorzelllinien ist der *SIRT6*-Lokus in insgesamt 35 % aller Datensätze deletiert. In einer Untersuchung von 253 Proben von Patienten des Kolorektalkarzinoms korrelierte eine niedrige Expression von SIRT6 mit kürzerem krankheitsfreien Überleben bei aggressiveren Tumoren⁴².

Es existieren auch Studien, die eine mögliche Rolle von SIRT6 als Onkogen ermittelten. In einer Studie mit Brustkrebs-Patienten zeigte sich eine Korrelation von einer erhöhten Expression von SIRT6 mit der Resistenz gegen Chemotherapeutika (Paclitaxel und Epirubicin)⁶⁹. Eine Überexpression von SIRT6 wurde auch in Prostatakarzinomen ermittelt, wo sie ebenfalls mit erhöhter Chemoresistenz in Zusammenhang steht⁷⁰. Es wird vermutet, dass das SIRT6-Protein Zellen bestimmter Tumorarten vor Chemotherapie-induzierter DNA-Schädigung schützen kann.

1.2. Das Hepatozelluläre Karzinom

1.2.1. Ätiologische und epidemiologische Aspekte

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC), das etwa 85 % aller primären Lebertumore ausmacht, ist die sechsthäufigste Tumorerkrankung im weltweiten Vergleich und die dritthäufigste Krebserkrankung, die zum Tod führt⁷¹. Die Karzinogenese erfolgt fast ausschließlich aufgrund einer andauernden Leberschädigung, beispielsweise verursacht durch chronische Infektion mit dem Hepatitis B oder -C-Virus (HBV, HCV), Alkohol-induzierte Zirrhose, Schädigung durch Exposition gegenüber Aflatoxin oder Vinylchlorid, nicht-alkoholinduzierte Steatohepatitis (*nonalcoholic steatohepatitis, NASH*) und einige weiterer Risikofaktoren⁷². Als gemeinsamer Mechanismus in der Entstehung von HCC gilt die Achse Inflammation-Fibrose-Krebs, die durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrolliert wird⁷³.

Aufgrund der geographischen und gesellschaftlichen Verteilung von Risikofaktoren sind über 80 % der HCC-Fälle im südlichen Afrika und östlichen Asien angesiedelt. Das Risiko für Männer, an HCC zu erkranken, liegt dabei doppelt bis vierfach so hoch wie das von Frauen⁷².

1.2.2. Genetische und epigenetische Veränderungen im HCC

Mit der malignen Transformation sowie dem Voranschreiten von Tumorerkrankungen sind Veränderungen im Genom und der Genexpression assoziiert. Es werden solche Gene überexprimiert oder konstitutiv aktiviert, die dem Tumor Vorteile in Bezug auf Wachstum, Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff und Resistenz gegen Apoptose verschaffen, diese Gene werden als Onkogene bezeichnet. Als Tumorsuppressorgene werden Gene klassifiziert, deren Expression während der Tumorgenese verringert wird oder deren Proteinprodukt durch Mutationen seine Funktionen verliert. Tumorsuppressoren sind an Kontrollmechanismen beteiligt, welche die Gesundheit der Zelle überwachen, Wachstum, Zellzyklus und Zellidentität kontrollieren und, falls eine Reparatur von Zellschäden unmöglich ist, an der Einleitung von Apoptose beteiligt sein können^{74,75}. Übergeordnete Mechanismen, die für diese Veränderungen in der Genexpression verantwortlich sind, schließen somatische Mutationen⁷⁶, Defekte in DNA-Reparaturmechanismen⁷⁷, Änderungen in der DNA-Methylierung⁷⁸ und der Regulation von Histonmodifikationen⁷⁹ ein.

Die Hepatokarzinogenese ist durch verschiedene Stadien gekennzeichnet. Während der relativ langen präneoplastischen Phase (10-30 Jahre), der dysplastischen Phase (3-5 Jahre) bis hin zum neoplastischen Stadium ändern sich durch die Akkumulation chromosomaler, genetischer und epigenetischer Veränderungen und deren Folgen für das Transkriptom und Proteom das Proliferationsverhalten, der Phänotyp und die Funktion der betroffenen Zellen⁸⁰.

Bereits im präneoplastischen Stadium, beispielsweise in Läsionen der zirrhotischen Leber, können erste Änderungen in der Genexpression festgestellt werden, die durch epigenetische Veränderungen wie deregulierter DNA-Methylierung im chronisch-

inflammatorischen Umfeld unter anderem durch die Wirkung von Cytokinen ausgelöst werden. Wachstumsfaktoren wie IGF-2 und TGF- α werden oft in Folge überexprimiert und bewirken eine gesteigerte Proliferation, aus der monoklonale Hepatozytenpopulationen hervorgehen.

Chromosomenaberrationen wie der Verlust einzelner Loci oder gesamter Chromosomenarme bzw. Duplikationen akkumulieren während der Hepatokarzinogenese, wobei die Häufigkeit während der dysplastischen Phase stark ansteigt und auch während der Entwicklung von gut differenziertem zu immer weniger differenziertem HCC weiter zunimmt⁸⁰. Somatische Mutationen in einzelnen Genen oder deren regulatorischen Sequenzen können Transkription, Translation, Funktion und Stabilität von Genen und deren Produkten so ändern, dass die Tumorgenese gefördert wird. Auch sie akkumulieren während aller Phasen der Karzinogenese⁸¹.

Veränderungen im Epigenom können die DNA-Methylierung, Modifikationen an Histonen und die Expression von Micro-RNAs betreffen. Im HCC werden Tumorsuppressorgene oft durch Hypermethylierung ihrer Promotorregionen inaktiviert, während das Genom, verglichen mit gesunden Zellen, eine globale Hypomethylierung aufweist^{82,83}. Der zeitliche Verlauf des Auftretens und der Progression einiger epigenetischer Alterationen in virus-freier und HBV- bzw. HCV-induziertem HCC sind in Abbildung 1.7 dargestellt.

Auch Histonmodifikationen können auf der Ebene einzelner Gene und des kompletten Genoms Veränderungen im HCC zeigen. Gut charakterisiert im Zusammenhang mit der Repression der Expression einzelner Gene im HCC sind die Hypoacetylierung von Lysinresten der Histone H3 und H4 sowie eine Zunahme von trimethyliertem H3K9 und H3K27 in betroffenen Promotorregionen. Auf der Ebene des gesamten Genoms konnte im HCC eine Reduktion von trimethyliertem H4K20 sowie eine Zunahme von trimethyliertem H3K27 sowie phosphoryliertem Histon H3 festgestellt werden⁸⁴. Die veränderte Expression verschiedener Micro-RNAs im HCC kann Prozesse wie den Zellzyklus, die Apoptose, die Malignität, sowie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Invasion beeinflussen⁸¹.

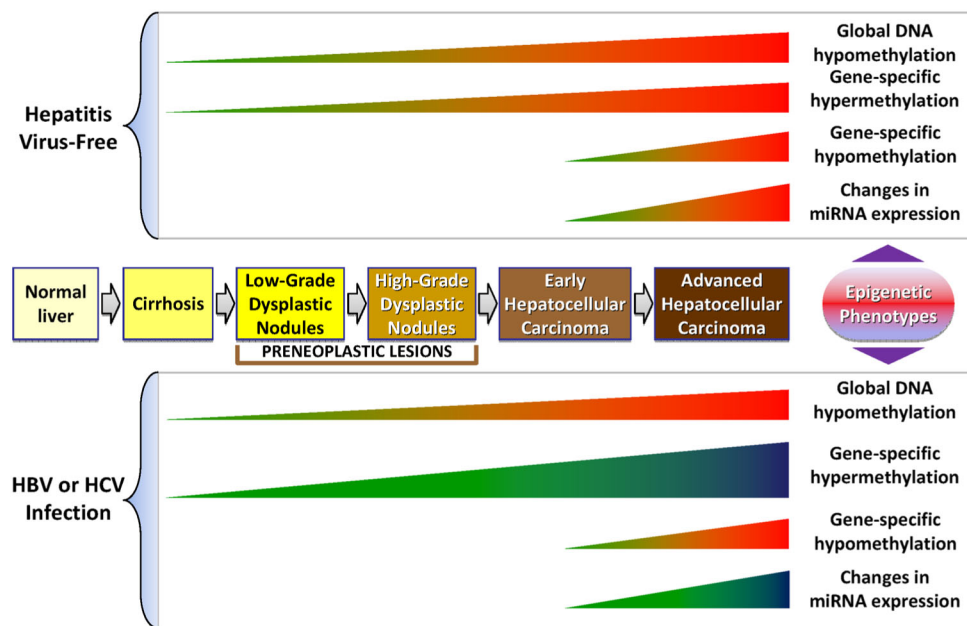


Abbildung 1.7: Die Chronologie von Veränderungen der DNA-Methylierung und Expression von Micro-RNAs in der humanen Hepatokarzinogenese.

(Nachgedruckt aus: Pogribny, I. P. & Rusyn, I.: Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 342, 223–30 (2014). Copyright 2014, mit Erlaubnis von Elsevier. ⁸⁴⁾

Die Vielfalt genomischer Läsionen lässt darauf schließen, dass sie vor allem zufällig erfolgen. Obwohl die molekularen Ursachen und Manifestationen genomischer und genetischer Aberrationen im HCC zwischen Tumoren verschiedener Individuen und sogar innerhalb eines Individuums stark variieren⁸⁰, sind letztendlich gewisse Faktoren und Signalwege mit großer Häufigkeit von diesen Veränderungen betroffen. Sie werden vermutlich positiv selektioniert durch ihre Fähigkeit, dem Tumor Vorteile in Bezug auf Überleben und Wachstum zu vermitteln. Häufig deregulierte Faktoren und deren Rolle in charakteristischen Prozessen während der Entstehung und Progression von HCC sind in Abbildung 1.8 zusammengefasst.

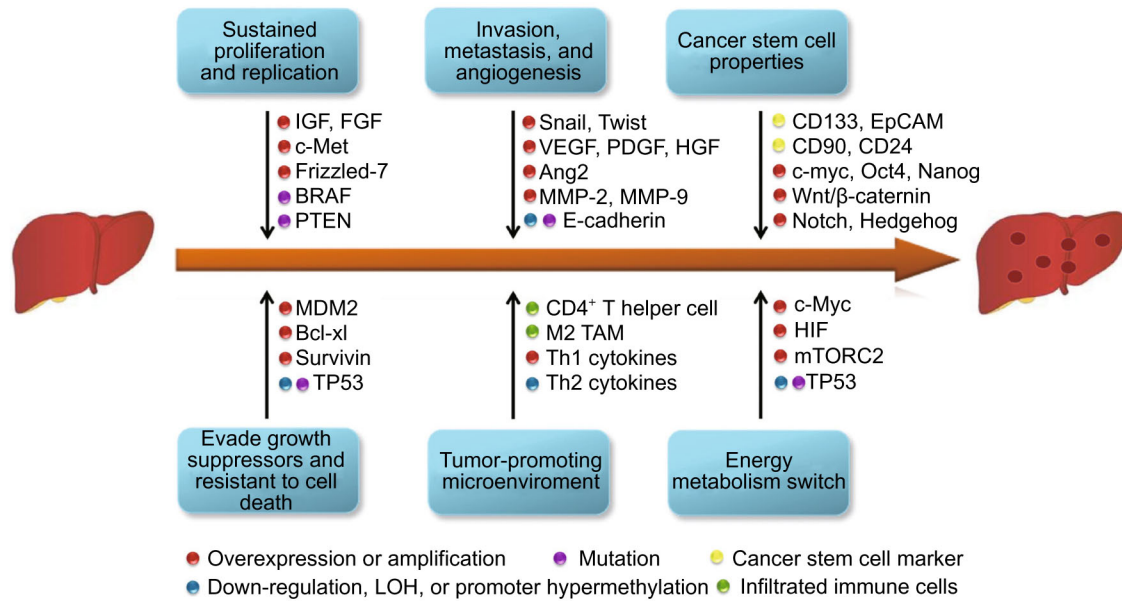


Abbildung 1.8: Stufen der Hepatokarzinogenese und ihnen zugrunde liegende molekulare Veränderungen in der Expression verschiedener Faktoren. Die Entstehung von HCC ist ein Prozess aus mehreren Schritten, die durch charakteristische Prozesse wie der unkontrollierten Proliferation, der Resistenz gegen Wachstumssuppression und Apoptose, der Invasion, der Angiogenese und der Deregulation des Energiestoffwechsels gekennzeichnet ist. Multiple zelluläre und molekulare Veränderungen wie die Amplifikation oder Überexpression von Onkogenen, Hypermethylierung oder Mutation von Tumorsuppressorgenen, Aktivierung von Stammzeleigenschaften und die Infiltration von Immunzellen tragen zur malignen Transformation im HCC bei. LOH = *Loss of heterozygosity*. (Nachgedruckt aus: Liu, M., Jiang, L. & Guan, X.-Y.: The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein Cell* 5, 673–91 (2014).⁸¹)

1.2.3. Expression onkofetaler Gene

Oft tritt innerhalb eines Tumors die Re-Expression von Genen auf, die normalerweise nur in der embryonalen oder fetalen Entwicklung exprimiert werden. Produkte dieser Gene werden auch als onkofetale Antigene bezeichnet. Schon früh wurde vermutet, dass die De-Repression dieser Gene entweder mit einer De-Differenzierung von Tumorzellen zu tun hat, die zur Wiedererlangung von Charakteristika embryonaler Stammzellen führt, oder dass Tumore aus transformierten Stammzellen entstehen. Onkofetale Antigene werden häufig sekretiert und können daher als Biomarker im Serum nachgewiesen werden. Ihre Aussagekraft ist allerdings eingeschränkt, da sie auch bei normaler Gewebeerneue-

rung durch die Aktivierung von Stammzellen des Gewebes ausgeschüttet werden können⁸⁵. Im HCC sind die am besten charakterisierten onkofetalen Antigene die Biomarker Alpha-Fetoprotein (AFP)^{85,86} und Glypican-3 (GPC-3)⁸⁶⁻⁸⁸. Sie dienen der Diagnose, Klassifikation sowie der Ermittlung der Prognose im HCC.

Auch die aberrante Expression geprägter Gene wie *H19* und *IGF-2* kann in verschiedenen Tumorerkrankungen (z.B. Wilms-Tumor) oder in für Tumore prädisponierenden Erkrankungen (Beckwith-Wiedemann-Syndrom) von Bedeutung sein⁸⁹. *H19* und *IGF-2* sind reziprok geprägt und werden regulär jeweils nur von einem Allel exprimiert, *H19* vom maternalen und *IGF-2* vom paternalen Allel⁹⁰. Die biallelische Expression von *H19* und *IGF-2* wurde im HCC beschrieben^{91,92}, bei der ein Verlust der Prägung (*Loss of Imprinting*, LOI) eine Rolle spielt, der dazu führt, dass beide Gene unabhängig voneinander überexprimiert werden⁹¹. LOI im Bereich des Chromosoms 11p15, in dem diese beiden Gene lokalisiert sind, wird meist durch Veränderungen der DNA-Methylierung in regulatorischen Sequenzen verursacht⁹³, wobei somatische Mutationen in diesem Bereich seltener eine Rolle spielen⁹⁴. Im HCC wird eine deregulierte Expression von *H19* und *IGF-2* mit fortgeschrittenem Tumorstadium sowie ungünstiger Prognose in Zusammenhang gebracht⁹⁵.

1.2.4. Umprogrammierung im Energiestoffwechsel

Es ist seit langem bekannt, dass Tumorzellen, verglichen mit gesunden Zellen, eine reduzierte mitochondriale Respiration betreiben, jedoch eine starke Abhängigkeit von der Glykolyse aufweisen. Damit geht in der Regel einher, dass ein Teil des in der Glykolyse entstehenden Pyruvats vergoren wird, was zur Produktion eines Laktatüberschusses führt, der von den Zellen zum Teil an die Umgebung abgegeben wird. Dies führt zu einer Ansäuerung dieser Umgebung (Warburg-Effekt)⁹⁶. Die Energiebilanz dieser Verschiebung im Stoffwechsel ist wesentlich ungünstiger als die vollständige Oxidation von Glukose zu CO₂, weshalb Tumorzellen einen stark erhöhten Bedarf an Glukose gegenüber gesunden Zellen haben, ihr Sauerstoffbedarf jedoch geringer ist. Diese Umschaltung liefert aber auch, vor allem aus dem Citratzyklus, viele Vorläufermoleküle für die Biosynthese von

Nukleotiden, Aminosäuren und Fettsäuren, die für eine effektive Erzeugung von Biomasse und damit für die Zellproliferation notwendig sind. Diese Tatsache wird durch den Umstand verdeutlicht, dass viele Tumorzelllinien nur auf der Basis von Glukose und Glutamin wachsen können⁹⁷.

Mittlerweile gilt als erwiesen, dass die beschriebene Umschaltung im Stoffwechsel durch die Aktivierung von onkogenen Signalwegen wie c-MYC, RAS, AKT und HIF gesteuert wird und ein Bestandteil der malignen Transformation ist⁹⁸. Auch im HCC ist diese Veränderung im Energiestoffwechsel hin zu verstärkter Glykolyse untersucht worden. Anders als bei Tumoren anderer Organe und Gewebe, welche die Glykolyserate bis zu 10-fach erhöhen, konnte in HCC-Proben nur eine etwa 4-fache Steigerung festgestellt werden⁹⁹.

1.2.5. Krebsstammzelltheorie

Die Krebsstammzelltheorie besagt, dass Tumore aus einer gewissen, meist anteilig sehr kleinen Zellpopulation hervorgehen, die durch einen Stammzellphänotyp mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Pluripotenz sowie der Expression von Stammzellmarkern gekennzeichnet sind, sogenannten Krebsstammzellen (*Cancer Stem Cells*, CSC). Ähnlich wie embryonale Stammzellen sind diese Zellen nicht oder nur wenig differenziert¹⁰⁰. Es ist bekannt, dass wenig differenzierte und aggressive humane Tumore eine Genexpressionsignatur, die ähnlich derer von embryonalen Stammzellen ist, aufweisen¹⁰¹.

Es wird vermutet, dass Ovalzellen, die als Vorläuferzellen an der Regeneration der Leber beteiligt sein können, mögliche Vorläufer von CSCs im HCC sind^{102,103}. CSCs haben die Fähigkeit, auch in sehr kleiner Anzahl Tumore zu regenerieren. Zudem sind sie hoch resistent gegenüber Chemotherapie und daher schwer zu bekämpfen¹⁰⁴.

Die Identifikation und Isolation von CSCs innerhalb einer Tumorzellpopulation wurde anfänglich nur anhand eines oder nur weniger Stammzellmarker auf der Zelloberfläche, unter anderem CD44, CD90, CD133 oder EpCam, durchgeführt. Ein weiterer Ansatz stellt die Analyse der „*Side Population*“ (SP) von HCC-Zellen dar, einer Population, welche die

Eigenschaft besitzt, den DNA-Farbstoff Hoechst 33342 mit ABCG2-Transportern aus dem Zellkern auszuschließen. Verschiedene Studien zeigen, dass die SP die CSC-Population beinhaltet^{105,106}.

Bezüglich der Genexpression wurde festgestellt, dass CSCs verschiedener Tumore zwar eine Aktivierung unterschiedlicher onkogener Signalwege wie MYC, SRC oder EGFR zeigen, aber auch eine gemeinsame stammzellartige Genexpressionssignatur aufweisen¹⁰⁶.

1.3. Zielsetzung

Als Regulator von DNA-Reparatur, Genomstabilität, Genexpression, Kohlenhydrat- und Cholesterinstoffwechsel, Inflammation und Tumorsuppression ist SIRT6 ein wichtiger, viele Prozesse beeinflussender und verknüpfender Faktor, dessen Eigenschaften, Funktionen und Interaktionen gerade erst entschlüsselt werden. Die Beeinflussung seiner Aktivität wird als hoch relevant für die Behandlung verschiedener Erkrankungen und zur Förderung einer möglichst langen, gesunden Lebensdauer eingeschätzt.

Um die Zusammenhänge eines Verlusts von SIRT6 mit den damit verbundenen phänotypischen Konsequenzen besser zu verstehen, sollten anhand eines bereits etablierten Mausmodells mit globalem, konstitutivem *Knockout* von *Sirt6* sowie eines während dieser Arbeit aus embryonalen Stammzellen, die eine konditionale Deaktivierung von SIRT6 ermöglichen, generierten Mausmodells mit leberspezifischem *Sirt6-Knockout* die Auswirkungen eines Verlusts von SIRT6 speziell in Hepatozyten untersucht werden. Im Fokus sollten dabei Veränderungen in grundlegenden Eigenschaften des Energiestoffwechsels und der Genexpression stehen. Da alle bisher beschriebenen SIRT6-regulierten Prozesse vor allem in Tumorerkrankungen Veränderungen unterworfen sind, sollte die Relevanz des Verlusts von SIRT6 im Zusammenhang mit der Tumorgenese im Allgemeinen und mit dem hepatozellulären Karzinom im Speziellen näher untersucht werden. Dazu sollte zunächst die Expression von SIRT6 in standardisierten Proben verschiedener humaner Tumore sowie in Hepatomzelllinien untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Expression von Tumorbiomarkern und Krebsstammzellmarkern, Proliferation, 2D-Koloniebildung

und Apoptosesensitivität von Hepatomzelllinien in Abhängigkeit von SIRT6 analysiert werden.

Um Hinweise auf weitere Substrate, Interaktionspartner und regulatorische Netzwerke von SIRT6 zu gewinnen, sollte außerdem eine Co-Immunpräzipitation von SIRT6 aus primären humanen Hepatozyten mit anschließender LC-MS-vermittelter label-freier quantitativer Proteomanalyse¹⁰⁷ aller co-präzipitierten Proteine und deren bioinformatischen Einordnung in zelluläre Prozesse durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte, Instrumente, Software und Verbrauchsgegenstände

Geräte und Instrumente

ACCU-CHEK® Sensor Blutzuckermessgerät	F. Hoffmann-La-Roche AG (Mannheim, D)
ACCU-CHEK® Aviva Blutzuckermessgerät	F. Hoffmann-La-Roche AG
Binder CB 150 CO ₂ Inkubator	Binder GmbH (Tuttlingen, D)
Bio-Rad Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules/CA, US)
Bio-Rad MyCycler™ thermal cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Biostep Dunkelhaube DH-30/32	Biostep GmbH (Jahnsdorf, D)
CASY Cell Counting System	Schärfe System GmbH (Reutlingen, D)
Electrophoresis Power Supply – EPS 601	Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare (Uppsala, SE)
Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG (Hamburg, D)
FACScalibur	Becton, Dickinson and Company (Sparks/MD, US)
GFL® Typ 1002 (Wasserbad)	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, D)
Heidolph MR 3001 (Magnetrührer)	Heidolph Instruments GmbH (Schwabach, D)
Heidolph REAX 1DR (Vortex)	Heidolph Instruments GmbH
Heidolph UNIMAX 1010 (Plattenschüttler)	Heidolph Instruments GmbH

Heraeus FunctionLine Typ B6 (Inkubator)	Heraeus Holding GmbH (Hanau, D)
Heraeus Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH
HG Tuning-Fork Scale (Laborwaage)	Shinko Denshi Co. Ltd. (Tokio, JP)
Hoefer SE 250 mini-vertical gel electrophoresis unit	Hoefer, Inc. (Holliston/MA, US)
Holten LaminAir Model 1,2	Holten (Allerød, DK)
IKAMAG® RCT (Magnetrührer)	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, D)
IKA® Schüttler MTS 4 (Plattenschüttler)	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
innOva 4230 Refrigerated Incubator Shaker	New Brunswick Scientific (Edison/NY, US)
Life Technologies™ HORIZON® 58 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Biometra GmbH, Göttingen, D
Leica CM1900 Kryostat	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D)
Mighty Small 4-gel Caster	Hoefer, Inc.
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Mitsubishi P93D Thermodrucker	Mitsubishi (Tokio, JP)
LSM 710 NLO Konfokales Laserscanning-Mikroskop (CLSM)	Carl Zeiss AG (Oberkochen, D)
Mettler Toledo AG201 DeltaRange® (Analysenwaage)	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, D)
Mettler Toledo SevenEasy (pH-Meter)	Mettler-Toledo GmbH
NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000	Thermo Fisher Scientific (Waltham/MA, US)
Olympus USB Kamera	Olympus Corporation (Peking, CN)
Sanyo Ultra Low Temperature Freezer	Sanyo Electric Co. Ltd. (Moriguchi City, JP)
SIGMA Laborzentrifuge 1 K 15	SIGMA Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, D)
Stratagene Mx3000P™ QPCR System	Stratagene (La Jolla/CA, US)
SpeedVac® Plus SC110A & Universal Vacuum System Plus UVS400A	Savant / Thermo Fisher Scientific
Tecan SAFIRE	TECAN Group Ltd. (Männedorf, CH)
Tecan SPECTRAFLUOR PLUS	TECAN Group Ltd.

Software und Datenbanken

MxPro QPCR Software (Stratagene)	BLAST
Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad)	CLUSTALW
XFluor™ (TECAN)	DAVID Bioinformatics Resources ^{108,109}
BD FACSuite™ (BD Biosciences)	ENSEMBL.org
Adobe Photoshop CS 5	PYRAT SYSTEM
Microsoft Office für Mac 2011	
Origin 7	

Verbrauchsgegenstände und Plastikware

ACCU-CHEK® Sensor Comfort Pro Teststreifen	F. Hoffmann-La-Roche AG
ACCU-CHEK® Aviva Teststreifen	F. Hoffmann-La-Roche AG
Adhesive PCR Film	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)
CASY <i>cups</i>	F. Hoffmann-La-Roche AG
CELLSTAR® Kulturflaschen, 25 & 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D)
CELLSTAR® Kulturschalen 100 mm	Greiner Bio-One GmbH
CELLSTAR® Kulturplatten 6-, 12-, und 96-Well	Greiner Bio-One GmbH
CELLSTAR® Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25 und 50 mL	Greiner Bio-One GmbH
Microtiterplatte 96 Well, flacher Boden; weiß, schwarz or transparent	Greiner Bio-One GmbH
Menzel-Gläser 24 X 55 mm #1 (Deckgläser)	Thermo Fisher Scientific
Menzel-Gläser POLYSINE® SLIDES	Thermo Fisher Scientific
Nunc™ CryoTube™ Vials 1.8 mL	Nalge Nunc International (Penfield/NY, US)
BD Falcon™ Cultureslides 8 Chamber	Becton, Dickinson and Company
BD Falcon™ Cell Strainers 40 µM/Blue	Becton, Dickinson and Company
Braun Omnican® 100	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Braun Sterican® Einmalkanülen	B. Braun Melsungen AG

Immobilon-P Membran (polyvenyli- dene fluoride (PVDF))	Merck Millipore, Merck KGaA
TipOne Tips 10 µL, 200 µL, 1000 µL	STARLAB GmbH (Hamburg, D)
TipOne Filter Tips 10 µL, 20 µL, 200 µL	STARLAB GmbH
TubeOne™ Microcentrifuge Tubes	STARLAB GmbH
Zellschaber, steril	Greiner Bio-One GmbH
96-well PCR Plate, Non-Skirted	Thermo Fisher Scientific

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid-bis 30 % (37.5:1) für die Elektrophorese	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Advanced MEM (Minimum Essential Medium)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific
Albumin - Fraction V (pH 7.0) (BSA)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Anti-Apo1 (CD95-Agonist)	Peter Krammer (DKFZ Heidelberg)
Aqua B. Braun (ddH ₂ O)	B. Braun Melsungen AG
Aqua-Poly/Mount	Polysciences (Warrington/PA, US)
Bacto Agar	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Benzonase® Nuclease	Sigma-Aldrich
Borsäure	AppliChem GmbH
Bromphenolblau	Merck KGaA
CASY ton	F. Hoffmann-La-Roche AG
CDP-Star®	Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific
Collagen R	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Collagenase Typ NB 4G	SERVA Electrophoresis GmbH
Collagenase Typ NB 8	SERVA Electrophoresis GmbH

complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	F. Hoffmann-La-Roche AG
Daunorubicin 2 mg/mL	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz
Dimethyl-Pimelimidat (DMP) = Pimelindiimidsäure-dimethylester-dihydrochlorid	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dextran-FITC	Molecular Probes®, Thermo Fisher Scientific
Doxorubicin 5 mg/mL	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat p.a.	AppliChem GmbH
Entellan	Merck KGaA
Ethanol, 99 %	AppliChem GmbH
Ethidiumbromid 10 mg/mL	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG (Berlin, D)
Formaldehyd, 16 %, Methanol-frei	Polysciences, Inc. (Warrington/PA, US)
Gibco® DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X)	Invitrogen™
Gibco® DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X)	Invitrogen™
Gibco® Pen Strep (Penicillin 10,000 U/mL, Strepto mycin 10,000 µg/mL)	Invitrogen™
Gibco® Natriumpyruvat 100 mM	Invitrogen™
Giemsa	Sigma-Aldrich
Glycerol ≥99.5 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin ≥99 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
G418 BC-Sulfate	Biochrom GmbH (Berlin, D)
Hämatoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	AppliChem GmbH
Hepes Puffer 1 M in 0.85 % NaCl	Lonza Group Ltd. (Basel, CH)

HCl, standard volumetric solution (1 M)	AppliChem GmbH
Hoechst 33342 (10 mg/mL)	Molecular Probes®
Igepal ("NP-40")	Sigma-Aldrich
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaisers Glyceringelatine für die Mikroskopie	Merck KGaA
Kaliumchlorid	Merck KGaA
Ketamin-hameln 50 mg/mL	Hameln Pharma Plus GmbH (Hameln, D)
L-Cystein – HCl	AppliChem GmbH
L-Glutamine 200 mM in 0.85 % NaCl solution	Cambrex Bio Science (Verviers, BE)
Lipofectamine® LTX and PLUS™ Reagent	Invitrogen™
2-Mercaptoethanol für die Synthese	Merck KGaA
Natriumazid, reinst (NaN ₃)	AppliChem GmbH
di-Natriumhydrogenphosphat- dihydrat (Na ₂ HPO ₄) ≥ 99.5 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
NaH ₂ PO ₄ X H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG
(NH ₄) ₂ SO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich
di-Natriumtetraborat-Decahydrat (Borax)	Carl Roth GmbH & Co. KG
2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose)	Molecular Probes®
Nitro-Block-II™	Applied Biosystems®
Olivenöl	Sigma-Aldrich
Ölrot O (C.I. 26125) für die Mikroskopie Certistain ®	Merck KGaA
Opti-MEM® Reduced Serum Medium	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific

GlutaMAX™	
PBS EDTA pH 7.5 steril filtriert für die Zellkultur	Lonza Group Ltd.
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics
Ponceau S	Merck KGaA
Protein A-Agarose	Roche
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific
Rompun 20 mg/mL	Bayer AG (Leverkusen, D)
Roti®-Nanoquant	Carl Roth GmbH & Co. KG
Saponin (aus Quillaja-Rinde)	Sigma-Aldrich
StarPure AGAROSE Low EEO Standard For Gel Electrophoresis	STARLAB GmbH
Sterile Kochsalz-Lösung 0,9 % Braun	B. Braun Melsungen AG
Tamoxifen	Sigma-Aldrich
TEMED	AppliChem GmbH
Tissue Freezing Medium Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Jung (Wetzlar, D)
TransFectin™ Lipid Reagent	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich
TRIS ≥99.9 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
TRITON X-100	Sigma-Aldrich
Tropix® DEA Diethanolamin 99 %	Applied Biosystems®
Tropix I-BLOCK™	Applied Biosystems®
Trypsin-EDTA (10X)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, A)
Trypton	Sigma-Aldrich
Tween® 20	SERVA Electrophoresis GmbH
Xylol	Merck KGaA

2.1.3. Spezielle Reagenzien, Kits und Assaysysteme

Absolutely RNA [®] Miniprep Kit	Agilent Technologies, Stratagene
Ampliquon III 1.1X Taq Master Mix RED	Ampliquon ApS (Skovlunde, DK)
CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay	Promega (Madison/WI, US)
Dynabeads [®] M-280 Tosylactivated	Invitrogen [™]
Mouse IL-6 DuoSet [®] ELISA Development Kit	R&D Systems Inc. (Minneapolis/MN, US)
Mouse IL-10 DuoSet [®] ELISA Development Kit	R&D Systems Inc.
Mouse IL-16 DuoSet [®] ELISA Development Kit	R&D Systems Inc.
Mouse IL-17 DuoSet [®] ELISA Development Kit	R&D Systems Inc.
BD OptEIA [™] Mouse IL-12(p70) ELISA Set	BD Biosciences (San Diego/CA, US)
BD OptEIA [™] Mouse GM-CSF ELISA Set	BD Biosciences
GeneRuler [™] 100bp Plus DNA Ladder Größenstandard für Agarose-Gelelektrophorese	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler [™] 1 kb DNA Ladder Größenstandard für Agarose-Gelelektrophorese	Thermo Fisher Scientific
iScript [™] cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	Thermo Fisher Scientific
miRNeasy mini Kit	Qiagen (Hilden, D)
miScript PCR Starter Kit	Qiagen
Nuclear Complex Co-IP Kit	Active Motif
PageRuler [™] Prestained Protein Ladder Größenstandard für SDS-PAGE	Thermo Fisher Scientific
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate (HRP-Nachweis)	Thermo Fisher Scientific
Taq PCR Core Kit	Qiagen
TissueScan [™] Starter qPCR Panel 1 (cDNA Panels for Disease Gene Expression Profiling)	OriGene Technologies (Rockville/MD, US)

2.1.4. Antikörper

Erstantikörper für Western Blot, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz

Actin (I-19)-HRP (#sc-1616)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-Akt (pan)	Cell Signaling Technology (Danvers/MA, US)
anti-Phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology
Mouse α -Fetoprotein/AFP Antibody (#AF5369)	R&D Systems Inc. (Minneapolis/MN, US)
AFP (Alpha-1-Fetoprotein) (#PP028AA)	Biocarta (Hamburg, D)
Histone H3 Antibody (#9715)	Cell Signaling Technology
Acetyl-Histone H3 (Lys9) Rabbit mAb (#9649)	Cell Signaling Technology
Acetyl-Histone H3 (Lys14) Antibody (#4318)	Cell Signaling Technology
Acetyl-Histone H3 (Lys18) Antibody (#9675)	Cell Signaling Technology
Acetyl-Histone H3 (Lys56) Antibody (#4243)	Cell Signaling Technology
Anti-IGF2 antibody (#ab9574)	abcam, Cambridge, GB
Anti-c-Myc (#11667149001)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
Normal Rabbit IgG (#2729)	Cell Signaling Technology
SirT6 Antibody (#2590)	Cell Signaling Technology
Anti-Sirt6 (N-terminal) (#S4322)	Sigma-Aldrich
mSirt6 pAb Antiserum aus Kaninchen gegen N ¹ -CHRPPKRVKTEAAPS-C ¹	Genosphere Biotechnologies (Gravilliers, FR)
Monoclonal Anti- β -Tubulin I antibody (#T7816)	Sigma-Aldrich

Zweitantikörper Western Blot und Immunfluoreszenz

Anti-Mouse IgG (Fab specific)- Alkaline Phosphatase (#A2179)	Sigma-Aldrich
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)- Alkaline Phosphatase antibody	Sigma-Aldrich
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG	Molecular Probes®

Antikörper für die Durchflusszytometrie

CD11c-APC (#17-0114-82)	eBioscience (San Diego/CA, US)
CD44 PerCP-Cyanine5.5 (#45-0441-80)	eBioscience
CD80-PE-Cy5.5 (#15080181)	eBioscience
CD86-PE (#12086181)	eBioscience
CD-133/2-PE (#170-070-702)	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, D)
MHCII-FITC (#114406)	BioLegend (San Diego/CA), US)
Rat IgG2a K Isotype Control PE (#12-4321-80)	eBioscience

2.1.5. Oligonukleotid-Primer

Alle verwendeten Oligonukleotide (Abbildungen 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, und 2.6) wurden von der Firma Eurofins MWG in Martinsried, Deutschland, bezogen.

2.1.6. Vektoren und Plasmide**pcDNA3.1(+)**

Invitrogen™

Leervektor; Expressionsvektor für Säugerzellen; *neo*-Resistenzgen zur Selektion mit Neomycin oder G418 in Säugerzellen; Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in Bakterien

***SIRT6*-Flag**

Addgene Inc. (Cambridge/MA, US)

Humanes *SIRT6*-Gen, kloniert in eine modifizierte Version von pcDNA3.1 (Invitrogen™); enthält eine Sequenz für einen C-terminalen Flag-Tag; Plasmid #13817

pCMV6-*SIRT6*

OriGene Technologies, Inc.

Humanes *SIRT6*-Gen, kloniert in pCMV6-Entry; enthält eine Sequenz für einen C-terminalen Myc-DDK-Tag; *neo*-Resistenzgen zur Selektion mit Neomycin oder G418 in Säugerzellen; Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion in Bakterien; #RC202833

2.1.7. Zelllinien

Bakterien

Escherichia coli XL1 Blue

Dieser *E. coli*-Stamm hat den Genotyp *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)*]. Chemisch kompetente Zellen wurden von xxx xxxxxx hergestellt. *E. coli* XL1 Blue Zellen wurden für Standard-Transformationen zur Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet.

Säugerzellen

HepG2, Hep3B, Huh-7 und PLC/PRF/5 sind humane Hepatomzelllinien^{110,111}.

2.1.8. Mauslinien und transgene Stämme

Abbildung 2.1: Namen von verwendeten Mausstämmen, Allelen oder Stammzellen sowie deren Herkunft.

Stamm- oder Allelbezeichnung	Herkunft
129- <i>Sirt6</i> ^{tm1Fwa} /J	The Jackson Laboratory
<i>Sirt6</i> ^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} (JM8-Stammzellen)	EuMMCR
C57BL/6-Tg(ACTFLPe)9205Dym/J	Prof. Dr. (Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin Mainz); abgeleitet vom Stamm B6.SJL-Tg(ACTFLPe)9205Dym/J, Stock 003800, The Jackson Laboratory)
C57BL/6J	The Jackson Laboratory
C57BL/6-Tg(Alb-cre)21Mgn/J	The Jackson Laboratory
<i>Adipoq</i> CreER ^{T2} (112)	Prof. Dr. (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsmedizin Mainz)

2.2. Methoden

2.2.1. Methoden der Nucleinsäureanalytik

2.2.1.1. Quantifizierung von Nucleinsäuren in wässriger Lösung

Die Konzentration und Reinheit von Nucleinsäuren (DNA, RNA) in wässriger Lösung (ddH₂O, TE-Puffer oder Elutionpuffer eines Isolations-Kits) wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie ermittelt. Die Messung basiert auf dem Absorptionsmaximum aromatischer Ringstrukturen der Nucleinsäuren bei 260 nm. Da aromatische Aminosäuren (Tyrosin und Tryptophan) bei einem Maximum von 280 nm absorbieren, kann die Messung beider Wellenlängen dazu herangezogen werden, die Proteinkontamination in der Probe zu berechnen, indem der Quotient A_{260}/A_{280} gebildet wird. Eine DNA-Lösung gilt als relativ rein, wenn ein Quotient von 1,8-2,0 erreicht wird; eine RNA-Lösung sollte dafür einen Quotienten von mindestens 2,0 aufweisen.

In dieser Arbeit wurde ein Nano-Drop® Spectrophotometer verwendet, bei dem nur 1 µL der meist unverdünnten Probe aufgetragen werden muss. Der Nullwert wird mit dem entsprechenden Lösungsmittel gesetzt. Die Messung, Berechnung des Quotienten A_{260}/A_{280} sowie der Konzentration der Nucleinsäuren in ng/µL erfolgt automatisch.

2.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

TBE (TRIS-BORAT-EDTA)-PUFFER

90 mM Tris-HCl pH 8,0

90 mM Borsäure

2.5 mM EDTA pH 8,0

PROBEN-LADEPUFFER (6X)

100 mM EDTA, pH 8,0

0,2 % (w/v) Bromphenolblau

30 % (v/v) Glycerol

-StarPure AGAROSE Low EEO Standard For Gel Electrophoresis

-1 mg/mL Ethidiumbromidlösung (1:10 aus Stock (10 mg/mL) mit ddH₂O)

-Größenstandard

Da Nucleinsäuren eine native negative Ladung aufweisen, können sie im elektrischen Feld in einem Agarose-Gel aufgetrennt werden. Die Geschwindigkeit der Wanderung in Richtung der Anode ist dabei umgekehrt proportional zur Molekülgröße und die Auflösung der Auftrennung ist abhängig von der Dichte der Gitterstruktur und damit vom prozentualen Agarosegehalt des Gels. In der Regel wird ein 1 %-iges (w/v) Agarosegel zur Auftrennung linearer DNA-Moleküle von 0,1 bis 7 kb verwendet. Bei größeren oder kleineren Fragmenten oder geringen Unterschieden in der Fragmentgröße kann der Agaroseanteil variiert werden.

Zur Herstellung eines Agarose-Gels wurde eine bestimmte Menge an Agarose mit der entsprechenden Menge an TBE-Puffer versetzt und Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/mL zugegeben. Die Mischung wurde bis zum Aufkochen in einer Mikrowelle erhitzt und dann bis zum völligen Auflösen der Agarose im Kolben geschwenkt. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde das flüssige Gel in ein horizontales Gelbett gegossen und mit einem Kamm versehen. Das auf Raumtemperatur erkaltete und fest gewordenen Gel konnte dann in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und nach Entfernung des Kamms die Geltaschen mit Größenstandard und Proben befüllt werden, die zuvor mit Proben-Ladepuffer im Verhältnis 1:6 versetzt wurden. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 70-100 Volt. Die Nucleinsäurebanden im Gel wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

2.2.1.3. Vermehrung von Plasmid-DNA

Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

LB-MEDIUM

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1 L mit ddH₂O

pH 7.0 mit NaOH

Sterilisation durch Autoklavieren

LB-AGAR

LB-Medium mit

15 g/L Bacto-Agar

Sterilisation durch Autoklavieren

Nach Abkühlen Antibiotikum zugeben

In Petrischalen gießen

Um Plasmid-DNA zu vermehren, wurden chemisch kompetente *E. coli* XL1 blue Zellen mit der entsprechenden DNA transformiert. Dazu wurden 100 μ L Zellsuspension auf Eis aufgetaut, im Reaktionsgefäß mit 0,5 μ g DNA gemischt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 Sek. bei 42 °C) im Wasserbad wurden die Zellen erneut 5 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 μ L vorgewärmtem LB-Medium wurden die Zellen für 45 Min. bei 37 °C horizontal geschüttelt und anschließend 25-50 μ L der Zellsuspension auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgebracht. Für die Plasmide pcDNA3.1(+) sowie *SIRT6*-Flag wurde den Platten Ampicillin in der Konzentration 100 μ g/mL zugesetzt, für das Plasmid pCVM6-*SIRT6* Kanamycin in der Konzentration 25 μ g/mL. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

Zum Ansetzen von Vorkulturen wurden je 2,5 mL antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und diese über mehrere Stunden bis zur Trübung des Mediums bei 37 °C geschüttelt. Die Hauptkultur (25 mL LB-Medium mit Antibiotikum) wurde dann entsprechend im Verhältnis 1:1000 aus der Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 5000 rpm für 20 Min. abzentrifugiert und im Folgenden aus dem Zellpellet DNA isoliert.

Isolation von Plasmid-DNA (Midi-Prep)

Plasmid-DNA aus einem aus 25 mL Flüssigkultur stammenden Bakterienpellet wurde mit dem QIAfilter Plasmid Midi Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die gefällte DNA wurde in ddH₂O resuspendiert und am Nano-Drop® Spectrophotometer quantifiziert.

2.2.1.4. Genotypisierung

Isolation von genomischer DNA aus murinen Gewebeproben

Benötigte Reagenzien:

LYSEPUFFER

100 mM Tris-HCl pH 8,0

10 mM EDTA pH 8,0

200 mM NaCl

0,5 % SDS

in ddH₂O

PROTEINASE K-LÖSUNG

10 mg/mL Proteinase K

in ddH₂O

(Lagerung bei -20 °C)

Die Ohr-, Schwanz- oder sonstige Gewebebiopsie wurde in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß mit 100 µL Lysepuffer und 5 µL Proteinase K-Lösung in einem Schüttler (750 rpm) bei 55 °C mindestens für 3 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße kurz anzentrifugiert, um eventuell am Deckel haftende Wassertropfen mit dem Lysat zu vereinigen. Dann erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Proteinase K im Heizblock bei 99 °C für 10 Min. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und weiterer kurzer Zentrifugation wurde das Lysat mit 250 µL ddH₂O verdünnt, um die SDS-Konzentration zu senken. Anschließend wurde zur Abtrennung der verbliebenen makroskopischen Gewebestandteile das verdünnte Lysat für 20 Min. bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dieses konnte für Genotypisierungs-PCR-Reaktionen verwendet werden.

PCR zur Genotypisierung mit genomischer DNA aus Gewebebiopsien

Benötigte Reagenzien:

-Ampliquon III Taq DNA Polymerase Master Mix RED (1,1 X)

-Primerlösungen (forward/reverse) (10 µM in ddH₂O)

-DNA-Lösung aus Gewebebiopsie

<u>ANSATZ PRO PROBE:</u>	<u>PCR-PROGRAMM</u>			
17 μ L Ampliquon III RED	5	Min	95 °C	1 X
1 μ L Primerlösung (forward)	30	Sec.	95 °C	35 X
1 μ L Primerlösung (reverse)	45	Sec.	55-65 °C	
1 μ L DNA-Lösung	30	Sec.	72 °C	

Zunächst wurde, angepasst an die Anzahl von Proben, ein Mastermix aus Ampliquon III RED und den Primern erstellt und von dieser Mischung je 19 μ L in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Die DNA der jeweiligen Probe wurde dann in das jeweilige Reaktionsgefäß hinzugefügt.

Listen der verwendeten Primer sind in Abbildungen 2.2 bzw. Abbildungen 2.3 und 2.4 aufgeführt. Für jeden Ansatz wurde auch eine Kontrolle ohne DNA (NTC) durchgeführt.

Nach Durchführung der PCR nach oben stehendem Protokoll konnte die PCR-Reaktion sofort mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.1.2.) analysiert werden. Dazu wurden von jedem PCR-Ansatz und der dazugehörigen NTC 10 μ L pro Geltasche aufgetragen.

Abbildung 2.2: Oligonucleotid-Primer zur Genotypisierung im Stamm KO-*Sirt6*-Fwa. Die Tabelle zeigt die Namen und Sequenzen der verwendeten Oligonucleotid-Primer zur Identifikation der *Sirt6*^{ko}- und *Sirt6*^{wt}-Allele.

Name Oligonucleotid-Primer	Sequenz 5'-3'
oIMR5970 (gemeinsam; forward)	GTG TGA TTG GTA GAG AGG CAC GT
oIMR5971 (<i>Sirt6</i> ^{ko} ; reverse)	GCA ATA GCA TCA CAA ATT TCA C
oIMR5972 (<i>Sirt6</i> ^{wt} ; reverse)	GTG CAT CTC AAT GGT GCA GTG

Abbildung 2.3: Oligonucleotid-Primer zur Genotypisierung im EUCOMM-System. Die Tabelle zeigt die Namen und Sequenzen der während verschiedener Zuchtschritte verwendeten Primer zur Identifikation der *Sirt6*-tm1a, -tm1c und -tm1d-Allele sowie der Sequenzen verschiedener Rekombinase-Gene.

Name Oligonucleotid-Primer	Sequenz 5'-3'
both5'for	CTCCACTTGCCCAAGGATCAG
mut5'U LAR3 rev	CACAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC
wt3'rev	CGAAGGTGGTGCAAACCTGGG
OrganKO Gen rev	ACATGAACTGATGGCGAGCTC
Ko-Sirt6-qPCR-f	CAGCGTGGTTTTCCACACG
Ko-Sirt6-qPCR-r	ATCCACGTAGCCGTGGATG
szFLP1-for	CACTGATATTGTAAGTAGTTTGC
szFLP1-rev	CTAGTGCGAAGTAGTGATCAGG
Cre forward	ACCTGAAGATGTTGCGATTATCT
Cre reverse	ACCGTCAGTACGTGAGATATCTT
Adipo-Cre-f	TGGTGCATCTGAAGACACTACA
Adipo-Cre-r	TGCTGTTGGATGGTCTTCACAG

Abbildung 2.4: Oligonucleotid-Primer und deren Verwendung im EUCOMM-System. Die Tabelle zeigt die Namen und Kombinationen der in Abbildung 2.3 aufgeführten Primer, die verwendete Annealing-Temperatur in der PCR-Reaktion und die Länge des resultierenden Amplifikats.

Nachgewiesenes Gen/Allel	Forward-Primer	Reverse-Primer	Annealing-Temperatur (°C)	Länge Amplifikat (bp) (andere mögliche)
<i>Sirt6</i> ^{wt}	both5'for	wt3'rev	65	468 (tm1a: 7642)
<i>Sirt6</i> -tm1a	both5'for	mut5'U LAR3 rev	65	277
<i>Sirt6</i> -tm1c („flox“)	both5'for	wt3'rev	65	686
<i>Sirt6</i> -tm1d (genomisch)	both5'for	OrganKO Gen rev	65	251 (tm1c: 2825)
<i>Sirt6</i> -tm1d (cDNA)	Ko-Sirt6-qPCR-f	Ko-Sirt6-qPCR-r	58	tm1c: 643 tm1d: 223
<i>Flp</i>	szFLP1-for	szFLP1-rev	58	725
<i>AlbuminCre</i>	Cre forward	Cre reverse	60	370
<i>AdipoqCreER</i> ^{T2}	Adipo-Cre-f	Adipo-Cre-f	65	600

2.2.1.5. Isolation von RNA

Isolation von RNA (≥ 200 nt)

RNA einer Molekülgröße von 200 nt und größer wurde mit dem Absolutely RNA[®] Miniprep Kit nach Herstellerangaben aus Zellen oder Geweben isoliert. Die Elution der RNA erfolgte in jedem Fall mit dem im Kit enthaltenen Elutionspuffer.

Isolation von Gesamt-RNA inklusive kleiner RNA-Spezies (z.B. miRNA)

Isolation von miRNA aus Zellen:

Die Isolation von Gesamt-RNA inklusive kleiner RNA-Spezies aus Zellen erfolgte mit dem miRNeasy mini Kit nach Herstellerangaben. Es wurde zusätzlich das RNAse-Free DNase Set nach Herstellerangaben in das übliche Protokoll integriert, da es nicht standardmäßig zum miRNeasy mini Kit gehört, jedoch empfohlen wird, wenn eine Kontamination mit genomischer DNA für weitere Anwendungen ausgeschlossen werden soll.

Isolation von miRNA aus Seren:

Zur Isolation von Gesamt-RNA inklusive kleiner RNA-Spezies aus Seren wurde das Protokoll des miRNeasy mini Kit leicht abgewandelt und für das verwendete Serumvolumen optimiert. Es wurden zu einem Volumen an Serum genau fünf Volumen an QIAzol Lysis Reagent gegeben und in späteren Schritten ein Volumen Chloroform bzw. in etwa das 1,5-fache Volumen der oberen wässrigen Phase (nach Ausschütteln mit Chloroform) an 100 %-igem Ethanol verwendet. In allem Weiteren wurde den Herstellerangaben gefolgt. Die Verwendung einer DNase ist nicht nötig. Die hier verwendeten Angaben entstammen einem auf der Homepage des Herstellers veröffentlichten „User-Developed Protocol“.

2.2.1.6. cDNA-Synthese

cDNA-Synthese bei mittleren und größeren RNA-Spezies (≥ 200 nt)

Zur Synthese von cDNA aus RNA ≥ 200 nt wurden 500-1000 ng RNA mit dem iScript™ cDNA Synthesis Kit nach Herstellerangaben revers transkribiert. Das Kit enthält die RNase H⁺ MMLV Reverse Transkriptase, deren RNase H Domäne RNA aus RNA:DNA-Hybriden degradiert, so dass einmal transkribierte RNA eliminiert wird.

cDNA-Synthese von kleinen RNA-Spezies

Benötigte Reagenzien (aus miScript PCR Starter Kit):

- 5x miScript HiSpec Buffer
- 10x miScript Nucleics Mix
- miScript Reverse Transcriptase Mix
- RNase-freies ddH₂O

Für die spätere Detektion reifer miRNA mittels RT-PCR wurde die cDNA-Synthese mit den im miScript PCR Starter Kit enthaltenen Reagenzien durchgeführt. Durch die Verwendung des miScript HiSpec-Puffers werden selektiv miRNAs und einige snoRNAs und snRNAs in cDNA transkribiert. Da miRNAs zu kurz für eine normale RT-PCR-Amplifikation sind, werden einige zusätzliche Schritte nötig. Zunächst werden die miRNAs in der Reaktion polyadenyliert. Bei der cDNA-Synthese in derselben Reaktion wird ein Oligo-dT-Primer verwendet, der am 5'-Ende eine universelle Sequenz als Verlängerung trägt und damit die entstehende cDNA noch weiter verlängert. Zusätzlich wird durch diese Modifikation und die spätere Verwendung eines der Verlängerungssequenz entsprechenden Reverse-Primers die Detektion genomischer DNA verhindert. Für die cDNA-Synthese wurde jeweils 1 μ g RNA verwendet und die Ansätze und Reaktionsschritte anhand der Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.7. RT-PCR

RT-PCR mit cDNA von RNA \geq 200 nt

Zur Analyse von cDNA, die von RNA \geq 200 nt transkribiert wurde, wurde das Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) in Verbindung mit dem Mx3000P™ QPCR system (Stratagene) verwendet. Da das verwendete Gerät den Fluoreszenzfarbstoff ROX als Referenz messen kann und dabei eine hohe Empfindlichkeit aufweist, wurde die im Maxima-Kit gelieferte ROX-Lösung (50 μ M) 1:10 in Nuclease-freiem Wasser verdünnt und davon 0,05 μ L pro 25- μ L PCR-Ansatz verwendet, dies entspricht einer Endkonzentration von 10 nM ROX. Primer wurden in einer Konzentration von 0,15 μ M im 25 μ L-Ansatz und cDNA in einer Menge von 25-50 ng pro 25 μ L-Ansatz eingesetzt. Alles Weitere erfolgte nach Herstellerangaben. Oligonukleotid-Primer zum Nachweis humaner bzw. muriner Gensequenzen sind in Abbildungen 2.5 bzw. 2.6 aufgeführt.

Abbildung 2.5: Oligonukleotid-Primer zum Nachweis humaner Gensequenzen.

Gensymbol	Sequenz Forward-Primer 5'-3'	Sequenz Reverse- Primer 5'-3'
AFP	TGCTTACACAAAGAAAGCCCC	TGTTTCATCCACCACCAAGCTG
H19	CTGAGCTTTCCTGTCTTTCC	GAATGCTTGAAGGCTGCTCC
IGF-2	GTTATATTCTGCCTCGCCGG	GAGTTGAGTCAAACACGGGC
RP-II	GGACCACGTCCAATGACAT	GTGCGGCTGCTTCCATAA
SIRT6	AGGATGTCGGTGAATTACGC	TGGAACACCACACTGGAAGA

Abbildung 2.6: Oligonukleotid-Primer zum Nachweis muriner Gensequenzen.

Gensymbol	Sequenz Forward-Primer 5'-3'	Sequenz Reverse-Primer 5'-3'
Andra2a	CTTTTTACCTACACGCTCATAG	GTCGGAAGTCGTGGTTGAA
AFP	GGAGGCTATGCATCACCAG	GAGAAATCTGCAGTGACAGC
Amy2	TCTGCTTGGGACTTTAACGAT	GCCACCTTGGTACGAACATAA
Arntl	TGGAGAAGGTGGCCCAAAGAG	GCGTACTTGTGATGTTTCAGCGG
Cdk4	CTTTGCAGAGATGTTCCGTC	GCTCCTCGAGGTAGAGATAC
Cdkn1c	GAGCAGGACGAGAATCAAGAG	CTCATCTCAGACGTTTGCGC
Clock	CAGGAACAGCAGCTTCCTTC	TGTCAGTCCTGTGCCGAGG
CycB1	CAGCACCTGGCTAAGAATGT	GCCTTTGTCACGGCCTTA
Cyp3a41	TGGCATGAGGTTTGCTTTCAT	TACATCCCGTGGTACAACCTT
Cry1	ACCATGCTGAGGCAAGCAGAC	TTCCCGCTGCTGCTACAACCTC
Cry2	ACGGCCCATCGTCAATCATGC	TGCTCCCAGCTTGGCTTGAAC
EGFR	CAGTGTGCCCACTACATTGA	CCATAGGTACAGTTGGCGTG
Gpc3	CTGTGCTGGAACGGACAAG	CTTGGGCACAGACATGGTTC
Gsn	AGCATGTGCAGGTGGAAGAA	GGCTTCCGTCTTTTCCTCTT
Gstm2	TGATGTCTTGATCAACACCG	CAAAGATTGGCTTGGAGAGGA
Gstm3	GTATGTTTGAGCCCAAGTGC	CCCCTGGGCTATCTTAGTAAA
H19	GAATCTGCTCCAAGGTGAAGC	CAAAGCTATCTCCGGGACTC
Igf-2	GGAAGCTAGGAGGCTTAAAG	CTTTAGGCACTTGCTGAGGG
Keg1	TGGGCAAGGTCAAGCATAAG	ATAACTGCTGGTCAAGAGGC
miR-675-5p	GTGCGAAAGGGCCACAG	-
Mup1	GGCTGGTGAATATTCTGTGAC	GAAGTCTCCACTCAACTG
Myom2	AGGAGCGATTTGAGGTTTAC	GCCATCAAACGCTCAAGTTC
Nr1d1	CGGCAAGGCAACACCAAGAATG	ACGATGCAAAGCGCACCATCAG
Ob-r (Lep-R)	AGGAATGGTTCTGCAAATCCA	TATGCCAGGTTAAGTGCAGCTATC
PDGFRa	AGCAAGCTGATACCACACAG	CGGAGTCATCGTCCGAAAG
Per1	AGCCTCTGTGCTGAAGCAAGAC	TTGAACGCTGCTGCCACAGTC
Pdk4	AAAACCGTCCTTCCTTGACC	TTCCGGGAATTGTCCATCAC
RP-II	CGACGAGGACATGCAATATG	CGGCTCTCAACTTCTCCAC
Scd1	AAGCTCTACACCTGCCTCTT	TACACGTCATTCTGGAACGC
Slco1a1	TCCCCGAGTCTTCATTCTA	CGACCTTAGGACTTCTGCAC
Sqle	TTGTTGCGGATGGACTCTTC	AACAAGCTCCGCAAATGG

RT-PCR von kleinen RNA-Spezies (z.B. miRNA)*Benötigte Reagenzien (aus miScript PCR Starter Kit):*

- 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
- 10X miScript Universal Primer (Reverse-Primer)
- 10X Hs_RNU6B_2 miScript Primer Assay
- RNase-freies ddH₂O

- Forward-Primer mmu-miR-675-5p: 5'- GTGCGGAAAGGGCCCACAG-3'

Für den Nachweis einer bestimmten miRNA ist nur ein spezifischer Forward-Primer notwendig, da durch die spezielle Art der cDNA-Synthese (siehe Abschnitt 2.2.1.6.) für alle nachzuweisenden miRNAs der selbe Reverse-Primer („miScript Universal Primer“) verwendet werden kann. Zum Nachweis der murinen Micro-RNA miR-675 wurde der Primer „mmu-miR-675-5p“ verwendet.

Für den Nachweis eines Referenz-Gens ist im miScript PCR Starter Kit bereits der Forward-Primer („miScript Primer Assay“) für die humane snRNA „RNU6B“ (Hs_RNU6B_2) enthalten, die jedoch ebenfalls für die Spezies Maus und Ratte verwendet werden kann. Dieser wurde in allen in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten als Referenzgen verwendet. Pro PCR-Reaktion (25 µL-Ansatz) wurde jeweils 1 ng cDNA eingesetzt.

<u>ANSATZ PRO PROBE:</u>	<u>PCR-PROGRAMM</u>		
12,5 µL QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	15 Min.	95 °C	1 X
2,5 µL 10X miScript Primer Assay (Fwd-Primer)	15 Sec.	95 °C	40 X
2,5 µL 10X miScript Universal Primer	30 Sec.	55 °C	
<2,5 µL cDNA-Lösung (50pg-3ng)	30 Sec.	70 °C	
ad 25 µL RNase-freies Wasser			

Zur Verifizierung der Spezifität des PCR-Produkts und zur Unterscheidung von Primer-Dimeren wurde im Anschluss an die RT-PCR für jeden Ansatz eine Dissoziationskurve gemessen.

2.2.1.8. Quantifizierung von *SIRT6* in humanen Tumorproben (Tissue Scan)

Benötigte Reagenzien:

- TissueScan™ Starter qPCR Panel 1 (OriGene)
- Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)
- Forward-Primer hSirt6_F 5'-AGGATGTCGGTGAATTACGC-3'
- Reverse-Primer hSirt6_R 5'-TGGAACACCACACTGGAAGA-3'

Zum Nachweis von *SIRT6* in cDNA aus Tumorproben aus Lunge, Brust (Mamma), Niere und Gebärmutter (Ovar) wurde das TissueScan™ Starter qPCR Panel 1 (OriGene) verwendet. Zunächst wurde mit dem Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) ein Mastermix hergestellt, das 10 nM ROX sowie jeweils 0,3 µM der Primer hSirt6_F und hSirt6_R pro Ansatz enthielt. Von diesem Mastermix wurden jeweils 25 µL in diejenigen Kavitäten der 96-well-Platte pipettiert, die die lyophilisierten c-DNA-Proben enthielten. Die Platte wurde anschließend zugleibt, für 15 Min. auf Eis inkubiert und in dieser Zeit mehrmals sanft gevortext. Im Anschluss wurde die Platte kurz abzentrifugiert und dann bei folgenden Bedingungen im Mx3000P™ QPCR system (Stratagene) inkubiert:

2	Min.	50 °C	1 X
15	Min.	95 °C	1 X
30	Sec.	95 °C	45 X
45	Sec.	57 °C	
1	Min.	72 °C	

2.2.1.9. Microarray-Analysen

Microarrays von RNA aus primären murinen Hepatozyten wurde mit Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays in der HDMA Core Facility (Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt. Die Normalisierung der Arrays erfolgte über die mittlere Intensität über die gesamten Chips. Die Änderungen in der Expressionsstärke der untersuchten Transkripte wurden bezogen auf die Kontrolle (*Sirt6^{wt}*) als Logarithmus zur Basis 2 angegeben. Die Daten der in dieser Arbeit analysierten Microarrays wurden bei EMBL-EBI hinterlegt (Accession Number E-MTAB-1477).

2.2.1.10. Quantifizierung der Menge an 5-Methylcytosin in genomischer DNA

Die Isolation von genomischer DNA aus murinen Lebern wurde von Dr. [Name] aus der Arbeitsgruppe von [Name] (Institut für Humangenetik, Universitätsmedizin Mainz) nach dem dort verwendeten Protokoll durchgeführt. Die Bestimmung der Menge an 5-Methylcytosin mit dem Methyl-Flash Methylated DNA Quantification Kit (Epigentek) wurde nach Herstellerangaben ebenfalls von Dr. [Name] durchgeführt, je Ansatz wurden 100 ng genomische DNA verwendet.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Bestimmung der Zellzahl

Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden Zellen in Suspension im Verhältnis 1:2 mit einer 0,1 %-igen Trypanblaulösung verdünnt und 10 µL der Mischung in eine Abteilung der Neubauer-Zählkammer gegeben. Der anionische Diazofarbstoff Trypanblau diffundiert durch die Zellmembran abgestorbener Zellen und färbt diese im Zytoplasma dunkelblau an. Durch das Ausschlussverfahren lässt sich die Zellviabilität intakter Zellen, die den Farbstoff nicht aufgenommen haben, lichtmikroskopisch bestimmen. Die Zellzahlen in allen vier Großquadraten des Kammerabteils wurden unter dem Mikroskop ermittelt und das arithmetische Mittel gebildet. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension errechnet sich durch Multiplikation des Mittelwertes mit dem Verdünnungsfaktor (2) und dem Kammerfaktor der Neubauer-kammer (10^4).

CASY Cell Counter and Analyzer

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung der Zellzahl bietet der *CASY Cell Counter and Analyzer*. Im verwendeten Gerät waren für alle verwendeten Zelllinien eigene Programme eingestellt, welche die Zellgröße berücksichtigen.

10 µL Zellsuspension wurden in 10 mL *CASY ton* in einem *CASY cup* verdünnt und durch Invertieren gemischt. Ein Messzyklus bestimmt den Mittelwert aus drei Messungen derselben Probe. Angegeben werden unter anderem die Zellzahl pro Milliliter sowie die Viabilität in Prozent.

2.2.2.2. Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien

Grundmedium für HepG2 / Huh-7 Zellen:	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Grundmedium für Hep3B Zellen:	Advanced MEM (Minimum Essential medium)
Zusätze für Kultur-Vollmedien:	10 % FCS
	20 mM HEPES
	2 mM L-Glutamin
	100 U/mL Penicillin
	100 µg/mL Streptomycin

Adhärenente Zellen wurden im Inkubator in wassergesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen wurden die zu 80-90 % konfluenten Zellen abgelöst, verdünnt und erneut ausgesät. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS/EDTA gewaschen. Die Ablösung der Zellen erfolgte mit 1 mL einer 0,1 %-igen Trypsin/EDTA Lösung. Die Zellen wurden dann für 5 Minuten im Wärmeschrank unter den oben genannten Bedingungen inkubiert und zum Abstoppen der Trypsinierung mit 5 ml Kulturmedium versetzt. Die Zellen wurden vorsichtig durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und je nach Dichte und Wachstumsgeschwindigkeit nur ein Teil der Zellsuspension in der Gewebekulturflasche belassen und mit frischem Vollmedium auf 15 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Zellen wurden nach spätestens 14 Tagen auf eine neue Gewebekulturflasche umgesetzt.

2.2.2.3. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

KRYO-MEDIUM

80 % FCS

10 % Zellkulturmedium

10 % DMSO

Die Zelllinien wurden für die langfristige Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Zellen wurden dazu wie zuvor beschrieben geerntet und bei Raumtemperatur für 5 Min. und 1000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Kryo-Medium mit einer Konzentration von 3-5 X 10⁶ Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu jeweils 1 mL in Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert und diese in einen Einfrierbehälter gestellt, in dem durch eine Umgebung der Röhrchen mit Isopropanol die Temperatur bei -80 °C um etwa 1 °C pro Minute sinkt. Nach dem Einfrieren bei -80 °C wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen von Zellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Wenn das Medium flüssig geworden war, wurden sofort 10 mL vorgewärmtes Kulturmedium zugegeben und die Zellen dann für 5 Min. bei 1000 x g abzentrifugiert. Dieser Waschschritt entfernt das als Frostschutzmittel zugesetzte DMSO. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 6 ml supplementiertem Kulturmedium aufgenommen und für die Kultivierung in eine kleine Gewebekulturflasche (25 cm²) ausgesät.

2.2.2.4. Lipofektion von Zellen

TransFectin™ Lipid Reagent

Benötigte Reagenzien:

- TransFectin™ Lipid Reagent
- Kulturmedium ohne Zusätze
- Kultur-Vollmedium

Zum Einbringen von Fremd-DNA (z.B. eukaryotischer Expressionsvektoren) wurde in der Regel TransFectin, ein kationisches Lipidreagenz mit dem Helferlipid DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin), verwendet. Das Reagenz bildet kleine unilamellare Vesikel, an deren Oberfläche die DNA ionisch gebunden wird. DNA-Liposomen-Komplexe werden dann über einen noch nicht völlig aufgeklärten Prozess von den Zellen aufgenommen.

Zellen wurden am Vortag der Transfektion oder mindestens drei Stunden vorher so ausgesät, dass die Konfluenz des Zellrasens bei Transfektion etwa 70 % betrug. Zunächst wurden DNA und TransFectin in Kulturmedium ohne Zusätze gemischt und für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Für die verwendeten Mengen an Medium, TransFectin und DNA wurden die Herstellervorgaben beachtet. In der Regel wurde 1 µg DNA/2 µL TransFectin pro Kavität einer 12-well-Platte und 2,5 µg DNA/5 µL TransFectin pro Kavität einer 6-well-Platte verwendet.

Das Aussaat-Medium wurde von den Zellen abgenommen und durch frisches Vollmedium ersetzt. Der Transfektionsansatz mit den DNA-Liposomen-Komplexen wurde anschließend vorsichtig zutropft und dabei über die gesamte Oberfläche der Kavität verteilt. Nach leichtem Schwenken wurde die Platte für 4-6 Stunden bei 37 °C / 5 % CO₂ inkubiert und anschließend das komplette Medium mit Kultur-Vollmedium erneuert.

Lipofectamine®

Benötigte Reagenzien:

- Lipofectamine® LTX
- PLUS™ Reagent
- Opti-MEM® Reduced Serum Medium, GlutaMAX™
- Kultur-Vollmedium

Für die Transfektion empfindlicherer Zelllinien, z.B. Hep3B, wurde das kationische Lipidreagenz Lipofectamine verwendet. Beispielhaft ist hier das Vorgehen für eine Kavität einer 6-well-Platte beschrieben: Zunächst wurden für den Transfektionsansatz 500 µL Opti-MEM in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und 2,5 µL PLUS-Reagent zugegeben. Nach Zugabe von 2,5 µg DNA wurde der Ansatz durch kurzes Vortexen gemischt und dann für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Erst dann wurden 6,25 µL Lipofectamine zugegeben, der Ansatz nochmals durch Vortexen gemischt und dann weitere 20 Min. bei RT inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde das Kulturmedium von den Zellen (etwa 70 %-ige Konfluenz des Zellrasens) entfernt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und

dann 1,5 mL Opti-MEM auf die Zellen gegeben. Der Transfektionsansatz wurde dann zutropft und die Zellkulturplatte nach leichtem Schwenken für 6 Std. bei 37 °C / 5 % CO₂ inkubiert und anschließend das Medium auf normales Kultur-Vollmedium gewechselt.

2.2.2.5. Bestimmung der Zellviabilität

Die Methode des dem CellTiter-Glo® Lumineszenz Zellviabilitätsassays dient der direkten Bestimmung des intrazellulären ATP-Spiegels von lebenden und metabolisch aktiven Zellen unter Beteiligung einer rekombinanten Luziferase. Die Zugabe des Reagenzes resultiert in einer Lyse der Zellen und einer Emission eines Lumineszenzsignals durch die Umwandlung von Luziferin zu Oxyluziferin in Anwesenheit von Mg²⁺, O₂ und ATP durch die Luziferase. Das emittierte Licht der Wellenlänge 562 nm ist proportional zum intrazellulären ATP-Gehalt und korreliert mit der Zellzahl¹¹³.

Für die Durchführung des Assays wurden in eine 96-Well-Platte ausgesäte Zellen in 100 µL Medium mit 25 µL/Kavität CellTiter-Glo Reagenz versetzt und zur Induktion der Lyse für 2 Min. auf dem Plattenschüttler vermischt. Die Platte wurde zur Stabilisierung des Lumineszenzsignals für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und dann aus jeder Kavität 85 µL des Lysates in eine weiße 96-Well-Platte transferiert. Die Lumineszenzsignale wurden anschließend im SpectraFluor Plus Plattenlesegerät detektiert. Die Intensität der gemessenen Lumineszenz wird in relativen Lichteinheiten angegeben. Um die Viabilität in Prozent anzugeben, wurde die Kontrolle (z.B. unbehandelte Zellen) auf 100 % gesetzt und die übrigen Messerte daran normiert.

2.2.2.6. Zytotoxizitätsassays

Um festzustellen, ob eine Substanz zytotoxisch bzw. apoptoseinduzierend wirkt, wurden Zellen, die 24 Std. zuvor transient mit einem Expressions- oder Kontrollvektor transfiziert wurden, in einer Dichte von 15.000 pro Kavität einer 96-Well-Platte ausgesät. Anschlie-

ßend wurden die Zellen für mindestens drei Stunden, idealerweise jedoch über Nacht, am Boden der Zellkulturplatte anwachsen gelassen.

Zytotoxizitätsassays wurden in dieser Arbeit mit den Substanzen Anti-Apo1 (ein agonistischer CD95 (Fas) Antikörper), Doxorubicin und Daunorubicin (zwei DNA-interkalierende zytostatische Anthracycline) durchgeführt. Da typischerweise die bioaktiven Konzentrationen zwischen verschiedenen Substanzen sehr unterschiedlich sind, wurden für jede Substanz immer mindestens 4-5 verschiedene Konzentrationen in einem Vorversuch getestet.

Zur Behandlung wurden jeweils 20-fach höher konzentrierte Vorverdünnungen der Substanzen in Zellkulturmedium ohne weitere Zusätze hergestellt und dann im Verhältnis 1:20 (d.h. Zugabe von 5 µL in 100 µL Zellkulturüberstand) in die zu behandelnden Kavitäten zugegeben. Alle Konzentrationen wurden mindestens in sechs Replikaten getestet, die Inkubationszeit betrug üblicherweise 24 Stunden. Die Bestimmung der Zellviabilität wurde dann mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.2.5.) und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

2.2.2.7. Proliferationsassay

Zellen wurden zunächst transient mit einem Expressions- oder Kontrollvektor transfiziert und nach 24 Std. in einer Dichte von 1000 Zellen pro Kavität einer 96-Well-Platte ausgesät. Zusätzlich wurde dem Kulturmedium ein Antibiotikum zugesetzt, um Zellen, die den transfizierten Vektor aufgenommen haben, zu selektieren. Am Tag der Aussaat und an den drei folgenden Tagen wurde die Anzahl lebender Zellen in mehreren Kavitäten (mindestens sechs) mit Hilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay quantifiziert (siehe Abschnitt 2.2.2.5.).

2.2.2.8. Zweidimensionaler (2D-) Koloniebildungs-Assay (Colony Formation Assay)

GIEMSA-FÄRBE LÖSUNG

1,5 % (w/v) Giemsa

in Methanol

Im 2D-Koloniebildungsversuch wurde der Einfluss einer Re-Expression von SIRT6 auf das Wachstum und Koloniebildungsverhalten transient transfizierter HepG2, Hep3B und Huh-7 Zellen untersucht. Die Zellen wurden 24 Std. nach Transfektion mit dem Vektor pCMV6-*SIRT6* oder einem Kontrollvektor abgelöst, mit dem CASY® Cell Counter gezählt und dann je 1000 Zellen pro Vertiefung einer 6-Kavitäten-Platte ausgesät. Für jeden Ansatz wurden Duplikate angesetzt. Über die gesamte Versuchszeit von zehn Tagen wurden die Zellen unter Selektion mit dem Antibiotikum G418 gehalten, da beide verwendeten Vektoren ein *neo*-Resistenzgen tragen. Das Medium wurde alle 2-3 Tage erneuert.

Um die Kolonien sichtbar zu machen, wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann für 5 Min. mit 100 %-igem Methanol fixiert. Einzelne Zellkolonien wurden durch 10-minütige Färbung mit einer 1,5 %-igen Giemsa-Lösung dargestellt und nach zweimaligem Waschen mit PBS mithilfe eines Geldokumentationsgerätes fotografiert.

2.2.2.9. Primäre Hepatozyten

Beschichtung von Zellkulturplatten mit Kollagen

10 %-IGE KOLLAGENLÖSUNG

10 % w/v Collagen R

in ddH₂O

-steril filtriert-

Zellkulturplatten für die Kultivierung primärer humaner oder muriner Hepatozyten wurden mit Kollagen beschichtet. Dafür wurde so viel 10 %-ige Kollagenlösung in die Vertiefungen von Zellkulturplatten oder auf Petrischalen gegeben, bis der Boden bedeckt war. Die Platten wurden dann über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler bewegt, damit sich das Kollagen gleichmäßig absetzen konnte. Die restliche Lösung wurde abgesaugt und die Platten wurden unter UV-Licht für mindestens 30 Min. getrocknet und sterilisiert.

Isolierung primärer humaner Hepatozyten

<u>PBS/HEPARIN</u>	<u>PRÄPERFUSIONS-LÖSUNG</u>	<u>KOLLAGENASE-LÖSUNG</u>
PBS/EDTA	Williams Medium	Williams Medium
10 U/mL Heparin	5 mM Natrium-Pyruvat	5 mM Natrium-Pyruvat
	20 mM HEPES	20 mM HEPES
	2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin
	0,05 % Glukose	100 U/mL Penicillin
	5 mM EGTA	100 µg/mL Streptomycin
	5 U/mL Heparin	0,05 % Glukose
		3 mM CaCl ₂
		0,45 mg/mL Collagenase NB8
	<u>AUSSAAT-MEDIUM</u>	<u>KULTURMEDIUM</u>
	Williams Medium mit	Williams Medium mit
	10 % FCS	5 % FCS
	15 mM HEPES (pH 7,4)	15 mM HEPES (pH 7,4)
	2 mM Glutamin	2 mM Glutamin
	100 U/mL Penicillin	100 U/mL Penicillin
	100 µg/mL Streptomycin	100 µg/mL Streptomycin

Die Isolierung primärer humaner Leberzellen aus gesunden Lebergewebe wurde in unserer Arbeitsgruppe von Herrn durchgeführt. Die verwendeten Leberge-

webe stammten von Patienten, die sich aus verschiedenen Gründen, wie z.B. einem Leberzellkarzinom, einer Lebermetastase oder einem Cholangiozellulären Karzinom, einer Hemihepatektomie unterziehen mussten. Das Leberstück wurde nach geeigneten Gefäßen untersucht und diese dann zuerst mit PBS/Heparin perfundiert, um das Blut zu entfernen. Anschließend wurden die Gefäße mit einer Präperfusionslösung für 45 Min. gespült, bevor der Verdau mit der Kollagenase-Lösung für 20-30 Min. erfolgte. Die unverdauten Bereiche des Leberstückes wurden entfernt und der verdaute Teil vorsichtig mit einem Skalpell mehrmals durchtrennt, sodass die Zellen sich lösen konnten. Die Zellsuspension wurde durch eine Gaze gefiltert und dreimal mittels Zentrifugation gewaschen. Die Vitalitätsbestimmung der Zellen erfolgte mit Trypanblau unter dem Mikroskop. Die Hepatozyten wurden mit einer Zelldichte von 10^5 /mL in Aussaat-Medium auf kollagenbeschichtete Zellkulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37° C bei 5 % CO₂ inkubiert. 16 Stunden nach Perfusion wurde das Aussaat-Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Dann wurde frisches Kulturmedium zugesetzt und die Zellen konnten für Versuche verwendet werden.

Die Isolierung muriner primärer Hepatozyten ist in Abschnitt 2.2.5.8. beschrieben.

2.2.2.10. Primäre murine Milz- und Knochenmarkszellen

Zellisolation

<u>PRÄP.MEDIUM MILZ & DC</u>	<u>ERYTHROZYTEN-LYSEPUFFER</u>
RPMI 1640	8,29g NH ₄ Cl
2 % FCS	1g KHCO ₃
100 U/mL Penicillin	0,0372g EDTA
100 µg/mL Streptomycin	ad 1L mit dH ₂ O
	steril filtrieren

KULTURMEDIUM MILZ-/KNOCHENMARKSZELLEN

RPMI 1640

5 % FCS

10 mM HEPES

2 mM L-Glutamin

100 U/mL Penicillin

100 µg/mL Streptomycin

Für die Isolierung primärer Milz- und/oder Knochenmarkszellen wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet. Dann erfolgte die Entnahme der Milz bzw. die Entnahme des Femurs beider Beine. Die Milz wurde mit einem Stempel in einem Zellsieb zerdrückt und die Zellen mit Präp.Medium durch das Sieb in ein 50 mL-Gefäß gespült. Durch Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension wurden die Zellen weiter vereinzelt. Der Femur wurde freipräpariert und an beiden Enden mit einer Schere geöffnet. Die Zellen aus dem Knochenmarkskanal wurden mit einer Kanüle mit Präp.Medium ausgespritzt und in einer Petrischale aufgefangen. Auch hier wurde durch Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension die Zellen weiter vereinzelt und dann ebenfalls durch ein Zellsieb in ein 50 mL-Gefäß gespült. Alle folgenden Schritte erfolgten für Milz- und Knochenmarkszellen in gleicher Weise. Die Zellsuspensionen wurden für 10 Min. bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellpellets wurden je nach Größe anschließend in 2-5 mL Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 2 Min. bei RT inkubiert. Die Lyse der Erythrozyten wurde dann durch Zugabe von 10-15 mL Präp.Medium gestoppt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 Min. bei 1500 rpm und 4 °C wurden die Zellen in 10 mL Präp.Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Kultivierung und Stimulation primärer muriner Milzzellen

Murine Milzzellen wurden wie in Abschnitt 2.2.2.10. beschrieben isoliert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit einer Dichte von 500.000 Zellen/mL in 12-Kavitäten-Platten ausgesät. Die Stimulation mit Concanavalin A (ConA) erfolgte bei einer Konzentration von 2,5 µg/mL für 18 Stunden. Die Zellen wurden danach mit dem Medi-

um in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt, abzentrifugiert, die Zellüberstände abgenommen und zur Bestimmung von Cytokinen verwendet.

Differenzierung von Dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark

DIFFERENZIERUNGSMEDIUM

RPMI 1640

5 % FCS

10 mM HEPES

2 mM L-Glutamin

100 U/mL Penicillin

100 µg/mL Streptomycin

5 ng/mL GM-CSF (aus Zelllinie X6310/GM-CSF)

Murine Knochenmarkszellen wurden wie in Abschnitt 2.2.2.10. beschrieben isoliert. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit einer Dichte von 750.000 Zellen/mL in Differenzierungsmedium auf Petrischalen ausgesät. An Tag 2 und 4 nach der Präparation wurde die Hälfte des Differenzierungsmediums gewechselt, die Entnahme des Mediums aus den Petrischalen erfolgte dabei vorsichtig am Rand nahe der Oberfläche. An Tag 6 erfolgte die Ernte der differenzierten Dendritischen Zellen (DCs), indem ein Großteil des Mediums vorsichtig entfernt wurde und die nur noch locker am Boden der Petrischalen haftenden DCs vorsichtig mit einer Pipette resuspendiert wurden. Nach Überführung der DCs in ein 50 mL-Gefäß wurden die Zellen zentrifugiert, in Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Für weitere Experimente wurden die DCs mit einer Konzentration von 500.000 Zellen/mL auf 12-Kavitätenplatten ausgesät.

Messung der Endozytoseaktivität Dendritischer Zellen (Dextran-FITC)

Von unreifen, aus Knochenmark differenzierten DCs wurden jeweils 500.000 Zellen in Suspension in FACS-Röhrchen gegeben, abzentrifugiert und in 100 μ L Dextran-FITC-Lösung (25 μ g/mL in PBS mit 1 % FCS) aufgenommen. Die Proben wurden für 1 Stunde ($t = 60$ c) bei 37 °C inkubiert und dann abzentrifugiert, mit 3 mL PBS gewaschen, für 15 Min. bei RT mit einem APC-markierten Antikörper gegen CD11c (1:250 in PBS) gefärbt, erneut in PBS gewaschen und dann in 2 % PFA (in PBS) aufgenommen und fixiert. Kontrollen ($t = 0$ Min.) wurden sofort wieder abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, mit anti-CD11c-APC gefärbt, gewaschen und fixiert. Bis zur Messung am FACScalibur wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

Reifung Dendritischer Zellen durch Stimulation mit LPS

Zur Reifung Dendritischer Zellen wurden diese in einer Dichte von 500.000 Zellen/mL auf 12-Kavitätenplatten ausgesät und mit Lipopolysaccharid (LPS) in einer Konzentration von 1 μ g/mL für 18 Stunden stimuliert. Die Zellen wurden dann in den Kavitäten resuspendiert, in 1,5-mL Gefäße überführt und abzentrifugiert. Die Zellüberstände wurden abgenommen und zur Bestimmung von Cytokinen separat aufbewahrt. Die Zellenpellets wurden in je 100 μ L Färbelösung (anti-MHCII-FITC, anti-CD11c-APC, anti-CD80-PE-Cy5.5, anti-CD86-PE, alle jeweils 1:250 in PBS) aufgenommen, für 15 Minuten bei RT inkubiert, abzentrifugiert, mit 3 mL PBS gewaschen, nochmals abzentrifugiert und in 2 % PFA (in PBS) aufgenommen und fixiert. Bis zur durchflusszytometrischen Messung am FACScalibur wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

2.2.2.11. Messung der Glukoseaufnahme in Zellen (2-NBDG)

Frisch isolierte primäre murine Hepatozyten, die sich in Suspension befanden, wurden abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und dann in glukosefreiem pmHep-Medium aufgenommen. Dem Medium wurde dann 2-NBDG in einer Endkonzentration von 100 μ M zugegeben. Die Proben wurden für 30 Minuten ($t = 30$ Min.) bei 37 °C inkubiert und

dann abzentrifugiert, mit 3 mL PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und dann in 2 % PFA (in PBS) aufgenommen und fixiert. Kontrollen ($t = 0$ Min.) wurden sofort wieder abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und fixiert. Bis zur Messung am FACScalibur wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

2.2.2.12. Durchflusszytometrie

Zellen, die fluoreszente Substanzen wie Dextran-FITC oder 2-NBDG aufgenommen hatten oder mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern ein- oder mehrfach gefärbt worden waren, wurden am FACScalibur durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden sowohl eine ungefärbte Probe sowie einzeln gefärbte Proben zum Einstellen der Geräteparameter und zur Kompensation der einzelnen Kanäle verwendet. Von den zu quantifizierenden Proben wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert. Am FACScalibur gemessene Proben wurden mit der Software FACSuite ausgewertet.

2.2.2.13. Metabolische Analysen (OCR und ECAR)

Analysen der Stoffwechselaktivität von primären murinen Hepatozyten, d.h. der Sauerstoffverbrauchsrate (*Oxygen Consumption Rate*, OCR) sowie der extrazellulären Azidifizierungsrate (*Extracellular Acidification Rate*, ECAR), wurden von Dr.

aus der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. rer. nat. (Institut für Pathophysiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt. Dazu wurden uns Zellkulturplatten zur Verfügung gestellt, die vor dem Aussäen der Hepatozyten noch mit Kollagen beschichtet wurden (siehe Abschnitt 2.2.2.9.), um ein ideales Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Die Messung erfolgte in einem XF Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience) mit den in der o. g. Arbeitsgruppe verwendeten Reagenzien und nach dem dort üblichen Protokoll. Die Normalisierung der Messwerte auf die Zellzahl erfolgte mit Janus Green.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Bradford-Test zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Benötigte Reagenzien:

- Lösungen von BSA in ddH₂O in den Konzentrationen 10, 20, 30, 50, 60 und 80 µg/mL für die Erstellung einer Eichreihe
- Roti[®]-Nanoquant-Arbeitslösung (1:5 in ddH₂O)

Der Bradford-Test ist eine kolorimetrische Methode zur photometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösung. Das Bradford-Reagenz, Coomassie-Brillant-Blau G-250, lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt damit Proteine unspezifisch an. Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm, wodurch sich seine Farbe von rot-braun nach blau ändert. Die Obergrenze für die Quantifizierung einer Proteinlösung liegt bei einer Konzentration von 20 µg/mL.

Zur Quantifizierung mit einem Photometer sollte immer eine Eichgerade mit Lösungen bekannter Proteinkonzentrationen erstellt werden, wobei der ungebundene Farbstoff als Nullwert gesetzt wird. Bei der Quantifizierung von Proteinkonzentrationen wurden meist mehrere Verdünnungen (z.B. 1:20, 1:40, 1:80 etc.) in ddH₂O erstellt, um eine oder mehrere Probenverdünnung im Messbereich zu erhalten. Es wurden dann je 50 µL ddH₂O (Nullwert) bzw. der o.g. Eichlösungen in eine transparente 96-Well-Platte pipettiert, ebenso von allen zu quantifizierenden Proben. Jeder Wert wurde mindestens in Duplikaten bestimmt. Jedem Well wurden dann 200 µL der Roti[®]-Nanoquant-Arbeitslösung zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 590 nm (proteingebundener Farbstoff) und 450 nm (ungebundener Farbstoff) gemessen. Die Gleichung der Eichgerade wurde berechnet, indem der Quotient OD₅₉₀/OD₄₅₀ gegen die jeweilige BSA-Konzentration der Eichlösungen aufgetragen wurde. Die Konzentration

nen der zu bestimmenden Proben wurden berechnet, indem ihr Quotient OD_{590}/OD_{450} in die Geradengleichung eingesetzt wurde.

2.2.3.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Methode des ELISA wurde verwendet, um die Menge verschiedener Zytokine in Zellüberständen zu quantifizieren. Die zu messenden Proben mussten dabei so verdünnt werden, dass die Zytokin-Konzentration innerhalb der Standard-Eichgeraden des jeweiligen ELISA-Kits lagen. Die Durchführung und Messung der ELISA-Ansätze erfolgte nach Herstellerangaben der jeweiligen Kits.

2.2.3.3. SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der von Laemmli im Jahr 1970 entwickelten Methode durchgeführt. Zur Überlagerung der intrinsischen Protein-Eigenladungen werden die Proben vor der Auftrennung mit dem anionischen Detergens SDS behandelt. Proteine erhalten somit ein gleichbleibendes Ladungs- zu Masseverhältnis. Ebenso werden die Disulfid-Brücken der Proteine mit β -Mercaptoethanol reduktiv gespalten, um eine Linearisierung der Peptidketten zu erreichen.

Herstellung von SDS-Gelen**Abbildung 2.7: Rezepte zur Herstellung von jeweils 4 SDS-Minigelen (ca. 8 X 6 cm) verschiedener Konzentrationen.**

Reagenz	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 5 %
Acrylamid-bis 30% (37.5:1)	10,7 mL	13,3 mL	20 mL	2,25 mL
1,8 M Tris (pH 8,8)	8 mL	8 mL	8 mL	-
0,6 M Tris (pH 6,8)	-	-	-	3 mL
dH ₂ O	20,8 mL	18,1 mL	11,5 mL	9,5 mL
10 % (w/v) SDS	400 µL	400 µL	400 µL	150 µL
10 % (w/v) APS	200 µL	200 µL	200 µL	75 µL
TEMED	8 µL	8 µL	8 µL	7,5 µL

Die Polymerisationsinitiation der Trenngel-Mischung für die Gelelektrophorese (siehe Abbildung 2.7) erfolgt durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED). Im Gel kommt es durch eine radikalische Kettenreaktion zur dreidimensionalen Vernetzung der Polyacrylamid-Moleküle mit dem Reagenz Bisacrylamid. Der Vernetzungsgrad und damit die Dichte der entstehenden molekularen Siebstruktur des Gels sind dabei direkt von der Konzentration des beigesetzten Acrylamids/Bisacrylamids abhängig.

Das flüssige Gel wurde zügig zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen, welche durch einen Abstandshalter voneinander getrennt wurden. Das noch flüssige Trenngel wurde mit 1 mL Butanol überschichtet, um eine möglichst waagerechte obere Kante zu erzeugen. Das polymerisierte Gel wurde anschließend mit einem Sammelgel überschichtet, um die SDS-beladenen Proteine an der Grenzschicht zum Trenngel aufzukonzentrieren. Mit einem Kamm wurden 10 Taschen im Sammelgel erzeugt.

Auftrennung von Proteinen im SDS-Gel

LAUFPUFFER

25 mM Tris

200 mM Glycin

0,1 % SDS

Die Mobilität eines SDS-gebundenen Proteins im Trenngel ist umgekehrt proportional zu der Länge seiner Peptidkette. Die Auswahl der Dichte eines SDS-Gels hängt davon ab, in welchem Größenbereich von Peptiden man eine möglichst gute Auflösung in der Auftrennung erzielen möchte.

Proben für die SDS-PAGE wurden zunächst 1:2 mit 2X SDS-Probenpuffer gemischt und 5 Min. bei 99 °C denaturiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben 1-2 Min. bei 18.500 x g zentrifugiert. In jede Tasche des SDS-PAGE Gels wurden 10-40 µg Protein aufgetragen und der Größenstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder als Referenz verwendet. Die Proben wurden in einer Hoefer SE 250 Elektrophorese-Einheit bei Raumtemperatur bei 20 mA/Gel im Sammelgel und bei 30 mA/Gel im Trenngel aufgetrennt.

Kolloidale Coomassie-Färbung („Blue Silver“) im SDS-Gel

FIXIERLÖSUNG

50 % Ethanol (v/v)

10 % Essigsäure (v/v)

in dH₂O

FÄRBELOESUNG

0,12 % Coomassie-Brillant-Blau G-250

10 % H₃PO₄ (v/v)

10 % (NH₄)₂SO₄ (w/v)

20 % Methanol (v/v)

Herstellung der Färbelösung:

Zu 1/10 des Endvolumens an Wasser wurde zuerst die Phosphorsäure hinzugegeben, dann das Ammoniumsulfat. Anschließend wurde das Coomassie-Brillant-Blau gelöst. Zu der Lösung wurde so lange Wasser zugesetzt, bis 80 % des Endvolumens erreicht waren. Dann

wurde Methanol zugegeben bis zu einer Endkonzentration von 20 % (v/v). Die fertige Lösung soll eine dunkelgrüne Färbung aufweisen, die sich auch erst nach 24 Std. einstellen kann. Ungelöste Farbpartikel können in der Lösung verbleiben, sie beeinträchtigen die Färbung nicht.

Durchführung:

Das Gel wurde für etwa 45 Min. in Fixierlösung geschüttelt, dabei wurde es deutlich kleiner. Die Färbung erfolgte für 3 Std. bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler. Das Gel wurde anschließend in H₂O durch mehrmaliges Waschen entfärbt, bis das Gel wieder transparent wurde und sich die blauen Proteinbanden gut vom Hintergrund abhoben.

2.2.3.4. Western Blot

Elektrotransfer von Proteinen

TRANSFERPUFFER

25 mM Tris

200 mM Glycin

20 % (v/v) Methanol

Um die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine mit Antikörpern untersuchen zu können, müssen sie zunächst auf eine proteinbindende Membran übertragen werden. Dazu kommt entweder Nitrozellulose oder, wie in diesem Fall, Polyvinylidenfluorid (PVDF) zum Einsatz.

Der Transfer wurde elektrophoretisch mit dem Tank-Blot-Verfahren durchgeführt. Die mit Methanol aktivierte Immobilon-P PVDF-Membran wird dabei direkt auf die Rückseite des Gels gelegt, beides wird mit in Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren und Schwämmen von beiden Seiten bedeckt und so zwischen die Elektroden in eine Transferkammer platziert, dass es in Richtung Anode zum horizontalen Transfer der Proteine auf die Membran kommt. Um Überhitzung zu vermeiden, ist ein Kühlpack in die

Trans-Blot®-Elektrophoresekammer (Bio-Rad) integriert. Der Transfer erfolgte für 90 Min. bei einer Stromstärke von 350 mA.

Ponceau-Färbung und Blockieren freier proteinbindender Oberfläche

<u>PONCEAU S-FÄRBE LÖSUNG</u>	<u>10X PBS</u>	<u>I-BLOCK LÖSUNG</u>
0.5% (w/v) Ponceau S	80 g NaCl	100 mL 10X PBS
in 1% Essigsäure	2 g KCl	2 g Tropix I-Block™
	14.4 g Na ₂ HPO ₄	1 mL Tween 20
	2.4 g KH ₂ PO ₄	<i>ad</i> 1 L mit dH ₂ O
	<i>ad</i> 1 L with dH ₂ O	

Der Erfolg der gleichmäßigen und luftblasenfreien Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran wurde mit einer Ponceau S-Färbung überprüft. Dazu wurde die Membran für eine Minute in Ponceau S-Färbelösung inkubiert und dann so lange mit dH₂O entfärbt, bis die Proteinbanden rot auf weißem Hintergrund zu sehen waren.

Da die gesamte Oberfläche der Membran proteinbindend wirkt, müssen nach dem Transfer frei gebliebene Stellen blockiert werden, da sie sonst unspezifisch Antikörper adsorbieren würden. Daher wurden die Membranen für 30-60 Min. in I-Block Lösung inkubiert, die aufgereinigtes Casein enthält.

Immundetektion von Proteinen

<u>1X PBS-T (0.1 % TWEEN)</u>	<u>ASSAY PUFFER</u>	<u>NITRO-BLOCK-II LÖSUNG</u>
100 mL 10X PBS	10.6 g Tropix® DEA	Nitro-Block-II™ 1:200 in Assay Puffer
1 mL Tween 20	500 µL 2 M MgCl ₂	
<i>ad</i> 1 L mit dH ₂ O	<i>ad</i> 1 L mit dH ₂ O	<u>CDP-STAR LÖSUNG</u>
	pH 9,5 mit HCl	CDP-Star® 1:1000 in Assay Puffer

Nach der Blockierung des Blots wurde dieser bei 4 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 1 Std. mit dem in I-Block Lösung verdünnten Primärantikörper inkubiert. Danach wurde der Blot dreimal für jeweils 5-10 Min. in PBS-T gewaschen und dann bei Raumtemperatur für 1 Std. mit dem an Alkalische Phosphatase-(AP)-gekoppeltem Sekundärantikörper, verdünnt in I-Block Lösung, inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in PBS-T für jeweils 5-10 Min. entfernt, die Membran für zweimal 10 Min. mit Assay Puffer behandelt und daraufhin zur Steigerung der Signalintensität für 10 Min. mit Nitro-Block-II Lösung inkubiert. Die Inkubation mit dem Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star, gelöst in Assay Puffer, erfolgte für 5 Min. bei Raumtemperatur. CDP-Star® ist ein 1,2-Dioxetan, das als Substrat für die an den Sekundärantikörper gebundene AP dient. Nach der Dephosphorylierung durch die AP bildet sich ein metastabiles Phenolat-Anion als Zwischenprodukt, das schnell zerfällt und dabei Licht der Wellenlänge 475 nm emittiert.

Der Blot wurde mit einer transparenten Folie vor dem Austrocknen geschützt und die Chemilumineszenz mit einem ChemiDoc™ XRS System detektiert. Digitale Fotos wurden mit der Software Quantity One analysiert, um einer Überbelichtung des Bildes vorzubeugen und die Intensität bestimmter Proteinbanden gegen eine Markerbande zu quantifizieren.

Strippen von PVDF Membranen

Um eine Membran ein zweites Mal mit einem anderen Primärantikörper untersuchen zu können, mussten zum Teil vorher gebundene Immunglobuline vom Blot entfernt werden. Dieser Vorgang wird als „Strippen“ bezeichnet. Zunächst wurde der Blot dreimal mit PBS-T gewaschen, um das chemilumineszente Substrat zu entfernen. Die Membranen wurden dann in Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer bei 37 °C auf einem Plattenschüttler für 15 Min. inkubiert. Anschließend wurde sie wieder dreimal in PBS-T gewaschen und erneut für 30-60 Min. in I-Block Lösung blockiert. Nach der Blockierung konnte der Blot wie oben beschrieben mit einem weiteren Primärantikörper untersucht werden.

2.2.3.5. Isolation SIRT6-spezifischer polyklonaler Antikörper aus Kaninchenserum

Für die Generierung polyklonaler Antikörper gegen SIRT6 wurde das Peptid *N*-CHRPPKRVKTEAAPS-*C* ausgewählt. Der Sequenzabschnitt *N*-CHRPPKRVK-*C* kommt sowohl in murinem als auch in humanem SIRT6 vor, der Abschnitt *N*-TEAAPS-*C* nur im murinen Protein. Polyklonale Antikörper gegen das vollständige Peptid sollten daher sowohl z.T. humanes als auch murines SIRT6 binden können.

Die Immunisierung von Kaninchen mit dem Peptid *N*-CHRPPKRVKTEAAPS-*C* wurde bei der Firma Genosphere Biotechnologies in Auftrag gegeben. Lyophilisiertes Antiserum wurde dann in mehreren Schritten zur Isolation von polyklonalen SIRT6-spezifischen Antikörpern verwendet.

Aufreinigung von Gesamt-Immunglobulin G aus Antiserum

Zunächst wurde Gesamt-Immunglobulin G (IgG) aus Kaninchen-Antiserum isoliert. Dazu wurde eine mit einer Fritte bestückte Säule mit ca. 2 mL ProteinA-Agarose-Suspension befüllt und die Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen an PBS gewaschen.

500 mg lyophilisiertes Antiserum wurde zunächst mit 6 mL ddH₂O rekonstituiert und dann 1:2 mit PBS verdünnt. Das verdünnte Antiserum wurde dann zweimal über die ProteinA-Agarose-Säule laufen gelassen und nach dem zweiten Durchlauf verworfen. Die Säule wurde im Anschluss so lange mit PBS gewaschen, bis die Absorption des Durchlaufs bei 280 nm annähernd wieder bei der von PBS lag. Die Elution erfolgte mit 100 mM Glycin (pH 2,8), das Eluat wurde in Fraktionen von je 1 mL aufgefangen. Die Absorption bei 280 nm aller Fraktionen wurde gegen das Elutionsmittel gemessen und die Fraktionen mit deutlich erhöhter Absorption vereinigt. Der pH der vereinigten Fraktionen wurde mit 500 mM Tris (pH 8,0) neutralisiert, die Absorption erneut gemessen und die ungefähre Proteinkonzentration abgeschätzt ($A_{280} \times 0,8 \approx \text{Proteinkonzentration } (\mu\text{g/mL})$). Die Antikörperlösung wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

Affinitätsreinigung von SIRT6-spezifischen polyklonalen Antikörpern mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid

Immobilisierung des Peptids an Säulenmaterial:

Benötigte Reagenzien:

<u>KOPPLUNGSPUFFER</u>	<u>QUENCHING-REAGENZ</u>	<u>WASCHPUFFER</u>
50 mM Tris	50 mM L-Cystein-HCl	1 M NaCl
5 mM EDTA-Na	in Kopplungspuffer	
pH 8,5		
<u>LAGERUNGSPUFFER</u>	<u>ELUTIONSPUFFER</u>	<u>NEUTRALISATIONSPUFFER</u>
PBS	100 mM Glycin	500 mM Tris
0,05 % NaN ₃	(pH 2,8)	(pH 8,0)

Eine Affinitätssäule mit dem kovalent gekoppelten Peptid *N*-CHRPPKRVKTEAAPS-*C* wurde mit SulfoLink® Coupling Gel (Pierce) hergestellt. 2 mL Gelsuspension wurden in eine Säule überführt, dieses enthält in etwa 1 mL Säulenvolumen für die Kopplung von 5 mg eines bestimmten Peptids, das mindestens eine freie SH-Gruppe trägt (in diesem Fall die des N-terminalen Cysteins). Die Herstellung der benötigten Puffer und Reagenzien sowie die Durchführung der Kopplungsreaktion erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers, jedoch wurde nach der Kopplungsreaktion die Säule sofort verwendet und die Säule daher mit NaN₃-freiem entgastem Lagerungspuffer (PBS) gewaschen.

Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper gegen SIRT6:

Das im vorherigen Schritt isolierte Gesamt-IgG wurde auf Raumtemperatur gebracht, dann auf die Affinitätssäule aufgetragen. Nach dem ersten Durchlauf wurde dieser Schritt wiederholt. Die Säule wurde im Anschluss so lange mit PBS gewaschen, bis die Absorption des Durchlaufs bei 280 nm annähernd wieder bei der von PBS lag. Die Elution erfolgte mit 100 mM Glycin (pH 2,8), das Eluat wurde in Fraktionen von je 1 mL aufgefangen. Die

Absorption bei 280 nm aller Fraktionen wurde gegen das Elutionsmittel gemessen und die Fraktionen mit deutlich erhöhter Absorption vereinigt. Der pH der vereinigten Fraktionen wurde mit 500 mM Tris (pH 8,0) neutralisiert, die Absorption erneut gemessen und die ungefähre Proteinkonzentration abgeschätzt ($A_{280} \times 0,8 \approx$ Proteinkonzentration ($\mu\text{g/mL}$)). Die Lösung der polyklonalen Antikörper wurde in Portionen von 100 μg aliquotiert und das Lösemittel im SpeedVac verdampft. Die Lagerung der getrockneten Antikörper erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Rekonstitution mit 100 μL ddH₂O.

Die Spezifität der polyklonalen SIRT6-spezifischen Antikörper wurde mittels Western Blot in Verdünnungen von 1:500-1:2000 mit Lysaten aus der Leber von *Sirt6*^{wt} bzw. *Sirt6*^{ko}-Mäusen des Stammes KO-Sirt6-Fwa bestätigt.

2.2.3.6. Co-Immunpräzipitation von SIRT6-assoziierten Proteinkomplexen

Die Immunpräzipitation (IP) dient der Fällung eines Antigens, meist eines Proteins, aus einer komplexen Proteinlösung wie beispielsweise einem Zelllysate oder Serum mithilfe eines spezifischen Antikörpers. Abgesehen von einer Anreicherung und Aufreinigung des Zielproteins können auch Faktoren, die mit ihm assoziiert sind, identifiziert und untersucht werden (Co-IP). Der verwendete Antikörper wird dazu entweder kovalent oder reversibel an eine solide makromolekulare Matrix gebunden, die eine Fällung ermöglicht, beispielsweise an Partikel („Beads“) aus Agarose oder magnetischem Metall. In dem hier beschriebenen Versuch wurde intrinsisches SIRT6 aus primären humanen Hepatozyten präzipitiert, um neue Interaktionspartner zu identifizieren. Die SIRT6-spezifischen Antikörper wurden kovalent an magnetische Beads gekoppelt und die Antikörperketten zusätzlich quervernetzt, um bei der anschließenden Analyse mittels LC-MS¹⁰⁷ wenig Verunreinigung durch IgG-Moleküle zu erreichen.

Kovalente Kopplung von Antikörpern an tosylaktivierte magnetische Beads*Benötigte Reagenzien:*

<u>PUFFER B</u>	<u>PUFFER C</u>	<u>BLOCKPUFFER</u>
0,1 M NaH ₂ PO ₄	3 M (NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM Tris
pH 7,4	gelöst in PufferB	pH 8,0

-100 mM Tris, pH 8,0

-Dynabeads® M-280 Tosylactivated (Invitrogen™): 30 mg Beads/mL (=2 X 10⁹ Beads/mL)

-Normal Rabbit IgG (#2729, Cell Signaling Technology): 1 mg/mL + 100 µg/mL BSA

-Anti-Sirt6 (N-terminal) (S4322, Sigma-Aldrich): 1 mg/mL

Das Bindungsvermögen der verwendeten Beads liegt bei 20 µg Antikörper pro 1 mg Beads. Für die drei Vorreinigungsschritte wurden dreimal je 2200 µg Beads mit 40 µg Normal Rabbit IgG (NRIgG) gekoppelt. Dabei wurde berücksichtigt, dass NRIgG zusätzlich 100 µg/mL BSA enthält. Für die Negativkontrolle wurden 1100 µg Beads mit 20 µg NRIgG gekoppelt und für die Immunpräzipitation von SIRT6 1000 µg Beads mit 20 µg Anti-Sirt6. Die entsprechenden Mengen an Bead-Suspension wurden in Reaktionsgefäße pipettiert und an einem Magnet pelletiert. Anschließend wurden sie dreimal mit je 1 mL Puffer B gewaschen.

Die nach dem Waschen pelletierten Beads wurden dann in Puffer B aufgenommen und das dem jeweiligen Ansatz entsprechende Volumen an Antikörper zugegeben, sodass die Mengen von Puffer B und Antikörperlösung jeweils ein Gesamtvolumen von 150 µL ergab. Die Ansätze wurden durch Vortexen gemischt und dann jeweils 100 µL Puffer C zugegeben. Die Ansätze wurden dann 40 Std. lang bei Raumtemperatur in einem Schüttler mit 950 rpm inkubiert.

Um eventuell ungebundene reaktive Gruppen der Beads zu blockieren, wurden nach der Kopplungsreaktion die Beads pelletiert, die Überstände abgenommen und die Beads jeweils in 1 mL Blockpuffer für eine Stunde bei 37 °C im Probenrad invertiert.

Kovalente Quervernetzung der Antikörper-Ketten*Benötigte Reagenzien:*CL-ASSAYPUFFER

0,01 % Triton X-100
in PBS
pH 7,4

CL-BLOCKPUFFER

50 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl
0,01 % Triton X-100

CL-CROSSLINKPUFFER

0,2 M di-Natriumtetra-
borat-Decahydrat
pH 9

DMP-CROSSLINKER (frisch hergestellt)

32 mg Dimethyl-Pimelimidat (DMP)
in 6 mL CL-Crosslink Puffer
(frisch hergestellt)

BLOCKPUFFER

100 mM Tris
pH 8,0
(+ Protease Inhibitor)

Die Beads wurden nach dem Blockierungsschritt pelletiert und dreimal mit je 500 μ L CL-Assaypuffer gewaschen. Danach folgte ein Waschschriff mit 500 μ L CL-Blockpuffer, dann eine Inkubation mit 500 μ L Blockpuffer bei 37 °C im Probenrad für 1 h. Anschließend wurden die Beads dreimal mit je 500 μ L CL-Crosslinkpuffer gewaschen und dann in jeweils 1 mL frisch angesetztem DMP-Crosslinker resuspendiert. Die Ansätze wurden dann 30 Min. bei Raumtemperatur im Probenrad invertiert. Die Beads wurden anschließend pelletiert, einmal mit 500 μ L CL-Blockpuffer gewaschen und dann wieder für 1 Std. mit 500 μ L Blockpuffer bei 37 °C im Probenrad invertiert. Nach diesem letzten Blockierungsschritt wurden die Beads dreimal mit je 500 μ L Blockpuffer gewaschen und bis zur Verwendung am nächsten Tag in je 150 μ L Blockpuffer (+PI) aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Herstellung des Kernlysats aus primären humanen Hepatozyten

Reagenzien aus dem Nuclear Complex Co-IP Kit (Active Motif):

- | | |
|------------------------|-------------------------------------|
| - 10X Hypotonic Buffer | - Protease Inhibitor Cocktail (PIC) |
| - Detergent | - Enzymatic Shearing Cocktail |
| - Digestion Buffer | - 5X IP Low Buffer |
| - 100 mM PMSF | - 0,5 M EDTA |

1X HYPOTONIC BUFFER (2 mL)200 μ L 10X Hypotonic Buffer1,8 mL ddH₂OCOMPLETE DIGESTION BUFFER (400 μ L)384 μ L Digestion Buffer2 μ L PMSF4 μ L PIC

Primäre humane Hepatozyten wurden nach der Isolation über Nacht auf collagenbeschichteten Petrischalen kultiviert. Am Morgen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit Accutase abgelöst. Nach Resuspendierung mit einer Pipette wurden alle Zellen in einem Zentrifugengefäß vereinigt und bei 1500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert.

Die Zellen wurden in 2 mL Hypotonic Buffer resuspendiert und 15 Min. auf Eis inkubiert. Dann wurden 25 μ L Detergent hinzugegeben und die Suspension durch Pipettieren gemischt. Nach einer Zentrifugation von 30 Sek. bei 14.000 x g und 4 °C wurde der Überstand (Zytoplasmalysat) abgenommen und verworfen. Das Pellet der Zellkerne wurde in 400 μ L Complete Digestion Buffer resuspendiert, mit der Pipette gemischt und dann 2 μ L Enzymatic Shearing Cocktail zugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und dann 90 Min. bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 8 μ L 0,5 M EDTA und vorsichtiges Mischen gestoppt und das Reaktionsgefäß für 5 Min. auf Eis inkubiert.

Nach einer Zentrifugation bei 14.000 x g und 4 °C für 10 Min. wurde der Überstand (= Kernlysat) in ein frisches, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Nur bei vollständiger

Lyse bleibt kein Pellet zurück. Vom Kernlysats wurde eine Probe von 25 μL abgenommen, die später zur Proteinkonzentrationsbestimmung und als Input-Probe für die SDS-PAGE (Kolloidale Coomassie-Färbung und Western Blot) verwendet wurde.

Mit dem restlichen Kernlysats wurde der IP-Inkubations-Ansatz hergestellt:

IP-INKUBATIONS-ANSATZ

395 μL ddH₂O

200 μL 5X IP Low Buffer

5 μL PIC

400 μL Kernlysats (ca. 600 μg Protein)

Vorreinigung des Kernlysats

IP LOW WASH BUFFER

6384 μL ddH₂O

1600 μL 5X IP Low Buffer

16 μL PIC

Die Vorreinigung des Lysats, das heißt das Abfangen unspezifisch an IgG bindender Proteine, erfolgte in drei Schritten mit kovalent an magnetische Beads gekoppelten unspezifischen Kaninchen-Antikörper (NRIgG). Der jeweilige Bead-NRIgG-Ansatz („Vorreinigung 1-3“) wurde am Magneten pelletiert, der Lagerungspuffer (Blockpuffer + PI) abgenommen und der IP-Inkubations-Ansatz zu den trockenen Beads gegeben. In allen drei Schritten wurde der Ansatz jeweils für 1 Std. bei 4 °C im Probenrad invertiert und dann zu dem jeweils nächsten Bead-NRIgG-Pellet überführt.

Zur späteren Kontrolle im SDS-Gel/Western Blot wurden nach der jeweiligen Inkubation die trockenen Beads dreimal mit je 500 μL IP Low Wash Buffer gewaschen und schließlich mit 660 μL 1X SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 Min. bei 99 °C die unspezifisch gebundenen Proteine eluiert. Diese Proben wurden von den Beads abgenommen, in ein frisches Gefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

SIRT6-Immunpräzipitation und Negativkontrolle

Nach der Vorreinigung wurde das Kernlysats in zwei gleiche Teile geteilt und jeweils 500 μL entweder zu den anti-Sirt6-Beads (IP SIRT6) oder den NRIgG-Beads (IP Negativkontrolle) gegeben. Beide Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C im Probenrad invertiert.

Zur Beendigung des Versuchs wurden die Beads beider Ansätze pelletiert, die Überstände für die Kontrolle im SDS-Gel/Western Blot aufbewahrt, die Beads jeweils dreimal mit je 500 μL IP Low Wash Buffer gewaschen und schließlich die Bead-Suspensionen nach dem letzten Waschen in zwei Teile geteilt: etwa 85 % der Beads wurden trocken bei -80 °C gelagert und nach der Bestätigung einer erfolgreichen IP mittels Western Blot an

(Core Facility Massenspektrometrie des Instituts für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) zur Identifizierung der co-präzipitierten Proteine durch label-freie quantitative Proteomanalyse¹⁰⁷ weitergegeben. 15 % der Beads wurden mit 85 μL 1X SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 Min. bei 99 °C die präzipitierten Proteine eluiert.

Überprüfung der SIRT6-Co-IP mittels Coomassie-Färbung und Western Blot

Zunächst wurde mittels Bradford-Assay die Konzentration des Kernlysats (= Input) bestimmt, diese lag bei 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Von dieser Probe wurden 15 μL auf die SDS-Gele aufgetragen. Da das Lysat in Folge verdünnt wurde, wurden von den Überständen der Proben „IP SIRT6“ bzw. „IP Negativkontrolle“ das 2,5-fache Volumen, also 37,5 μL aufgetragen. Bei den von Beads eluierten Proben wurden darauf geachtet, jeweils Protein von ca. 50 μg Beads aufzutragen; so wurden von den Proben „Vorreinigung 1-3“ je 15 μL Eluat, von den Proben „IP SIRT6“ bzw. „IP Negativkontrolle“ jeweils 25 μL Eluat aufgetragen.

Insgesamt wurden zwei 10 %-SDS-Gele mit derselben Probenreihenfolge aufgetragen, von denen das eine anschließend mit Coomassie gefärbt wurde (kolloidale Coomassie-Färbung) und das andere für den Nachweis von SIRT6 durch Western Blot verwendet wurde. Dazu wurde ein anderer Antikörper als für die Immunpräzipitation verwendet (SirT6 Antibody von Cell Signaling Technology).

2.2.4. Histologische Methoden

2.2.4.1. Fixierung von Zellen

Zellen, die für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet werden sollten, wurden zunächst auf Chamberslides, d.h. in ein auf Glasboden aufgesetztes Kammersystem, ausgesät. Für Färbungen an fixierten Zellen wurden Chamberslides mit einem Glasboden in Format und Dicke eines Objektträgers verwendet.

Nach mindestens 24-stündigen Anwachsen auf der Glasfläche wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte entweder für 20 Min. mit 4 %-igem, methanolfreiem Formaldehyd bei Raumtemperatur, für 5 Min. mit 100 %-igem eisgekühlten Methanol bei -20 °C oder einem eisgekühlten Gemisch aus Aceton und Methanol (1:1) für 1 Min. bei -20 °C. Die Fixierungslösung wurden dann abgenommen, die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und bis zur Färbung in PBS bei 4 °C gelagert.

2.2.4.2. Kryoschnitte am Kryostat

Kryoschnitte wurden bei -18 bis -20 °C am Leica CM1900 Kryostat durchgeführt. Ein Organstück wurde in Gewebe-Gefriermedium eingebettet, grob bis auf die gewünschte Tiefe angeschnitten und dann Kryoschnitte mit einer Dicke von 4-5 µM angefertigt, die sofort auf Poly-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezogen wurden. Die Kryoschnitte wurden dann entweder unfixiert bei -20 °C gelagert oder fixiert.

2.2.4.3. H/E-Färbung am Kryoschnitt

Benötigte Reagenzien:

-4 %-iges, methanolfreies Formaldehyd

-PBS, dH₂O, Leitungswasser

- 1 %-iger HCl-Alkohol
- Hämatoxilin-Färbelösung
- Eosin-Färbelösung
- Ethanol (70, 96 und 100 % ig)
- Xylol
- Entellan

Die Kryo-Schnitte von Mauslebern wurden zunächst für 20 Min. mit 4 %-igem, methanolfreiem Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert, dann einmal in PBS und zweimal für je 2 Min. in destilliertem Wasser gewaschen. Nach achtminütiger Inkubation in Hämatoxilin-Färbelösung wurde der Objektträger für 2 Min. in Leitungswasser gestellt und dann kurz in 1 %-igen HCl-Alkohol getaucht. Anschließend wurden die Schnitte in laufendem Leitungswasser für 15-30 Min. differenziert und dann kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte in Eosin-Färbelösung für 3 Min. Es folgte die aufsteigende Alkohol-Reihe (70, 96, 100 % Ethanol) mit je 2 Min. Inkubation pro Schritt. Nach zwei fünfminütigen Inkubationen in Xylol erfolgte das Einbetten in Entellan.

2.2.4.4. Ölrot O-Färbung am Kryoschnitt

Benötigte Reagenzien:

- 60 %-iges Isopropanol
- Ölrot O-Lösung (0,2 % Ölrot O in 60 %-igem Isopropanol, aufgekocht und filtriert)
- Hämatoxilin-Färbelösung
- Kaisers Glyceringelatine (auf 45 °C erwärmt)

Die Färbung von intrazellulären Fettvakuolen in murinem Lebergewebe erfolgte bei Raumtemperatur an frischen Kryo-Schnitten, die bereits auf Objektträger aufgezogen waren. Die Schnitte wurden kurz in 60 %-igen Isopropanol getaucht und dann für 20 Min. in Ölrot O-Lösung gefärbt. Nach erneutem kurzen Eintauchen in 60 %-iges Isopropanol wurden die Objektträger in destilliertem Wasser gewaschen. Die Gegenfärbung mit Hä-

matoxilin erfolgte für 5 Min., woraufhin die Schnitte nochmals in destilliertem Wasser gewaschen und dann für 5 Min. unter laufendem Leitungswasser differenziert wurden. Das Einbetten erfolgte mit im Wasserbad erwärmter Kaisers Glyceringelatine. Da die Färbung relativ schnell ausbleicht, wurden die Schnitte möglichst noch am selben Tag nach Aushärten des Einbettmediums gesäubert und am Lichtmikroskop fotografiert.

2.2.4.5. Immunfluoreszenzfärbung

Benötigte Reagenzien:

<u>PERMEABILISIERUNGSLÖSUNG</u>	<u>BLOCKLÖSUNG</u>	<u>HOECHST 33342</u>
0,2-0,5 % Saponin in PBS	3-5 % BSA 0,1-0,3 % Triton-X100 in PBS	100 µg/mL in PBS

- PBS-T (PBS mit 0,1 % Tween 20)
- dH₂O
- Aqua-Poly/Mount

Entsprechend den Anforderungen des Primärantikörpers fixierte Zellen oder Gewebeschnitte wurden zunächst in PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Kernmembranen mit Saponin (höhere Konzentration bei Gewebeschnitten) erfolgte durch Überschichtung des Objekts mit Permeabilisierungslösung und Inkubation für 20 Min. bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifisch an Proteine bindender Epitope mit Blocklösung (höhere Konzentrationen von BSA und Triton-X100 bei Gewebeschnitten) für 30-45 Min. bei RT. Der/die Primärantikörper wurden entsprechend der Herstellerangaben in Blocklösung verdünnt und eine Stunde bei RT mit den Zellen oder Gewebeschnitten inkubiert. Pro verwendetem Primärantikörper wurde jeweils ein Schnitt bzw. eine Zellkavität als Negativkontrolle ohne Antikörper belassen und später nur mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper gefärbt.

Im Anschluss wurden die Objekte dreimal mit PBS-T gewaschen und dann mit dem ebenfalls in Blocklösung verdünntem fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper und im Verhältnis 1:100 zugesetzter Hoechst 33342-Verdünnung inkubiert. Diese Inkubation erfolgte für eine Stunde im Dunkeln. Diese Färbelösung wurde auch bei den Negativkontrollen verwendet.

Nach der Sekundärfärbung wurden die Zellen oder Schnitte erneut dreimal mit PBS-T und dann noch einmal in destilliertem Wasser gewaschen und schließlich mit Aqua-Poly/Mount eingebettet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei 4 °C. Fotografien der Immunfluoreszenzfärbungen wurden am LSM 710 NLO gemacht. Wenn verschiedene Ansätze direkt verglichen werden sollten, wurden dabei die selben Geräte- und Softwareeinstellungen verwendet.

2.2.5. Arbeit mit Versuchstieren

2.2.5.1. Tierhaltung

Die Haltung der verwendeten Mäuse wurde nach Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt und erfolgte im SPF-Bereich mit den für diesen Standard geltenden Vorschriften. In der Zucht wurden jeweils 1-2 Weibchen mit einem Männchen verpaart und Nachkommen im Alter von 21 Tagen von den Eltern abgesetzt und nach Geschlecht getrennt zu maximal fünf Individuen gehalten. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen (transparente Plastik Käfige mit Gittereinsatz; Raumtemperatur 22 °C, Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden, Kunstlicht 300 lx) und die Fütterung mit Pelletfutter erfolgte *ad libitum*. Die Tiere standen während der gesamten Haltungszeit unter tierärztlicher Kontrolle.

2.2.5.2. Kennzeichnung und Entnahme von Biopsien

Mäuse wurden üblicherweise beim Absetzen von den Elterntieren mit Ohrmarkierungen nach dem System R1 / L1 / R2 / L2 / (-) (R=rechts, L=links) gekennzeichnet. Zur Gewinnung von DNA zur Genotypisierung wurde das ausgestanzte Ohrgewebe verwendet. Unmarkierten (-) Mäusen wurde zu diesem Zweck die Schwanzspitze (3 mm) abgetrennt.

2.2.5.3. Genotypisierung

Die Genotypisierung von Mäusen mit zu Markierungszwecken entnommenem Ohr- oder Schwanzgewebe wird in Abschnitt 2.2.1.4. beschrieben.

2.2.5.4. Transgen-Induktion mit Tamoxifen

Zum Ansetzen einer Tamoxifen-Lösung wurde Tamoxifen steril entnommen und soviel gereinigtes Olivenöl zugesetzt, dass eine Konzentration von 20 mg/mL Tamoxifen erreicht wurde. Zum Lösen wurde die Tamoxifen-Suspension über mehrere Stunden im Wasserbad bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und etwa alle 2 Std. für 20 Min. im Ultraschallbad geschallt, bis sich das Tamoxifen völlig gelöst hatte. Die Lösung wurde schließlich steril filtriert und dann über den Injektionszeitraum von fünf Tagen bei 4 °C gelagert. Jeder Maus wurde über fünf Tage täglich zur selben Uhrzeit 1 mg Tamoxifen (50 µL der Tamoxifen-Lösung) *i.p.* injiziert. Kontrolltieren wurde das entsprechende Volumen an Olivenöl verabreicht.

2.2.5.5. Narkotisierung bei Mäusen

Zur Betäubung von Mäusen wurde Ketaminhydrochlorid („Ketamin“; dissoziatives Anästhetikum) in einer Dosierung von 125 mg/kg Körpergewicht versetzt mit 20 mg/kg Kör-

pergewicht Xylazinhydrochlorid („Rompun“; Sedativum / Analgetikum / Muskelrelaxans) verwendet. Die Lösungen wurden gemischt, bei Bedarf das Volumen mit steriler Kochsalzlösung erhöht und intraperitoneal injiziert. Nach Verabreichung des Substanzgemisches wurde das Verschwinden des Zwischenzehenreflexes an allen vier Pfoten abgewartet, bis das Abdomen eröffnet wurde.

2.2.5.6. Entnahme von Blut und Organen

Nach Eröffnung des Abdomens wurde zunächst das Zwerchfell der Maus durchtrennt und Blut mit einer Spritze direkt aus dem noch schlagenden Herzen entnommen, in Folge dessen der Tod des Tieres schnell eintrat. Organe des Tieres wurden anschließend entnommen und sofort in Präparationsmedium gelegt, in flüssigem Stickstoff gefroren oder in Roti®-Histofix (4 %-iges Formaldehyd) für das spätere Einbetten in Paraffin fixiert.

2.2.5.7. Messung des Glukosegehalts im Vollblut

Aus dem Herzen entnommenes Vollblut wurde sofort mit einem ACCU-CHEK® Sensor bzw. ACCU-CHEK® Aviva Blutzuckermessgerät mit den dazugehörigen Messstreifen nach Herstelleranleitung getestet.

2.2.5.8. Isolierung primärer muriner Hepatozyten

Die Isolierung von Zellen aus muriner Leber wurde in unserer Arbeitsgruppe von Herrn durchgeführt. Für die Isolierung der primären Hepatozyten wurden die Mäuse mit einem Gemisch aus Ketamin und Rompun narkotisiert (siehe Abschnitt 2.2.5.5.).

Benötigte Reagenzien:

<u>PUFFER I</u>	<u>PUFFER II</u>	<u>PUFFER III</u>	<u>PMHEP MEDIUM</u>
10 mM HEPES	100 mM HEPES (pH 7.6)	10 mM HEPES	DMEM mit
140 mM NaCl	70 mM NaCl	140 mM NaCl	10 % FCS
7 mM KCl	7 mM KCl	7 mM KCl	10 mM HEPES
pH 7,4	6.0 mM CaCl ₂	1.5 mM CaCl ₂	2 mM L-Glutamin
-steril filtriert-	0,05% Kollagenase	pH 7,4	1 mM Natrium-Pyruvat
	pH 7,6	-steril filtriert-	100 U/mL Penicillin
	-steril filtriert-		100 µg/mL Streptomycin

Nach Verschwinden der Zwischenzehenreflexe an allen vier Pfoten erfolgte die Öffnung des Abdomens. Durch die Vena Portae wurde die Leber mit 50 mL Puffer I, der zuvor bei 37 °C vorgewärmt wurde, mit Hilfe einer Kanüle und einer Pumpe vorperfundiert. Die Perfusion wurde gleichzeitig mit dem Aufschneiden der Vena Cava gestartet und das Einleiten der Flüssigkeit erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 18-20 mL/Min. Daraufhin wurde die Leber mit 50 ml Puffer II gespült. Die perfundierte Leber wurde entnommen und in eine Petrischale mit kaltem Puffer III überführt. Die Leberkapsel wurde entfernt und die Hepatozyten wurden durch vorsichtig Hin- und Herbewegen im Puffer mithilfe einer Pinzette aus dem Gewebe gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension durch eine Gaze filtriert und durch Zentrifugation bei 500 rpm (ohne Bremse) die nicht parenchymalen Zellen von den Hepatozyten getrennt. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt, bevor die Zellen auf kollagenbeschichtete Platten in pmHep-Medium ausgesät werden konnten. Sobald sich die Zellen nach etwa drei Stunden am Boden angeheftet hatten, wurde das Medium gewechselt.

3. Ergebnisse

3.1. *Sirt6*-Knockout in verschiedenen Mausmodellen

3.1.1. Mausmodell mit konstitutiver, globaler Inaktivierung von *Sirt6*

3.1.1.1. Stammbeschreibung, Zucht und Genotypisierung

Mäuse des Stammes 129-*Sirt6*^{tm1Fwa/J} wurden vom Jackson Laboratory erworben. Die Expression von *Sirt6* vom tm1Fwa-Allel wurde durch die Insertion des *lacZ*-Gens hinter den ersten 21 Basen des ersten Exons unterbrochen, indem die Exone 1-6 von *Sirt6* durch homologe Rekombination entfernt wurden⁶. Die vom Jackson Laboratory erworbenen Mäuse sind heterozygot bezüglich des tm1Fwa-Allels und wurden miteinander gekreuzt, um homozygote Tiere zu erhalten (siehe Kreuzungsschema in Abbildung 3.1(A)). Das *Sirt6*^{tm1Fwa}-Allel wird im Folgenden als "*Sirt6*^{ko}"-Allel bezeichnet, der Stamm 129-*Sirt6*^{tm1Fwa/J} als „KO-*Sirt6*-Fwa“. Alle Nachkommen heterozygoter Eltern wurden in zwei separaten PCR-Reaktionen genotypisiert, dazu wurde zunächst DNA aus Ohr- oder Schwanzbiopsien isoliert. In den PCR-Reaktionen wurde jeweils ein gemeinsamer Forward-Primer (oIMR5970) mit einem individuellen Reverse-Primer (oIMR5971 für *Sirt6*^{ko} oder oIMR5972 für *Sirt6*^{wt}) kombiniert (siehe Abbildung 2.2).

Das PCR-Produkt von *Sirt6*^{ko} hat eine Länge von 380 bp, das Produkt von *Sirt6*^{wt} eine Länge von 600 bp. Ein Beispiel für eine Genotypisierung ist in Abbildung 3.1(B) gezeigt.

Als wildtypische Kontrollen gelten nur Mäuse, die homozygot für das *Sirt6*^{wt}-Allel sind, als *Sirt6*-knockout-Tiere gelten nur Mäuse, die homozygot das Allel *Sirt6*^{ko} tragen. Heterozygote Tiere fanden nur in der Zucht Verwendung.

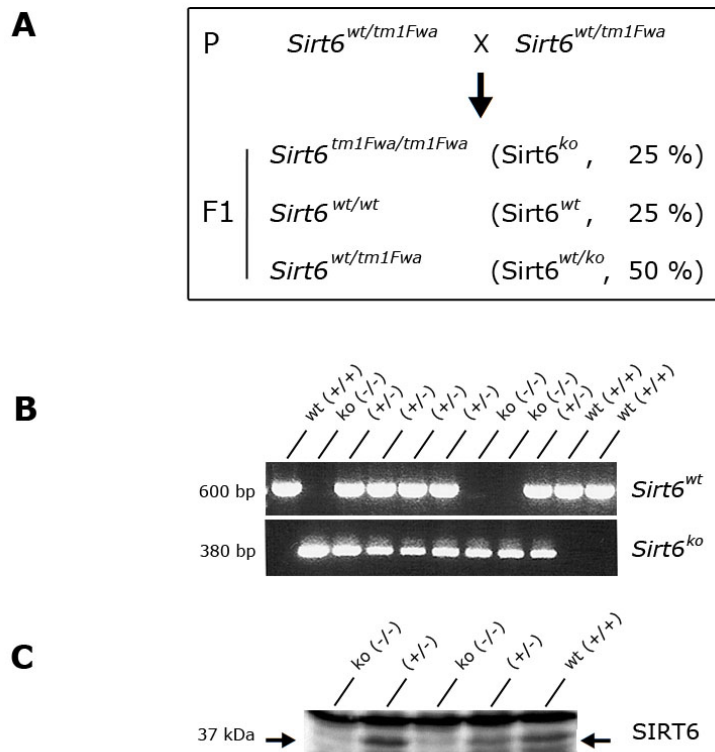
129-*Sirt6*^{tm1Fwa/J}

Abbildung 3.1: Nachweis des *Sirt6*-Knockouts in Mäusen des Stammes KO-*Sirt6*-Fwa.

A Kreuzungsschema zur Zucht von *Sirt6*^{tm1Fwa/tm1Fwa} (*Sirt6*^{ko}) Mäusen. **B** Agarose-Gelanalyse einer Genotypisierung zum Nachweis der Allele *Sirt6*^{wt} und *Sirt6*^{ko} (*Sirt6*^{tm1Fwa}). Die Allele wurden in zwei getrennten PCR-Reaktionen mit DNA aus Ohr- bzw. Schwanzbiopsien nachgewiesen. **C** Western Blot-Analyse zum Nachweis von SIRT6 in Proteinextrakten aus Lebern von Mäusen verschiedener Genotypen aus dem Stamm KO-*Sirt6*-Fwa.

3.1.1.2. Nachweis des SIRT6-Proteins

Um SIRT6-exprimierende von *Sirt6*-defizienten Tieren zu unterscheiden, wurde Protein aus Gesamtleberproben von mehreren Tieren verschiedener Genotypen aus dem Stamm KO-*Sirt6*-Fwa isoliert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und diese mit einem spezifischen Antikörper gegen SIRT6 getestet. Die Western Blot-Analyse der SIRT6-Expression zeigt in den Proben aus

Sirt6^{wt}- und auch Sirt6^{+/-}-Tieren eine Bande auf Höhe von etwa 37 kDa, die bei Sirt6^{ko}-Tieren fehlt (Abbildung 3.1(C)). Dieses Ergebnis bestätigt den Verlust von wildtypischem SIRT6 in Sirt6^{ko}-Tieren.

3.1.2. Mausmodell mit konditionaler Inaktivierung von *Sirt6*

3.1.2.1. Embryonale Stammzellen mit Reporter-markiertem Allel zum konditionalen *Knockout* von *Sirt6*

Embryonale JM8-Stammzellen des genetischen Hintergrundes C57BL/6NTac; C57BL/6NTac; C57BL/6N-A^{tm1Brd/a}¹¹⁴ mit dem heterozygot vorliegenden Allel *Sirt6*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} wurden vom EuMMCR (European Mouse Mutant Cell Repository) erworben. Das in diesen embryonalen Stammzellen enthaltene mutante *Sirt6*-Allel wurde durch Gentergeting^{115,116} innerhalb des European Conditional Mouse Mutagenesis Program (EUCOMM) erzeugt¹¹⁷. Es ist zu beachten, dass die verwendeten JM8-Stammzellen zwar vom C57BL/6N Stamm abgeleitet sind, jedoch über ein intaktes *Agouti*-Allel verfügen, dessen phänotypische Ausprägung dominant ist¹¹⁴.

Zum Gentergeting von *Sirt6* wurde eine sogenannte L1L2_Pgk_P Kasette zwischen die Exone 2 und 3 des *Sirt6* Gens eingebracht. Die L1L2_Pgk_P Kasette ist mit FRT-Rekombinationsstellen flankiert, sodass sie durch Einkreuzung eines Flippase (Flp)-Deleter-Stamms deletiert werden kann. Sie besteht aus einer *Splice Acceptor*-Sequenz, einer IRES-Sequenz, einer für β -Galactosidase codierenden Sequenz (*lacZ*), sowie einer geflochten Neomycinresistenz (*neo*)-Kasette. Dabei wurde die 3'-terminale *loxP* Stelle der *neo*-Kasette hinter die *FRT*-Stelle eingebracht, sodass sie bei Flp-vermittelter Rekombination der L1L2_Pgk_P Kasette erhalten bleibt. Weiter stromabwärts zwischen Exon 6 und 7 von *Sirt6* wurde eine weitere *loxP* Stelle inseriert. Die Insertion der L1L2_Pgk_P Kasette bewirkt einen konstitutiven *Knockout* des *Sirt6*-Gens, weshalb das Allel *Sirt6*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} in den im Folgenden beschriebenen Zuchtschritten immer nur hetero-

zygot geführt wird. Durch Flp-vermittelte Rekombination kann die L1L2_Pgk_P Kasette jedoch entfernt werden und es verbleiben lediglich zwei *loxP*-Rekombinationsstellen, die die Exone 3-6 des *Sirt6*-Gens flankieren. Somit entsteht ein konditionales Inaktivierungspotential basierend auf dem Cre/*loxP*-System (Abbildung 3.2).

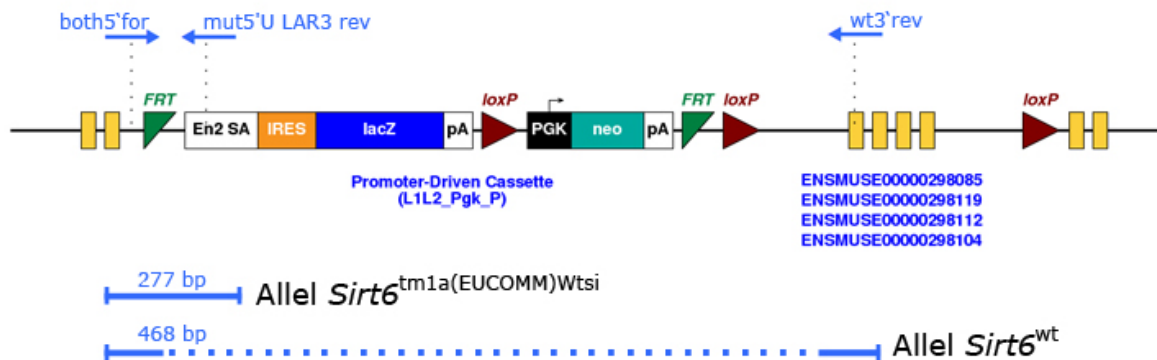


Abbildung 3.2: Schema des Allels *Sirt6*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} („knockout-first allele“) des embryonalen JM8-Stammzellklons mit konditionalem Potential.

Die codierenden Bereiche des *Sirt6* Gens (Exone) sind als gelbe Rechtecke dargestellt. Die Kasette L1L2_Pgk_P wird durch Flippase (Flp)-Erkennungsstellen (*FRT*; grüne Dreiecke) flankiert. Die Exone 3-6 von *Sirt6* werden zudem von Cre Recombinase-Erkennungsstellen (*loxP*; rote Dreiecke) flankiert. Die dritte *loxP*-Erkennungsstelle innerhalb der L1L2_Pgk_P Kasette ist für die verwendete Vorgehensweise nicht von Bedeutung. Die für die Bestimmung des/der vorliegenden *Sirt6*-Allels/e benötigten Primer sind als blaue Pfeile eingezeichnet. Die resultierenden PCR-Amplifikate sind ebenfalls schematisch dargestellt.

(Quelle: <https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1354161>; verändert)

3.1.2.2. Erzeugung chimärer Mäuse

Die Vermehrung der embryonalen JM8-Stammzellen, das Entnehmen von Blastozysten aus Spendermäusen, die Einbringung der embryonalen JM8-Stammzellen in die entnommenen Blastozysten (ESC-Injektion) sowie der Embryotransfer in Ammenmäuse wurde in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz von Frau _____ unter der Einrichtungsleitung von Dr. med. vet.

durchgeführt. Alle Schritte erfolgten nach dem dort verwendeten Protokoll.

3.1.2.3. Vererbung des Allels *Sirt6*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}

Eine Übersicht zu den im Folgenden beschriebenen Zuchtschritten zeigt Abbildung 3.4(A). Eine Aufstellung aller während der Zuchtschritte im EUCOMM-System verwendeten Primer ist in Abbildung 2.3 gezeigt; Details zu deren Verwendung finden sich in Abbildung 2.4. Die aus der ESC-Injektion resultierenden chimären Mäuse wurden in der Zuchteinrichtung der ZVTE mit C57BL/6N Mäusen verpaart. Wenn aus den JM8-Stammzellen hervorgegangenes Gewebe an der Keimzellbildung der chimären Tiere beteiligt war, zeigten die aus dieser Verpaarung resultierenden Nachkommen mit 50-prozentiger Wahrscheinlichkeit eine Agouti-Fellfarbe, die unabhängig vom Allel *Sirt6*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} dominant vererbt wird. Dieser Umstand ermöglicht die direkte Identifikation chimärer Elterntiere, die das gewünschte Allel vererben können.

Aufgrund der unabhängigen Vererbung beider Allele wurde bei Würfen, in denen agoutifarbene Individuen auftraten, bei allen Nachkommen durch Genotypisierung das Vorliegen des Allels *Sirt6*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} untersucht. Dazu wurden zwei PCR-Primer verwendet, von denen der Forward-Primer („both5'for“) innerhalb des Introns 2-3 stromaufwärts der L1L2_Pgk_P Kasette bindet, was sowohl für das *Sirt6*^{wt-} als auch für das *Sirt6*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}-Allel zutrifft. Der verwendete Reverse-Primer bindet an eine Sequenz, die innerhalb der L1L2_Pgk_P Kasette liegt („mut5'U LAR3 rev“). Nur bei Vorliegen des Allels *Sirt6*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} entsteht bei Kombination dieser beiden Primer ein PCR-Produkt der Länge 277 bp. Das heterozygote Vorliegen des wildtypischen *Sirt6* Allels kann zudem durch die Kombination der Primer „both5'for“ und „wt3'rev“ nachgewiesen werden. Der Primer „wt3'rev“ bindet innerhalb des Exons 3 von *Sirt6*. Bei Abwesenheit der L1L2_Pgk_P Kasette entsteht so ein PCR-Produkt der Länge 468 bp. Auch vom mutanten Allel kann theoretisch bei der Kombination dieser beiden Primer ein PCR-Produkt der Länge 7642 bp entstehen, das allerdings bei der Elongationszeit einer konventionellen PCR-Reaktion nicht synthetisiert wird. Der Nachweis des wildtypischen *Sirt6*-Allels wurde zur Kontrolle der eingesetzten DNA immer parallel durchgeführt, um das Risiko falsch negativer PCR-Reaktionen zu minimieren und möglichst kein mutantes Tier zu übersehen (Abbildung 3.4(B)). Für die weiteren Zuchtschritte wurden jedoch nur Träger

des Allels *Sirt6*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} mit schwarzer Fellfarbe ausgewählt, weil dies die gängige Fellfarbe bei Tieren des Stammes C57BL/6N ist.

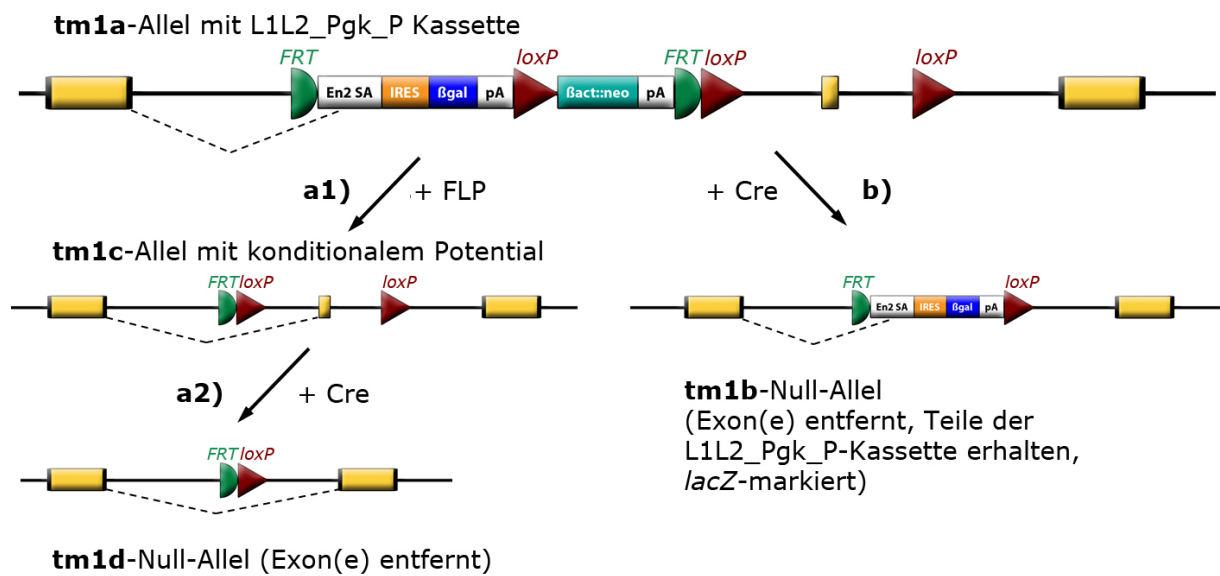


Abbildung 3.3: Allgemeines Schema der Rekombinationsschritte im EUCOMM-System. Das Schema verdeutlicht die Flexibilität des *tm1a*-Allels („*knockout-first allele*“). Die Insertion der L1L2_Pgk_P-Kassette führt bereits zu einem völligen Funktionsverlust (*Knockout*) des Allels, das daher in der Zucht nur heterozygot geführt wird. **a1)** Zur Erzeugung eines Allels mit konditionalem *Knockout*-Potential (*tm1c*) muss das Gen *Flp* eingekreuzt werden, was zur Deletion der L1L2_Pgk_P-Kassette an den Flippase-Erkennungsstellen (*FRT*, grüne Halbkreise) führt. Das resultierende *tm1c*-Allel trägt nun einen von *Cre*-Erkennungsstellen (*loxP*, rote Dreiecke) flankierten Exon-Bereich, die Expression des codierten Proteins vom *tm1c*-Allels („*fl*“; „*flox*“) erfolgt in wildtypischer Weise. **a2)** Im Anschluss kann ein *Cre*-Gen eingekreuzt werden, das zur Deletion der *loxP*-flankierten Exon-Bereichen des Gens führt, das resultierende Null-Allel wird als *tm1d* bezeichnet. **b)** Alternativ könnte mit einer sofortigen Einkreuzung eines *Cre*-Gens das *tm1a*-Allel so modifiziert werden, dass ein Null-Allel (*tm1b*) entsteht, aus dem die *loxP*-flankierten Exon-Bereiche ebenfalls deletiert werden, jedoch das *lacZ*-Gen der L1L2_Pgk_P-Kassette erhalten bleibt. Das Vorliegen des *tm1b*-Allels kann somit mithilfe einer β -Galaktosidase-Reaktion nachgewiesen werden.

3.1.2.4. Erzeugung des Allels *Sirt6*^{tm1c(EUCOMM)Wtsi} durch Elimination der Kassetten L1L2_Pgk_P

Die im Folgenden beschriebenen Zuchtschritte vom Allel *Sirt6*-tm1a bis zum Allel tm1c sind in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt, ein Kreuzungsschema ist in Abbildung 3.4(A) gezeigt. Beispiele für den Nachweis der verschiedenen Allele durch Genotypisierung sind in Abbildung 3.4(B-F) zu sehen.

Zur Elimination der L1L2_Pgk_P Kassetten wurden Mäuse des Genotyps *Sirt6*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}/wt mit Mäusen verpaart, welche die Rekombinase FLP1 unter der Kontrolle des humanen *ACTB* Promotors ubiquitär exprimieren. Die offizielle Stammbezeichnung lautet B6.SJL-Tg(ACTFLPe)9205Dym/J und bezeichnet den ursprünglich beim Jackson Laboratory erworbenen Stamm (Stock Nr.: 3800), der jedoch auf nicht standardisiertem genetischen Hintergrund vertrieben wird. Die für diese Zucht verwendeten Mäuse wurden freundlicherweise von Professor Dr. rer. nat. (Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt, der diesen Stamm mit standardisiertem C57BL/6 Hintergrund hält.

Die Verpaarung erfolgte nach folgendem Schema:

$$Sirt6^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}/wt \quad X \quad Flp$$

Es spielte dabei keine Rolle, welches Elterntier welches Geschlecht hatte. Aus der Verpaarung resultierten folgende Genotypen:

$$Sirt6\text{-tm1c(flox)}/wt + Flp \quad (25\%, \text{ gewünschter Genotyp})$$

$$Sirt6^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}/wt \quad (25\%)$$

$$Sirt6\text{-wt}/wt + Flp \quad (25\%)$$

$$Sirt6\text{-wt}/wt \quad (25\%)$$

Da ungefähr zehn Tiere des gewünschten Genotyps für die weitere Zucht benötigt wurden, wurden die Verpaarungen nach der Geburt von ca. 40 Nachkommen aufgelöst. Der Genotyp der Nachkommen wurde mit DNA aus Schwanzbiopsien bestimmt.

An diesem Punkt musste einerseits das *Flp*-Transgen nachgewiesen und andererseits die vorliegenden *Sirt6*-Allele bestimmt werden (Abbildung 3.4(C)). Da das Gen *Flp* ubiquitär exprimiert wird, sollte bereits im gesamten Körper das *Sirt6*-tm1a-Allel zum tm1c-Allel

(im Folgenden auch „Sirt6-flox“ genannt) rekombiniert worden sein, falls beide Allele vorliegen. Durch die Kombination der Primer „both5’for“ und „wt3’rev“ lassen sich sowohl das *Sirt6*^{wt}- als auch das *Sirt6*-flox-Allel in derselben PCR-Reaktion nachweisen, da das *Sirt6*-flox-Allel in dem durch die Primer abgedeckten Bereich eine verbleibende *FRT*- sowie eine *loxP*-Stelle besitzt, die das resultierende PCR-Produkt um 218 bp verlängern. Die Produkte beider Allele lassen sich im Agarose-Gel leicht unterscheiden. Für die weitere Zucht wurden Tiere ausgewählt, die eine Doppelbande für *Sirt6*-flox (686 bp) und *Sirt6*^{wt} (468 bp) und zusätzlich die Bande für das *Flp*-Transgen aufwiesen. Tiere, die nur die Bande für *Sirt6*^{wt} aufwiesen, könnten auch noch das Allel *Sirt6*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} tragen, was allerdings für die weitere Zucht keine Rolle spielte, da diese Tiere nicht weiter verwendet wurden.

3.1.2.5. Elimination des *Flp*-Transgens und Verifizierung der Keimbahntransmission des *Sirt6*-tm1c(flox) Allels

Im nächsten Zuchtschritt wurde das *Flp*-Transgen aus der Zuchtlinie herausgekreuzt. Hierzu wurden Tiere des Genotyps *Sirt6*-tm1c(flox)/wt + *Flp* mit C57BL/6J-Tieren verpaart:

$$Sirt6\text{-flox/wt} + Flp \quad X \quad C57BL/6J$$

Es spielte dabei keine Rolle, welches Elterntier welches Geschlecht hat. Aus der Verpaarung resultieren folgende Genotypen:

<i>Sirt6</i> -flox/wt	(25%, gewünschter Genotyp)
<i>Sirt6</i> -flox/wt + <i>Flp</i>	(25%)
<i>Sirt6</i> -wt/wt + <i>Flp</i>	(25%)
<i>Sirt6</i> -wt/wt	(25%)

Da ungefähr zehn Tiere des gewünschten Genotyps für die weitere Zucht benötigt wurden, wurden die Verpaarungen nach der Geburt von ca. 40 Nachkommen aufgelöst. Der Genotyp der Nachkommen wurde mit DNA aus Schwanzbiopsien bestimmt; nachgewie-

sen wurden dabei die vorliegenden *Sirt6*-Allele sowie das *Flp*-Transgen (Abbildung 3.4(D)).

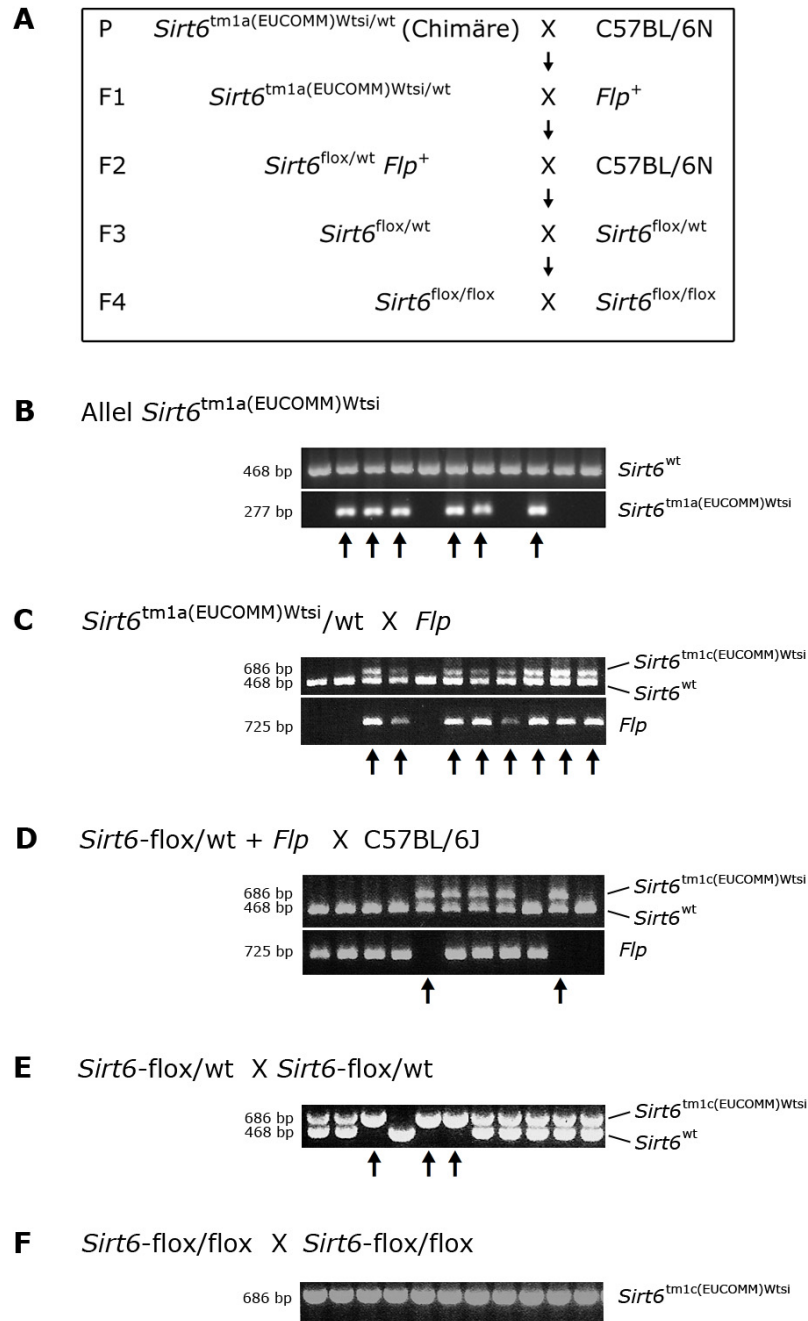


Abbildung 3.4: Genotypisierungen während verschiedener Zuchtschritte zur Erzeugung und Erhaltung des Allels *Sirt6*^{tm1c(EUCOMM)Wtsi} (*Sirt6*-flox).

A Kreuzungsschema zur Zucht von *Sirt6*^{flox/flox} Mäusen. **B** Beispiel für den Nachweis des Allels *Sirt6*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} in Nachkommen aus der Verpaarung chimärer Mäuse mit C57BL/6N Tieren. **C-F** Beispiele für Genotypisierungen aus den in der Abbildung benannten Verpaarungen nachfolgender Zuchtschritte. Es sind jeweils Spuren solcher Tiere mit Pfeilen markiert, die für den nachfolgenden Zuchtschritt als Elterntier in Frage kamen.

3.1.2.6. Erzeugung homozygoter *Sirt6*-flox/flox Tiere und weitere Zucht

Im folgenden Zuchtschritt wurden die Tiere des vorangegangenen Zuchtschritts untereinander verpaart:

$$Sirt6\text{-flox/wt} \quad X \quad Sirt6\text{-flox/wt}$$

Aus der Verpaarung resultieren folgende Genotypen:

$$\begin{array}{ll} Sirt6\text{-flox/flox} & (25\%, \text{ gewünschter Genotyp}) \\ Sirt6\text{-flox/wt} & (50\%) \\ Sirt6\text{-wt/wt} & (25\%) \end{array}$$

Der Genotyp der Nachkommen wurde mit DNA aus Schwanzbiopsien bestimmt (Abbildung 3.4(E)).

Tiere des gewünschten Genotyps konnten anschließend untereinander verpaart werden:

$$Sirt6\text{-flox/flox} \quad X \quad Sirt6\text{-flox/flox}$$

Aus dieser Zucht resultieren nur noch Tiere des Genotyps *Sirt6*^{flox/flox}, die nur noch zur Kontrolle im Abstand von ca. fünf Generationen durch Genotypisierung überprüft werden sollten (Abbildung 3.4(F)). Diese Zucht wurde auch nach Abschluss der vorangegangenen Zuchtschritte durch die ZVTE weitergeführt und erhalten. Nachkommen dieser Zucht wurden regelmäßig für die Generierung verschiedener konditionaler *Sirt6*-*knockout*-Stämme und dazu benötigten Rückkreuzungsschritte in den Tierraum unserer Arbeitsgruppe überstellt, wo die weiteren Verpaarungen mit verschiedenen *Cre*-Linien durchgeführt wurden.

3.1.2.7. Generierung verschiedener konditionaler *Sirt6-Knockout*-Stämme

3.1.2.7.1. Allgemeine Beschreibung des Vorgehens

Alle im Folgenden verpaarten Tiere besaßen den Stammhintergrund C57BL/6, sodass keine hintergrundbedingten Rückkreuzungen notwendig waren. Zudem lagen alle *Cre*-Gene in den Stämmen und Tieren jeweils nur heterozygot vor.

Alle Zuchtschritte wurden in den Tierräumen unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Drei verschiedene Verpaarungsschritte waren nötig, um Versuchstiere des Genotyps *Sirt6^{flox/flox}Cre* (Konditionaler Knockout) zu erhalten:

1. $Sirt6\text{-flox/flox}$ X $Cre^{+/-}$

Aus Schritt 1 resultieren folgende Genotypen:

$Sirt6\text{-flox/wt} + Cre^{+/-}$ (50 %, gewünschter Genotyp)

$Sirt6\text{-flox/wt}$ (50%)

2. $Sirt6\text{-flox/wt} + Cre^{+/-}$ X $Sirt6\text{-flox/flox}$

Aus Schritt 2 resultieren folgende Genotypen:

$Sirt6\text{-flox/flox} + Cre^{+/-}$ (25 %, gewünschter Genotyp)

$Sirt6\text{-flox/wt} + Cre^{+/-}$ (25 %, evtl. zur Erhaltung von Schritt 2)

$Sirt6\text{-flox/flox}$ (25 %, gewünschter Genotyp)

$Sirt6\text{-flox/wt}$ (25 %)

3. $Sirt6\text{-flox/flox} + Cre^{+/-}$ (♂) X $Sirt6\text{-flox/flox}$ (♀)

Aus Schritt 3 resultieren folgende Genotypen:

$Sirt6\text{-flox/flox} + Cre^{+/-}$ (50 %, gewünschter Genotyp)

$Sirt6\text{-flox/flox}$ (50 %, wildtypische Kontrolltiere)

Dieser Zuchtschritt ist der einzige, bei dem auf das Geschlecht der Elterntiere geachtet wurde, da der konditionale *Knockout* im Elterntier zu einem noch nicht bekannten Phänotyp führen könnte. *Sirt6^{flox/flox}Cre*-Tiere wurden daher nicht als Muttertiere verwendet, da die Fruchtbarkeit, die Embryogenese und die Entwick-

lung des Fötus durch einen Phänotyp der Mutter hätte beeinträchtigt werden können. Nachkommen aus Schritt 3 konnten sowohl zu dessen Erhaltung wie auch als Versuchstiere verwendet werden.

Die Nachkommen aus den Zuchtschritten 1 und 2 wurden auf die vorliegenden *Sirt6*-Allele (wt oder flox) sowie auf das jeweilige *Cre*-Gen genotypisiert. Bei den Nachkommen aus Zuchtschritt 3 war der Nachweis des *Cre*-Allels ausreichend, da nur Elterntiere mit dem Genotyp *Sirt6*-flox/flox verwendet wurden.

3.1.2.7.2. Hepatozyten-spezifischer *Knockout* von *Sirt6*

Mäuse mit dem Gen *AlbuminCre* („*AlbCre*“) des Stammes C57BL/6-Tg(*Alb-cre*)21Mgn/J wurden freundlicherweise von Dr. _____ zur Verfügung gestellt. Tiere mit Hepatozyten-spezifischem *Sirt6-Knockout* wurden wie im Abschnitt 3.1.2.7.1. allgemein beschrieben gezüchtet. Die Ergebnisse von Genotypisierungen während Zuchtschritte 1-3 sind exemplarisch in Abbildung 3.5 dargestellt.

Nachweis des *AlbuminCre*-vermittelten *Knockouts* von *Sirt6* in Hepatozyten

Der *Albumin*-Promotor wird zwar bereits früh im Embryo aktiviert (Stadium von 7-8 Somiten), jedoch ist eine vollständige Rekombination gefloxter Gene durch *AlbuminCre* erst ca. sechs Wochen nach der Geburt zu erwarten¹¹⁸. Zum Nachweis der Rekombination des *Sirt6*-flox-Allels (*Sirt6*^{tm1c(EUCOMM)Wtsi}) zum Allel *Sirt6*-tm1d wurden Hepatozyten aus einem *Sirt6*^{fl/fl}*AlbCre*-Tier und auch *Sirt6*^{fl/fl} (wildtypisches Geschwistertier) im Alter von sechs Wochen isoliert. Aus den gewonnenen Zellen wurden genomische DNA, Gesamt-RNA und Proteine isoliert, um die Rekombination des *Sirt6*-flox-Allels auf genomischer, transkriptioneller und translationaler Ebene nachzuweisen.

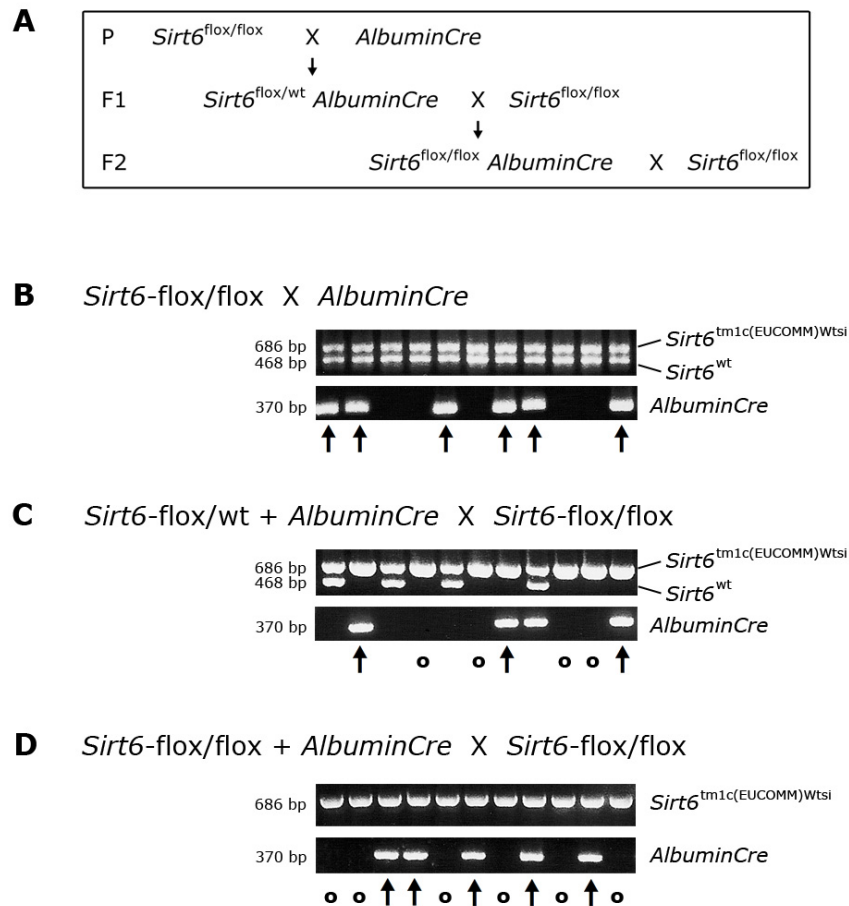


Abbildung 3.5: Genotypisierungen während verschiedener Zuchtschritte zur Erzeugung von Mäusen mit konditionalem *Sirt6*-Knockout in Hepatozyten im Stamm KO-*Sirt6*-EUCOMM X *AlbuminCre*.

A Kreuzungsschema zur Erzeugung von *Sirt6*^{flox/flox}*AlbCre* Mäusen. **B-D** zeigen Beispiele für Genotypisierungen bei verschiedenen in der Abbildung näher bezeichneten Zuchtschritten. Die Genotypisierungen wurden mittels PCR mit DNA aus Ohr- oder Schwanzbiopsien durchgeführt. Es sind jeweils Spuren solcher Tiere mit Pfeilen markiert, die für den nachfolgenden Zuchtschritt als Elterntier in Frage kamen (**B** und **C**) bzw. für Untersuchungen verwendet werden konnten (**C** und **D**). Mit einem Kreis (○) sind Tiere mit dem Genotyp *Sirt6*^{flox/flox} markiert, die als Zuchttiere und wildtypische Kontrollen bei Untersuchungen dienten.

Nachweis des *Sirt6*-tm1d-Allels in Tieren des Genotyps *Sirt6*^{flox/flox}*AlbCre*

Zunächst wurde genomische DNA aus murinen Hepatozyten isoliert, die DNA-Konzentrationen bestimmt und gleiche Mengen an DNA in PCR-Reaktionen eingesetzt. Wie bei einer konventionellen Genotypisierung wurde zunächst das Allel *Sirt6*-tm1c mit den Primern „both5’for“ und „wt3’rev“ nachgewiesen. In einer weiteren Reaktion wurde das Allel *AlbuminCre* mit den Primern „Cre-forward/-reverse“ amplifiziert. Ein Fragment

vom Allel *Sirt6*-tm1d kann mit den Primern „both5'for“ und „OrganKO Gen rev“ amplifiziert werden (siehe Abbildung 2.4).

Abbildung 3.6(A) zeigt, dass in beiden Proben ein Amplifikat vom Allel *Sirt6*-tm1c entstand, wobei die Menge an Amplifikat in Zellen mit dem Genotyp *Sirt6*^{flox/flox}*AlbCre* geringer erscheint. Nicht rekombiniertes *Sirt6*-tm1c in *Sirt6*^{flox/flox}*AlbCre*-Proben könnte aus einem Teil der Hepatozyten, aber auch aus anderen Zelltypen stammen, die mit den Hepatozyten aus der Leber isoliert wurden und in denen *AlbuminCre* nicht exprimiert wird. Wie erwartet, konnte *AlbuminCre* nur in *Sirt6*^{flox/flox}*AlbCre*-Proben nachgewiesen werden. Ein Amplifikat vom rekombinierten *Sirt6*-tm1d-Allel konnte nur in *Sirt6*^{flox/flox}*AlbCre*-Proben nachgewiesen werden. In *Sirt6*^{flox/flox}-Proben wurde sogar das sehr viel längere Amplifikat (2825 bp) vom nicht rekombinierten *Sirt6*-tm1c-Allel synthetisiert. Dass dieses in *Sirt6*^{flox/flox}*AlbCre*-Proben nicht synthetisiert wird, obwohl *Sirt6*-tm1c nachgewiesen werden kann, liegt womöglich an einer geringen Ausgangsmenge dieses Allels und einer großen Länge des Amplifikats. Die AlbuminCre-vermittelte Rekombination von *Sirt6*-tm1c zu *Sirt6*-tm1d in einer Maus des Genotyps *Sirt6*^{flox/flox}*AlbCre* konnte somit auf genomischer Ebene nachgewiesen werden.

Nachweis der verkürzten mRNA vom *Sirt6*-tm1d-Allel in Hepatozyten

Zunächst wurde Gesamt-RNA aus murinen Hepatozyten isoliert, die RNA-Konzentrationen bestimmt und gleiche Mengen an RNA für die cDNA-Synthese verwendet. Die Amplifikation vom jeweils exprimierten *Sirt6*-Transkript erfolgte mit dem Primerpaar „Ko-Sirt6-qPCR-f/-r“ (Abbildung 2.4). Die Länge des Amplifikats vom Transkript *Sirt6*-tm1c (wildtypisch) beträgt 643 bp, die Länge des Amplifikats von *Sirt6*-tm1d (durch Rekombination verkürzt) nur 223 bp.

Abbildung 3.6(B) zeigt, dass das Amplifikat der cDNA von *Sirt6*-tm1c deutlich in der *Sirt6*^{flox/flox}-Probe und nur sehr schwach in der *Sirt6*^{flox/flox}*AlbCre*-Probe nachzuweisen war. Nicht rekombiniertes *Sirt6*-tm1c in *Sirt6*^{flox/flox}*AlbCre*-Proben könnte aus einem Teil der Hepatozyten, aber auch aus anderen Zelltypen stammen, die mit den Hepatozyten aus der Leber isoliert wurden und in denen *AlbuminCre* nicht exprimiert wird. Eine durch Re-

kombination von *Sirt6*-tm1c zu *Sirt6*-tm1d entstandene verkürzte *Sirt6*-mRNA konnte nur in einer Maus des Genotyps *Sirt6*^{flx/flx}*AlbCre* nachgewiesen werden.

Nachweis des SIRT6-Proteins in Hepatozyten

Zunächst wurde Zellprotein aus murinen Hepatozyten isoliert. Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen SIRT6 getestet. Der verwendete polyklonale Antikörper („mSirt6pAb“) bindet an die Sequenz *N*-CHRPPKRVKTEAAPS-*C* im C-Terminus von SIRT6. Der polyklonale Antikörper wurde wie in Abschnitt 2.2.3.5. beschrieben selbst aus Kaninchen-Aniserum isoliert.

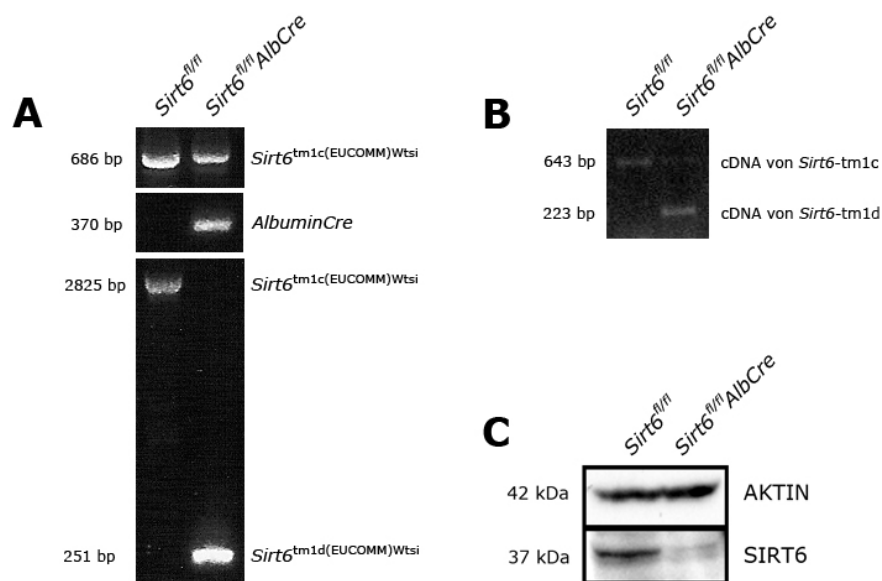


Abbildung 3.6: Nachweis der Rekombination von *Sirt6*-tm1c zu *Sirt6*-tm1d und des Verlusts von SIRT6 in Hepatozyten im Stamm KO-*Sirt6*-EUComm X *AlbuminCre*. Aus Tieren des Genotyps *Sirt6*^{fl/fl} bzw. *Sirt6*^{fl/fl}*AlbCre* wurden mittels Leberperfusion Hepatozyten isoliert. **A** Nach Isolation von genomischer DNA wurden die Allele *Sirt6*-tm1c, *AlbuminCre* und *Sirt6*-tm1d mittels PCR nachgewiesen. **B** Nach Isolation von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese wurde mittels PCR jeweils das von *Sirt6*-tm1c bzw. *Sirt6*-tm1d stammende Transkript nachgewiesen. **C** Nach Isolation von Zellproteinen wurden diese durch Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen SIRT6 analysiert. Als Ladekontrolle wurde AKTIN nachgewiesen.

In Abbildung 3.6(C) ist zu sehen, dass in den Hepatozyten aus der Maus des Genotyps *Sirt6*^{fl^{ox}/fl^{ox}}*AlbCre* im Vergleich zum wildtypischen Vergleichstier die Menge an SIRT6 sehr stark reduziert war. Die verbleibende Menge könnte aus Hepatozyten stammen, in denen *Sirt6*-tm1c noch nicht vollständig rekombiniert wurde, sowie aus anderen Zelltypen, die mit den Hepatozyten aus der Leber isoliert wurden und in denen *AlbuminCre* nicht exprimiert wird.

3.1.2.7.3. Adipozyten-spezifischer *Knockout* von *Sirt6*

Mäuse des Stammes *AdipoqCreER*^{T2} („*AtiCre*“) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt. Die Sequenz *AdipoqCreER*^{T2} codiert für ein Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und mutiertem Tamoxifen-reaktivem Östrogenrezeptor unter der Kontrolle des *Adipoq*-Promotors, der nur in differenzierten Adipozyten aktiviert wird¹¹². *AdipoqCreER*^{T2} wird zwar in allen differenzierten Adipozyten exprimiert, jedoch die Cre-Rekombinaseaktivität erst durch Verabreichung von Tamoxifen induziert. Tiere mit Adipozyten-spezifischem *Sirt6-Knockout* wurden wie im Abschnitt 3.1.2.7.1. allgemein beschrieben gezüchtet. Die Ergebnisse von Genotypisierungen während der Zuchtschritte 1-2 sind exemplarisch in Abbildung 3.7 dargestellt.

Induktion der Expression von *AdipoqCreER*^{T2} mit Tamoxifen und Nachweis des rekombinierten *Sirt6*-tm1d-Allels

Die Induzierbarkeit der Cre-Rekombinaseaktivität des Fusionsproteins *CreER*^{T2} und die erfolgreiche Rekombination von *Sirt6*-tm1c zu *Sirt6*-tm1d in Fettgewebe wurden an wenigen Tieren getestet. Hierzu wurden Mäuse im Alter von zwölf Wochen verwendet, von denen einem Tier des Genotyps *Sirt6*^{fl/fl}*AdipoqCreER*^{T2} an fünf aufeinanderfolgenden Tagen je 1 mg Tamoxifen intraperitoneal injiziert¹¹² wurde. Als Kontrollen wurden jeweils einem *Sirt6*^{fl/fl}-Tier (wildtypische Kontrolle) als auch einem *Sirt6*^{fl/fl}*AdipoqCreER*^{T2} (Induktionskontrolle) nur Lösemittel injiziert. Alle drei Tiere wurden 14 Tage nach der letzten

Injektion getötet und Fettgewebe aus dem Peritoneum sowie Fettgewebe unterhalb der Nieren entnommen. Aus dem Fettgewebe wurde genomische DNA isoliert und das Vorliegen der Allele *Sirt6*^{tm1d} sowie *Adipoq*CreER^{T2} mittels PCR nachgewiesen (verwendete Primer und Konditionen siehe Abbildungen 2.3 und 2.4).

Das Ergebnis der PCR-Analyse im Agarosegel ist in Abbildung 3.8 zu sehen.

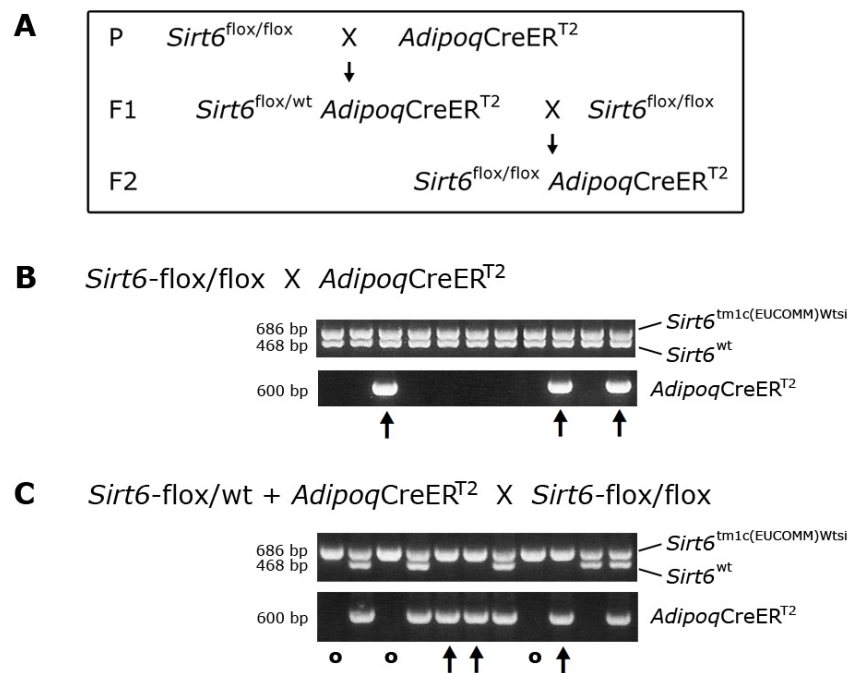


Abbildung 3.7: Zuchtschritte zur Erzeugung von Mäusen mit konditionalem *Sirt6*-Knockout in Adipozyten im Stamm KO-*Sirt6*-EUCOMM X *Adipoq*CreER^{T2}. **A** Kreuzungsschema zur Erzeugung von *Sirt6*^{flox/flox}*Adipoq*CreER^{T2} Mäusen. **B** und **C** zeigen Beispiele für Genotypisierungen bei verschiedenen in der Abbildung näher bezeichneten Zuchtschritten. Die Typisierungen wurden mittels PCR mit DNA aus Ohr- oder Schwanzbiopsien durchgeführt. Es sind jeweils Spuren solcher Tiere mit Pfeilen markiert, die für den nachfolgenden Zuchtschritt als Elterntier in Frage kamen (**B** und **C**) bzw. für Untersuchungen verwendet werden konnten (**C**). Mit einem Kreis (○) sind Tiere mit dem Genotyp *Sirt6*^{flox/flox} markiert, die als Zuchttiere und wildtypische Kontrollen bei Untersuchungen dienten.

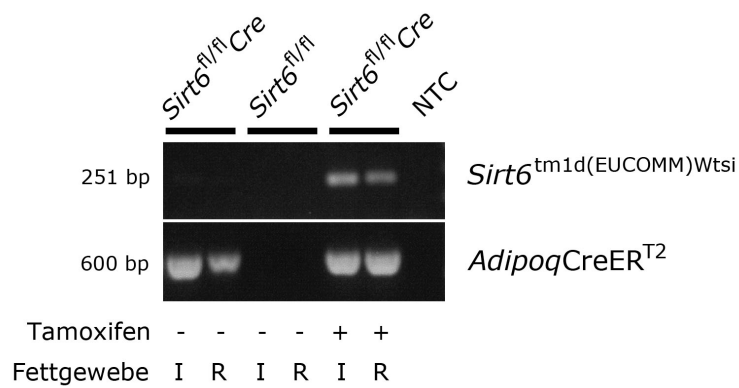


Abbildung 3.8: Adipozyten-spezifische, CreER^{T2}-vermittelte Rekombination von *Sirt6-tm1c* („*Sirt6-flox*“) zu *Sirt6-tm1d* in weißem Fettgewebe nach Induktion mit Tamoxifen.

Die Induzierbarkeit der Aktivität der Cre-Rekombinase wurde an einem Tier des Genotyps *Sirt6^{fl/fl}AdipoqCreER^{T2}* im Alter von zwölf Wochen getestet. An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurde je 1 mg Tamoxifen *i.p.* injiziert; Kontrolltieren wurde das entsprechende Injektionsvolumen an Lösemittel verabreicht. 14 Tage nach der letzten Injektion wurde den Tieren weißes Fettgewebe aus dem Peritoneum (I) und unterhalb der Nieren (R) entnommen, DNA isoliert und die Allele *Sirt6-tm1d* sowie *AdipoqCreER^{T2}* mittels PCR nachgewiesen. I = intraperitoneal, R = retroperitoneal.

Das Allel *Sirt6-tm1d* kann zwar auch in sehr geringem Maße in dem *Sirt6^{fl/fl}AdipoqCreER^{T2}*-Tier nachgewiesen werden, das nicht mit Tamoxifen induziert wurde, jedoch ist der Nachweis im induzierten Tier sehr viel deutlicher. Dies lässt auf nur geringe basale Aktivität von CreER^{T2} im Fettgewebe schließen. Wie erwartet, waren beide Allele im *Sirt6^{fl/fl}*-Tier nicht nachweisbar.

3.2. Allgemeine phänotypische Merkmale *Sirt6*-defizienter Mäuse

Mäuse mit konstitutivem *Sirt6-Knockout* weisen einen Phänotyp mit vielen Hinweisen auf eine Deregulation in Stoffwechselprozessen auf. Dazu gehören vermindertes Wachstum, Verlust von Unterhautfett und ein verringerter Blutglukosespiegel⁶. Die geringere Körpergröße von *Sirt6*^{ko} Tieren (siehe Abbildung 1.3) ging einher mit einem gegenüber wildtypischen Tieren gleichen Alters etwa um die Hälfte reduziertem Körpergewicht (Abbildung 3.9).

Eine vergleichende Analyse von Blutbildern von jeweils drei Mäusen zeigte nur zwei Parameter, in denen signifikante Unterschiede zwischen *Sirt6*^{ko} und wildtypischen Tieren zu erkennen waren. Zum einen zeigten *Sirt6*^{ko} Tiere eine leicht erhöhte Anzahl an Leukozyten (Abb. 3.10(A)), wobei jedoch alle gemessenen Werte innerhalb des Normalbereichs lagen. Zum anderen zeigten *Sirt6*^{ko}-Tiere deutlich verringerte Hämoglobin (Hb)-Werte, die im Gegensatz zu den Werten wildtypischer Tiere alle unterhalb des Normalbereichs lagen, was auf eine Anämie bei *Sirt6*-Defizienz hindeutet (Abb.3.10(B)).

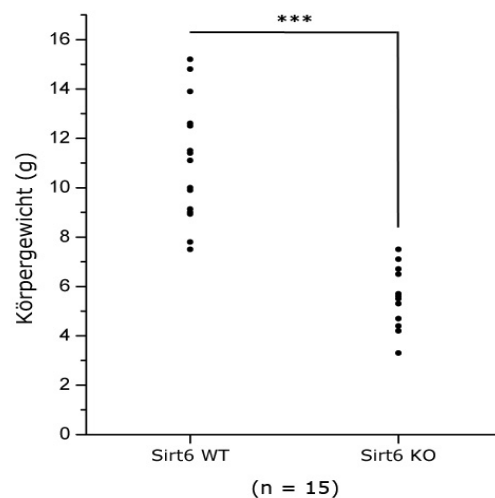


Abbildung 3.9: Vergleich des Körpergewichts von jeweils 15 *Sirt6*^{wt} und *Sirt6*^{ko} Tieren des Stammes KO-*Sirt6*-Fwa. Das Gewicht von *Sirt6*^{ko}-Tieren liegt bei nur der Hälfte des Gewichts von wildtypischen Tieren ($5,4 \pm 1,1$ g gegenüber $11,0 \pm 2,3$ g). Die statistische Signifikanz wurde mittels Student t-Test bestimmt; $***p < 0,001$.

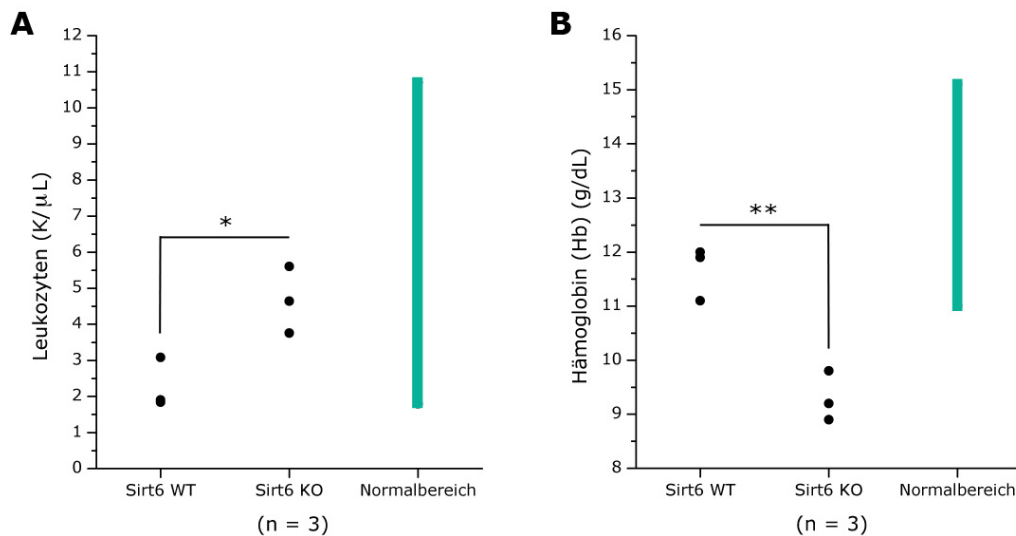


Abbildung 3.10: Unterschiede im Blutbild von $Sirt6^{wt}$ und $Sirt6^{ko}$ Mäusen des Stammes KO- $Sirt6$ -Fwa. Für jeden Genotyp wurde mit Vollblut aus je drei Tieren im Alter von 21 Tagen ein Blutbild erstellt. Bei zwei Parametern wurden signifikante Unterschiede zwischen wildtypischen und $Sirt6$ -defizienten Tieren gefunden: in der Anzahl der Leukozyten (A) und beim Hb-Wert (B). Der Normalbereich ist jeweils mit einem grünen Balken dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student t-Test bestimmt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.3. Untersuchung der Rolle von SIRT6 im Stoffwechsel von Mäusen mit $Sirt6$ -Defizienz

Das Hauptaugenmerk der hier durchgeführten Untersuchungen lag auf der Leber und der Charakterisierung ihrer Funktion in Abhängigkeit von SIRT6. Die Leber spielt als zentrales metabolisches Organ eine entscheidende Rolle im Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel des gesamten Organismus.

Bei der histologischen Untersuchung der Leber von Mäusen mit konstitutivem $Sirt6$ -Knockout ($Sirt6^{ko}$) konnte eine vermehrte Einlagerung von Lipiden und damit eine beginnende Fettleber bereits im Alter von drei Wochen beobachtet werden (Abbildung 3.11(A)). Ein stark verminderter Blutzuckerspiegel in Mäusen dieses Genotyps konnte ebenfalls bestätigt werden (Abbildung 3.11(B)).

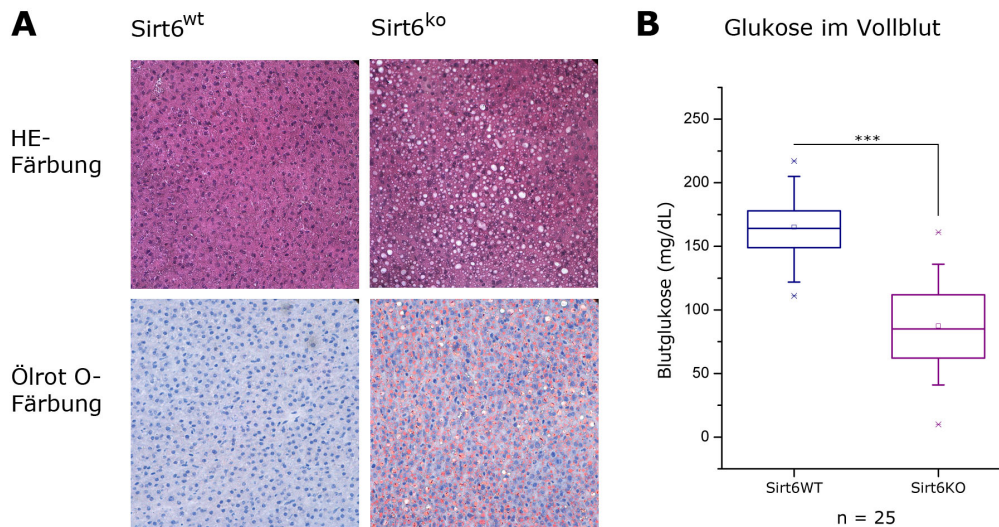


Abbildung 3.11: Unterschiede in der Fetteinlagerung der Leber und im Blutglukosespiegel in Sirt6^{wt} und Sirt6^{ko} Mäusen des Stammes KO-Sirt6-Fwa. **A** Leberschnitte aus 21 Tage alten Mäusen wurden mit HE- und Ölrot O-Färbungen analysiert. **B** Der Blutzucker aus Vollblut wurde in jeweils 25 Sirt6^{wt} und Sirt6^{ko} Tieren im Alter von etwa 21 Tagen gemessen. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student t-Test bestimmt; ***p<0,001.

3.3.1. Metabolische Analyse in Hepatozyten aus Mäusen mit konstitutivem *Sirt6-Knockout*

Um die Eigenschaften des Hepatozytenstoffwechsels in Sirt6^{ko}-Mäusen genauer zu charakterisieren, wurden durch Leberperfusion isolierte Hepatozyten einigen metabolischen Untersuchungen unterzogen. Die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (*Oxygen Consumption Rate*, OCR) sowie die der extrazellulären Azidifizierungsrate (*Extracellular Acidification Rate*, ECAR) sind nützliche Parameter, um die Glykolyserate und bioenergetische Funktion des Mitochondrienstoffwechsels verschiedener Zellen zu untersuchen¹¹⁹.

Die Messung von OCR und ECAR wurden von Dr. [Name] in der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. rer. nat. [Name] (Institut für Pathophysiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt. Dazu wurden uns Zellkulturplatten zur Verfügung gestellt, die vor dem Aussäen der primären Hepatozyten noch mit Kol-

lagen beschichtet wurden, um ein ideales Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Die Messung erfolgte in einem XF Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). Alle verwendeten Medien und Substanzen wurden ebenfalls von Dr. zur Verfügung gestellt. Die Messung von OCR und ECAR von unbehandelten Zellen wurden in drei unabhängigen Versuchen in gleicher Weise durchgeführt. In Abbildung 3.12 ist ein repräsentatives Ergebnis gezeigt. Die Normalisierung der Messwerte auf die Zellzahl erfolgte mit Janus Green.

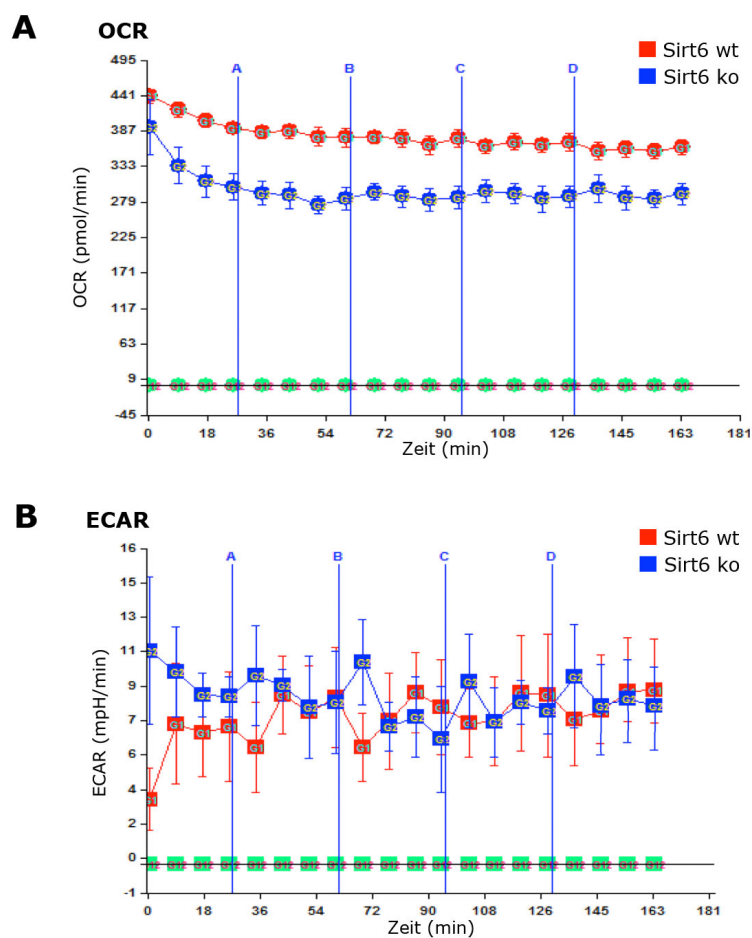


Abbildung 3.12: Metabolische Analyse in Hepatozyten aus $Sirt6^{wt}$ und $Sirt6^{ko}$ Mäusen. $Sirt6^{wt}$ (+/+) und $Sirt6^{ko}$ (-/-) Hepatozyten aus Mäusen des Stammes KO- $Sirt6$ -Fwa wurden metabolischen Untersuchungen unterzogen. **A** Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate, OCR). **B** Messung der extrazellulären Azidifizierungsrate (Extracellular Acidification Rate, ECAR). Messpunkte der $Sirt6^{wt}$ Zellen sind in rot dargestellt, die der $Sirt6^{ko}$ Zellen jeweils in blau. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert aus zwei gemessenen Wells. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

In Abbildung 3.12(A) ist zu sehen, dass die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) in *Sirt6*^{wt} (+/+) Hepatozyten bei etwa 400 pmol/min lag, die der *Sirt6*^{ko} (-/-) Zellen jedoch nur bei etwa 300 pmol/min. Dies entspricht einem um ca. 25 % reduzierten Sauerstoffverbrauch in *Sirt6*^{ko} Hepatozyten gegenüber dem Wildtyp. Abbildung 3.12(B) zeigt die Messung der ECAR im selben Versuchsansatz. Beide Zelltypen zeigten hier sehr niedrige Werte, die nah an der Detektionsgrenze des Analysegeräts lagen. Ein Unterschied in der ECAR von *Sirt6*^{wt} und *Sirt6*^{ko} Zellen war in diesem Versuchsansatz nicht zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass beide Zelltypen den Großteil des in der Glykolyse entstandenen Pyruvats zu Acetyl-CoA abbauten und nur wenig zu Laktat reduziert wurde.

In weiteren Versuchsansätzen wurde untersucht, inwiefern sich die Parameter OCR und ECAR in Hepatozyten mit konstitutivem *Sirt6-Knockout* durch verschiedene Substanzen beeinflussen lassen. Dabei kamen 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP), 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) und Rotenon (Rot) zum Einsatz, deren Wirkweisen schematisch in Abbildung 3.13 dargestellt sind.

2,4-DNP wirkt als Entkoppler der Oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, indem es Protonen aus dem Intermembranraum in die Mitochondrienmatrix schleust. Die im Protonengradienten gespeicherte Energie geht als Wärme verloren und kann somit nicht mehr zur Synthese von ATP verwendet werden. Da weiterhin Elektronen über die Proteinkomplexe der Atmungskette übertragen werden, wird O₂ unvermindert zu H₂O reduziert. Um trotzdem genügend Energie in Form von ATP produzieren zu können, beschleunigt sich der Zellstoffwechsel durch eine Steigerung der Glykolyserate und die Sauerstoffverbrauchsrate steigt, da nun noch mehr Elektronen über die Atmungskette übertragen werden müssen.

2-DG ist ein Analogon der Glukose. Es wird vom Enzym Hexokinase zwar in Deoxyglukose-6-phosphat überführt, dieses kann aber nur in geringen Mengen von der Phosphoglukoisomerase umgesetzt werden, die in Folge kompetitiv gehemmt wird. Es kommt zu einer Hemmung der Glykolyse.

Rotenon inhibiert Komplex I der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran, was zu einer Blockade der Elektronenübertragung führt. In der Folge können Reduktionsäquivalente aus dem Citratzyklus nicht mehr oxidiert werden. Eine Aufrechterhaltung

des Protonengradienten und damit die ATP-Produktion werden verhindert und der Stoffwechsel kommt zum Erliegen.

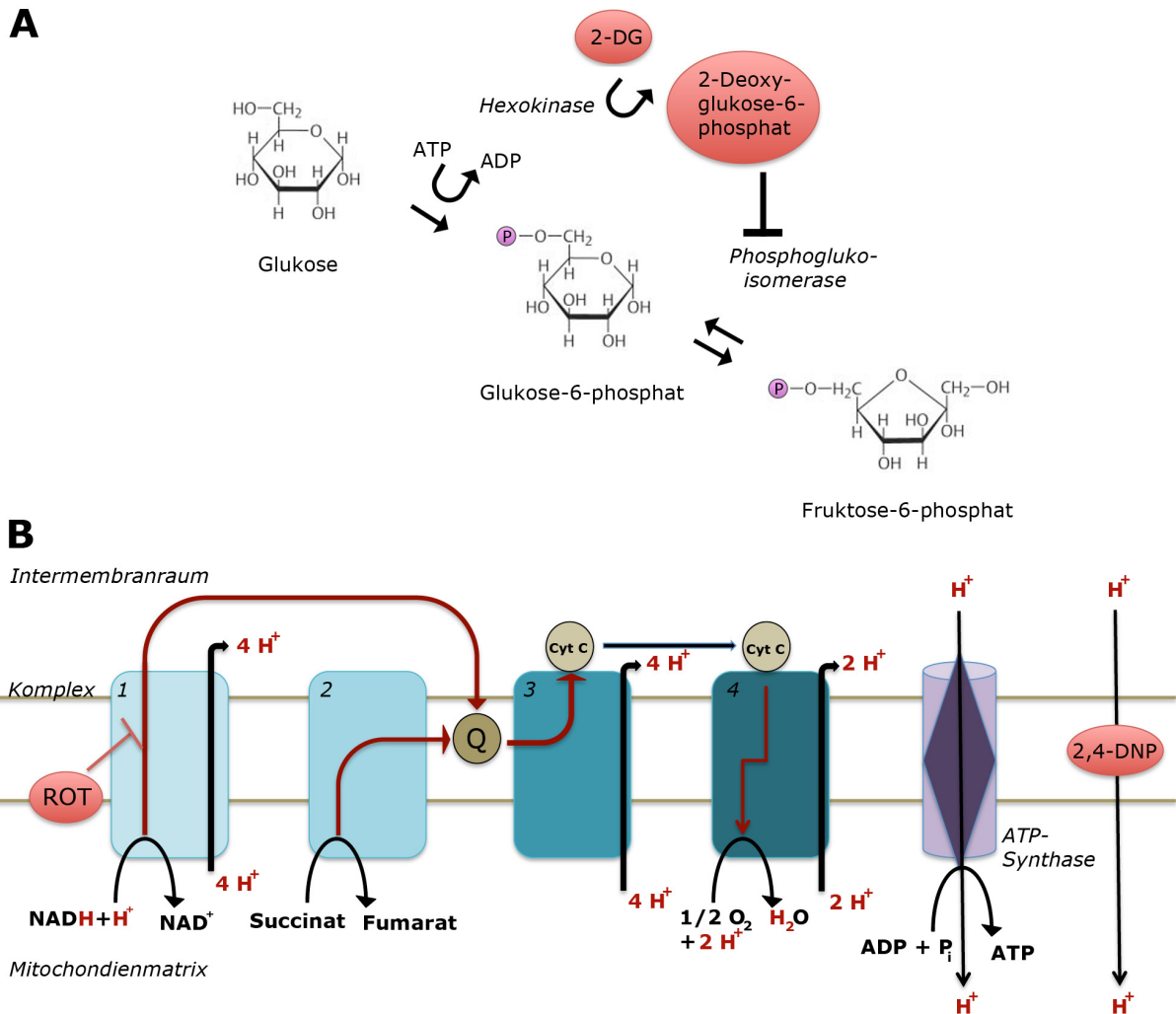


Abbildung 3.13: Wirkungsmechanismen der Inhibitoren 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG), 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) und Rotenon (ROT).

A zeigt die ersten beiden Schritte der Glykolyse. 2-DG wird vom Enzym Hexokinase in 2-Deoxyglukose-6-phosphat umgewandelt, das die Phosphoglukoisomerase kompetitiv hemmt. **B** zeigt eine schematische Darstellung der Atmungskette. ROT inhibiert den Elektronentransport an Komplex 1; 2,4-DNP schleust Protonen aus dem Intermembranraum in die Mitochondrienmatrix und entkoppelt so die oxidative Phosphorylierung vom Elektronentransport. Rote Pfeile zeigen den Weg der Elektronen; Q = Coenzym Q (Ubichinon); Cyt C = Cytochrom C.

Abbildung 3.14 zeigt die Beeinflussung der OCR mit 2,4-DNP. Teil 3.14(A) zeigt die wildtypischen, Teil 3.14(B) die *Sirt6*^{ko} Hepatozyten. Zum besseren Vergleich ist die OCR in Prozent angegeben; die vierte Messung vor der ersten 2,4-DNP-Zugabe wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Die rote (3.14(A)) bzw. blaue (3.14(B)) Messreihe zeigt jeweils die unbehandelten Zellen analog zu Abbildung 3.12(A).

In Abbildung 3.14(A) zeigt die magentafarbene Linie die Beeinflussung der OCR wildtypischer Hepatozyten durch eine schrittweise Konzentrationserhöhung von 2,4-DNP auf 10, 20, 50 und schließlich 100 μ M. Die OCR stieg bei den jeweiligen 2,4-DNP-Injektionen auf etwa 120, 135, 160 und 180 % des Ausgangswertes an, was einer maximalen OCR von etwa 720 pmol/min bei der höchsten 2,4-DNP-Konzentration entspricht. Bei *Sirt6*^{ko} Hepatozyten (Abbildung 3.14(B), braune Messreihe) stieg die OCR bei den selben 2,4-DNP-Konzentrationen auf 110, 115, 140 und 150 % des Ausgangswertes an, was einer maximalen OCR von 450 pmol/min entspricht. Der höchste erreichte OCR-Wert der *Sirt6*^{ko} Hepatozyten überstieg damit nur knapp den Grundverbrauch der wildtypischen Hepatozyten von etwa 400 pmol/min (siehe Abbildung 3.12(A)).

Die Sauerstoffverbrauchsrate sowohl der wildtypischen als auch der *Sirt6-Knockout* Hepatozyten ließ sich mit 2,4-DNP beeinflussen, allerdings die der *Sirt6*^{ko} Hepatozyten in einem geringeren Maß. Die maximal erreichte OCR der *Sirt6-Knockout* Hepatozyten lag bei nur 62,5 % der entsprechenden Rate der wildtypischen Zellen. Die Zugabe von Rotenon bewirkte in beiden Zelltypen einen sofortigen Abfall der OCR auf etwa 50 % des jeweiligen Ausgangswertes.

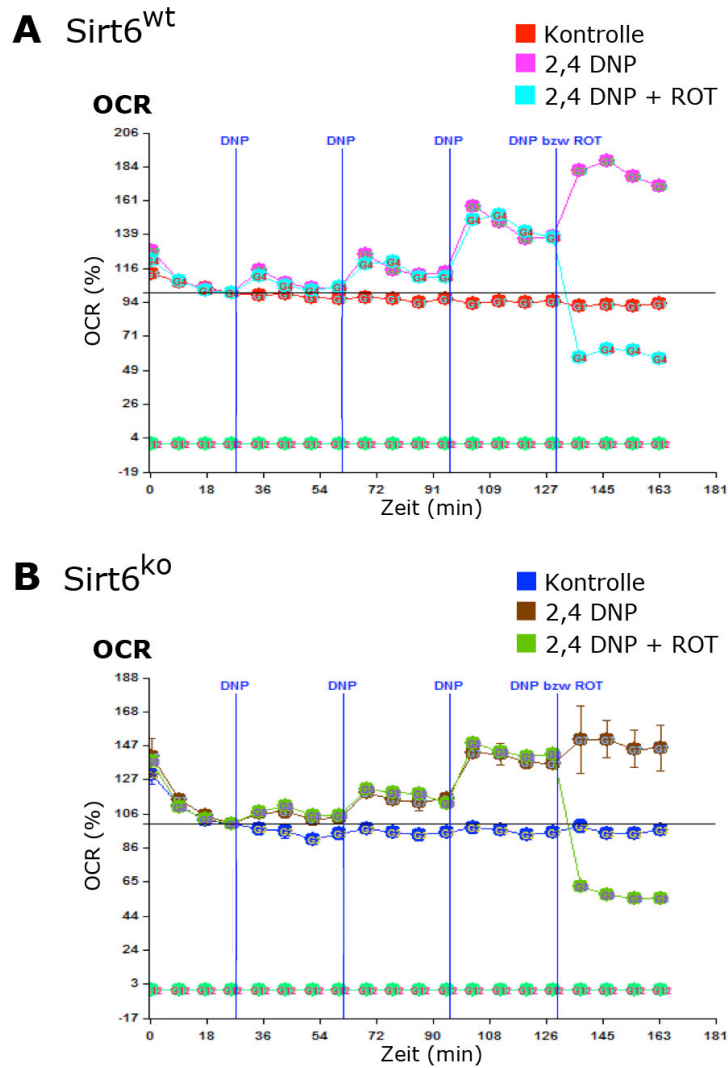


Abbildung 3.14: Beeinflussung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) mit 2,4-Dinitrophenol. In **A** $Sirt6^{wt}$ (+/+) **B** $Sirt6^{ko}$ (-/-) Hepatozyten wurde zur Entkoppelung der Oxidativen Phosphorylierung die Substanz 2,4-Dinitrophenol (DNP) an vier Zeitpunkten während der Messung dem Medium zugesetzt und die Konzentration schrittweise von 0 auf 10, 20, 50 und schließlich 100 μM 2,4-DNP erhöht. In einer weiteren Messreihe wurde jeweils im 4. Injektionsschritt Rotenon (ROT) mit einer Endkonzentration von 10 μM zugesetzt, um die Atmungskette am Membrankomplex I zu inhibieren. Der 4. Messwert vor der 1. Injektion jeder Messreihe wurde jeweils auf 100 % gesetzt.

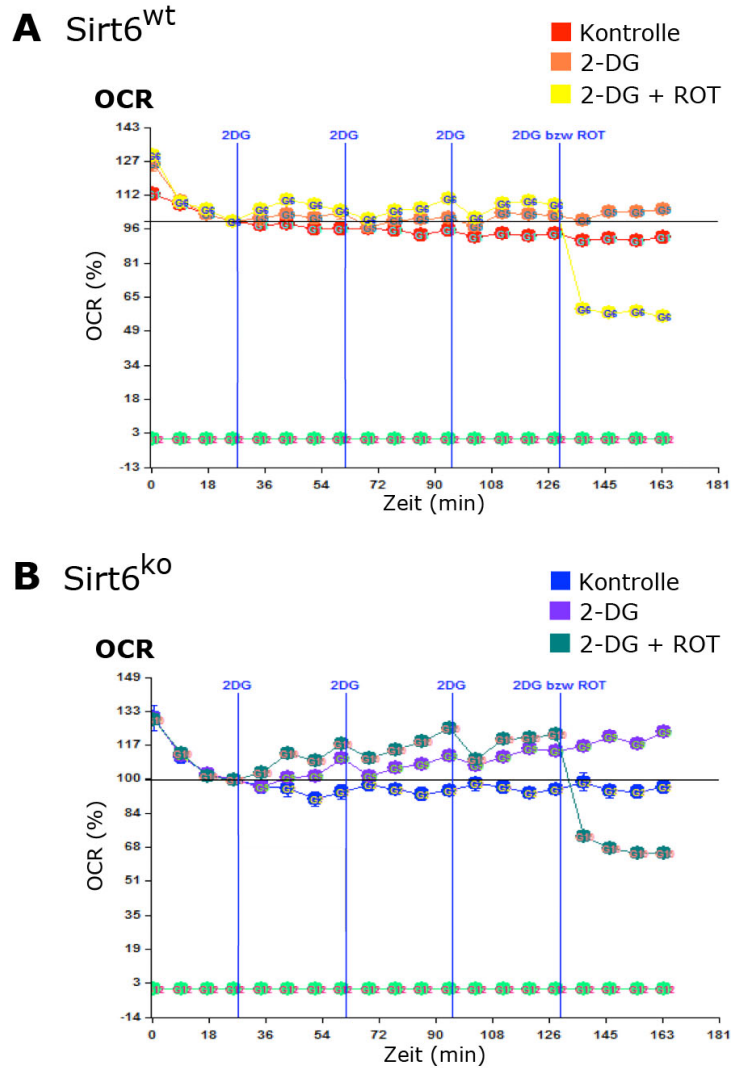


Abbildung 3.15: Beeinflussung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) mit 2-Deoxy-D-Glukose. In **A** $Sirt6^{wt}$ (+/+) **B** $Sirt6^{ko}$ (-/-) Hepatozyten wurde zur Hemmung der Glykolyse die Substanz 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) an vier Zeitpunkten während der Messung dem Medium zugesetzt und die Konzentration schrittweise von 0 auf 10, 20, 40 und schließlich 80 μM 2-DG erhöht. In einer weiteren Messreihe wurde jeweils im 4. Injektionsschritt Rotenon (ROT) mit einer Endkonzentration von 10 μM zugesetzt, um die Atmungskette am Membrankomplex I zu inhibieren. Der 4. Messwert vor der 1. Injektion jeder Messreihe wurde jeweils auf 100 % gesetzt.

Abbildung 3.15 zeigt die Beeinflussung der OCR mit 2-DG. Teil 3.15(A) zeigt die Ergebnisse der wildtypischen, Teil 3.15(B) die der $Sirt6^{ko}$ Hepatozyten. Zum besseren Vergleich ist die OCR in Prozent angegeben; die vierte Messung vor der ersten 2-DG-Zugabe wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Die rote (3.15(A)) bzw. blaue (3.15(B)) Messreihe zeigt jeweils

die unbehandelten Zellen analog zu Abbildung 3.12(A). In Abbildung 3.15(A) zeigt die orangefarbene Linie die Beeinflussung der OCR wildtypischer Hepatozyten durch eine schrittweise Konzentrationserhöhung von 2-DG auf 10, 20, 40 und schließlich 80 μM . Die OCR der wildtypischen Zellen stieg insgesamt nur schwach an und der höchste erreichte Wert lag bei etwa 105-110 % des Grundverbrauchs. Die Ergebnisse für die *Sirt6*^{ko} Hepatozyten sind in Abbildung 3.15(B) gezeigt. Die lilafarbene Messreihe zeigt einen Anstieg der OCR unter Einfluss von 2-DG auf maximal 125 % des Ausgangswertes. Rotenon führte wie auch schon im Versuch mit 2,4-DNP zu einem sofortigen Abfall der OCR auf etwa 50 % des jeweiligen Ausgangswertes. Im Versuch mit 2-DG wurde parallel die ECAR gemessen, es konnte jedoch weder bei wildtypischen noch bei *Sirt6-knockout* Hepatozyten eine Beeinflussung der Azidifizierungsrate durch Behandlung mit 2-DG detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

In *Sirt6*^{ko} Hepatozyten ließ sich die Sauerstoffverbrauchsrate durch Entkoppelung des Elektronentransports von der oxidativen Phosphorylierung mit 2,4-DNP weniger stark beeinflussen als in wildtypische Zellen (Abbildung 3.14). Durch die Inhibition der Glykolyse mit 2-DG wurde die OCR in *Sirt6*^{ko} Zellen jedoch etwas stärker beeinflusst als in wildtypischen Zellen, die Sauerstoffverbrauchsrate stieg im Vergleich zu wildtypischen Zellen zu einem größeren Prozentsatz an (Abbildung 3.15). Ob dieser Unterschied signifikant ist, müsste noch durch Wiederholung des Versuchs bestätigt werden. Das vorliegende Ergebnis deutet jedoch auf verschiedenen starke Abhängigkeiten von einzelnen Abschnitten des Glukosestoffwechsels bzw. deren Steigerungskapazitäten in den beiden untersuchten Zelltypen.

3.3.2. Untersuchung der Aufnahme von Glukose durch Hepatozyten aus Mäusen mit konstitutivem *Sirt6-Knockout*

Die in Abschnitt 1.3.1. beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass Hepatozyten aus *Sirt6*^{ko} Mäusen einen um 25 % reduzierten Sauerstoffverbrauch gegenüber *Sirt6*^{wt} Hepatozyten aufwiesen. Eine Ansäuerung des Mediums, die durch eine mögliche gesteigerte Milchsäu-

regärung in *Sirt6^{ko}* Zellen stattfinden könnte, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass auch in *Sirt6^{ko}* Hepatozyten die aufgenommene Glukose vollständig zu Acetyl-CoA abgebaut wurde.

Es sollte nun untersucht werden, ob der niedrigere Sauerstoffverbrauch von *Sirt6^{ko}* Hepatozyten durch eine geringere Menge an aufgenommener und damit oxidierbarer Glukose bedingt ist. Die Glukoseaufnahme wurde zu diesem Zweck durch die Messung der Aufnahme des fluoreszierenden Glukoseanalogons 2-NBDG durchflusszytometrisch untersucht.

Frisch isolierte Hepatozyten aus einer *Sirt6^{ko}* Maus und einem wildtypischen Geschwister-tier wurden in glukosefreiem pmHep-Medium mit 100 μ M 2-NBDG für 30 Min. bei 37 °C inkubiert und dann fixiert (t = 30 Min.). Kontrollen wurden sofort nach Zugabe von 2-NBDG fixiert (t = 0 Min.).

Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung ist in Abbildung 3.16 gezeigt; alle im Folgenden genannten Werte wurden über den Wert des Medians berechnet: Zunächst wurden die lebenden Zellen zur weiteren Analyse ausgewählt (P1 in Teil A). Bereits ein Vergleich der Größe der Kontrollzellen im *Forward Scatter* (Teil B) zeigt, dass sich das Volumen der Hepatozyten zwischen den Genotypen unterschied und das mittlere Volumen von *Sirt6^{ko}* Zellen um etwa 18 % unter dem von wildtypischen Zellen lag. Durch Aufnahme von 2-NBDG nahm die mittlere Größe wildtypischer Zellen um etwa 15 % zu (Teil B, links), die Größe von *Sirt6^{ko}* Zellen jedoch nur um etwa 8 % (Teil B, rechts). Die Fluoreszenz durch Aufnahme von 2-NBDG stieg bei wildtypischen Zellen etwa 2,3-fach, bei *Sirt6^{ko}* Zellen nur etwa 2-fach an (Teil C). Dieses Ergebnis zeigt einerseits, dass ein grundlegender Größenunterschied zwischen Hepatozyten aus *Sirt6^{wt}* und *Sirt6^{ko}* Mäusen bestand und dass auch die Größenzunahme durch Aufnahme von 2-NBDG sich zwischen den Zellen unterschied, was auf eine schwächere Aufnahme von 2-NBDG in *Sirt6^{ko}* Hepatozyten im Vergleich zu wildtypischen Zellen hindeutet. Diese Schlussfolgerung wurde ebenfalls durch die prozentuale Zunahme der Fluoreszenz bestätigt.

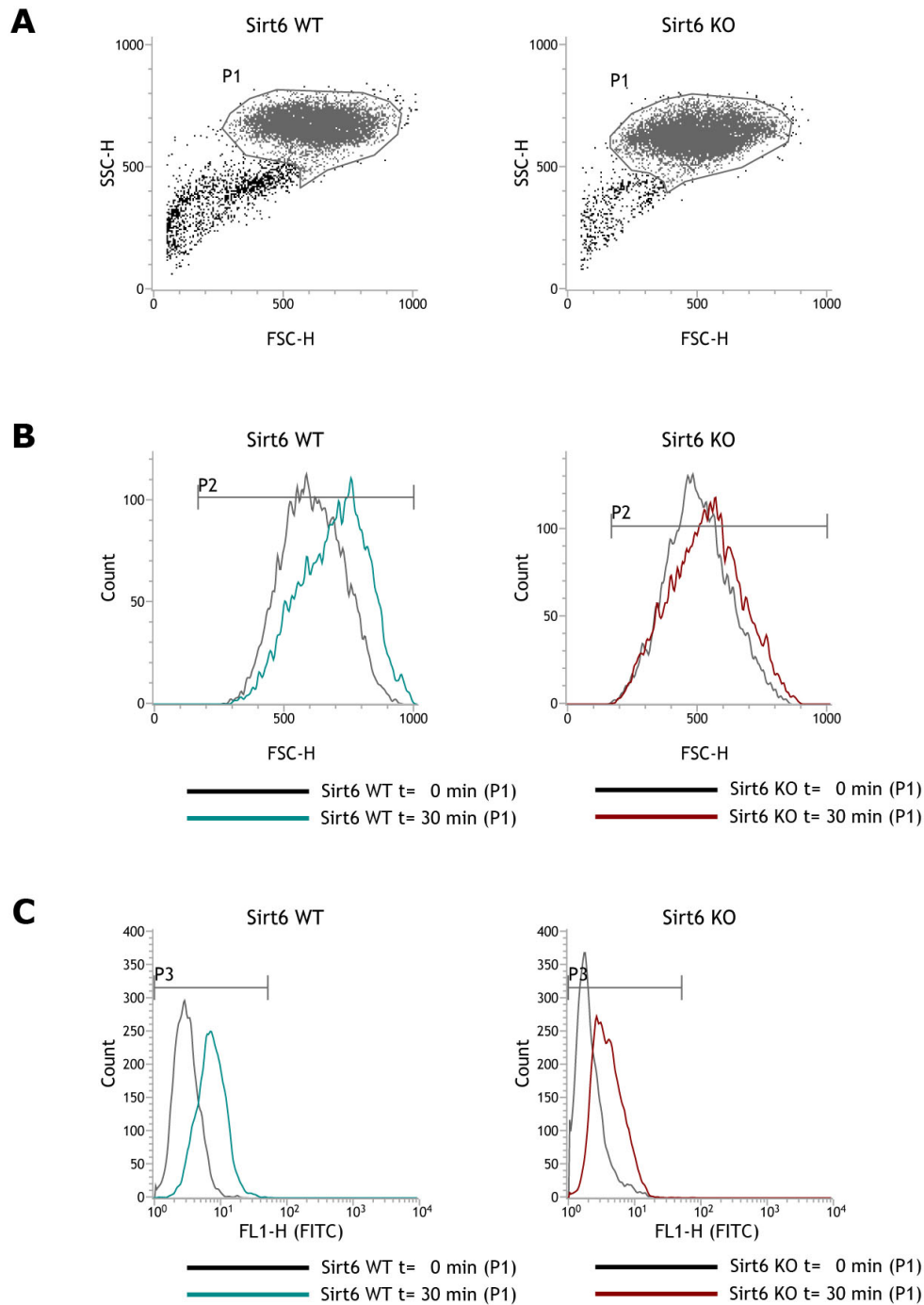


Abbildung 3.16: Messung der Aufnahme des Glukoseanalogons 2-NBDG in Hepatozyten aus Sirt6^{wt} und Sirt6^{ko} Mäusen mittels FACS. Hepatozyten wurden direkt nach der Isolation in pmHep-Medium ohne Glukose aufgenommen. Nach der Zugabe von 100 μ M 2-NBDG wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert und dann fixiert (t = 30 min); Kontrollzellen wurden sofort nach Zugabe von 2-NBDG fixiert (t = 0 min). Die Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigt die Größe und Granularität der Zellen im Dotplot, aus der Population 1 (P1) zur weiteren Untersuchung ausgewählt wurde (**A**), die Größe der Zellpopulationen im Histogramm des *Forward Scatters* (FSC) (**B**) und die Veränderung in der Fluoreszenz in Histogrammen (**C**).

Im Zusammenhang mit der Untersuchung des Blutglukosespiegels und der Aufnahme von Glukose in Hepatozyten von Mäusen mit konstitutivem *Sirt6-Knockout* wurde auch die Phosphorylierung von Proteinkinase B (PKB)/Akt untersucht, da dieser Faktor eine zentrale Rolle im Insulin-Signalweg und in der Glukosehomöostase spielt. Zu diesem Zweck wurde aus frisch isolierten Hepatozyten aus *Sirt6^{wt}* und *Sirt6^{ko}* Geschwistertieren Gesamtprotein isoliert und mittels Western Blot auf phosphoryliertes Akt (Serin 473) hin untersucht. Als Ladekontrolle diente die Gesamtmenge an Akt. Abbildung 3.17 zeigt, dass in Abwesenheit von SIRT6 eine gegenüber den wildtypischen Hepatozyten stärkere Phosphorylierung von Akt (Ser473) festgestellt werden konnte. Sowohl die Ursache der gesteigerten Phosphorylierung von Akt in Abwesenheit von SIRT6 als auch die Auswirkungen auf zellulärer Ebene und auf der Ebene des gesamten Organismus müssen in weiteren Untersuchungen näher charakterisiert werden.

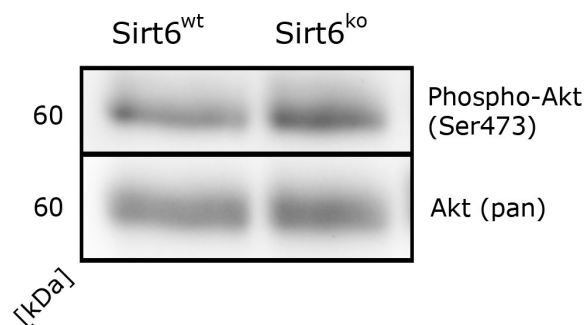


Abbildung 3.17: Untersuchung der Phosphorylierung von PKB/Akt in Hepatozyten aus *Sirt6^{wt}* und *Sirt6^{ko}* Mäusen. Zellextrakte aus Hepatozyten wurden mittels Western Blot auf die Menge von Phospho-Akt (Serin 473) und Gesamtmenge von Akt hin untersucht.

3.3.3. Untersuchung des Phänotyps von Mäusen mit leberspezifischem *Sirt6-Knockout*

Im Vergleich zu Mäusen mit konstitutivem *Sirt6-Knockout* zeigten die in dieser Arbeit untersuchten Tiere mit hepatozytenspezifischem Verlust von *Sirt6* keine offensichtlichen

äußerlichen Auffälligkeiten, weder in der Körpergröße, Agilität oder erreichtem Lebensalter.

Zur allgemeinen Charakterisierung wurden sowohl das Körpergewicht (Abbildung 3.18) als auch der Blutglukosespiegel (Abbildung 3.19) in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht in *Sirt6^{fl/fl}* („Sirt6 WT“) bzw. *Sirt6^{fl/fl}AlbCre* („Sirt6 AlbCre“) Tieren analysiert. Abbildung 3.18 zeigt, dass sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren beider Genotypen das Gewicht bis zu einem Alter von 30–40 Wochen regelmäßig anstieg und dann im Allgemeinen konstant blieb; die Streuung der individuellen Körpergewichtswerte stieg mit dem Alter jedoch an. Mit Ausnahme der ältesten Männchen aller untersuchten Tiere war kein Unterschied beim Körpergewicht zwischen wildtypischen Tieren und solchen mit hepatozytenspezifischem *Knockout* von *Sirt6* zu beobachten. Bei Männchen im Alter von 72 Wochen zeigten *Sirt6^{fl/fl}AlbCre*-Tiere jedoch ein signifikant niedrigeres Körpergewicht (Abbildung 3.18(A) rechts) als wildtypische Männchen.

Die Blutglukosewerte zeigen, zumindest bezogen auf die Werte der Weibchen, eine stärkere Streuung der individuellen Werte mit steigendem Lebensalter (Abbildung 3.19(B)). Auch hier zeigten die Männchen im Alter von 72 Wochen einen signifikant niedrigeren Blutglukosespiegel verglichen mit gleichaltrigen wildtypischen Individuen des selben Geschlechts (Abbildung 3.19(A) rechts), ähnlich wie beim Körpergewicht. Ansonsten waren keine Unterschiede bei Werten des Blutglukosepiegels in Abhängigkeit vom hepatozytenspezifischen *Sirt6-Knockout* zu beobachten.

3.4. Untersuchungen verschiedener Immunreaktionen in Mäusen mit konstitutivem *Sirt6-Knockout*

Mäuse mit konstitutivem *Sirt6-Knockout* zeigen Anzeichen möglicher Fehlfunktionen in der Regulation der Immunantwort. So ist auf zellulärer Ebene beispielsweise eine erhöhte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, der maßgeblich an der Regulation von Entzündungs- und Alterungsprozessen beteiligt ist, in Abwesenheit von SIRT6 zu beobachten²⁷. Phänotypisch zeigt sich eine Kolitis, die durch die Erosion von Darmepithel gekennzeichnet ist⁶.

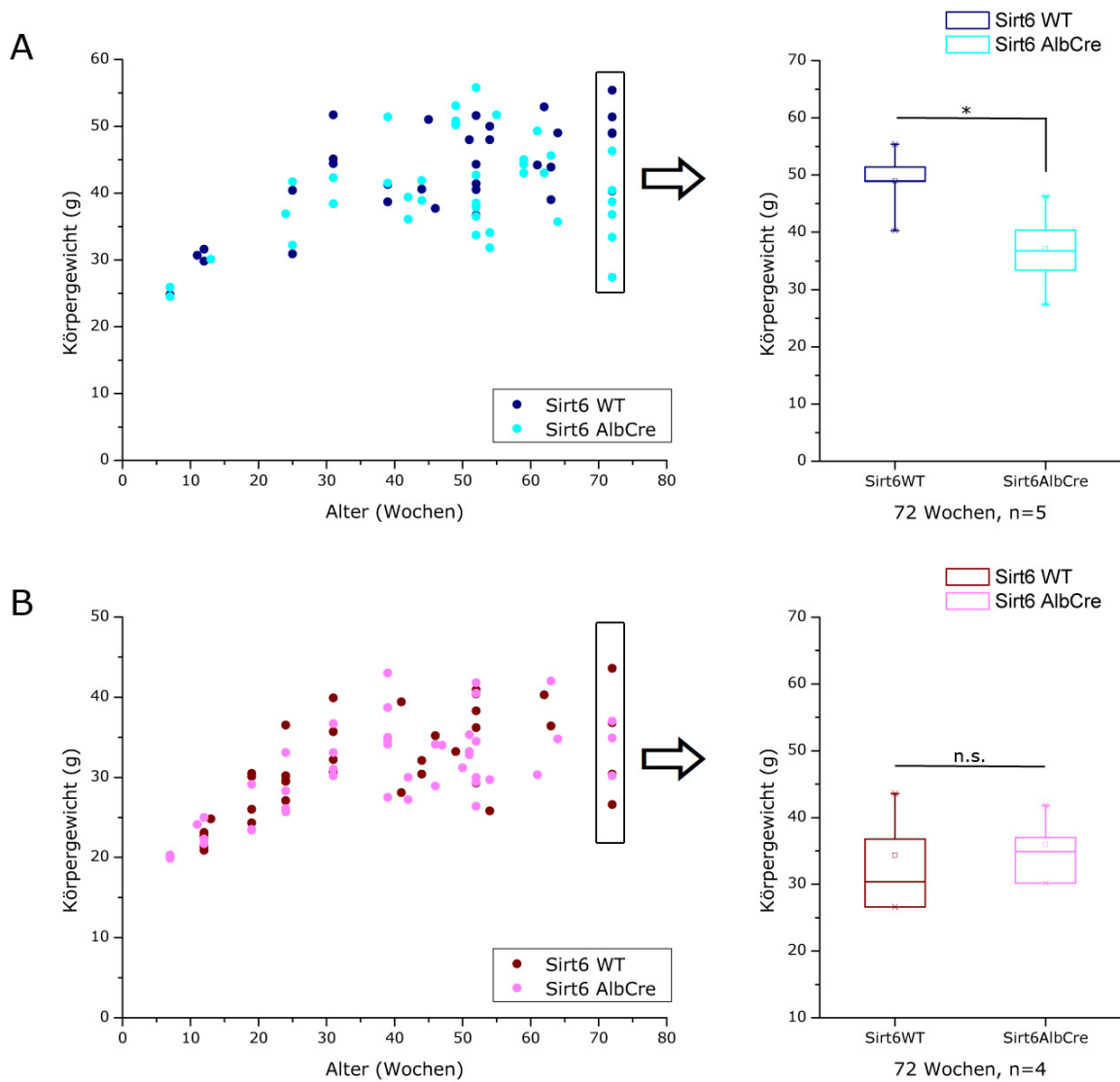


Abbildung 3.18: Untersuchung des Körpergewichts in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht bei Mäusen mit leberspezifischem *Sirt6-Knockout*. Tiere des Stammes KO-*Sirt6*-EUCOMM wurden gewogen und ihr Gewicht gegen ihr Alter aufgetragen. Es wurden jeweils Werte von Tieren mit leberspezifischem *Sirt6-Knockout* (*Sirt6 AlbCre*) und Werte von wildtypischen Tieren (*Sirt6 WT*) nach Geschlechtern getrennt dargestellt. **A** zeigt links die Werte aller männlichen Tiere und rechts eine Detailanalyse für die männlichen Tiere im Alter von 72 Wochen. **B** zeigt die Werte aller weiblichen Tiere. *Sirt6 WT* = *Sirt6^{fl/fl}*; *Sirt6 AlbCre* = *Sirt6^{fl/fl}AlbCre*. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student t-Test bestimmt; * $p < 0,05$.

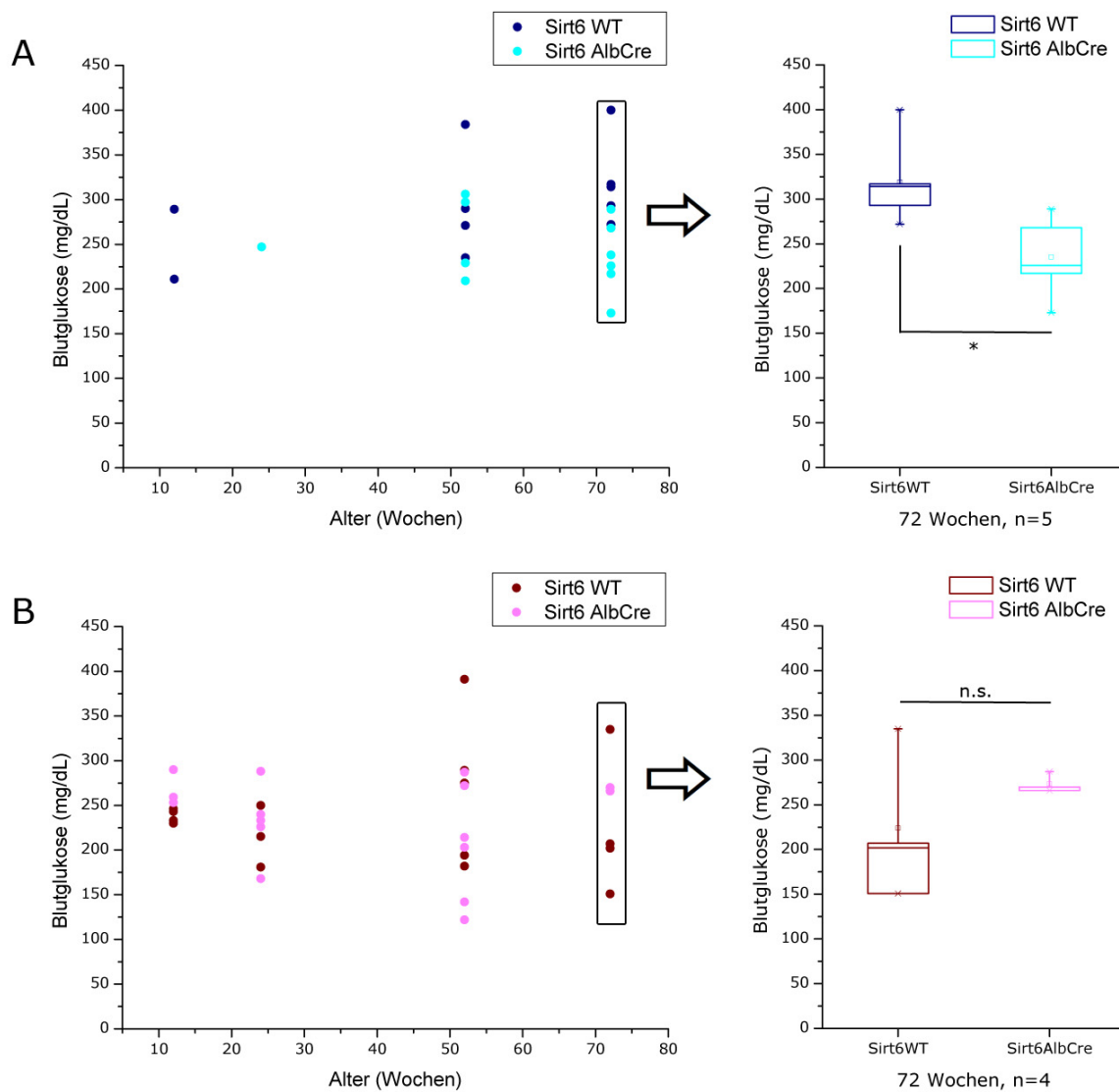


Abbildung 3.19: Untersuchung des Blutglukosewertes in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht bei Mäusen mit leberspezifischem *Sirt6-Knockout*. Bei Tieren des Stammes KO-*Sirt6*-EUCOMM wurde der Glukosewert im Vollblut bestimmt und die Werte gegen ihr Alter aufgetragen. Es wurden jeweils Werte von Tieren mit leberspezifischem *Sirt6-Knockout* (*Sirt6 AlbCre*) und Werte von wildtypischen Tieren (*Sirt6 WT*) nach Geschlechtern getrennt dargestellt. **A** zeigt links die Werte aller männlichen Tiere und rechts eine Detailanalyse für die männlichen Tiere im Alter von 72 Wochen. **B** zeigt die Werte aller weiblichen Tiere. *Sirt6 WT* = *Sirt6^{fl/fl}*; *Sirt6 AlbCre* = *Sirt6^{fl/fl}AlbCre*. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student t-Test bestimmt; * $p < 0,05$.

3.4.1. Untersuchung der Sekretion von IL-16 und IL-17 durch Milzzellen in Reaktion auf Stimulation mit ConA

Besondere Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit inflammatorischen Darmerkrankungen haben in den letzten Jahren die Zytokine IL-16 und IL-17 erfahren^{120,121}. Beide Zytokine werden unter anderem mit autoimmunen Erkrankungen in Verbindung gebracht¹²²⁻

125.

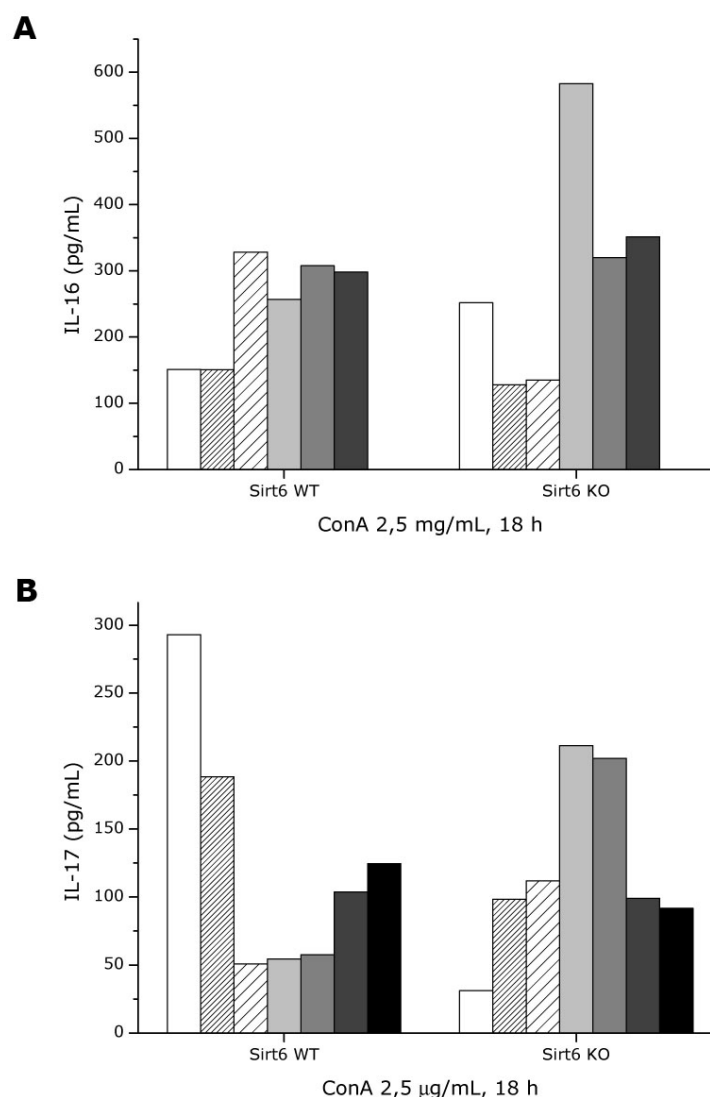


Abbildung 3.20: Untersuchung der Sekretion von IL-16 und IL-17 durch Milzzellen aus Sirt6^{wt} und Sirt6^{ko} Mäusen nach Stimulation mit Concanavalin A (ConA). Aus der Milz isolierte Zellen wurden in gleicher Zellzahl ausgesät und für 18 Std. mit 2,5 µg/mL ConA stimuliert. In den Zellüberständen wurde die Menge an **A** IL-16 und **B** IL-17 mittels ELISA bestimmt. Balken gleicher Farbe zeigen zusammengehörige Ergebnisse zweier Geschwistertiere aus jeweils einem unabhängigen Experiment.

In einem ersten Experiment wurde darum die Sekretion der Zytokine IL-16 und IL-17 in Antwort auf die Stimulation von Gesamtmilzzellen aus wildtypischen und Sirt6^{ko}-Mäusen mit Concanavalin A (ConA) untersucht. ConA wirkt als starkes Mitogen, das vor allem T-Zellen aktiviert¹²⁶. Nach Isolation aus der Milz wurden die Zellen in jeweils gleicher Zellzahl ausgesät und für je 18 Std. mit 2,5 µg/mL ConA behandelt. Aus den Zellüberständen wurde mittels ELISA die Menge an IL-16 bzw. IL-17 ermittelt. Das Ergebnis in Abbildung 3.20 zeigt, dass unter gleichen Versuchsbedingungen die individuellen Schwankungen der Sekretion beider untersuchten Zytokine zu stark variierte, um eine Aussage über einen Unterschied zwischen wildtypischen und Sirt6^{ko}-Mäusen treffen zu können. Die Menge des durch jeweils unbehandelte Kontrollen sekretierten IL-16 bzw. IL-17 lagen jeweils nahe der Nachweisgrenze und zeigten keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

3.4.2. Untersuchung der Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen

Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob aus wildtypischen und Sirt6^{ko}-Mäusen stammende dendritische Zellen (DCs) Unterschiede in der Differenzierung, Endozytoseaktivität oder Reifung aufweisen. Zunächst wurden aus je zwei Sirt6^{wt}- und Sirt6^{ko}-Geschwistertieren Knochenmarkszellen isoliert und zu DCs differenziert.

Zur Untersuchung der Endozytoseaktivität wurden differenzierte DCs in Suspension für eine Stunde mit Dextran-FITC inkubiert (t = 60 Min.) und dann fixiert, während Kontrollzellen sofort nach Zugabe von Dextran-FITC fixiert wurden (t = 0 Min.). Abbildung 3.21 zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Zunächst wurden nur solche Zellen weiter berücksichtigt, die positiv für das Oberflächenmolekül CD11c waren (rechte Quadranten in den Punktdiagrammen), wobei sich die Menge CD11c-positiver Zellen zwischen den Genotypen nicht unterschied. Es ist deutlich zu erkennen, dass aus Sirt6^{ko}-Mäusen stammende DCs eine deutlich höhere Anzahl FITC-positiver Zellen nach Inkubation mit Dextran-FITC aufwiesen als wildtypische DCs (P3 in den Histogrammen bzw. oberer rechter Quadrant in den Punktdiagrammen).

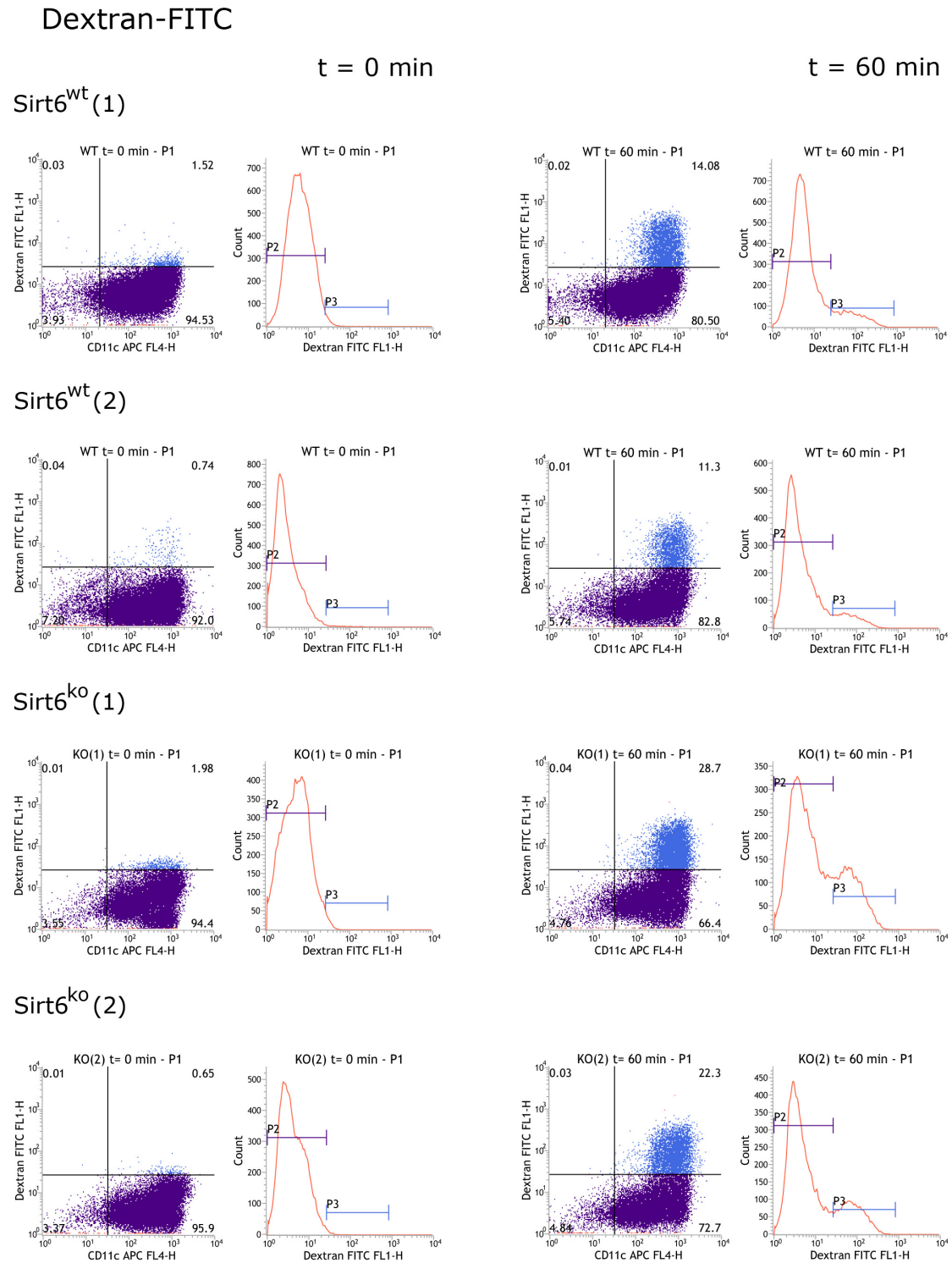


Abbildung 3.21: Untersuchung der Endozytoseaktivität dendritischer Zellen aus Sirt6^{wt} und Sirt6^{ko} Mäusen durch die Aufnahme von Dextran-FITC. Aus Knochenmark differenzierte unreife dendritische Zellen wurden mit Dextran-FITC inkubiert und entweder sofort (t = 0 min) oder nach einer Stunde (t = 60 min) fixiert und dann durchflusszytometrisch analysiert. Bei der Messung wurden nur Zellen zur Analyse ausgewählt, die das Oberflächenmolekül CD11c aufwiesen (siehe Punktdiagramme). Diese wurden hinsichtlich ihrer Aufnahme des FITC-markierten Dextrans untersucht (siehe oberer rechter Quadrant der Punktdiagramme bzw. P3 in den Histogrammen). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Eine Auswertung aller drei durchgeführten Experimente ist zusätzlich in Abbildung 3.22 gezeigt und bestätigt, dass DCs aus *Sirt6^{ko}*-Mäusen signifikant mehr CD11c/FITC-positive Zellen nach Inkubation mit Dextran-FITC aufwiesen, was auf eine erhöhte Endozytoseaktivität von DCs aus *Sirt6^{ko}*-Mäusen gegenüber wildtypischen Tieren hinweist.

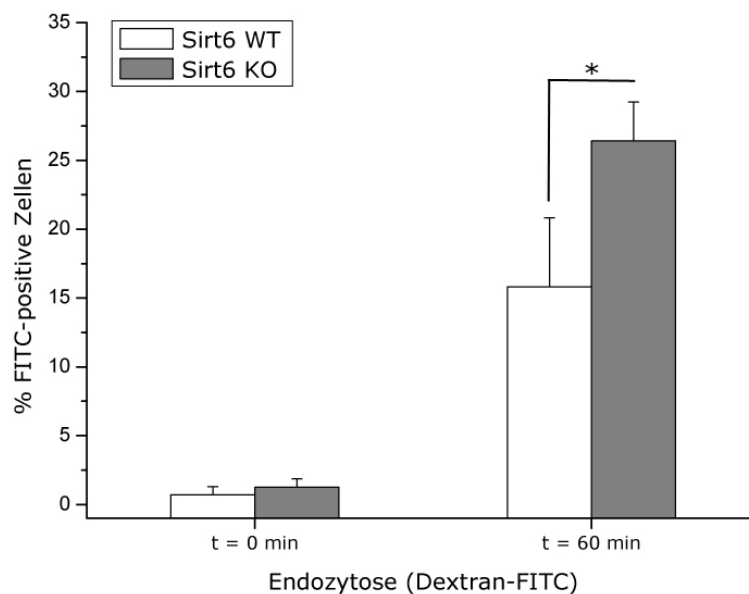


Abbildung 3.22: Untersuchung der Endozytoseaktivität dendritischer Zellen aus *Sirt6^{wt}* und *Sirt6^{ko}* Mäusen durch die Aufnahme von Dextran-FITC. Aus Knochenmark differenzierte unreife dendritische Zellen wurden mit Dextran-FITC inkubiert und entweder sofort (t = 0 min) oder nach einer Stunde (t = 60 min) fixiert und dann mittels FACS analysiert. Bei der Messung wurden nur Zellen zur Analyse ausgewählt, die das Oberflächenmolekül CD11c aufweisen. Diese wurden hinsichtlich ihrer Aufnahme des FITC-markierten Dextrans untersucht. Die in der Abbildung dargestellten Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student t-Test bestimmt; * $p < 0,05$.

Im Folgenden wurde die Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen aus *Sirt6*^{ko} und wildtypischen Tieren untersucht und verglichen. Zu diesem Zweck wurden Knochenmarkzellen zu DCs differenziert und anschließend für 24 Std. mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Zur durchflusszytometrischen Analyse der DCs wurden die Oberflächenmoleküle CD11c, MHCII, CD80 und CD86 mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Dabei dienten die Oberflächenmoleküle CD11c und MHCII der Identifizierung der Zellpopulation mit phagozytischen und antigenpräsentierenden Eigenschaften. Die Expression von CD80 und CD86 in ihrer Eigenschaft als co-stimulatorische Moleküle wurde als Maß für die Aktivierung und Reifung dieser Zellen quantifiziert.

Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 3.23 dargestellt, untersucht wurden die aus je zwei wildtypischen bzw. *Sirt6*^{ko} Mäusen isolierten und differenzierten Zellen. Abbildung 3.23(A)-(C) zeigt beispielhaft die Analyse und Auswertung einer gemessenen Probe; Teil 3.23(D) die Auswertung der Menge CD11c/MHCII-positiver Zellen als Anteil aller lebenden Zellen und Teil 3.23(E) die Auswertung der Menge CD80/CD86-positiver Zellen als Anteil aller phagozytischen Zellen.

Es ist zu erkennen, dass sich die Anteile CD11c/MHCII-positiver Zellen sowohl im unstimulierten als auch in stimulierten Zustand zwischen wildtypischen und *Sirt6*^{ko}-Zellen nicht deutlich unterscheiden (Abb. 3.23(D)). Bei der Analyse der gleichzeitigen Expression von CD80 und CD86 fällt auf, dass im unstimulierten Zustand CD11c/MHCII-positive Zellen aus *Sirt6*^{ko}-Tieren bereits eine größere Menge dieser co-stimulatorischen Oberflächenmoleküle aufwiesen als wildtypische Zellen. Im LPS-stimulierten Zustand konnte zwischen wildtypischen und *Sirt6*-defizienten DCs kein Unterschied beim Anteil CD80/CD86-positiver Zellen festgestellt werden.

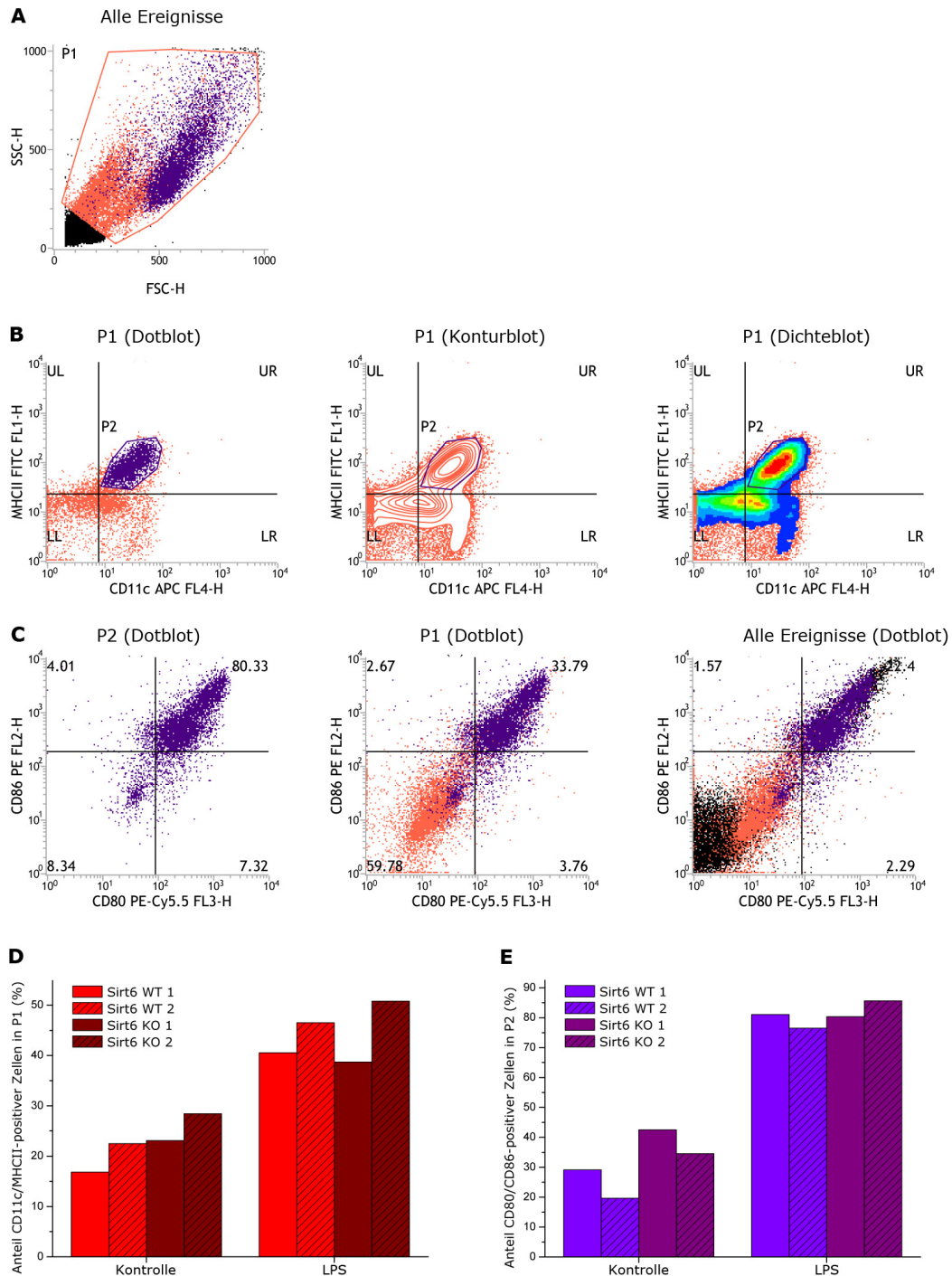


Abbildung 3.23: Untersuchung der Reifung dendritischer Zellen aus $Sirt6^{wt}$ und $Sirt6^{ko}$ Mäusen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS). Unreife, aus Knochenmark differenzierte dendritische Zellen aus $Sirt6^{wt}$ und $Sirt6^{ko}$ Mäusen wurden für 24 Std. mit LPS stimuliert und anschließend die Oberflächenmoleküle CD11c, MHCII, CD80 und CD86 mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. **A-C** zeigen beispielhaft die Analyse einer mittels Durchflusszytometrie untersuchten Probe. Zunächst wurden die lebenden Zellen ausgewählt (Population 1 (P1) in **A**). Aus P1 wurde die Population ausgewählt, die positiv für die Oberflächenmoleküle CD11c und MHCII war (P2 in **B** (drei verschiedene Darstellungen)). P2 wird in **C** als Anteil von P2 (links), als Anteil von P1 (Mitte) und als Anteil aller Ereignisse (rechts) dargestellt. **D** zeigt die Anteile CD11c/MHCII-positiver Zellen in in P1, **E** zeigt die Anteile CD80/CD86-positiver Zellen in P2.

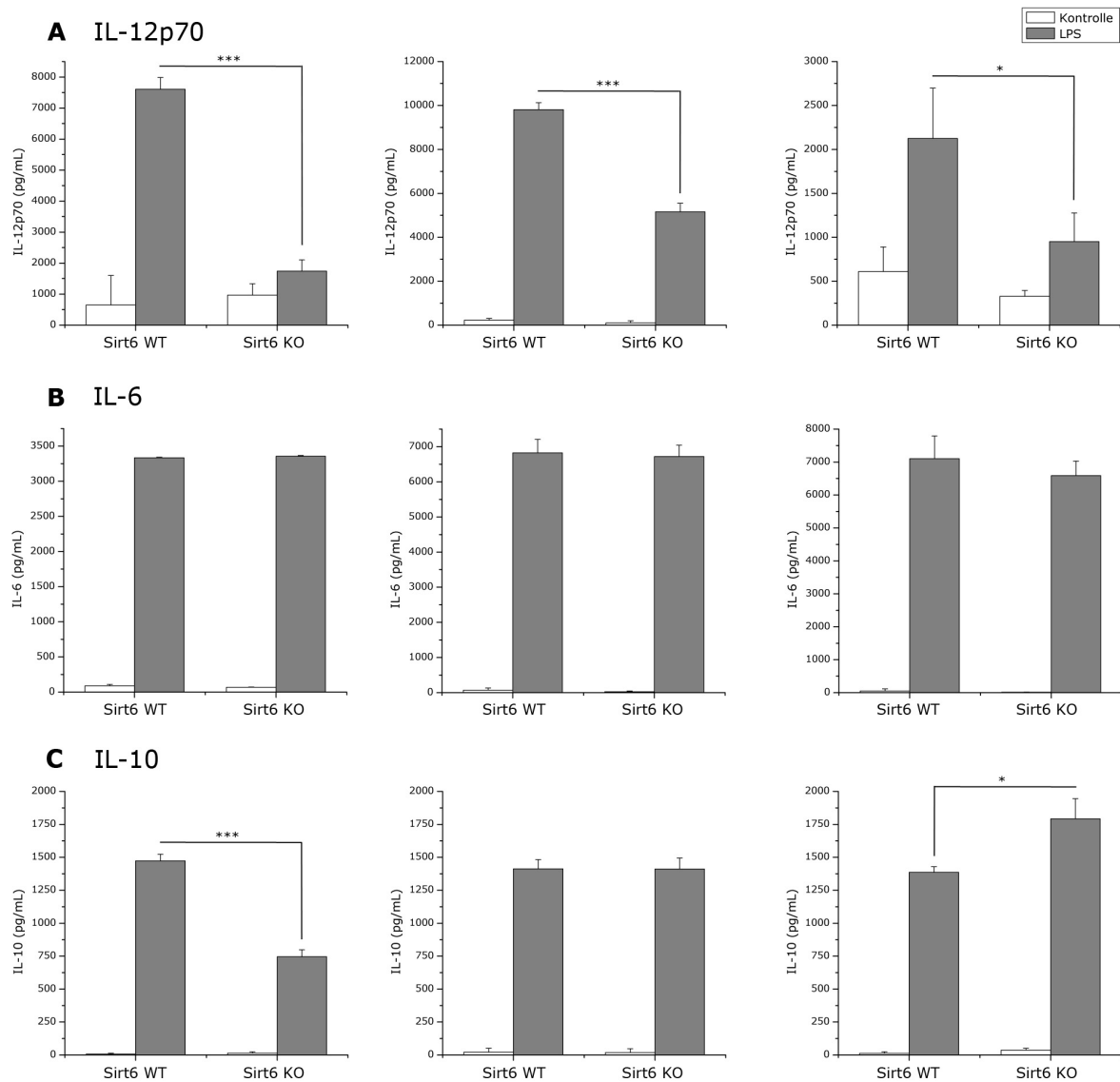


Abbildung 3.24: Untersuchung der Sekretion von IL-12(p70), IL-6 und IL-10 durch dendritische Zellen aus Sirt6^{wt} und Sirt6^{ko} Mäusen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS). Unreife, aus Knochenmark differenzierte dendritische Zellen aus Sirt6^{wt} und Sirt6^{ko} Mäusen wurden für 18 Std. mit 1 µg/mL LPS stimuliert. In den Zellüberständen wurde die Menge an **A** IL-12p70, **B** IL-6 und **C** IL-10 mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student t-Test bestimmt; *p<0,05, ***p<0,001.

Auch die Sekretion von Zytokinen durch DCs aus wildtypischen und Sirt6^{ko} Mäusen wurde zum Vergleich von Differenzierung und Reifung herangezogen und Zellüberstände unstimulierter bzw. für 18 Stunden mit LPS behandelten Zellen auf die Sekretion von IL-12(p70) und IL-6 als proinflammatorische/immunstimulatorische¹²⁷ sowie IL-10 als immunsuppressives/immunregulatorisches Zytokin¹²⁷ mittels ELISA untersucht.

Abbildung 3.24 zeigt die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente. In allen drei Experimenten war eine signifikant niedrigere Sekretion von IL-12p70 durch DCs aus *Sirt6*^{ko} Mäusen im Vergleich zu DCs aus wildtypischen Tieren messbar. Für die Sekretion von IL-6 war in allen Experimenten kein Unterschied zwischen wildtypischen und *Sirt6*-defizienten DCs feststellbar. Im Fall des Zytokins IL-10 unterschied sich die sekretierte Menge in allen drei Experimenten, sodass keine Aussage über eine Abhängigkeit von SIRT6 getroffen werden kann. Zusammenfassend zeigte sich in Abwesenheit von SIRT6 eine niedrigere Sekretion von IL-12p70 durch dendritische Zellen in Antwort auf Stimulation mit LPS.

3.5. Untersuchung der Regulation der Genexpression in SIRT6-defizienten Zellen

3.5.1. Untersuchung von Alterationen im Epigenom SIRT6-defizienter Hepatozyten

SIRT6 ist ein vor allem im Zellkern lokalisiertes, mit Chromatin assoziiertes Protein, das in den meisten Geweben exprimiert wird⁶. In mehreren Fällen wurde nachgewiesen, dass SIRT6 an der Regulation der Expression verschiedener Gene beteiligt ist^{27,39,41}. In Lebern mit hepatozytenspezifischem *Sirt6-Knockout* im Alter von zwei Monaten wurde zudem für eine Vielzahl von Genen eine differenzielle Expression in Abwesenheit von SIRT6 festgestellt¹¹.

Da für SIRT6 bereits eine Deacetylase-Funktion für Histon H3-Lysin^{98,27} und -Lysin^{5628,29} nachgewiesen wurde, wurde zunächst der Status einiger Acetylierungen des Histons H3 in *Sirt6*^{ko} und *Sirt6*^{wt} Hepatozyten aus dem Stamm KO-*Sirt6*-Fwa untersucht (Abbildung 3.25). Sowohl die Western Blot- (Abb. 3.25(A)) als auch die Immunfluoreszenzanalyse (Abb. 3.25(B)) zeigt, dass in *Sirt6*^{ko}-Hepatozyten für H3K9 und für H3K14 eine stärkere Acetylierung im Vergleich zu wildtypischen Zellen nachgewiesen werden konnte. In der Immunfluoreszenzfärbung erschien auch H3K18 in *Sirt6*^{ko}-Hepatozyten stärker acetyliert

zu sein. Ein Zusammenhang zwischen SIRT6 und H3K14 bzw. H3K18 wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Die Acetylierung von H3K56 war, verglichen mit den anderen untersuchten Acetylierungen, nur schwer zu detektieren und es war zudem kein Unterschied zwischen *Sirt6*^{wt}- und *Sirt6*^{ko}-Zellen zu erkennen.

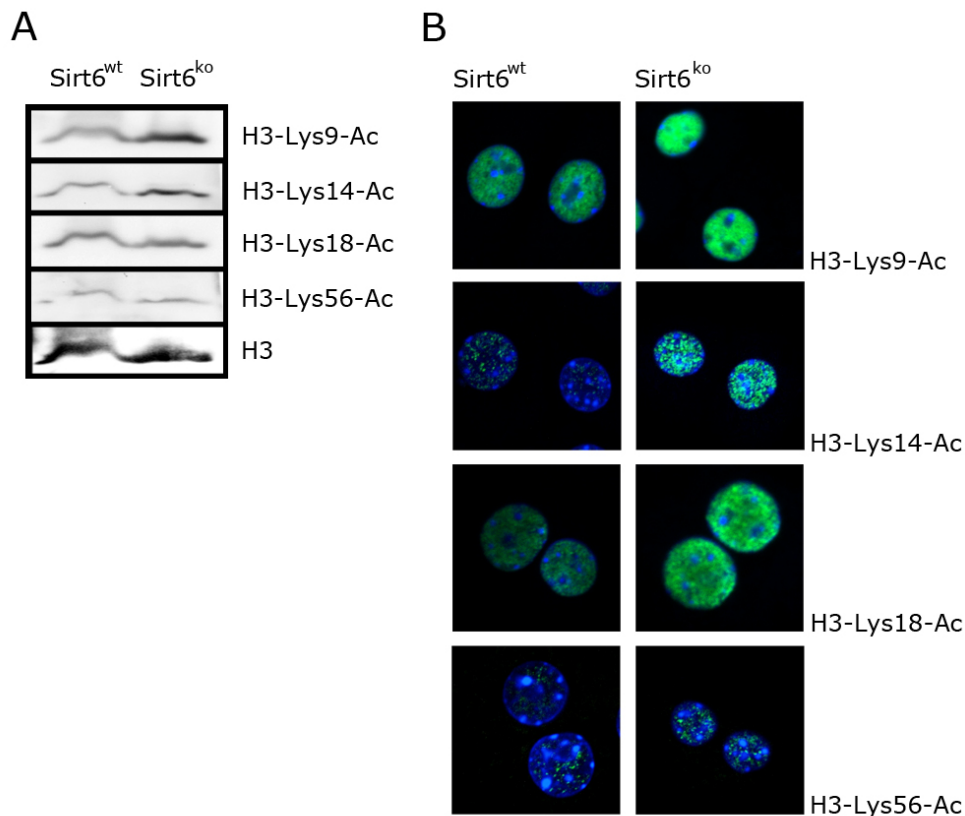


Abbildung 3.25: Acetylierung von Lysinresten des Histons H3 in *Sirt6*^{wt} und *Sirt6*^{ko}-Hepatozyten. *Sirt6*^{wt} und *Sirt6*^{ko} Hepatozyten aus Mäusen des Stammes KO-*Sirt6*-Fwa wurden mittels **A** Western Blot und **B** Immunfluoreszenzfärbung auf verschiedene Lysin-Acetylierungen des Histons H3 untersucht.

Eine Ursache starker Veränderungen im Transkriptom einer Zelle können auch Änderungen in der globalen DNA-Methylierung des Genoms sein. In der Leber von *Sirt6*^{ko}- und *Sirt6*^{wt}-Mäusen aus dem Stamm KO-*Sirt6*-Fwa wurde deshalb die Menge an 5-Methylcytosin (5-mC) bestimmt. Die Untersuchungen wurden von Dr. in

der Arbeitsgruppe von (Institut für Humangenetik, Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt. In Abbildung 3.26 ist zu sehen, dass in *Sirt6*^{ko}-Tieren die globale Menge an 5-mC nur etwa 60-80% des jeweiligen Geschwistertieres betrug.

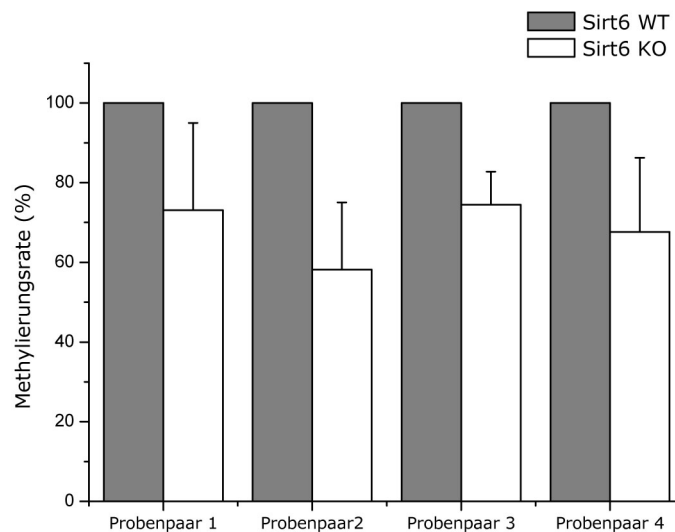


Abbildung 3.26: Globale DNA-Methylierung in *Sirt6*^{ko} Mäusen im Vergleich zu *Sirt6*^{wt} Tieren. Die Menge an 5-Methylcytosin (5-mC) in genomischer DNA aus der Leber von *Sirt6*^{wt} und *Sirt6*^{ko} Mäusen wurde in vier verschiedenen Geschwisterpaaren kolorimetrisch mit dem MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (Epigentek) bestimmt. Die Menge an genomischem 5-mC jeder *Sirt6*^{ko}-Maus wird als Prozent des zugehörigen *Sirt6*^{wt} Geschwistertieres dargestellt. Die gezeigte Standardabweichung resultiert aus jeweils drei technischen Replikaten. Die globale DNA-Methylierung in *Sirt6*^{ko} Proben unterscheidet sich signifikant von der in *Sirt6*^{wt} Proben ($p < 0,01$ über alle Probenpaare).

3.5.2. Genexpression in *Sirt6*-defizienten Hepatozyten

Um den Einfluss von SIRT6 auf die Genexpression von Hepatozyten zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA aus *Sirt6*^{ko} und *Sirt6*^{wt} Mäusen des Stammes KO-*Sirt6*-Fwa einer Microarray-Analyse unterzogen⁴⁰. Es wurde festgestellt, dass in *Sirt6*-defizienten Zellen

für 1814 Probe-IDs auf dem Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array eine mindestens um den Betrag 2 veränderte Expression vorlag. Davon zeigten 1070 Sequenzsonden eine Hochregulation und 742 IDs eine Herunterregulation der Menge des entsprechenden Transkripts an.

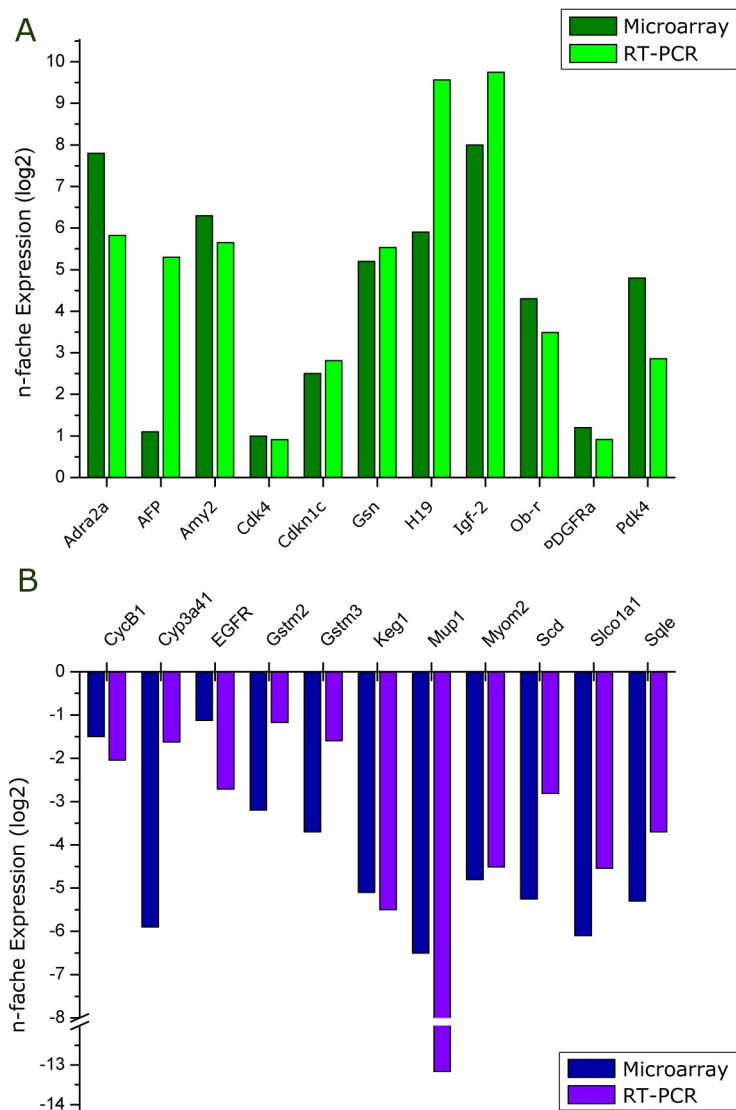


Abbildung 3.27: Validierung von Microarray Daten aus $Sirt6^{ko}$ Hepatozyten durch RT-PCR.

Die Expression ausgewählter Gene in $Sirt6^{ko}$ Hepatozyten wurde in drei Tieren mittels RT-PCR gemessen, auf die jeweiligen wildtypischen Geschwistertiere bezogen und der erhaltene Mittelwert gegen den Datenpunkt aus dem Microarray aufgetragen. **A** zeigt hochregulierte und **B** herunterregulierte Gene basierend auf den Ergebnissen des Microarray. Zur Normalisierung der RT-PCR Daten diente die Expression von RNA-Polymerase II.

Zur Bestätigung der Ergebnisse des Microarray wurden aus Hepatozyten dreier Geschwisterpaare Gesamt-RNA isoliert und in diesen Proben die Expression von 22 Genen untersucht, die im Microarray eine besonders stark veränderte Expression in *Sirt6*^{ko}-Zellen aufwiesen. Das Ergebnis in Abbildung 3.27 zeigt, dass sich auch in den drei weiteren Proben von *Sirt6*^{ko}-Hepatozyten die Expression der untersuchten Gene im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern in erwarteter Weise und in erwartetem Maße unterschied.

Um einzuordnen, welche zellulären Prozesse von veränderter Genexpression durch SIRT6-Defizienz betroffen sind, wurden die Daten aus der Microarray-Analyse einer bioinformatischen Auswertung unterzogen. Zur funktionellen Analyse wurde die „Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resources 6.7 (NIAID/NIH)“^{108,109} verwendet. Um die Datensätze analysieren zu können, mussten zunächst die auf dem Chip verwendeten Gensymbole in „DAVID IDs“ umgewandelt werden. Hierzu wurden die Affymetrix Probe-IDs in das Tool „Gene ID Conversion“ eingefügt und mittels des Identifiers „AFFYMETRIX_3PRIME_IVT_ID“ in eine Genliste umgewandelt.

Alle stärker exprimierten Transkripte wurden mit dem verwendeten Identifier in insgesamt 716 DAVID IDs transkribiert. 909 IDs wurden dabei als Gene von *Mus musculus* identifiziert, 37 galten als unbekannt. Doppelt vorkommende Transkriptvarianten wurden zudem automatisch zusammengefasst, wodurch sich die reduzierte Anzahl an IDs ergab.

Mit dem Tool für funktionelle Annotation von DAVID können Datensätze mit aus verschiedenen Datenbanken stammenden Kategorien abgeglichen werden (z.B. GO, INTERPRO, KEGG Pathways etc.), welche verschiedene inhaltliche Schwerpunkte bezüglich der funktionellen Annotation haben (z.B. Genontologie, Proteindomänen, Signal- und Stoffwechselwege etc.). Welcher p-Wert bei der Anreicherung bestimmter Gene unter einem Oberbegriff (z.B. „Transkription“) erreicht wird, hängt davon ab, wie groß der Umfang dieses Begriffes ist. Daher ist der p-Wert ausdrucksstärker als die bloße Anzahl angereicherter Gensymbole pro Oberbegriff.

In Abbildung 3.28 ist beispielhaft die Auswertung der in *Sirt6*^{ko}-Hepatozyten stärker exprimierten Transkripte unter der Kategorie „GO Biological Process“ dargestellt. Ein Überblick auch über andere Kategorien zeigt, dass in *Sirt6*^{ko} Hepatozyten höher exprimierte

Gene vor allem zu Oberbegriffen wie Immunantwort, Wundheilung, Apoptose, Kreislaufsystem, Transkriptionsregulation und biologische rhythmische Prozesse gehören. Besonders auffällig ist, dass 190 Transkripte, d.h. 26,5 % aller stärker exprimierten RNAs, in Zusammenhang mit alternativem Splicing gebracht werden (nach der funktionalen Kategorisierung SP_PIR_KEYWORDS; p-Wert 1,40E-04). Funktionelle Moleküle wie ABC-Transporter, einige Stoffwechselwege wie der Fettsäuremetabolismus und auch MAPK-, PPAR- und p53-gesteuerte Signalwege sind von signifikanter Überexpression einiger Komponenten betroffen.

Die Analyse der in Sirt6^{ko} Hepatozyten schwächer exprimierten Transkripte wurde wie auch schon für die stärker exprimierten Transkripte beschrieben durchgeführt. Von den betroffenen Affymetrix-IDs wurden 659 als zu *Mus musculus* gehörend identifiziert, zehn waren unbekannt.

Abbildung 3.28: Auswertung der in Sirt6^{ko}-Hepatozyten stärker exprimierten Transkripte anhand der Kategorie „GO - Biologische Prozesse“. Begriffe mit sehr starker Ähnlichkeit wurden zusammengefasst. Gezeigt werden nur signifikante Häufungen von Gensymbolen verschiedener Oberbegriffe mit $p < 0,01$ ($< 1,00E-02$).

Begriff	Anzahl der Gensymbole	Prozent aller Gensymbole	p-Wert (Modified Fisher Exact p-value, EASE score)
Regulation der Zellproliferation	38	5,3	8,00E-05
Immunantwort	33	4,6	3,00E-04
Regulation der Transkription	89	12,4	4,70E-04
Kreislaufsystem	13	1,8	5,30E-04
Prozessierung und Präsentation von Peptid-Antigenen	7	1,0	1,30E-03
Rhythmische Prozesse	11	1,5	2,40E-03
Apoptose	29	4,1	4,20E-03
Metabolische Prozesse mit Acyl-CoA	5	0,7	4,70E-03
Phospholipidtransport	5	0,7	7,90E-03
Negative Regulation von Proteinkinaseaktivität	7	1,0	8,70E-03
RNA-Splicing	6	0,8	9,20E-03
Zircadiane Rhythmik	6	0,8	9,20E-03

Die Probe-IDs wurden in 509 DAVID IDs transkribiert; doppelt vorkommende Transkriptvarianten wurden automatisch zusammengefasst. Das Ergebnis der bioinformatischen Auswertung ist in Abbildung 3.29 zu sehen. In Sirt6^{ko} Hepatozyten ist der Steroid- und Lipidstoffwechsel der am stärksten von herunterregulierter Genexpression betroffene biologische Prozess. Darüber hinaus ist der Prozess der Zell- und insbesondere der Zellteilung betroffen, möglicherweise im Zusammenhang mit Störungen in der Organisation des Zytoskeletts. Ebenfalls durch verminderte Expression betroffen sind die DNA-Schädigungs-Kontrollpunkte während der Mitose, sowie die DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur (Abbildung 3.29).

Abbildung 3.29: Auswertung der in Sirt6^{ko}-Hepatozyten schwächer exprimierten Transkripte anhand der Kategorie „GO - Biologische Prozesse“. Begriffe mit sehr starker Ähnlichkeit wurden zusammengefasst. Gezeigt werden nur signifikante Häufungen von Gensymbolen verschiedener Oberbegriffe mit $p < 0,05$ ($< 5,00E-02$).

Begriff	Anzahl der Gensymbole	Prozent aller Gensymbole	p-Wert (Modified Fisher Exact p-value, EASE score)
Steroid-Biosynthese	25	4,9	8,90E-21
Lipid-Biosynthese	40	7,9	1,40E-17
Oxidations-/Reduktionsprozesse	61	12	2,80E-17
Zellteilung	35	6,9	8,50E-14
Cholesterin-Biosynthese	13	2,6	9,40E-14
Fettsäure-Metabolismus	19	3,7	1,70E-06
Zelluläre Eisenion-Homöostase	6	1,2	8,60E-04
Akute Inflammationsprozesse	8	1,6	5,40E-03
Zytoskelett-Organisation	17	3,3	1,20E-02
Schwesterchromatid-Segregation	4	0,8	1,30E-02
Antwort auf DNA-schädigenden Stimulus	15	2,9	2,00E-02
Mitose-Checkpoint DNA-Schädigung (Zellzyklus)	4	0,8	2,40E-02
Chromosom-Organisation	18	3,5	3,90E-02
Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur über homologe Rekombination	3	0,6	4,40E-02

3.5.3. Regulation der zirkadianen Rhythmik bei SIRT6-Defizienz

In Abwesenheit von SIRT6 wurde eine Deregulation der Expression zirkadianer Gene in Hepatozyten aus Mäusen mit konstitutivem, globalem *Sirt6*-Knockout beobachtet (siehe Abbildung 3.28). Im Speziellen handelt es sich bei diesen Genen um *Arntl*, *Nr1d1*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* und *Per2*, die den Großteil der zentralen Faktoren der zellulären Uhr darstellen.

3.5.3.1. *In vitro* Untersuchung der Expression von Faktoren der zirkadianen Uhr in Hepatozyten aus Mäusen mit konstitutivem *Sirt6*-Knockout

Um die Expression der Gene der zellulären Uhr *in vitro* in Zellkultur in Zelllinien oder primären Zellen untersuchen zu können, muss zunächst eine Synchronisation aller Zellen stattfinden, die unter physiologischen Bedingungen vom Gehirn gesteuert und durch Hormone über den Blutkreislauf vermittelt wird. Diese Synchronisation kann *in vitro* durch bestimmte Reize wie der Behandlung mit einem Glukokortikoid¹²⁸ (z.B. Dexamethason) oder der Inkubation mit hohen Konzentrationen an Serum im Medium¹²⁹ („Serumschock“) erreicht werden.

In Vorbereitung auf eine Untersuchung der Expression von Faktoren der Zelluhr in der Leber von wildtypischen und *Sirt6*-defizienten Mäusen sollte zunächst *in vitro* untersucht werden, ob sich die Expression einiger dieser Gene zwischen primären Hepatozyten aus wildtypischen und *Sirt6*^{ko} Mäusen unterscheidet. Durch Leberperfusion isolierte Hepatozyten wurden nach dem Anwachsen auf Zellkulturplatten durch Serumschock (50 % FCS in pmHep-Medium für zwei Stunden) synchronisiert und dann in pmHep-Medium mit 1 % FCS weiter kultiviert. Zellen aus je einem Ansatz wurden sofort nach dem Serumschock (t = 0 h) und dann an sechs weiteren Zeitpunkten mit einem Abstand von jeweils vier Stunden geerntet und Gesamt-RNA isoliert, die zur relativen Quantifizierung der Gene *Arntl* (*Bmal1*), *Nr1d1* (*Rev-Erba*), *Cry2* und *Per1* mittels RT-PCR verwendet wurde.

Das Ergebnis in Abbildung 3.30 zeigt in vergleichenden Darstellungen die Expressionsniveaus der untersuchten Gene in wildtypischen und *Sirt6*-defizienten Hepatozyten. Bei allen vier untersuchten Genen unterschieden sich die Expressionsniveaus zwischen wildtypischen und *Sirt6*-defizienten Zellen direkt nach Serumschock ($t = 0$ h) deutlich. Ein deutlich phasischer Verlauf der Expression war nur bei *Arntl* zu beobachten, genau wie auch eine Phasenverschiebung zwischen *Sirt6*^{wt} und *Sirt6*^{ko} Zellen. Bei den Genen *Nr1d1*, *Cry2* und *Per1* war jeweils, wenn auch in unterschiedlich starkem Maße, das Expressionsniveau in wildtypischen Zellen bei $t = 0$ Std. höher als in *Sirt6*^{ko} Zellen. Bei nachfolgenden Zeitpunkten verringerten sich die Expressionsniveaus dieser Gene in jeweils beiden Ansätzen, bis sie auf einem jeweils nahezu gleichen Niveau verblieben.

3.5.3.2. Untersuchung der Expression von Faktoren der zirkadianen Uhr in der Leber von Mäusen mit konstitutivem *Sirt6*-*Knockout*

Um die Deregulation der Expression dieser zentralen Faktoren der zellulären Uhr in der Leber von Mäusen mit *Sirt6*-*Knockout* zu bestätigen, wurden Tiere, die einem strengen zwölf Std. Helligkeit / zwölf Std. Dunkelheit-Regiment unterlagen, zu zwei bestimmten Tageszeiten getötet, die Leber entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Als Zeitpunkte wurden ZT 2 (zwei Std. nach Beginn der Beleuchtung) und ZT 11 (eine Std. vor Ende der Beleuchtungsphase) gewählt. Pro Zeitpunkt wurden fünf wildtypische und fünf *Sirt6*^{ko}-Tiere verwendet. Mittels RT-PCR wurde dann die Expression von *Arntl* (codierend für BMAL-1), *Clock*, *Nr1d1* (codierend für REV-ERB α), *Cry1*, *Cry2* und *Per1* untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.31 dargestellt.

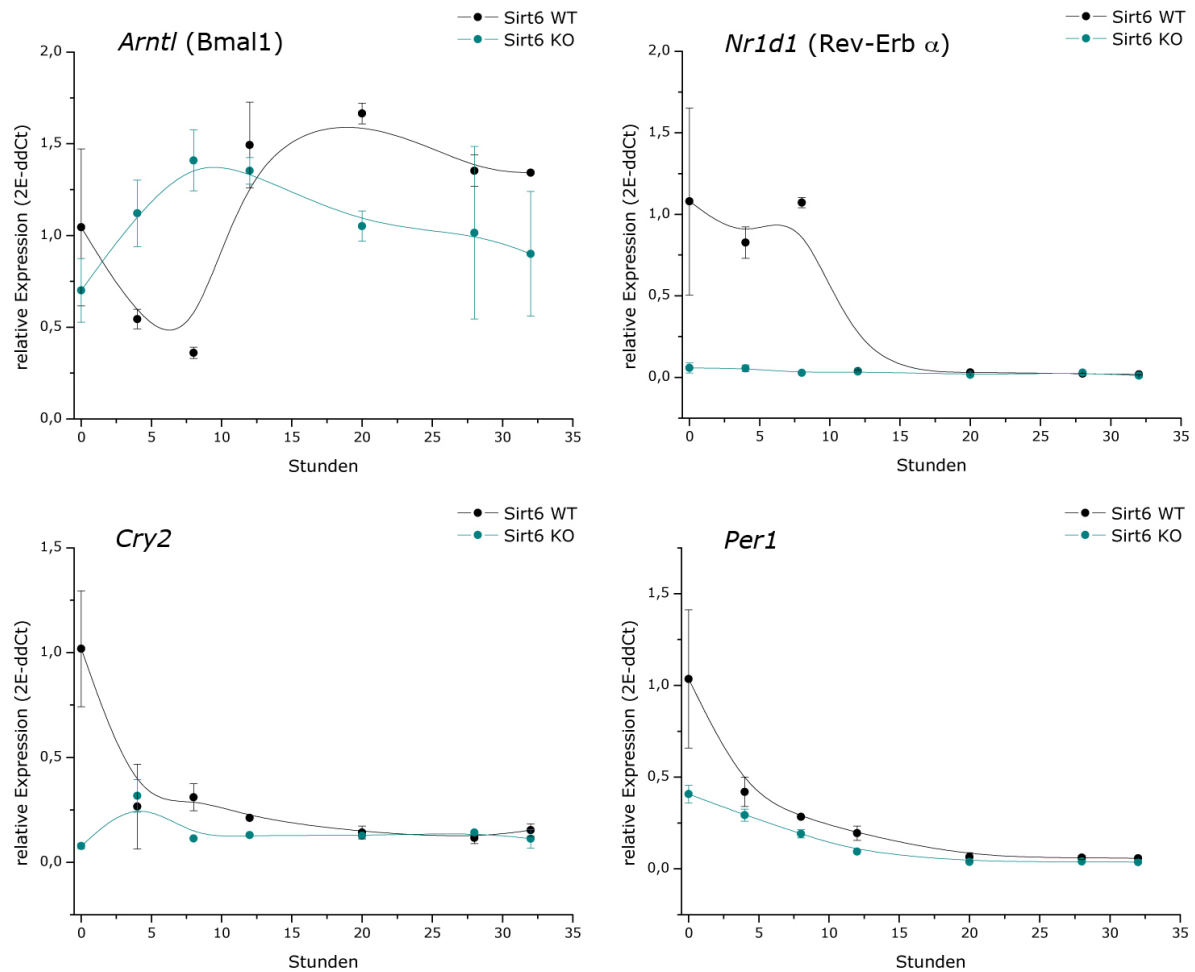


Abbildung 3.30: Expression von Genen der zirkadianen Uhr in primären Hepatozyten aus *Sirt6^{wt}* und *Sirt6^{ko}* Mäusen *in vitro* nach Serumschock. Primäre Hepatozyten wurden nach dem Anwachsen auf Zellkulturplatten einem Serumschock (50 % FCS für zwei Stunden) unterzogen. Der Anfangswert (null Stunden) entspricht dem Zeitpunkt direkt nach dem Serumschock. Zellen wurden für weitere vier bis 32 Stunden in Medium mit 1 % FCS kultiviert und alle vier Stunden RNA für die Analyse der Expression der Gene *Arntl*, *Nr1d1*, *Cry2* und *Per1* mittels RT-PCR isoliert. Alle Werte wurden auf den Anfangswert von *Sirt6^{wt}* normiert.

In Abbildung 3.31 ist zu sehen, dass in der Expression von *Arntl*, *Clock* und *Cry1* jeweils deutliche Unterschiede zwischen Lebern aus wildtypischen und *Sirt6^{ko}*-Mäusen vorlagen. Für alle drei Transkripte lag das wildtypische Expressionsniveau morgens (ZT 2) höher als abends (ZT 11).

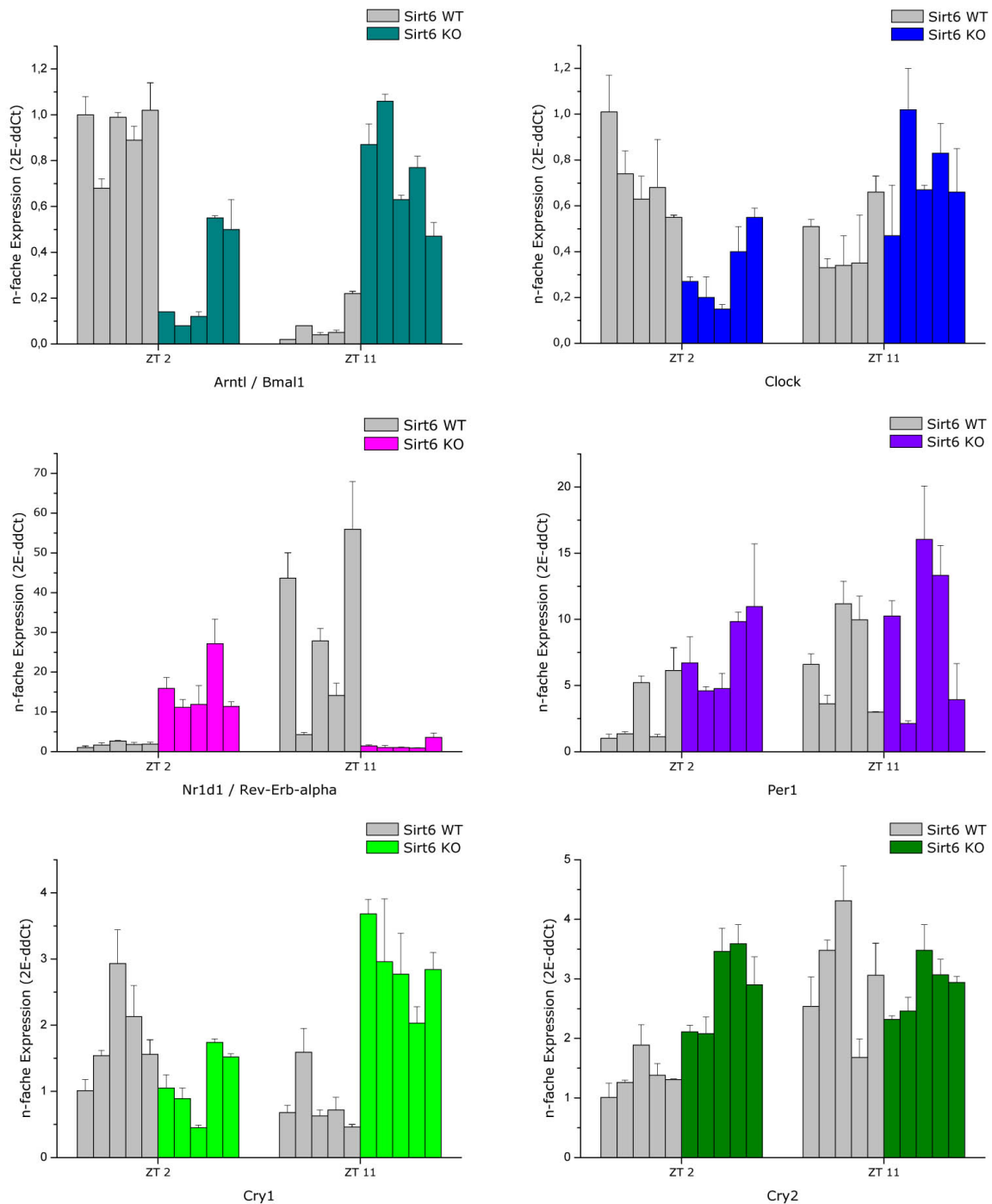


Abbildung 3.31: Expression von Genen der zirkadianen Uhr in der Leber von $Sirt6^{wt}$ und $Sirt6^{ko}$ Mäusen. Die Expression der Gene *Arntl*, *Clock*, *Nr1d1*, *Per1*, *Cry1* und *Cry2* wurde in RNA aus Lebergewebe mittels RT-PCR untersucht. Hierzu wurden zu jeweils zwei verschiedenen Tageszeiten (ZT 2 und ZT 11) aus jeweils fünf $Sirt6^{wt}$ und fünf $Sirt6^{ko}$ Tieren des Stammes KO-*Sirt6*-Fwa im Alter von 21-23 Tagen Lebergewebe entnommen. In der Darstellung wurde immer der Wert des Tieres WT-1 zum Zeitpunkt ZT 2 auf 1 gesetzt und die übrigen Werte daran angepasst.

In der *Sirt6*^{ko}-Leber waren diese Niveaus entgegengesetzt. Auch für *Nr1d1* waren bei ZT 2 und ZT 11 entgegengesetzte Expressionsniveaus zwischen wildtypischen und *Sirt6-knockout* Lebergeweben zu beobachten. Zwar zeigten sich zwischen den einzelnen Tieren individuelle Unterschiede, jedoch ähnelten sich die Expressionsstärken innerhalb eines Genotyps jeweils sehr stark. Für *Cry2* und *Per1* zeigten sich an den gewählten Zeitpunkten keine eindeutigen SIRT6-abhängigen Unterschiede in der Expression.

Im Vergleich zu Tieren mit konstitutivem, globalem *Sirt6-Knockout* wurde im Folgenden auch die Expression einiger dieser Gene (*Arntl*, *Clock* und *Nr1d1*) in Mäusen mit hepatozytenspezifischem *Sirt6-Knockout* untersucht. Da die Albumin-Cre vermittelte Rekombination von *Sirt6* im Stamm KO-*Sirt6*-EUCOMM X *AlbuminCre* erst in einem Alter von etwa sechs Wochen nach der Geburt zu erwarten ist¹¹⁸, wurden Tiere im Alter von neun Wochen für den Versuch verwendet und jeweils zwei Tiere pro Genotyp und Zeitpunkt (ZT 2 und ZT 11) getötet, Lebergewebe entnommen, schockgefroren und Gesamt-RNA aus den Lebern isoliert. Mittels RT-PCR wurde die Expression von *Arntl*, *Clock* und *Nr1d1* untersucht und die Ergebnisse in Abbildung 3.32(B) den entsprechenden Ergebnissen der Mäuse mit konstitutivem, globalem *Sirt6-Knockout* (Abb. 3.32(A)) gegenübergestellt. Abbildung 3.32 zeigt, dass eine Deregulation der Expression der untersuchten Gene, wie sie in Abbildung 3.31 zu sehen ist, unter den verwendeten Versuchsbedingungen in Mäusen mit hepatozytenspezifischen *Sirt6-Knockout* nicht beobachtet werden konnte. Die Expressionsniveaus in Lebern von *Sirt6*^{fl/fl}*AlbCre*-Tieren entsprachen in starkem Maße denen der wildtypischen Vergleichstiere.

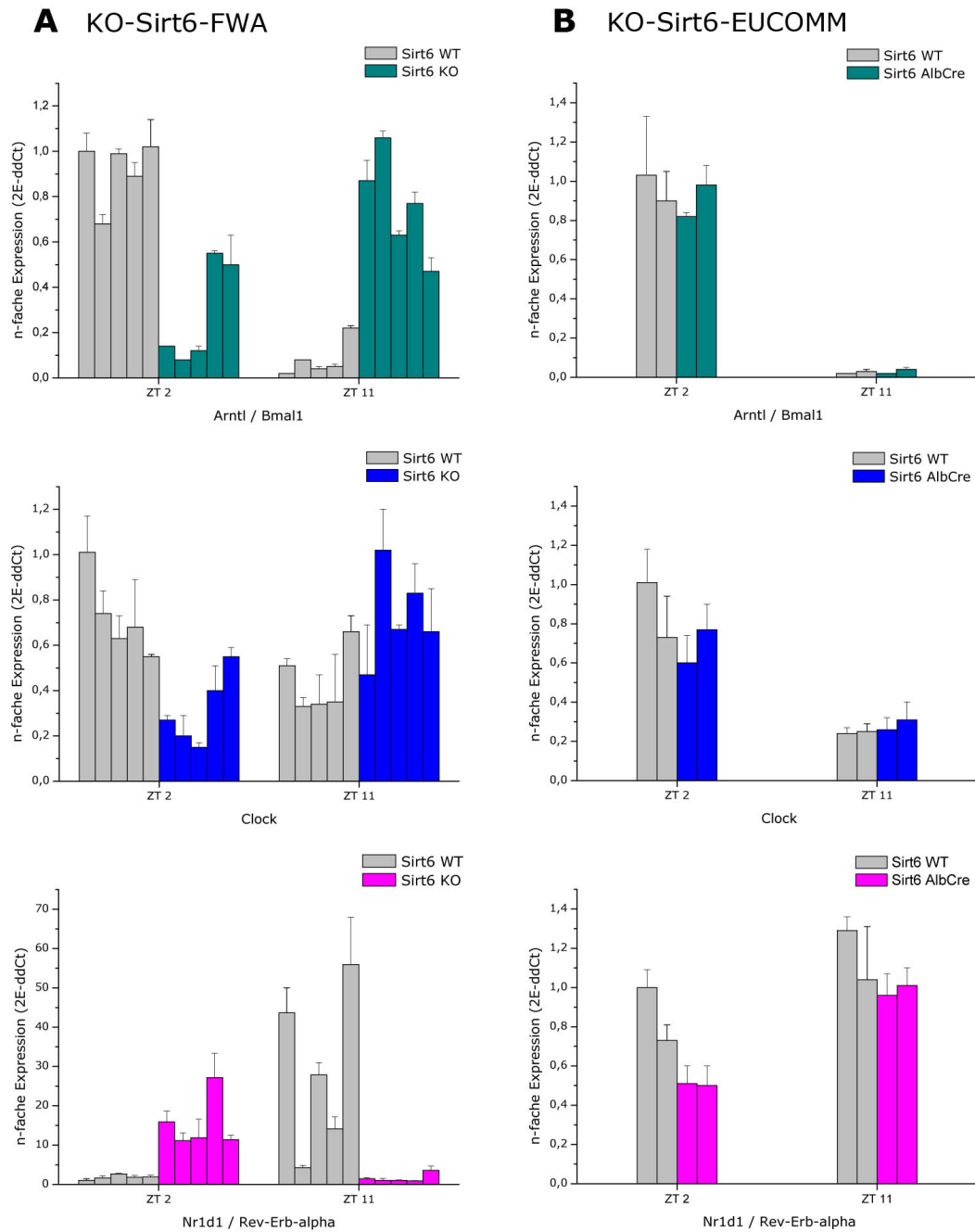


Abbildung 3.32: Vergleich der Expression von Genen der zirkadianen Uhr in der Leber von Mäusen mit leberspezifischem *Sirt6-Knockout* mit Mäusen mit konstitutivem *Sirt6-Knockout*. Die Expression der Gene *Arntl*, *Clock* und *Nr1d1* wurde in RNA aus Lebergewebe mittels RT-PCR untersucht. Hierzu wurden zu jeweils zwei verschiedenen Tageszeiten (ZT 2 und ZT 11) aus **A** jeweils fünf *Sirt6*^{wt} und fünf *Sirt6*^{ko} Tieren des Stammes *KO-Sirt6-FWA* im Alter von 21-23 Tagen bzw. **B** jeweils zwei *Sirt6*^{fl/fl} (*Sirt6* WT) und zwei Mäusen mit hepatozytenspezifischen *Sirt6-Knockout* (*Sirt6*^{fl/fl}*AlbCre*; *Sirt6* *AlbCre*) Tieren des Stammes *KO-Sirt6-EUCOMM* im Alter von neun Wochen Lebergewebe entnommen. In der Darstellung wurde immer der Wert des Tieres WT-1 zum Zeitpunkt ZT 2 auf 1 gesetzt und die übrigen Werte daran angepasst.

3.5.4. Expression onkofetaler Gene in Abwesenheit von SIRT6

Zwei der am stärksten in murinen *Sirt6*^{ko} Hepatozyten überexprimierten Gene sind *H19* und *Igf-2*, deren Expression in adulten Mäusen normalerweise gänzlich herunterreguliert sein sollte¹³⁰. Die Expression dieser beiden Gene sowie zweier weiterer im Zusammenhang mit der Leber gut charakterisierter onkofetaler Gene (*Afp* und *Gpc-3*) wurden im Folgenden in Hepatozyten dreier *Sirt6*^{ko} und *Sirt6*^{wt}-Geschwisterpaare des Stammes KO-*Sirt6*-Fwa mittels RT-PCR untersucht.

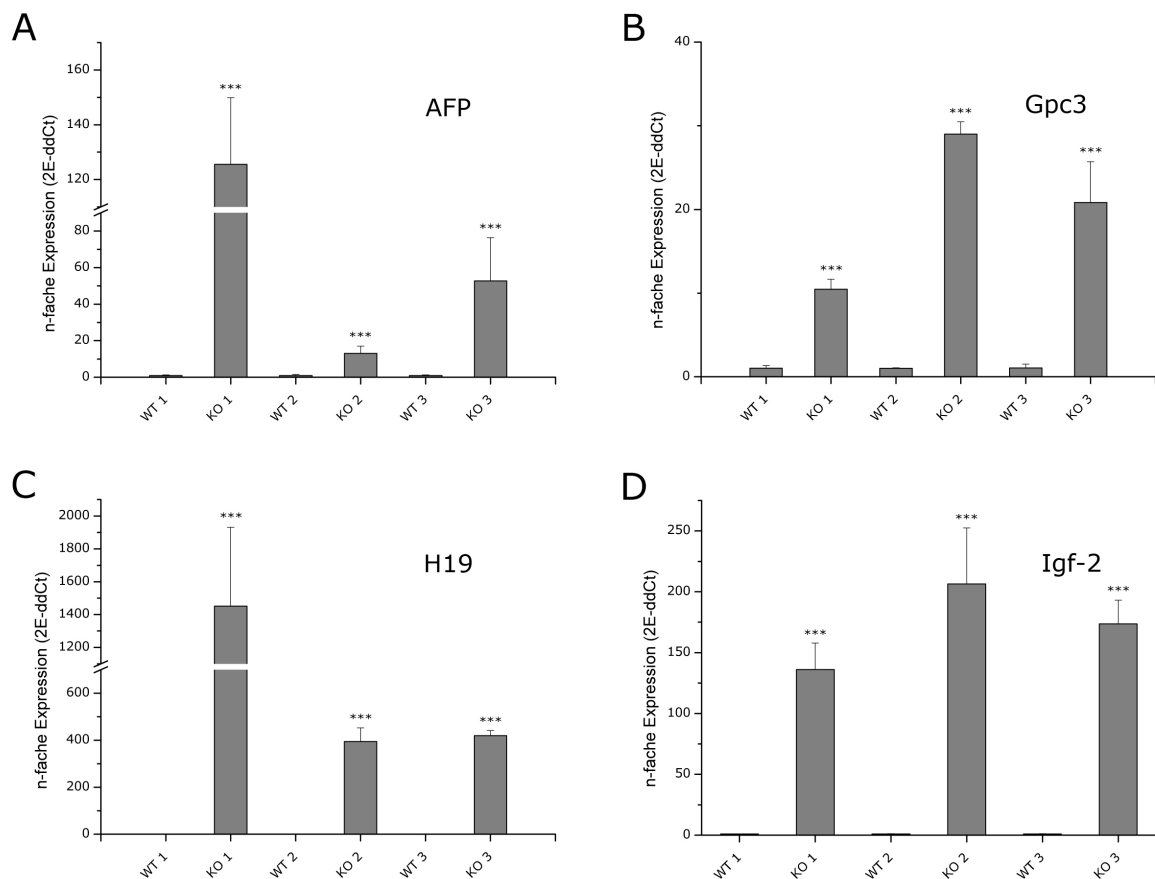


Abbildung 3.33: Untersuchung der Expression potentiell durch Sirt6 regulierter Faktoren in *Sirt6*^{ko} Hepatozyten. Die Expression von **A** Alpha-Fetoprotein (*Afp*), **B** Glypican 3 (*Gpc3*), **C** *H19* und **D** Insulin-like Growth Factor 2 (*Igf-2*) in *Sirt6*^{wt} und *Sirt6*^{ko} Hepatozyten wurde mittels RT-PCR in Zellen dreier Geschwisterpaare analysiert. Die Expression im jeweiligen wildtypischen Geschwistertier (WT) wurde auf 1 gesetzt und die Expression in den dazugehörigen *Sirt6* knockout (KO) Zellen darauf bezogen. Die Daten wurden mit dem Student t-Test analysiert, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Das in Abbildung 3.33 dargestellte Ergebnis zeigt, dass die Menge aller vier untersuchten Transkripte in allen untersuchten *Sirt6^{ko}*-Tieren gegenüber ihrem wildtypischen Geschwistertier signifikant erhöht war.

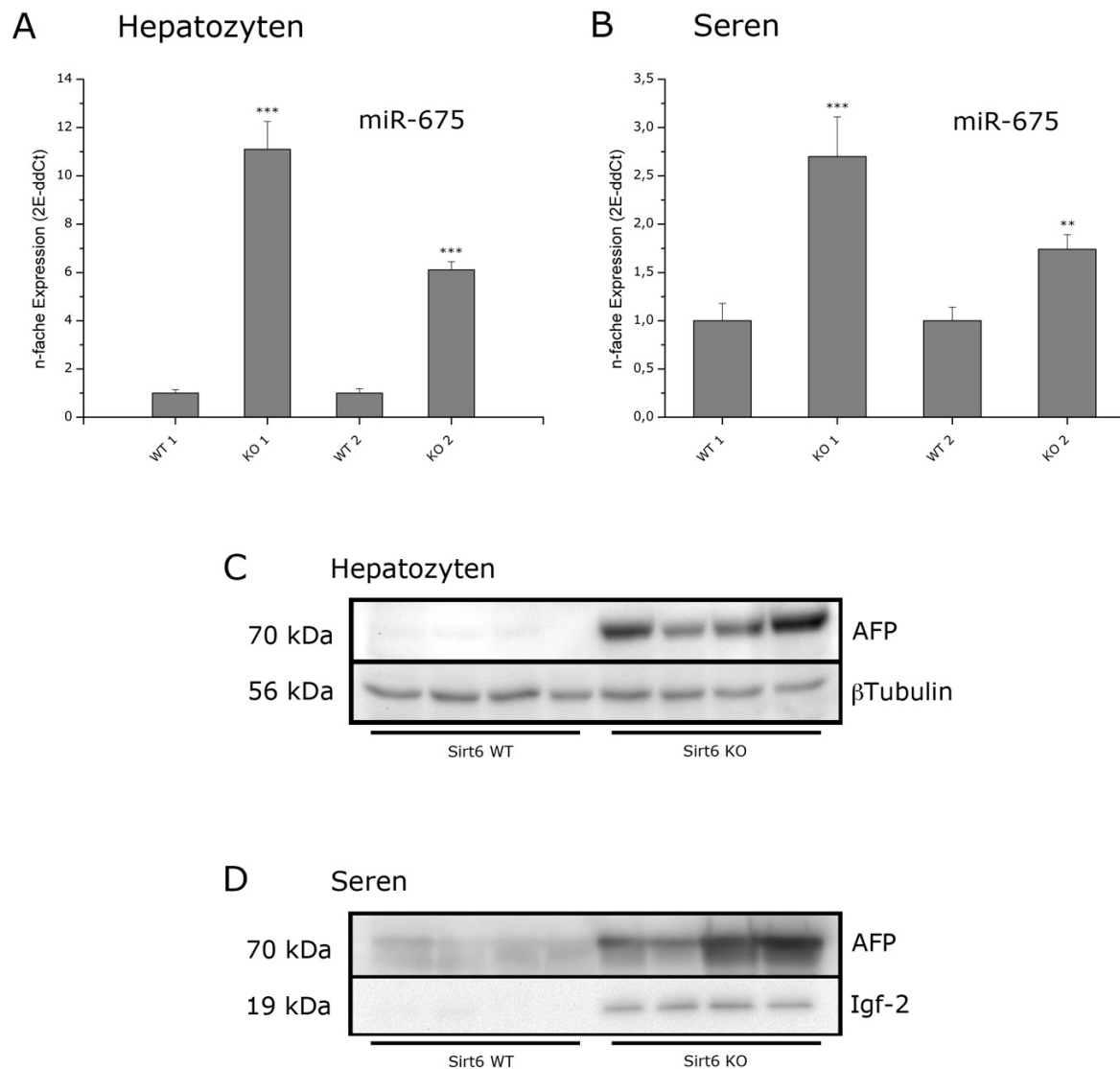


Abbildung 3.34: Untersuchung der Expression der von H19 abstammenden Micro-RNA miR-675 sowie AFP und IGF-2 in in Hepatozyten und Seren von *Sirt6^{wt}* und *Sirt6^{ko}* Mäusen. Die Expression von miR-675 in **A** Hepatozyten und **B** Seren von *Sirt6^{ko}* - im Vergleich zu *Sirt6^{wt}* -Geschwistertieren wurde in jeweils zwei Paaren mittels RT-PCR analysiert. Die Expression im wildtypischen Vergleichstier wurde auf 1 gesetzt. Die Daten wurden mit dem Student t-Test analysiert; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Expression von Alpha-Fetoprotein (AFP) bzw. IGF-2 wurde in **C** Gesamtzelllysaten isolierter Hepatozyten oder **D** Seren mittels Western Blot analysiert. Verwendet wurden Zellen und Seren aus vier Geschwisterpaaren. β Tubulin wurde in Hepatozyten als Ladekontrolle verwendet.

Des weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die von der nicht-protein codierenden RNA H19 abstammende Micro-RNA miR-675 sowohl in Hepatozyten als auch in Seren zweier *Sirt6*^{ko} Tiere gegenüber deren wildtypischen Geschwistertieren signifikant erhöht war (Abb. 3.34(A) und (B)). AFP wurde sowohl in Hepatozyten als auch in Seren mittels Western Blot detektiert, jedoch konnte es jeweils nur in *Sirt6*^{ko}-Proben nachgewiesen werden (Abb. 3.34(B) und (C)). IGF-2 konnte im Serum detektiert werden, allerdings ebenfalls nur in Seren aus *Sirt6*^{ko}-Tieren (Abb. 3.34(C)). Es ist zu beachten, dass es sich nicht um die vollständig gereifte Form von IGF-2 der Größe von etwa 8 kDa, sondern um eine größere Vorstufe von etwa 19 kDa handelte¹³¹.

Die Expression von *H19* und *Igf-2* wurde auch in Hepatozyten von Mäusen mit hepatozytenspezifischem *Sirt6*-Knockout überprüft. Auch hier konnte festgestellt werden, dass beide Gene in *Sirt6*^{fl/fl}*AlbCre*-Mäusen signifikant höher exprimiert wurden als in wildtypischen Vergleichstieren (Abb. 3.35).

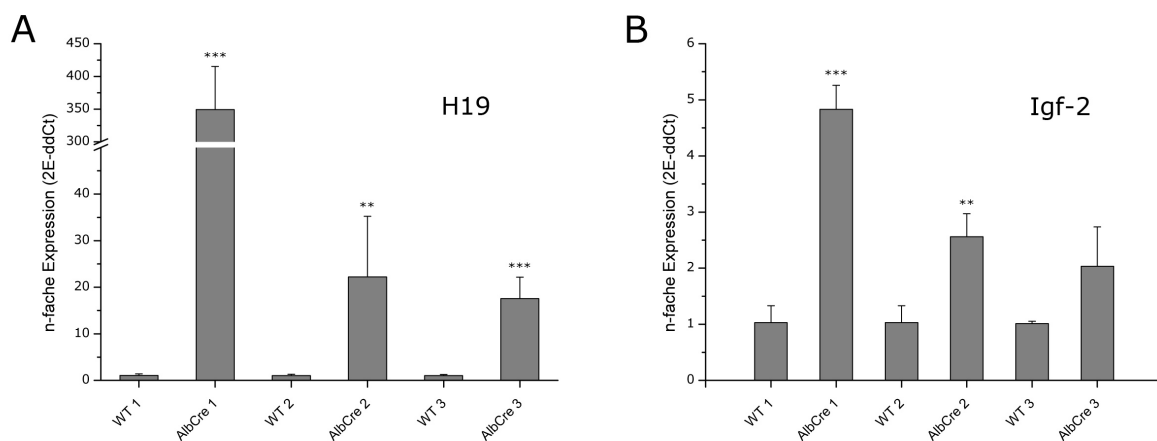


Abbildung 3.35: Untersuchung der Expression von H19 und Igf-2 in Hepatozyten aus Mäusen mit leberspezifischem *Sirt6* knockout. Die Expression von **A** H19 und **B** Insulin-like Growth Factor 2 (Igf-2) in *Sirt6*^{fl/fl} (WT) und *Sirt6*^{AlbCre} (*AlbCre*) Hepatozyten wurde mittels RT-PCR in Zellen dreier Geschwisterpaare analysiert. Die Expression im jeweiligen wildtypischen Geschwistertier (WT) wurde auf 1 gesetzt und die Expression in den dazugehörigen *Sirt6*^{AlbCre} Hepatozyten darauf bezogen. Die Daten wurden mit dem Student t-Test analysiert; ** p<0.01, *** p<0,001.

3.6. Untersuchung der Expression von *SIRT6* und von potentiell in ihrer Expression durch *SIRT6* regulierten Faktoren in humanen malignen Erkrankungen

Für *SIRT6* wurden bereits Rollen in der Regulation der Genomstabilität^{6,132}, der Genexpression^{27,41,133}, der DNA-Reparatur^{6,7,30,132,134}, des Zellzyklus²⁸ und des Zellstoffwechsels^{11,39,52,133} nachgewiesen, was auf eine Schlüsselfunktion von *SIRT6* in der natürlichen, gesunden Funktionalität sowohl einzelner Zellen als auch des ganzen Organismus hindeutet. Diese Prozesse sind zudem häufig in Tumorerkrankungen gestört oder dereguliert.

3.6.1. Untersuchung der Expression von *SIRT6* in humanen Tumorerkrankungen

Um die Expression von *SIRT6* in humanen Tumorerkrankungen verschiedener Organe zu untersuchen, wurde eine standardisierte Zusammenstellung von normalisierten cDNA-Proben aus verschiedenen, gut charakterisierten humanen Tumorproben mittels RT-PCR untersucht (TissueScan von OriGene). Die Proben stammen aus Tumoren der Lunge, Brust (Mamma), Niere und Gebärmutter (Ovar). Eine normale Gewebeprobe dient jeweils zum Vergleich (Abbildung 3.36).

In Tumoren der Lunge und Niere war in jeweils vier von fünf untersuchten Tumorgeweben eine Reduktion der Menge an *SIRT6*-Transkript im Vergleich zum Normalgewebe zu beobachten. In Karzinomen der weiblichen Brust (Mamma) zeigte sich eine Reduktion der *SIRT6*-Expression in zwei von fünf Proben, wohingegen in Karzinomen des Ovar in keiner der untersuchten Proben eine Reduktion der *SIRT6*-Expression messbar war. Im Vergleich zum Normalgewebe war eine deutliche Veränderung der *SIRT6*-Expression in fast allen untersuchten Tumorproben nachweisbar, jedoch scheint die Art der Änderung in der Expression von *SIRT6* mit dem Ursprungsgewebe der Tumore in Verbindung zu stehen (Abb. 3.36). Um darüber jedoch eine statistisch relevante Aussage treffen zu können, müssten sehr viel mehr Gewebeproben analysiert werden.

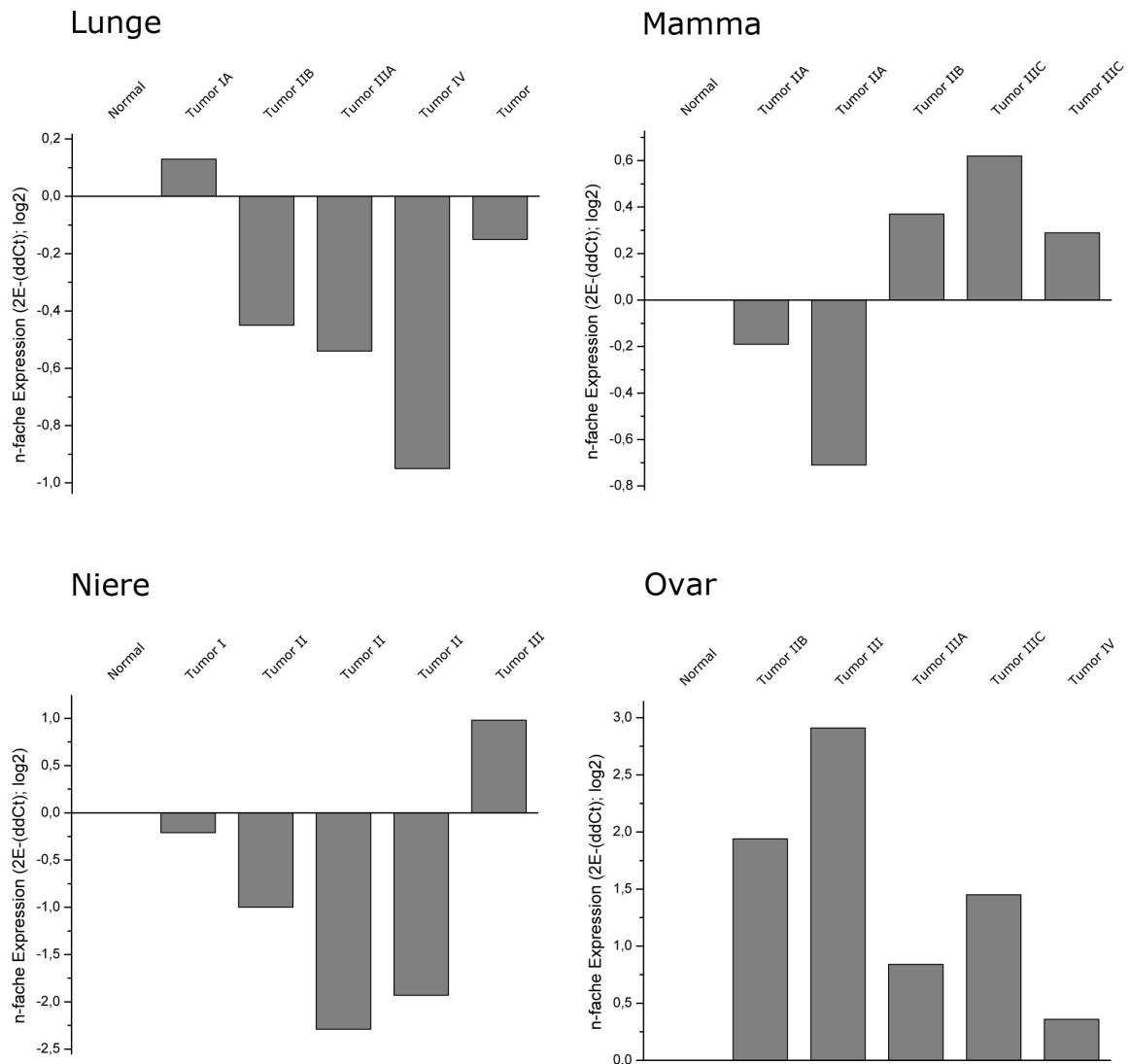


Abbildung 3.36: Untersuchung der Expression von *SIRT6* in verschiedenen humanen Tumorgeweben. Die Expression von *SIRT6* wurde in insgesamt 24 normalisierten cDNA-Proben humaner klinischer Proben gemessen (TissueScan von OriGene). Es handelt sich um gut charakterisierte Tumore verschiedener Stadien und verschiedenen zellulären Ursprungs in den Organen Lunge, Mamma, Niere und Ovar.

3.6.2. Expression von *SIRT6* und von potentiell in ihrer Expression durch *SIRT6* regulierten Faktoren im Hepatozellären Karzinom (HCC) und humanen Hepatomzelllinien

Um eine Korrelation der *SIRT6*-Expression mit verschiedenen Erkrankungen der Leber zu untersuchen, haben wir zunächst die Expression von *SIRT6* in verschiedenen zum Teil

öffentlich zugänglichen Expressionsdatensätzen humaner HCC-Proben untersucht. In über 40 % aller verglichenen Datensätze (insgesamt 91) wurde eine signifikant verringerte Expression von *SIRT6* im Vergleich zu gesundem Lebergewebe festgestellt. Auch in zirrhatischen Lebergeweben wurde eine signifikant reduzierte *SIRT6*-Expression nachgewiesen. Darüber hinaus haben wir die in murinen Hepatozyten durch *Sirt6-Knockout* resultierende Genexpressionssignatur dazu verwendet, die Expressionsmuster orthologer humaner Gene in HCC-Geweben näher zu analysieren. Eine Übereinstimmung des HCC-Expressionsmusters mit der *Sirt6-Knockout*-Signatur ist assoziiert mit bestimmten HCC-Subtypen ungünstigerer Prognose, d.h. häufigerem erneuten Auftreten der Erkrankung und kürzerer Überlebensdauer⁴⁰.

In diesem Zusammenhang wurde auch die *SIRT6*-Expression in gut charakterisierten humanen Hepatomzelllinien im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten untersucht. Die Expression der potentiell durch *SIRT6* regulierten Gene und gut charakterisierten onkofetalen Tumormarker *Alpha-Fetoprotein* (*AFP*), *H19* und *IGF-2* wurde ebenfalls analysiert (Abbildung 3.37). In allen untersuchten Zelllinien war eine starke und signifikante Herunterregulation der Expression von *SIRT6* im Vergleich zu gesunden humanen Hepatozytenproben zu beobachten. *AFP* hingegen zeigte in allen Hepatomzelllinien eine signifikant erhöhte Expression. *H19* wurde nur in Hep3B Zellen höher exprimiert als in gesunden Hepatozyten, für *IGF-2* war eine signifikant höhere Expression in HepG2 und Hep3B Zellen nachweisbar.

3.6.3. Untersuchung einer möglichen Korrelation der Expression von *SIRT6* und *AFP* in Hep3B Zellen

In Hep3B Zellen war sowohl eine herunterregulierte Expression von *SIRT6* als auch eine gesteigerte Expression von Alpha-Fetoprotein (*AFP*), *H19* und Insulin-like Growth Factor 2 (*IGF-2*) im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten zu beobachten (Abb. 3.37). Es sollte daher untersucht werden, ob eine Steigerung der Expression von *SIRT6* zu einer Änderung der Expression von *AFP* als potentiell durch *SIRT6* reguliertem Faktor in die-

sen Zellen führt. Zu diesem Zweck wurden Hep3B Zellen mit dem Vektor *SIRT6*-Flag bzw. einem Kontrollvektor transfiziert und unter Selektion mit dem Antibiotikum G418 mehrere stabil transfizierte Klone herangezogen und isoliert. Aus je drei stabil transfizierten Klonen wurde Gesamt-RNA und Gesamt-Protein isoliert und die Expression von *SIRT6* und AFP mittels RT-PCR und Western Blot analysiert.

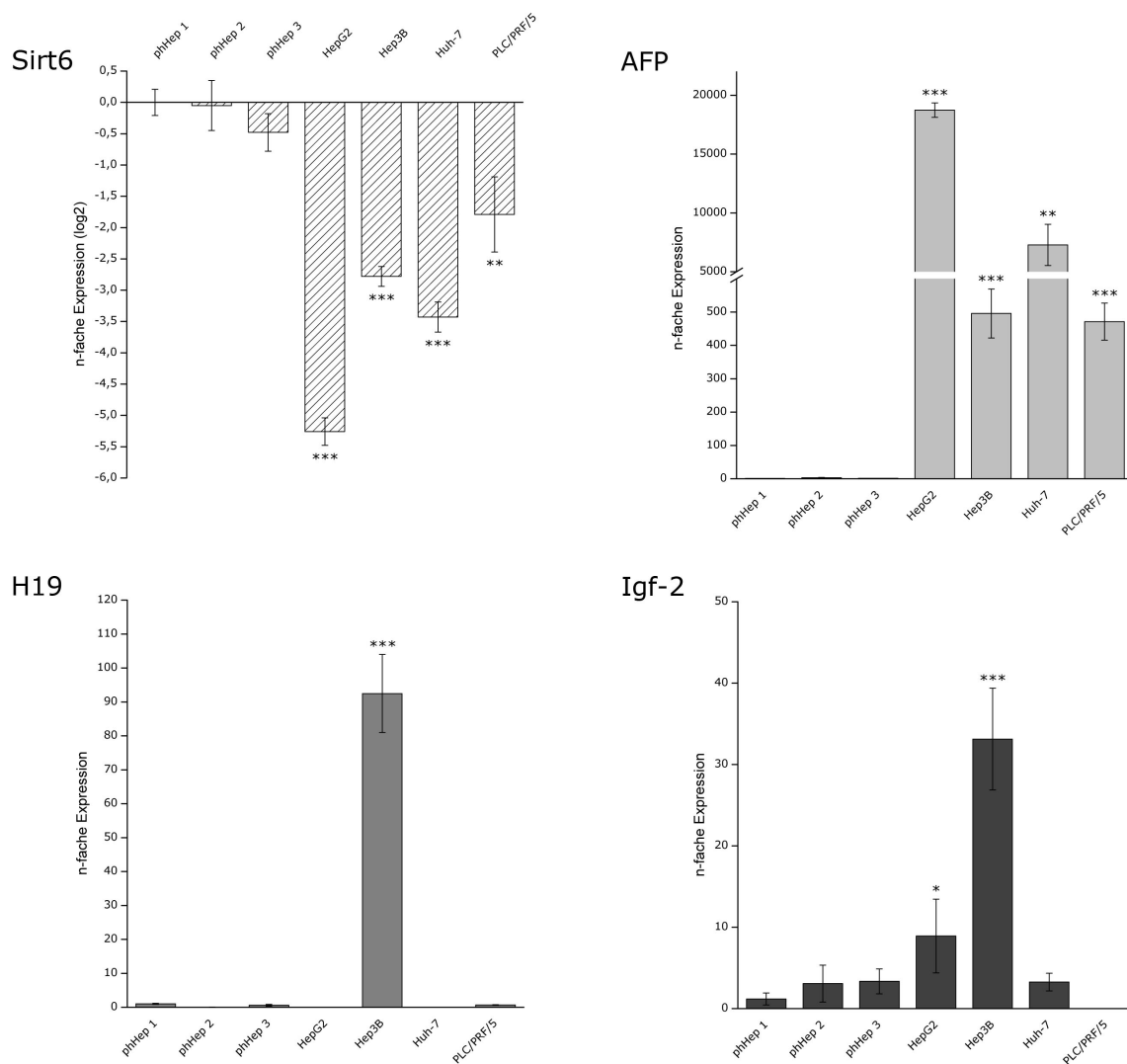


Abbildung 3.37: Korrelation der Expression von *SIRT6* und potentiell durch *SIRT6* regulierter Gene in humanen Hepatomzelllinien. Die Genexpression von *SIRT6*, *AFP*, *H19* und *IGF-2* wurde in vier humanen Hepatomzelllinien (HepG2, Hep3B, Huh-7 und PLC/PRF/5) mittels RT-PCR untersucht. Drei Proben primärer humaner Hepatozyten (phHep1-3) dienen als Kontrollen. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen und die erhaltenen Daten auf phHep1=1 normalisiert. Die Signifikanz der Daten wurde mittels Student t-Test analysiert; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Das Ergebnis in Abbildung 3.38 zeigt, dass durch RT-PCR eine 10-15-fach stärkere Expression von *SIRT6* in den mit *SIRT6*-Flag transfizierten Klonen festgestellt werden konnte (Abb. 3.38(A)). Die Überexpression war ebenfalls im Western Blot (Abb. 3.38(B)) nachweisbar. Darüber hinaus zeigte sich mit den gleichen Nachweismethoden eine gleichzeitig auftretende schwächere Expression von AFP gegenüber den mit Kontrollvektor transfizierten Zellen mit einer Reduktion auf etwa 15-55 % des Ausgangsniveaus der Expression. In dem hier verwendeten Versuchsansatz lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Expression von *SIRT6* und AFP vermuten, dessen Natur noch näher untersucht werden muss.

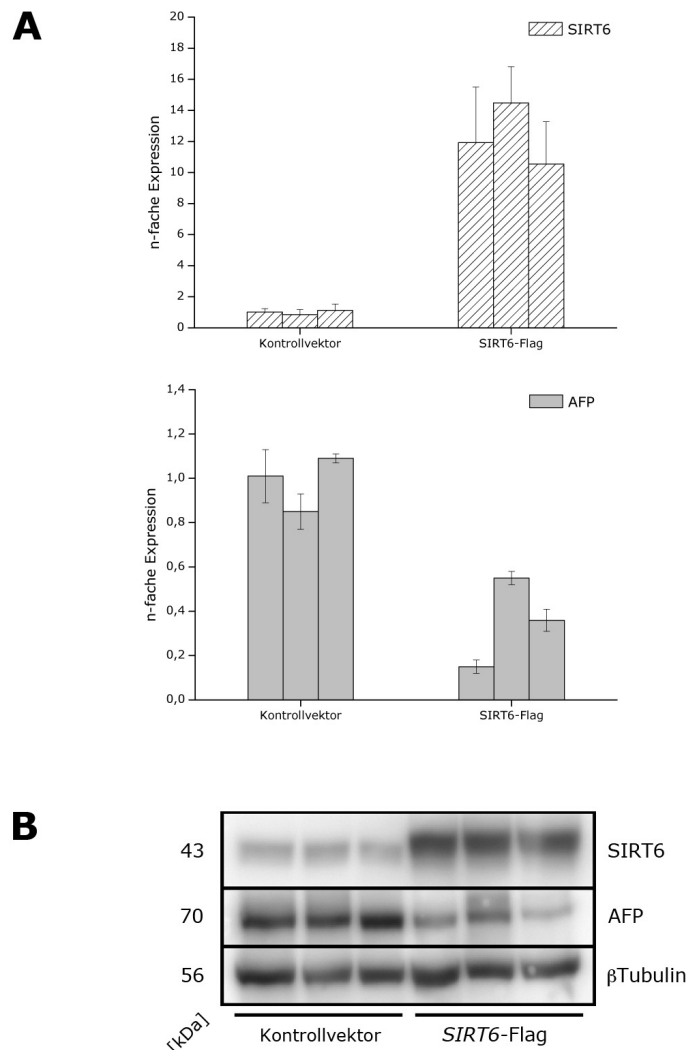


Abbildung 3.38: Untersuchung des Einflusses einer *SIRT6*-Überexpression auf die Expression von Alpha-Fetoprotein (AFP) in Hep3B Zellen. Hep3B Zellen wurden stabil mit *SIRT6*-Flag oder einem Kontrollvektor transfiziert. Die Expression von *SIRT6* und AFP wurde in je drei stabil transfizierten Klonen mittels RT-PCR (**A**) und Western Blot (**B**) analysiert.

3.6.4. Untersuchung der Expression von Merkmalen des Krebsstammzellphänotyps in Abhängigkeit von der SIRT6-Expression

Am Beispiel der Hepatomzelllinie Huh-7 sollte untersucht werden, ob sich die Expression von SIRT6 auf die Expression von Merkmalen so genannter Krebsstammzellen („*Cancer Stem Cells*“, „*CSCs*“) dieser Zelllinie auswirkt. Als Oberflächenmarker für Krebsstammzellen beim Hepatozellulären Karzinom (HCC) gelten unter anderem CD44, CD90, CD133 und EpCAM¹³⁵⁻¹³⁸. Für Huh-7, aber auch in anderen Hepatomzelllinien wurde die Co-Expression der Stammzellmarker CD44 und CD133 als ein entscheidendes Merkmal für die Identifikation von CSCs beschrieben¹³⁵.

Zunächst wurden eine in einem früheren Projekt generierte Huh-7-Zelllinie mit stabilem *Knockdown* der SIRT6-Expression („Huh-7/SIRT6-Knockdown“) sowie ein Klon mit stabil transfizierten Kontrollvektor („Huh-7/pSuper“)¹³⁹ durchflusszytometrisch auf ihre Expression der Oberflächenmoleküle CD44 und CD133 untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich der Anteil CD44+/CD133+ Zellen zwischen diesen beiden Zelllinien unterschied und der Anteil doppelt positiver Zellen in der Linie mit verminderter SIRT6-Expression von 22,6 auf nur noch 8,34 % vermindert war (Abbildung 3.39(B)). Eine genauere Analyse der einzelnen Marker zeigt, dass die Reduktion doppelt positiver Zellen durch eine Reduktion der Expression von CD133 bedingt war, für CD44 jedoch keine Änderung in der Expression festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis deutet auf eine Korrelation zwischen der Expression von SIRT6 und CD133 hin.

Zur weiteren Untersuchung einer solchen Korrelation wurden Huh-7 Zellen transient mit siRNA gegen *SIRT6* bzw. einem Expressionsplasmid für *SIRT6* („*SIRT6*-Flag“) transfiziert und nach Färbung von CD133 mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle dienten untransfizierte Huh-7 Zellen sowie die Transfektion mit unspezifischer siRNA oder einem Kontrollvektor, von denen in Abbildung 3.40(B) nur eine repräsentative Kontrolle dargestellt ist. Alle im Folgenden genannten Werte beziehen sich auf den Median der Expressionkurve von CD133, der aus Abbildung 3.40(B) berechnet wurde.

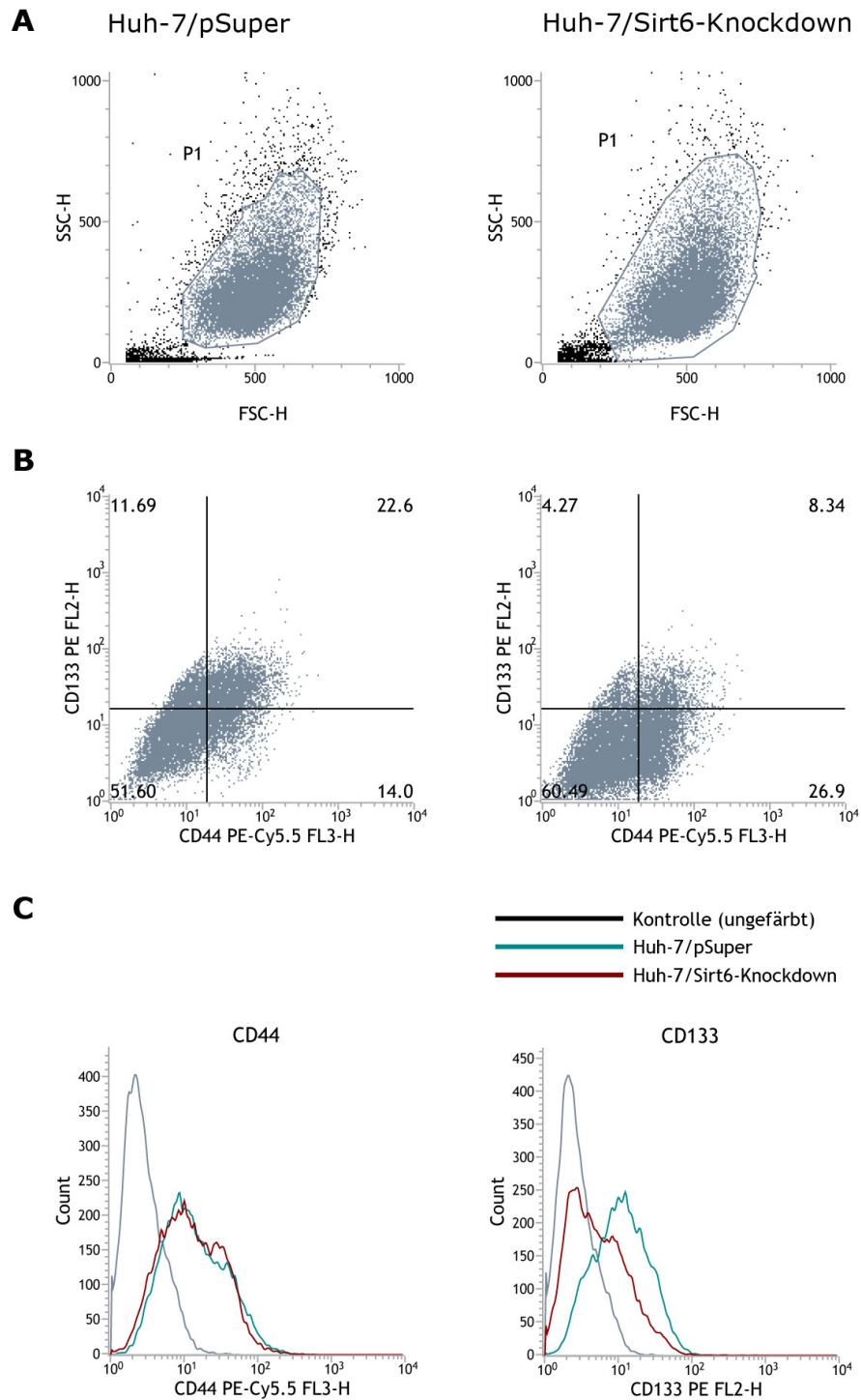


Abbildung 3.39: Korrelation der SIRT6-Expression mit der Größe der CD44+/CD133+ Population in Huh-7 Zellen. Huh-7 Zellen mit stabilem *SIRT6*-Knockdown bzw. mit stabil transfiziertem Kontrollvektor (Huh-7/pSuper) wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD44 und CD133 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

A Zur Auswertung wurde jeweils die lebende Zellpopulation ausgewählt (oben; P1). **B** Zellen der beiden Linien wurden hinsichtlich ihrer Expression eines oder beider untersuchten Obeflächenmarker hin analysiert. **C** zeigt Histogramme der Verteilung der CD44- bzw. CD133-Expression im Vergleich zwischen beiden Linien.

Das Ergebnis in Abbildung 3.40(B) zeigt, dass die Transfektion mit siRNA gegen *SIRT6* zu einer Verschiebung der mittleren Expression von CD133 von 32 (Kontrolle) auf 29 führte. Die Überexpression von *SIRT6* hingegen führte zu einer Erhöhung der mittleren Expression von 32 auf 42. Dieses Ergebnis untermauert die Vermutung, dass die Expression von CD133 mit der von *SIRT6* korreliert. Die funktionalen Ursachen dieser Korrelation sowie deren Bedeutung müssen in weiteren Experimenten näher untersucht und charakterisiert werden.

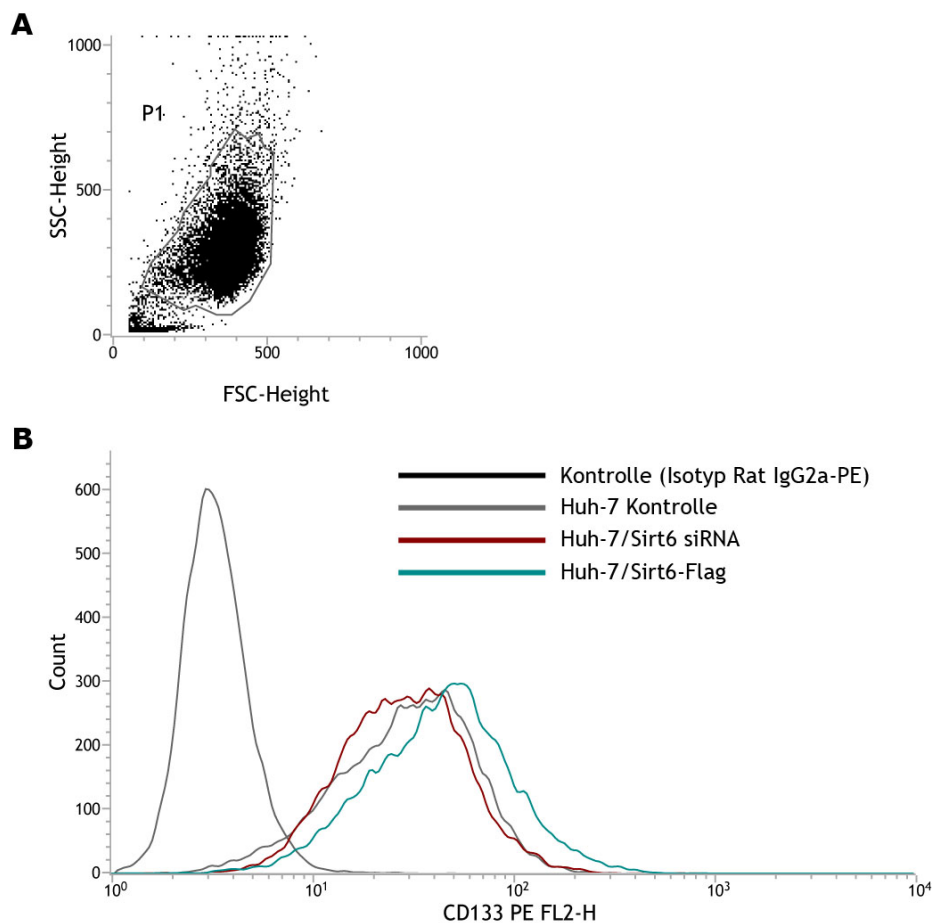


Abbildung 3.40: Korrelation der *SIRT6*-Expression mit der Expression von CD133 in Huh-7 Zellen. Huh-7 Zellen wurden transient mit siRNA gegen *SIRT6* oder einem *SIRT6*-Expressionsplasmid (*SIRT6*-Flag) transfiziert. Die Zellen wurden mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen CD133 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. **A** Für die Auswertung wurde jeweils die Population lebender Zellen (P1) berücksichtigt. **B** zeigt im Histogramm die Verteilung der CD133-Expression in P1 der verschiedenen transfizierten Zellen. Als Transfektionskontrollen dienten untransfizierte Zellen, die Transfektion mit unspezifischer siRNA bzw. eines Kontrollvektors, wovon nur eine repräsentative Kontrolle im Histogramm dargestellt ist.

3.6.5. Einfluss von SIRT6 auf die Proliferation und 2D-Koloniebildung in humanen Hepatomzelllinien

Da eine Herunterregulation der *SIRT6*-Expression in allen untersuchten Hepatomzelllinien festgestellt wurde (Abb. 3.37), sollte im Folgenden der Einfluss einer Re-Expression von SIRT6 auf Merkmale der Malignität einiger dieser Tumorzelllinien (Hep3B, HepG2 und Huh-7) untersucht werden.

Zunächst wurde in HepG2-Zellen beispielhaft bestätigt, dass eine transiente Transfektion mit dem Vektor pCMV6-*SIRT6* zu einer Überexpression von SIRT6 führt. Diese wurde nach 24 Std. durch Western Blot von Gesamtzelllysaten untersucht. Abbildung 3.41 zeigt sowohl die Expression von intrinsischem SIRT6 als auch die des etwas größeren SIRT6-Myc in HepG2 Zellen, die mit pCMV6-*SIRT6* transfiziert wurden.

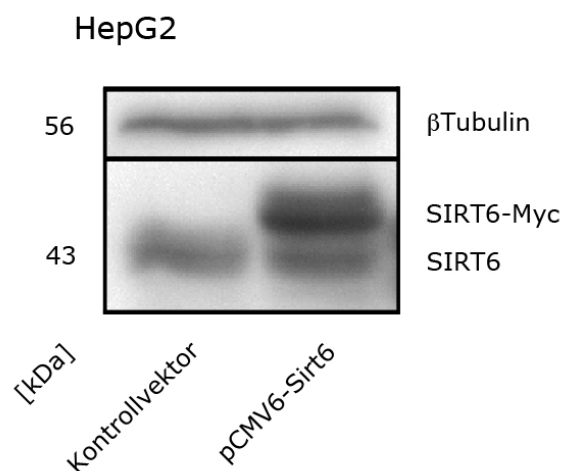


Abbildung 3.41: Untersuchung der Überexpression von SIRT6 in HepG2 Zellen. HepG2 Zellen wurden transient mit dem Vektor pCMV6-*SIRT6* oder einem Kontrollvektor transfiziert. Die Expression von ektoischem SIRT6-Myc in HepG2 Zellen wurde mittels Western Blot untersucht. β Tubulin diente als Ladekontrolle.

Im Folgenden sollte geprüft werden, ob eine Überexpression von ektoischem SIRT6 Einfluss auf das Wachstumsverhalten verschiedener Hepatomzelllinien hat. Dafür wurden

Hep3B, HepG2 und Huh-7 Zellen transient mit pCMV6-*SIRT6* oder einem Kontrollvektor transfiziert und nach 24 Std. entweder für einen Proliferations-Assay auf 96-Kavitätenplatten oder für einen 2D-Koloniebildungsversuch auf 6-Kavitätenplatten ausgesät. Für beide Versuche wurden die Zellen unter Behandlung mit dem Antibiotikum G418 gehalten, um transfizierte Zellen zu selektieren.

Für die Messung der Proliferationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von *SIRT6*-Überexpression wurde am Tag der Aussaat und an den drei folgenden Tagen die Anzahl lebender Zellen in mehreren Kavitäten mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay gemessen (Abb. 3.42(A)). Für den 2D-Koloniebildungsversuch wurden die Zellen über zehn Tage auf den Platten kultiviert, dann fixiert und die Zellkolonien mit Giemsa-Farbstoff sichtbar gemacht. Abbildung 3.42(B) zeigt jeweils zwei repräsentative Kavitäten. Im Proliferations-Assay zeigten die Wachstumskurven der mit pCMV6-*SIRT6* oder Kontrollvektor transfizierten Zellen bei allen drei Zelllinien jeweils einen sehr ähnlichen Verlauf (Abb. 3.42(A)). Auch im 2D-Koloniebildungs-Assay war keine Änderung in Größe oder Anzahl der Kolonien abhängig von einer Überexpression von *SIRT6* zu erkennen (Abb. 3.42(B)). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse in Abbildung 3.42, dass im verwendeten Versuchsansatz die Überexpression von *SIRT6* das Wachstumsverhalten von humanen Leberkrebszelllinien nicht beeinflusste.

3.6.6. Einfluss von *SIRT6* auf die Apoptosesensitivität humaner Hepatomzelllinien

Als weiteres Merkmal der Malignität von Hepatomzelllinien sollte auch der Einfluss einer *SIRT6*-Überexpression auf die Sensitivität bezüglich verschiedener Chemotherapeutika sowie auf die Stimulation des CD95-Rezeptors getestet werden. Hierzu wurden HepG2, Hep3B und Huh-7 Zellen transient mit pCMV6-*SIRT6* oder einem Kontrollvektor transfiziert und für 24 Std. mit dem CD95-Agonisten Anti-Ap01 oder den Chemotherapeutika Daunorubicin oder Doxorubicin behandelt. Die Messung der Zellviabilität wurde dann mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay durchgeführt.

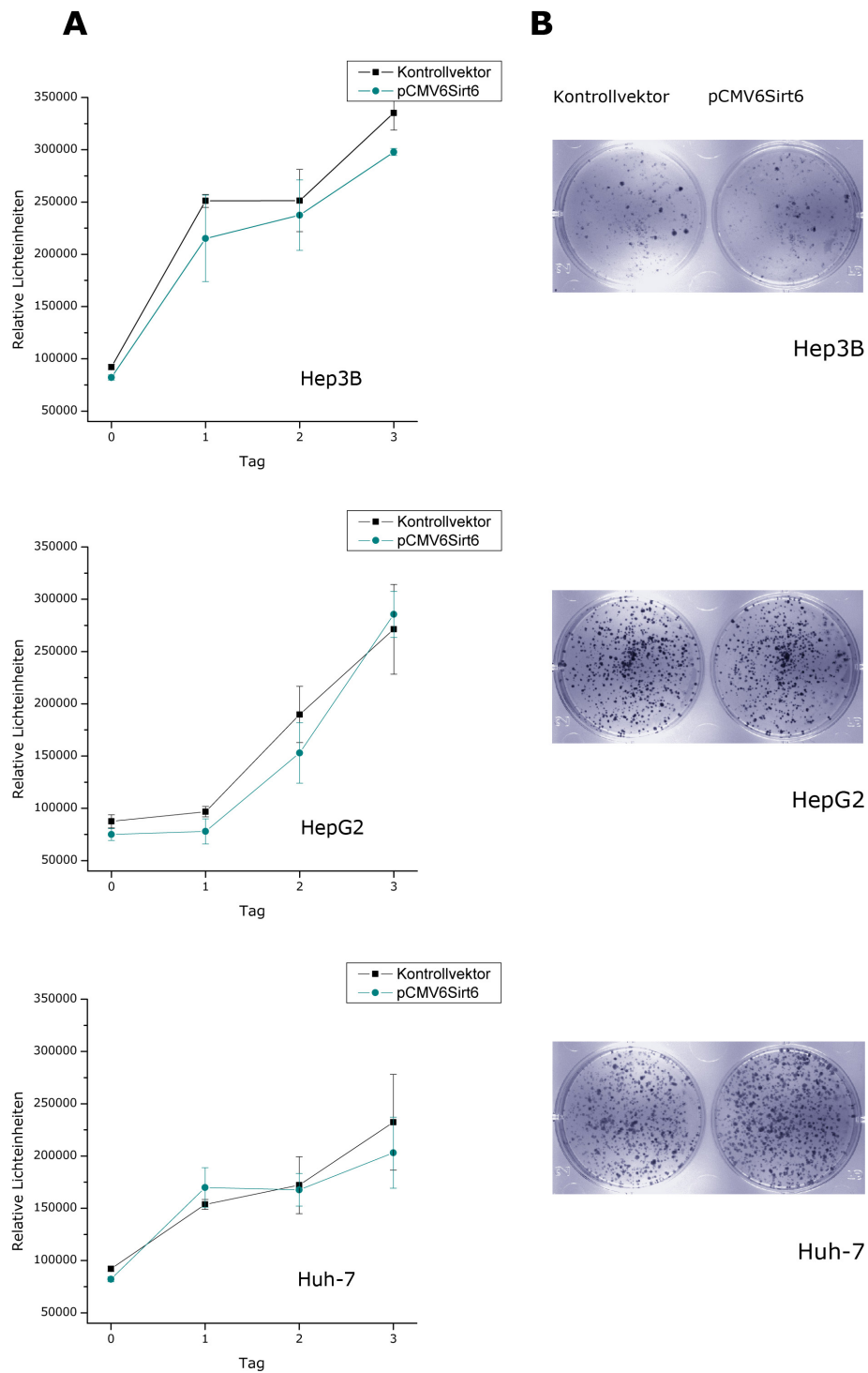


Abbildung 3.42: Untersuchung des Einflusses der SIRT6 Überexpression auf Proliferation und 2D-Koloniebildung von humanen Hepatomzelllinien. Hep3B, HepG2 und Huh-7 Zellen wurden transient mit pCMV6-SIRT6 oder einem Kontrollvektor transfiziert, mit gleicher Zellzahl ausgesät und unter Selektion mit dem Antibiotikum G418 kultiviert.

A Am Tag der Aussaat sowie an drei nachfolgenden Tagen wurde die Zellzahl mit Hilfe des CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay in jeweils drei Replikaten gemessen. **B** 2D-Kolonien wurden nach zehn Tagen durch Färbung mit Giemsa-Lösung sichtbar gemacht.

Abbildung 3.43 zeigt das Ergebnis der Untersuchung der Apoptosesensitivität von HepG2 Zellen. Bei Überexpression von SIRT6 durch Transfektion mit dem Vektor pCMV6-*SIRT6* zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate nach Behandlung mit dem CD95-Rezeptor Agonisten Anti-Apo1 sowie mit den Chemotherapeutika Daunorubicin und Doxorubicin gegenüber der unbehandelten Kontrollen (Abbildung 3.43(A-C)). Im Falle von Hep3B und Huh-7 Zellen waren keine Veränderungen in der Apoptosesensitivität bei SIRT6-Überexpression zu beobachten.

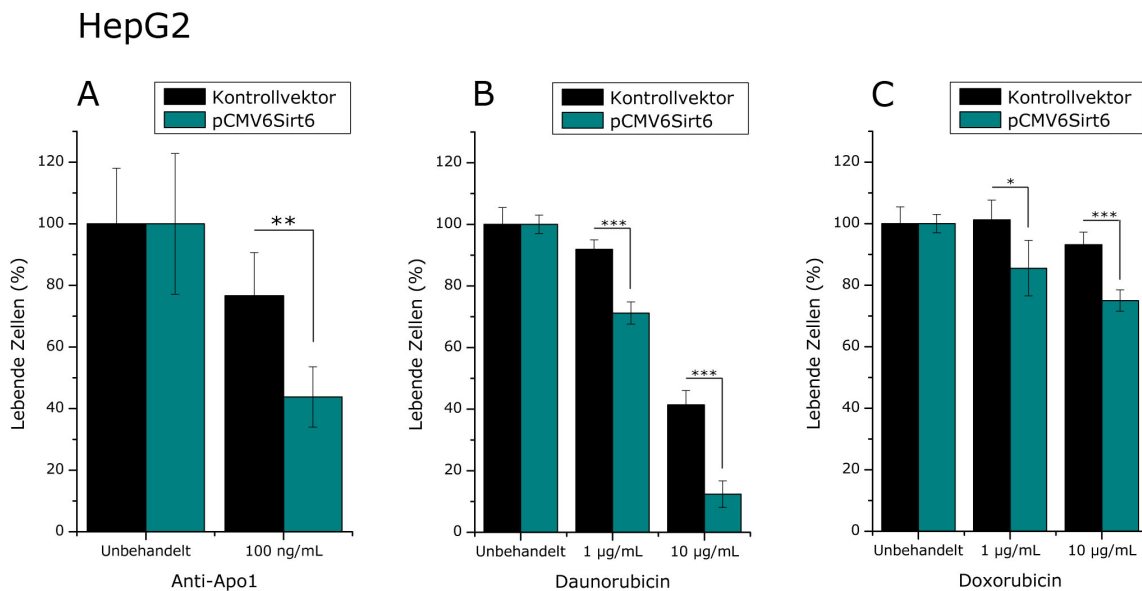


Abbildung 3.43: Untersuchung der Apoptosesensitivität von HepG2 Zellen in Antwort auf verschiedene Stimuli in Abhängigkeit von SIRT6. HepG2 Zellen wurden transient mit pCMV6-*SIRT6* oder einem Kontrollvektor transfiziert. 24 Std. nach Transfektion wurden die Zellen für 24 Std. mit **A** Anti-Apo1; **B** Daunorubicin oder **C** Doxorubicin behandelt. Die Viabilität der Zellen wurde mit dem CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay gemessen und die Viabilität der jeweils unbehandelten Zellen auf 100% gesetzt. Die Daten wurden mit dem Student t-Test analysiert; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.7. Identifikation von Interaktionspartnern von SIRT6 durch Co-Immunpräzipitation aus primären humanen Hepatozyten

In Abwesenheit von SIRT6 zeigen sich Veränderungen in verschiedensten Prozessen wie der Genomstabilisierung, Genexpression, Stoffwechselregulation und Entzündungsreaktion, jedoch wurden bisher verhältnismäßig wenige Interaktionspartner und Substrate von SIRT6 identifiziert bzw. näher charakterisiert. Um weitere direkt mit SIRT6 interagierende Faktoren in Hepatozyten zu identifizieren, wurde daher eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP) mit anschließender Identifikation der präzipitierten Proteine durchgeführt.

Da SIRT6 vornehmlich im Nucleus lokalisiert ist, wurde zur Co-IP ausschließlich Kernextrakt verwendet. Um einen möglichst physiologischen Zustand der SIRT6-Interaktionsnetzwerke in der Leber analysieren zu können, wurden primäre humane Hepatozyten verwendet und auf die Arbeit mit immortalisierten Zelllinien oder ektopischer Überexpression von SIRT6 verzichtet. Primäre humane Hepatozyten wurden durch Perfusion eines aus einer Teilresektion stammenden, gesunden Lebergewebestückes isoliert.

Die Co-IP wurde wie in Abschnitt 2.2.3.6. beschrieben durchgeführt. In Kürze dargestellt wurde das Kernlysats in drei Schritten mit kovalent an magnetische Beads gekoppelten unspezifischen IgG-Molekülen vorgereinigt und dann in zwei gleiche Teile geteilt. Eine Hälfte wurde mit spezifischem SIRT6-Antikörper, die andere mit unspezifischem IgG (Negativkontrolle) inkubiert, die ebenfalls kovalent an magnetische Beads gekoppelt worden waren. Ein Großteil der Beads beider Ansätze wurden nach Beendigung der Immunpräzipitation zur Analyse gebundener Proteine mittels einer label-freien quantitativen Proteomanalyse¹⁰⁷ an Dr.

(Core Facility Massenspektrometrie des Instituts für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) weitergegeben.

Zuvor wurden jedoch Proben des Kernlysats und aller an IgG/magnetische Beads gebundenen Proteine mittels kolloidaler Coomassie-Färbung im SDS-Gel sowie im Western Blot analysiert, um den Erfolg der SIRT6-IP zu bestätigen (Abb. 3.44). In dem Coomassiegefärbten SDS-Gel (Abb. 3.44(A)) ist zu sehen, dass nur die Spur der Probe „IP Sirt6“ ein schwaches Bandenmuster aufwies; in den Spuren der Vorreinigungsschritte und der Negativkontrolle scheint weniger Protein präzipitiert worden zu sein. Im Western Blot mit

spezifischem SIRT6-Antikörper (Abb. 3.44(B)) ist zu erkennen, dass SIRT6 erfolgreich präzipitiert und im Überstand dieses Ansatzes deutlich depletiert wurde. In der Negativkontrolle ist SIRT6 nicht nachweisbar. Trotz kovalenter Koppelung der Immunglobuline an die magnetischen Beads war eine schwache Bande der schweren IgG-Ketten in allen von Beads eluierten Proteingemischen detektierbar.

In der Core Facility Massenspektrometrie des Instituts für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz wurden die präzipitierten Proteine mit Trypsin nach dem FASP-Protokoll¹⁰⁷ in kurze Peptidketten gespalten und mittels LC-MS analysiert¹⁰⁷. Die gewonnenen Daten wurden mit dem humanen Proteom abgeglichen^{107,140}. Sowohl in der Negativkontrolle als auch in der Co-IP Probe wurden jeweils fünf Messungen durchgeführt.

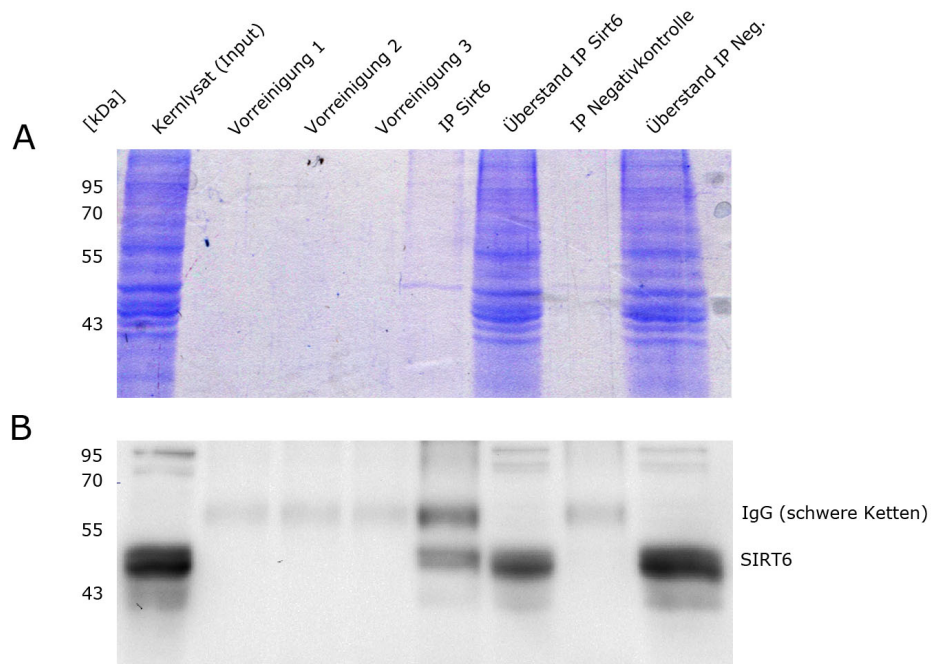


Abbildung 3.44: Überprüfung der Immunpräzipitation von SIRT6. SIRT6 wurde aus Kernlysaten primärer humaner Hepatozyten immunpräzipitiert und die im Laufe des Versuchs genommenen Proben zweimal in gleicher Weise auf 10-%ige SDS-Gele aufgetragen. **A** Kolloidale Coomassie-Färbung im SDS-Gel. **B** Western Blot und Detektion mit anti-SIRT6 / anti-Rabbit-AP.

Für die weitere bioinformatische Analyse wurden nur Proteine verwendet, die in der Co-IP im Vergleich zur Negativkontrolle mindestens doppelt erhöht nachgewiesen werden konnten. In diese Gruppe fielen 98 Proteine. Für diese wurde eine funktionelle Analyse mit der „Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resources 6.7 (NIAID/NIH)^{108,109}“ durchgeführt. Zunächst wurden die Proteinsymbole mit dem „Gene Accession Conversion Tool“ konvertiert und dann mit DAVID analysiert. Die gefundenen Proteine wurden anhand der Kategorie „GO - Biologische Prozesse“ eingeordnet und der Signifikanz nach dargestellt (Abbildung 3.45).

Besonders auffällig ist die starke Häufung von mit SIRT6 co-immunpräzipitierten Proteinen, die mit RNA-Splicing/Prozessierung und Assemblierung makromolekularer Komplexe in Verbindung stehen. Die Interaktion von SIRT6 mit diesen Proteinen sowie die Bedeutung dieser Interaktionen muss in folgenden Untersuchungen weiter analysiert werden, jedoch liefert die Fülle der Daten auch noch zahlreiche weitere Ansätze für die Erforschungen der vielfältigen Funktionen von SIRT6 in Hepatozyten.

Abbildung 3.45: Einordnung der mit SIRT6 co-immunpräzipitierten Proteine anhand der Kategorie „GO - Biologische Prozesse“. Begriffe mit sehr starker Ähnlichkeit wurden zusammengefasst. Gezeigt werden nur signifikante Häufungen von Proteinen verschiedener Oberbegriffe mit $p < 0,05$ ($< 5,00E-02$).

Begriff	Anzahl der Proteine	Prozent aller Proteine	p-Wert (Modified Fisher Exact p-value, EASE score)
RNA-Splicing	22	24,2	2,00E-18
(m)RNA Prozessierung	24	26,4	9,60E-15
Biogenese/Assemblierung von Ribonucleoprotein-Komplexen	7	7,7	4,80E-04
Translationale Elongation	5	5,5	2,40E-03
Oxidation/Reduktion	11	12,1	2,70E-03
Spliceosomale snRNP Biogenese	3	3,3	1,00E-02
Assemblierung makromolekularer Komplexe	10	11	1,10E-02
Assemblierung Spliceosom	3	3,3	1,40E-02
Organisation von Untereinheiten makromolekularer Komplexe	10	11	1,60E-02
Translation	6	6,6	3,70E-02

4. Diskussion

4.1. Konsequenzen des Verlusts von SIRT6 im Mausmodell

4.1.1. Stoffwechsel

4.1.1.1. Anämie

Eine Anämie in Zusammenhang mit dem Verlust von SIRT6 wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben, jedoch zeigten alle in dieser Arbeit untersuchten Tiere mit globalem *Sirt6-Knockout* einen Hämoglobinwert deutlich unterhalb des Normbereichs, wobei die Anzahl an Erythrozyten im Vergleich zu wildtypischen Tieren nicht verringert war. Die genauen Charakteristika sowie die Gründe dieser Anämie sind bisher unbekannt. Mangelnde Nahrungsaufnahme wurde für *Sirt6^{ko}*-Mäuse als Grund für ihr vermindertes Wachstum zwar ausgeschlossen⁶, trotzdem ist es möglich, dass im Verdauungstrakt Eisen nicht ausreichend resorbiert wird, um eine effiziente Hämoglobinsynthese zu gewährleisten. Ein verminderter Hämoglobinwert wirkt sich auf die Sauerstofftransportkapazität des Blutes aus und könnte zum Teil für die verminderte Aktivität von *Sirt6^{ko}*-Mäusen verantwortlich sein.

Die Häufigkeit des Auftretens von Anämien beim Menschen steigt mit dem Alter an, jedoch steht die Aufklärung der genauen Gründe hierfür bisher aus¹⁴¹. Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass Sirtuine eine Rolle im Alterungsprozess hämatopoetischer Stammzellen und des hämatologischen Systems sowie in altersbedingten Erkrankungen dieses Systems spielen¹⁴². Das Auftreten einer Anämie könnte daher ein weiterer Aspekt des degenerativen Phänotyps *Sirt6*-defizienter Mäuse sein.

4.1.1.2. Steatose

Studien an Mäusen mit hepatozytenspezifischem *Sirt6-Knockout* ergaben, dass diese beginnend im Alter von 5-6 Monaten eine Fettleber entwickeln¹¹. Untersuchungen in dieser Arbeit an Mäusen mit konstitutivem, globalem *Sirt6-Knockout* zeigten bereits im Alter von drei Wochen die beginnende Ausbildung einer Fettleber⁴⁰, was darauf hindeutet, dass bei Verlust von SIRT6 im gesamten Organismus Änderungen in der Regulation des Hepatozytenstoffwechsels sehr viel früher morphologische Auswirkungen in der Leber zeigen als bei hepatozytenspezifischem *Sirt6-Knockout*.

4.1.1.3. Veränderungen im Hepatozytenstoffwechsel

Um die Eigenschaften des Hepatozytenstoffwechsels in Abwesenheit von SIRT6 näher zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit untersucht, wie sich *Sirt6*-defiziente Hepatozyten im zellautonomen Zustand in Bezug auf Sauerstoffverbrauch, Laktatproduktion und Glukoseaufnahme verhalten. Diese Eigenschaften geben Hinweise darauf, in welchem Ausmaß die Zellen Glykolyse, Gärung und oxidative Phosphorylierung betreiben.

Sirt6-defiziente Hepatozyten zeigten einen gegenüber wildtypischen Zellen um 25 % verringerten Sauerstoffverbrauch. Die Sauerstoffverbrauchsrate sowohl wildtypischer als auch *Sirt6*-defizienter Hepatozyten ließ sich in erwarteter Weise mit verschiedenen Inhibitorsubstanzen beeinflussen. Auffällig war, dass die Entkoppelung der Elektronentransportkette von der oxidativen Phosphorylierung durch Behandlung mit 2,4-DNP den Sauerstoffverbrauch in *Sirt6*-defizienten Zellen zwar steigern konnte, dieser jedoch auf dem höchsten erreichten Niveau nur knapp den Grundverbrauch von wildtypischen Zellen überstieg. Wildtypische Zellen zeigten darüber hinaus prozentual ein höheres Steigerungspotential des Sauerstoffverbrauchs durch Behandlung mit 2,4-DNP. Die geringere Wirkung von 2,4-DNP auf den Sauerstoffverbrauch SIRT6-defizienter Zellen könnte darauf hindeuten, dass diese weniger Reduktionsäquivalente bzw. Kapazität an Komponen-

ten der Atmungskette zur Verfügung haben oder auf die Oxidative Phosphorylierung als Energieproduzent weniger stark angewiesen sind als wildtypische Zellen.

Bei Inhibition der Glykolyse mit 2-DG zeigte sich tendenziell ein umgekehrtes Bild. In diesem Fall stieg der Sauerstoffverbrauch von *Sirt6*^{ko} Hepatozyten prozentual etwas stärker an als bei wildtypischen Zellen. Die im Vergleich zu wildtypischen Zellen stärkere Wirkung von 2-DG auf den Sauerstoffverbrauch deutet auf eine stärkere Abhängigkeit von SIRT6-defizienten Hepatozyten von der Glykolyse zur Gewinnung von Energie und eine unmittelbarere Notwendigkeit zur Steigerung der oxidativen Phosphorylierung bei ihrer Inhibition hin.

Die Laktatproduktion der Hepatozyten wurde indirekt über den pH-Wert des Zellmediums gemessen, da davon ausgegangen wird, dass überschüssiges Laktat zunächst ein Endprodukt des Energiestoffwechsels darstellt und von der Zelle zumindest zum Teil sekretiert wird¹⁴³. Weder bei SIRT6-defizienten noch bei wildtypischen Zellen konnte eine Ansäuerung des Mediums festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass beide Zellen nur sehr wenig Laktat produzieren. Da die intrazelluläre Laktatproduktion nicht quantifiziert wurde, kann jedoch bisher nicht mit Sicherheit angenommen werden, dass das aus der Glykolyse entstehende Pyruvat durch *Sirt6*^{ko} Hepatozyten vollständig in Acetyl-CoA abgebaut wird, oder ob nicht doch ein größerer Teil zu Laktat reduziert wird. Die extrazelluläre Messung von Laktat im Zellüberstand, auch über die hier angewandte Versuchsdauer, ist jedoch eine etablierte Methode^{119,144}.

Sirt6-defizienten Hepatozyten nahmen in den hier durchgeführten Untersuchungen weniger Glukose auf als wildtypische Zellen, was jedoch teilweise durch die geringere Zellgröße gegenüber wildtypischen Hepatozyten bedingt sein könnte. Die zellautonome Aufnahme von Glukose kann leider nur begrenzt Auskunft über das tatsächliche Verhalten der Zellen *in vivo* geben, denn es ist wahrscheinlich, dass die Leber *Sirt6*-defizienter Tiere unter physiologischen Bedingungen von weiteren Faktoren wie der Insulinkonzentration im Blut bzw. einer veränderten Insulinsensitivität beeinflusst wird. Eine erhöhte Insulinsensitivität *Sirt6*-defizienter Gewebe wurde bereits nachgewiesen¹⁴⁵, jedoch gibt es kontroverse Berichte darüber, ob die Leber SIRT6-defizienter Tiere mehr Glukose resorbiert als die wildtypischer Tiere^{39,145}. Eine Aktivierung des AKT-Signalwegs führt normaler-

weise zu einer erhöhten zellulären Aufnahme von Glukose¹⁴⁶. Obwohl hier untersuchte SIRT6-defiziente Hepatozyten eine verstärkte basale Phosphorylierung der Kinase AKT an Serin 473 aufwiesen, was zur Aktivierung dieses Enzyms führt¹⁴⁷, konnte diese erwartete Auswirkung nicht beobachtet werden, sondern im Gegenteil eine etwas geringere Aufnahme von Glukose.

Die hier gefundenen Eigenschaften des Hepatozytenstoffwechsels in Abwesenheit von SIRT6 umfassen einen stark reduzierten Sauerstoffverbrauch und eine leicht verringerte Glukoseaufnahme trotz erhöhter Phosphorylierung der Kinase AKT (Ser473). Eine erhöhte Laktatproduktion durch SIRT6-defiziente Hepatozyten konnte nicht festgestellt werden.

Auf molekularer Ebene wurde bereits beschrieben, dass SIRT6 die Expression von Zielgenen des Transkriptionsfaktors Hif1 α inhibiert³⁹. Hif1 α bewirkt unter Sauerstoff- oder Nährstoffmangel eine gesteigerte Expression glykolytischer Gene⁴⁸ sowie eine Inhibition mitochondrialer Respiration⁴⁹ und ist damit ein Vermittler der Umschaltung von der Zellatmung zum anaeroben Stoffwechsel (Pasteur-Effekt)⁵⁰. Unter hypoxischen Bedingungen sichert dieser Stoffwechselmodus das Überleben der Zellen. Diese Umprogrammierung des Stoffwechsels, allerdings unabhängig vom verfügbaren Sauerstoff, machen sich auch Tumorzellen zunutze. Dieses Phänomen, bekannt unter dem Namen Warburg-Effekt⁹⁶, erlaubt, dass Intermediate des Zitratzyklus verstärkt zur Synthese von Zellkomponenten wie Fett-, Nuclein- und Aminosäuren umgeleitet werden, sodass Tumorzellen Biomasse aufbauen und proliferieren können. Aufgrund des sehr hohen Glukoseverbrauchs bei gleichzeitig niedriger Energiegewinnung (2-4 mol ATP/mol Glukose) werden von Tumorzellen trotzdem etwa 85% des Pyruvats in Laktat umgewandelt⁹⁷.

Es wird vermutet, dass in Abwesenheit von SIRT6 durch fehlende Repression von Hif1 α -kontrollierten Genen diese Umschaltung auch unter aeroben und nährstoffreichen Bedingungen geschieht und es damit zu einer Verschiebung in der zellulären Energiegewinnung von der Zellatmung in Richtung aerober Glykolyse kommt³⁹. Zhong *et al.* konnten zeigen, dass *Sirt6*-defiziente embryonale Stammzellen sowohl mehr Glukose aufnahmen als wildtypische ES-Zellen, als auch einen deutlich verminderten Sauerstoffverbrauch aufwiesen. Zudem produzierten die *Sirt6*-defizienten Zellen mehr Laktat als wildtypische.

In vivo konnte eine vermehrte Aufnahme von Glukose nur in Muskeln sowie braunem Fettgewebe *Sirt6*-defizienter Mäuse festgestellt werden, nicht jedoch in der Leber oder im Gehirn. Auch erhöhte Laktatwerte im Serum konnten gemessen werden³⁹. In einer unabhängigen Studie konnte eine leicht erhöhte Glukoseaufnahme in fast allen untersuchten *Sirt6*-defizienten Geweben einschließlich der Leber nachgewiesen werden, die sich nach Stimulation von Insulin noch verstärkte¹⁴⁵.

Der hier festgestellte verminderte Sauerstoffverbrauch *Sirt6*-defizienter Hepatozyten deutet zwar auf den Warburg-Effekt⁹⁷ hin, doch gibt es keine Anhaltspunkte für den dafür charakteristisch gesteigerten Glukoseverbrauch bei gleichzeitig höherer Laktatproduktion. In SIRT6-defizienten Zellen ist die Expression von Enzymen, die am Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel beteiligt sind, dereguliert^{11,39,40} und es kommt in Abwesenheit von SIRT6 zu gesteigerter Triglyceridsynthese¹¹ in Hepatozyten und zur Ausbildung einer Fettleber^{11,40}. Vermutlich wird das aus Pyruvat bei der oxidativen Decarboxylierung entstehende Acetyl-CoA, anstatt im Citratzyklus weiter abgebaut zu werden, zum Großteil in die Fettsäuresynthese umgeleitet. Diese verbraucht pro Acetyl-CoA etwa zwei Reduktionsäquivalente, sodass der Bedarf an Sauerstoff als Elektronenakzeptor automatisch sinkt, was auch eine Reduktion von Pyruvat zu Laktat zur Regeneration von Reduktionsäquivalenten unnötig macht. Da aus einem Molekül Glukose nach Glykolyse und oxidativer Decarboxylierung zwei Moleküle Acetyl-CoA und vier Reduktionsäquivalente entstehen, führt diese Verwertung von Acetyl-CoA in der Fettsäuresynthese zu einer ausgeglichenen Redoxbilanz.

4.1.1.4. Hypoglykämie und erhöhter IGF-2 Spiegel

Ein weiteres auffälliges Symptom bei globalem Verlust von SIRT6 bei Mäusen ist eine ausgeprägte Hypoglykämie⁶, die bei in dieser Arbeit untersuchten Tieren ebenfalls festgestellt werden konnte⁴⁰. Es ist bekannt, dass *Sirt6*-defiziente Mäuse zudem einen stark erniedrigten Spiegel des Hormons IGF-1 aufweisen⁶ und auch ein erniedrigter Insulinspiegel wurde in *Sirt6*-defizienten Mäusen nachgewiesen. In diesem Zusammenhang wird ver-

mutet, dass die erniedrigte Insulinproduktion entweder als Adaption an die Hypoglykämie stattfindet, bzw. dass eine erhöhte Insulinsensitivität vorliegt, welche die Hypoglykämie verursacht³⁹. Die Hypoglykämie wird als ausschlaggebender Faktor für die frühe Sterblichkeit *Sirt6*-defizienter Mäuse angesehen¹⁴⁵.

In dieser Arbeit konnte in Hepatozyten von *Sirt6-Knockout*-Mäusen eine erhöhte IGF-2-Expression nachgewiesen werden. Die Sekretion einer langen Form von IGF-2 in den Blutkreislauf konnte durch Nachweis im Serum bestätigt werden. Obwohl sich dieser erhöhte IGF-2-Spiegel nicht steigernd auf das Körperwachstum auszuwirken scheint, könnte die erhöhte Menge an IGF-2 andere biologische Auswirkungen haben.

In einigen Fällen leiden Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) unter Hypoglykämie, und in fast allen Fällen geht diese mit einer erhöhten Expression des Faktors IGF-2, meist einer langen Form, einher¹⁴⁸⁻¹⁵⁴. Auch in anderen Tumorerkrankungen sind sowohl IGF-2 Überexpression als auch Hypoglykämie beschrieben¹⁵⁵. IGF-2 vermittelt seine biologischen Funktionen nicht nur über seinen eigenen Rezeptor, sondern bindet und aktiviert mit ähnlicher Affinität wie zu IGF-1R auch die Insulinrezeptor-Isoform IR-A¹⁵⁶. Über diesen kann IGF-2 die Insulin-Signalkaskade über PI3K/AKT aktivieren¹⁵⁷. Eine Überexpression von IGF-2 in Kombination von IR-A wurde auch in verschiedenen Tumorerkrankungen beschrieben¹⁵⁸. Ein erhöhter IGF-2-Spiegel, wie er in dieser Arbeit an *Sirt6-Knockout* Mäusen nachgewiesen wurde, könnte daher maßgeblich für die erhöhte basale AKT-Phosphorylierung in Hepatozyten sowie die Hypoglykämie *Sirt6*-defizienter Mäuse verantwortlich sein.

4.1.1.5. Körpergewicht und Glukosespiegel bei leberspezifischer SIRT6-Defizienz

Mäuse mit leberspezifischem *Sirt6-Knockout* wurden über 18 Monate in Bezug auf ihr Körpergewicht überwacht. Zudem wurde der Blutglukosespiegel gemessen, sobald Tiere zur Entnahme von Organen getötet wurden. Dabei konnten signifikante SIRT6-abhängige Unterschiede dieser Parameter nur bei den ältesten männlichen Tieren festgestellt wer-

den. Im Alter von 18 Monaten zeigten männliche Tiere mit hepatozytenspezifischer SIRT6-Defizienz ein signifikant niedrigeres Körpergewicht sowie einen niedrigeren Blutglukosespiegel als wildtypische Männchen. Ob und wie diese veränderten Parameter in Abwesenheit von SIRT6 sich tatsächlich auf die Gesundheit älterer männlicher Tiere auswirken, muss noch weiter untersucht werden.

In Bezug auf geschlechtsspezifische Unterschiede wurde berichtet, dass männliche, SIRT6 global überexprimierende Mäuse eine längere mittlere Lebensdauer (15 %) als wildtypische Männchen aufwiesen. Bei weiblichen Tieren wurde ein solcher Unterschied jedoch nicht festgestellt¹⁵⁹. Eine andere Studie berichtete, dass bei Mäusen mit leberspezifischen *Knockout* von *Sirt6* im Alter von mehr als acht Monaten sowohl unter Fasten- als auch unter Fütterungsbedingung ein etwas höherer Blutglukosespiegel als bei wildtypischen Tieren gemessen werden konnte¹¹. Dabei wurde nicht zwischen den Geschlechtern differenziert. Bei den in der Studie verwendeten Mäusen wurden allerdings andere Exone (Exone 2 und 3) des *Sirt6*-Gens deletiert und zudem handelte es sich um einen anderen Stammhintergrund (NIH Black Swiss, Taconic) als bei den hier verwendeten Tieren. Es ist bekannt, dass der Stammhintergrund für die Ausprägung von Manifestationen der SIRT6-Defizienz bei Mäusen eine Rolle spielt¹⁴⁵, was diese Modelle, vor allem bei weniger starken genotypspezifischen Unterschieden, nur bedingt vergleichbar macht. Beispielsweise wurde bei der vergleichenden Analyse des postnatalen Überlebens von Mäusen mit konstitutivem *Knockout* von *Sirt6* festgestellt, dass Mäuse mit dem gemischten Stammhintergrund 129/FVB/Black Swiss länger überlebten als solche mit 129SvEv Hintergrund¹⁴⁵ oder solche mit 129SvJ Hintergrund⁶.

4.1.2. Veränderungen in der Reifung dendritischer Zellen

Bei einer in dieser Arbeit analysierten Microarray-Untersuchung zum Vergleich der Genexpression wildtypischer und SIRT6-defizienter Hepatozyten zeigten sich Unterschiede in der Expression von Genen der Immunantwort sowie der Prozessierung und Präsentation

von Peptid-Antigenen. Es wurde daher zunächst untersucht, ob dendritische Zellen (DCs) aus wildtypischen und *Sirt6-Knockout* Mäusen Unterschiede in Eigenschaften bezüglich ihrer Differenzierung, Endozytoseaktivität oder Reifung aufweisen.

Dendritische Zellen (DCs) sind als professionelle antigenpräsentierende Zellen ein entscheidender Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Sie sind in allen peripheren Geweben präsent, wo sie unablässig Antigene der Umgebung aufnehmen. Werden Fremd-Antigene oder Pathogene erkannt und aufgenommen, setzt die Reifung der DCs ein, was unter anderem zur Expression von co-stimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche und zur Sekretion von Zytokinen führt. Die aufgenommenen Peptidantigene werden prozessiert und auf der Zelloberfläche präsentiert¹⁶⁰. Gleichzeitig wandern aktivierte DCs in die Lymphknoten, wo sie über Antigenpräsentation, co-stimulatorische Moleküle und Zytokine naive T-Zellen stimulieren und aktivieren¹⁶¹.

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden zunächst DCs aus Knochenmark wildtypischer und SIRT6-defizienter Mäuse differenziert, dabei zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Anzahl differenzierter Zellen. Allerdings zeigte sich eine deutlich stärkere endozytische Aktivität bei SIRT6-defizienten unreifen DCs im Vergleich zu wildtypischen Zellen. Es wurde ebenfalls festgestellt, dass SIRT6-defiziente DCs im differenzierten, aber noch unreifen Zustand schon eine größere Menge der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche exprimierten. Im mit LPS stimulierten Zustand sekretierten SIRT6-defiziente DCs eine signifikant geringere Menge des proinflammatorischen Zytokins IL-12p70. Von Dendritischen Zellen sezerniertes IL-12p70 ist zusammen mit IFN γ für die Differenzierung von Typ 1-T-Helferzellen (T_H1)-Zellen verantwortlich, die vor allem eine Rolle in der Bekämpfung intrazellulärer Bakterieninfektionen spielen. Eine verminderte Sekretion von IL-12p70 durch DCs in Abwesenheit von SIRT6 könnte daher zu einer abgeschwächten T_H1-Antwort führen^{162,163}.

Unreife DCs zeichnen sich durch eine hohe endozytische Aktivität aus, die rezeptorvermittelt und über Makropinozytose und Phagozytose erfolgt. Wird jedoch ein Antigen als fremd erkannt, setzt die Reifung der DCs ein und die Endozytoseaktivität wird aktiv herunterreguliert und aufgenommene Antigene werden verstärkt prozessiert¹⁶⁰. Die Beobachtung, dass SIRT6-defiziente DCs über eine Versuchsdauer von 60 Minuten mehr Antigen

internalisierten, könnte darauf hindeuten, dass der Prozess der Endozytose in diesen Zellen langsamer inhibiert wird als bei wildtypischen Zellen. Eine Studie zeigte, dass DCs ihre Endozytose bereits 15-30 Minuten nach Kontakt mit Antigenen sehr stark einschränken können¹⁶⁴. Eine langsamere Herunterregulation dieses Prozesses in Abwesenheit von SIRT6 könnte die Antigenprozessierung und -präsentation verzögern sowie das Spektrum präsentierter Antigene verändern. Ebenso könnte beeinflusst werden, ob SIRT6-defiziente DCs Toleranz oder Immunität bezüglich der präsentierten Peptide induzieren.

Die Reifung dendritischer Zellen ist durch eine streng zeitlich geregelte Abfolge der Induktion und Repression der Expression hunderter Gene verbunden¹⁶⁵. Schon von Beginn an, aber vor allem gegen Ende des Reifeprozesses beginnt die Herunterregulation die Induktion von Genen zu dominieren¹⁶⁵. Es ist möglich, dass SIRT6 als Silencing-Faktor eine Rolle in der Herunterregulation dieser Gene spielt und es so in seiner Abwesenheit zu Veränderungen im Expressionsmuster kommt. Beispielsweise wird die Expression des Faktors Hif1 α während der Reifung von DCs induziert^{165,166}. Zielgene von Hif1 α werden von SIRT6 negativ reguliert³⁹, sodass das Fehlen von SIRT6 zu einer Deregulation der Expression Hif1 α -kontrollierter Gene während der DC-Reifung führen könnte.

Dass SIRT6-defiziente DCs bereits im unreifen Zustand eine größere Menge co-stimulatorische Moleküle exprimieren, im reifen Zustand jedoch weniger IL-12p70 sekretieren als wildtypische DCs, könnte ebenfalls mit SIRT6-regulierter Genexpression im Zusammenhang stehen, muss jedoch im Detail noch untersucht werden. In Bezug auf die Ergebnisse des Microarray ist ebenfalls von Interesse, wie sich die veränderte Expression von Genen der Antigenprozessierung und -präsentation in Abwesenheit von SIRT6 auf die Funktion dendritischer Zellen auswirkt.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass die Funktionen dendritischer Zellen in Bezug auf die Regulation der Endozytose, Expression von co-stimulatorischen Molekülen und die Sekretion von IL-12p70 in Abwesenheit von SIRT6 Veränderungen aufweisen.

4.1.3. Epigenom und Genexpression

4.1.3.1. Alterationen im Epigenom

Hier durchgeführte Untersuchungen an Acetylierungen verschiedener Lysinreste von Histon H3 in Hepatozyten zeigten in Abwesenheit von SIRT6 eine Zunahme von acetyliertem H3K9, H3K14 und H3K18. Eine Veränderung der Menge an acetyliertem H3K56 konnte unter den verwendeten Bedingungen nicht festgestellt werden. In Abwesenheit von SIRT6 nahm zudem die globale Methylierung von Cytosinresten der DNA signifikant ab.

Die Deacetylasefunktion von SIRT6 für Histon H3K9^{8,27} und H3K56^{28,29} ist bereits beschrieben. Die Deacetylierung von H3K56 durch SIRT6 erfolgt nach bisheriger Erkenntnis abhängig vom Zellzyklus und im Zusammenhang mit der Genomstabilisierung, daher ist es möglich, dass die hier verwendeten Versuchsbedingungen nicht geeignet waren, um SIRT6-abhängige Veränderungen dieser Modifikation nachzuweisen. Von einem Zusammenhang von SIRT6 mit H3K14 bzw. H3K18 ist in der Literatur bisher nicht berichtet worden, jedoch ist es möglich, dass SIRT6 Histonmodifikationen von noch weiteren Lysinresten entfernen kann als den bisher bekannten. Anfänglich wurde zudem vor allem die Deacetylasefunktion von SIRT6 untersucht, jedoch ist mittlerweile bekannt, dass SIRT6 auch längerkettige Fettsäurereste von Lysinresten hydrolysieren kann¹⁸. Längerkettige Fettsäuren wurden auch als Histonmodifikationen identifiziert, beispielsweise die Reste der Buttersäure, Propionsäure¹⁶⁷ und Crotonsäure¹⁶⁸. Zudem zeigte SIRT6 *in vitro* auch Deacetylaseaktivität an mehreren Lysinen des Histons H4 (K5, K8, K12 und K16), die bisher *in vivo* noch nicht festgestellt wurde¹⁷. Es ist möglich, dass sich zukünftig durch Aufklärung noch weiterer Histonsubstrate, die sich wiederum in verschiedene Lysinreste und Acylmodifikationen aufgliedern, ein noch viel komplexeres SIRT6-abhängiges Regulationsmuster ergibt.

Ein direkter mechanistischer Zusammenhang zwischen dem Verlust von SIRT6 und einer Abnahme der globalen DNA-Methylierung kann bisher nicht hergestellt werden, es liegt allerdings die Vermutung nahe, dass sie eine Konsequenz der Veränderung des Histonmo-

difikationsmusters in Abwesenheit von SIRT6 darstellt. Beispielsweise kann auf die Deacetylierung von H3K9, das ein Substrat von SIRT6 ist^{8,27}, die Methylierung von H3K9 und anschließend die Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen (DNMT) und damit die Methylierung von Cytosinen des assoziierten DNA-Abschnitts folgen^{169,170}. Einen weiteren Hinweis auf DNA-Methylierung in Folge bestimmter Histonmodifikationen liefert der Zusammenhang zwischen trimethyliertem H3K27 und nachfolgender *de novo* Methylierung von DNA in Tumoren¹⁷¹.

4.1.3.2. Verändertes Profil der Genexpression

In Abwesenheit von SIRT6 kommt es in Hepatozyten sowohl zur erhöhten als auch zur verminderten Expression hunderter Gene. Der in dieser Arbeit analysierte Genexpressionsvergleich zwischen Hepatozyten aus wildtypischen und *Sirt6-Knockout* Mäusen wurde zunächst anhand von 22 ausgewählten Transkripten validiert. Mithilfe eines internetbasierten Tools zur funktionellen Annotation wurden die Gensymbole biologischen Prozessen zugeordnet, um festzustellen, welche zellulären Funktionen durch den Verlust von SIRT6 durch veränderte Expression ihrer Faktoren betroffen sind. Für einige identifizierte Prozesse wie den Lipidmetabolismus, die DNA-Doppelstrangbruchreparatur, die Transkriptionsregulation und Inflamationsprozesse sind Verbindungen mit dem Phänotyp *Sirt6*-defizienter Mäuse offensichtlich. Bisher weniger bekannte Prozesse im Zusammenhang mit SIRT6 sind beispielsweise das RNA-Splicing, die Zirkadiane Rhythmik, die Prozessierung und Präsentation von Peptid-Antigenen und die Apoptose, die in dieser Arbeit zum Teil näher untersucht wurden.

Ein von uns durchgeführter Vergleich mit den Expressionsdaten einer anderen Studie, die die Transkriptome von Gesamtlebergewebe verglich¹¹, zeigte eine Übereinstimmung von 26,5 % bezüglich der von Deregulation betroffenen Gensymbole und eine starke Überlappung in den zugeordneten biologischen Prozessen in Abwesenheit von SIRT6⁴⁰. Unterschiede zwischen den Analysen ergaben sich wahrscheinlich durch Vermischung der Ex-

pressionsmuster verschiedener Zelltypen bei Verwendung von Gesamtleber im Vergleich mit einer relativ reinen Hepatozytenfraktion.

4.1.3.3. Deregulation der zellulären Uhr

Die tageszeitgebundene Expression von zentralen Faktoren der zellulären Uhr in Hepatozyten zeigte eine Deregulation bei globalem, aber nicht bei hepatozytenspezifischem *Knockout* von *Sirt6* sowohl in isolierten Hepatozyten als auch in tageszeitabhängig isoliertem Lebergewebe im Vergleich zu wildtypischen Tieren.

Die im Microarray festgestellte, vom Wildtyp abweichende Expression der Gene *Arntl*, *Nr1d1*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* und *Per2* in SIRT6-defizienten Hepatozyten wurde zunächst anhand einiger Faktoren in synchronisierten Hepatozyten *in vitro* bestätigt. Besonders deutlich konnte ein unterschiedlicher Verlauf der Expression von *Arntl*, das für den Faktor BMAL1 codiert, nachgewiesen werden, der zudem eine Phasenverschiebung in der Expression aufwies. Dies deutet darauf hin, dass die zelluläre Uhr bei Hepatozyten aus Mäusen mit globalem *Sirt6-Knockout* nicht völlig zum Erliegen kommt, allerdings eine zeitliche Verschiebung aufweist.

Die aus Mäusen mit globalem *Knockout* von *Sirt6* entnommenen Lebern zeigten im Vergleich zu wildtypischen Vergleichstieren entgegengesetzte Expressionsniveaus für die Gene *Arntl*, *Clock*, *Nr1d1* (codierend für REV-ERB α), *Cry1* und *Per2* an den beiden gewählten Tageszeiten. Eine relativ starke Übereinstimmung der Expressionshöhen in den SIRT6-defizienten Lebern legt auch hier die Vermutung nahe, dass es bei globalem Verlust von SIRT6 zu einer Phasenverschiebung in der Expression der zentralen Komponenten der zellulären Uhr in der Leber kommt. Im Gegensatz dazu führte ein hepatozytenspezifischer *Knockout* von *Sirt6* nicht zum gleichen Ergebnis wie bei globalem *Knockout*, es konnte kein Unterschied in der Expression der Gene *Arntl*, *Clock* und *Nr1d1* im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die bei Mäusen mit globalem *Sirt6-Knockout* festgestellte Deregulation der zellulären Uhr in der Leber durch eine bereits im SCN beginnende, an die peripheren Organe kommunizierte

Fehlsteuerung induziert wurde und dass SIRT6 im SCN eine entscheidende Rolle in der Regulation der Zeitgeber-Uhr spielen könnte. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie konnte ebenfalls bei Mäusen mit hepatozytenspezifischem *Sirt6-Knockout* keine veränderte Expression von BMAL1 (codiert durch *Arntl*) feststellen⁶⁴. Es ist also möglich, dass ein funktionierender Zeitgeber im Gehirn die Auswirkungen einer SIRT6-Defizienz in peripheren Organen ausgleicht. Im zellautonomen Zustand zeigten jedoch auch synchronisierte SIRT6-defiziente Hepatozyten eine deregulierte Expression von BMAL1, da SIRT6 in der Uhr peripherer Organe vermutlich ebenfalls eine Rolle spielt.

Masri *et al.* stellten zudem fest, dass SIRT6 mit BMAL1 und CLOCK interagiert und dadurch vor allem die Expression vieler weiterer CCGs beeinflusst, die eine Rolle im Zellstoffwechsel spielen. Da SIRT6 durch $\text{NAD}^{+(16)}$ und langkettige Fettsäuren¹⁸ aktiviert wird, könnte es eine Sensorfunktion für den Status des Stoffwechsels ausüben und in Abhängigkeit dieses Status die Expression von CCGs kontrollieren. Wie genau SIRT6 Einfluss auf die Expression oder Funktion der zentralen Faktoren der zellulären Uhr hat, muss jedoch noch untersucht werden. Das genaue Verständnis der tageszeitabhängigen Regulation des Stoffwechsels ist von entscheidender Bedeutung für die Erhaltung und Förderung der Gesundheit. Das erhöhte Auftreten von Tumoren durch die so genannte Chronodisruption bei Schichtarbeitern führte bereits zur Einstufung von Schichtarbeit als Karzinogen¹⁷². Auch für Krankheiten wie das Metabolische Syndrom, Übergewicht und Diabetes Mellitus Typ 2 spielt das Phänomen der Chronodisruption eine Rolle¹⁷³.

4.1.3.4. Expression onkofetaler Gene

Onkofetale Gene verdanken ihren Namen dem Umstand, dass sie normalerweise nur während der Embryonalentwicklung exprimiert und dann stillgelegt werden. Oft tritt jedoch eine Re-Expression solcher Gene in Tumorzellen auf. Bei primären Tumoren der Leber gelten *Alpha-Fetoprotein (AFP)*, *Glypican-3 (GPC-3)*, *H19* und *Insulin-like Growth Factor 2 (IGF-2)* als typische onkofetale Gene.

In Hepatozyten aus Mäusen mit globalem *Sirt6-Knockout* konnte die Expression der oben genannten onkofetalen Gene nachgewiesen werden, sowie auch die Micro-RNA miR-675 und die Proteine AFP und IGF-2 in Leberzellen bzw. im Serum. Auch bei hepatozyten-spezifischem Verlust von SIRT6 konnte eine gesteigerte Expression von *H19* und *Igf-2* nachgewiesen werden.

Der genaue Mechanismus der De-Repression dieser Gene in Abwesenheit von SIRT6 ist bislang ungeklärt, könnte aber seinen Ursprung in der Veränderung von Histonmodifikationen und DNA-Methylierung, die in Abwesenheit von SIRT6 beobachtet wurden, haben. Der *H19-Igf2*-Lokus ist dabei von besonderem Interesse, da er durch den Mechanismus der Prägung (*Imprinting*) besonders komplexen Regulationsmechanismen unterliegt¹⁷⁴, für die eine Beteiligung von SIRT6 bisher noch nicht beschrieben wurde.

4.2. Expression von SIRT6 in humanen Tumorgeweben und Zelllinien

In standardisierten Proben des Transkriptom humaner Tumore konnte in neun von 20 Proben, besonders in Karzinomen von Lunge und Niere, eine verminderte Expression von *SIRT6* nachgewiesen werden. In allen untersuchten humanen Hepatomzelllinien konnte eine verminderte Expression von *SIRT6* sowie eine gleichzeitig erhöhte Expression von *AFP* gemessen werden. Bei Hep3B Zellen zeigte sich zudem auch eine stark erhöhte Expression von *H19* und *IGF-2*. Hep3B Zellen wurden daher verwendet, um eine mögliche Korrelation der Expression von SIRT6 und AFP näher zu untersuchen. Tatsächlich zeigte sich bei ektopischer Expression von SIRT6 eine Herunterregulation von AFP sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Ebene. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die Expression von *AFP* spezifisch durch SIRT6 reprimiert werden kann.

An Huh-7 Zellen wurde zudem der Einfluss von SIRT6 auf die Expression der Krebsstammzellmarker CD44 und CD133 untersucht. Dabei zeigte sich bei einem Knockdown der Expression von *SIRT6* ein Rückgang der Expression von CD133 und bei Überexpression von *SIRT6* eine erhöhte Expression dieses Oberflächenmarkers. Obwohl diese Be-

obachtung auf den ersten Blick gegen eine durch SIRT6 vermittelte Hemmung der Expression von onkofetalen Genen spricht, könnte sie darauf hindeuten, dass SIRT6 eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Stammzellidentität zukommt bzw. in der Regulation von Differenzierungsprozessen eine Rolle spielt. Die mögliche Bedeutung einer Korrelation der Expression von SIRT6 und CD133 für den Phänotyp von Krebsstammzellen müssen ebenfalls noch näher charakterisiert werden.

Die Re-Expression von SIRT6 in mehreren Hepatomzelllinien zeigte keinen Einfluss auf deren Proliferations- und Koloniebildungsverhalten, führte jedoch in HepG2 Zellen zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber einem CD95(Fas)-Agonisten sowie den Chemotherapeutika Daunorubicin und Doxorubicin. HepG2 Zellen exprimieren als einzige der hier untersuchten Zelllinien wildtypisches p53, das neben dem Fas-Rezeptor-System zur Chemotherapie-induzierten Apoptose notwendig ist¹⁷⁵. Es wurde bereits berichtet, dass SIRT6 den p53-Signalweg in Tumorzellen induzieren kann⁶⁸. Möglicherweise bietet eine pharmakologische Aktivierung von SIRT6 einen Ansatzpunkt für die Erhöhung der Chemosensitivität von Tumoren mit wildtypischem p53, was geringere Mengen des Therapeutikums und damit eine geringere Toxizität für den Patienten bedeuten würde.

4.3. Analyse des Interaktoms von SIRT6 in Hepatozyten

Eine Co-Immunpräzipitation von mit SIRT6 interagierenden Proteinen wurde in Hepatozyten aus primärem humanem Lebergewebe mit endogenem SIRT6 durchgeführt. Dabei wurden etwa 100 Proteine identifiziert, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant angereichert waren. Die funktionelle Annotation ergab, dass diese Proteine besonders in Prozessen des RNA-Splicings, der RNA-Prozessierung und der Assemblierung makromolekularer Komplexe beteiligt waren.

Die Beteiligung von SIRT6 an dem Prozess der RNA-Prozessierung wurde noch nicht näher charakterisiert, obwohl es auch in anderen kürzlich veröffentlichten Studien über das Interaktom von SIRT6 den am häufigsten annotierten Prozess darstellt^{31,32}. In diesem Zu-

sammenhang ist ebenfalls bemerkenswert, dass von den in SIRT6-defizienten Hepatozyten stärker exprimierten Transkripten 26,5 % in Zusammenhang mit alternativem Splicing gebracht wurden. Dies lässt darauf schließen, dass es in Abwesenheit von SIRT6 zu Änderungen im Splicing vieler Transkripte kommt. Es gibt Hinweise darauf, dass Signaturen von Histonmodifikationen und DNA-Methylierungen das Resultat des Splicings einer prä-mRNA bestimmen, indem sie die Rekrutierung bestimmter Faktoren des Splicing-Apparates beeinflussen¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. In malignen Erkrankungen spielt die Expression aberranter Splice-Varianten eine Rolle in der Deaktivierung von Tumorsuppressoren und Aktivierung von Onkogenen¹⁷⁹. Da sich das Profil von Histonmodifikationen und globaler DNA-Methylierung in Abwesenheit von SIRT6 stark verändert, könnte der Verlust von SIRT6, vor allem wenn es zusätzlich physisch am Prozess des RNA-Splicings beteiligt ist, sogar doppelt negativ auf einen natürlichen Ablauf der RNA-Prozessierung auswirken.

4.4. Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es in Abwesenheit von SIRT6 zu Veränderungen des Epigenoms, der Expression onkofetaler und vieler weiterer Gene, der Zirkadianen Rhythmik und der Apoptosesensitivität kommt. Diese Veränderungen erinnern an Eigenschaften von Tumorzellen und sind für die Tumorgenese und -progression relevant. Es ist daher zu vermuten, dass SIRT6 die Rolle eines Tumorsuppressors zukommt und dass sein Verlust zu einem für die maligne Transformation förderlichen Zustand der Zelle führt.

Aufgrund seiner Rolle in der Regulation NF- κ B-gesteuerter Inflamationsprozesse²⁷ ist insbesondere die Funktion von SIRT6 im Zusammenhang mit der Entstehung von HCC in chronisch entzündetem Lebergewebe von Interesse. Zu diesem Zweck könnten auf Fibrose oder chronischer Hepatitis basierte Modelle in Mäusen mit hepatozytenspezifischem *Sirt6*-Knockout von Nutzen sein. Insbesondere könnten durch die Charakterisierung von weiteren Interaktionspartnern von SIRT6 in nachgeschalteten zellulären Signalwegen

Ansätze zur pharmakologischen Kompensation eines Verlusts von SIRT6 identifiziert werden.

Wir konnten zeigen, dass der Verlust von SIRT6 bereits in der zirrhotischem Lebergewebe nachweisbar ist⁴⁰ und auch andere Forschungsergebnisse deuten auf den Verlust von SIRT6 als frühes Ereignis in der Tumorgenese hin⁴². In diesem Zusammenhang könnte die Etablierung eines molekulargenetischen Diagnoseverfahrens basierend auf der Identifikation von Deletion, Mutationen oder Hypermethylierung des Promotorbereichs des *SIRT6*-Gens von Bedeutung für die Früherkennung einer Prädisposition zur Tumorbildung bei Steatose, Fibrose oder Zirrhose sein, die für Diagnose, Prognose und Therapie wegweisend sein könnte.

Zur Behandlung des Hepatozellulären Karzinoms mit Chemotherapie ist es von Interesse, welche Rolle SIRT6 im CD95-vermittelten Apoptosesignalweg spielt, wie genau sich ein Verlust von SIRT6 auf die Resistenz gegen Chemotherapeutika auswirkt und ob Chemosensitivität durch Stimulation der Aktivität von SIRT6 oder anderer Sirtuine wiederhergestellt werden kann.

Zusammenfassung

Sirtuin 6 (SIRT6) ist ein Mitglied der Familie der Sirtuine, die eine Rolle in Prozessen der Genomstabilität, Genexpression, Stoffwechselregulation, Inflammation, Differenzierung, Alterung und Langlebigkeit spielen. Der Verlust von SIRT6 in Mäusen führt zu einem degenerativen Phänotyp mit stark verminderter Lebensdauer. Aufgrund seiner Funktion in vielfältigen zellulären Prozessen ist die Funktion von SIRT6 in der Entstehung von Krankheiten, insbesondere in metabolischen und malignen Erkrankungen, Gegenstand der aktuellen Forschung.

In dieser Arbeit wurden anhand zweier *Knockout*-Mausmodelle mit globalem bzw. hepatozytenspezifischem Verlust von SIRT6 die Auswirkungen seiner Defizienz in der Leber, aber auch in Zellen des Immunsystems untersucht. Ein Verlust von SIRT6 in Hepatozyten führte zu einem verminderten Sauerstoffverbrauch durch eine Verschiebung des Stoffwechselgleichgewichts zu aerober Glykolyse und gesteigerter Lipidsynthese mit resultierender Steatose. Auf Ebene des Genoms führte der Verlust von SIRT6 in Hepatozyten zu einem veränderten Profil von Acetylierungen am Histon H3 und zu einer Verminderung der globalen DNA-Methylierung. In Konsequenz kam es zu einer Veränderung im Genexpressionsmuster, die hunderte Gene betraf. Unter anderem wurde die gesteigerte Expression verschiedener onkofetaler Gene beobachtet, die im Hepatozellulären Karzinom als Tumormarker gelten. Bei globalem Verlust von SIRT6 kam es zudem zu einer Deregulation der Expression von zentralen Faktoren der zellulären Uhr, die eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellstoffwechsels spielt.

Aufgrund einer auffälligen Veränderung in der Expression von in der Antigenprozessierung und -präsentation involvierten Faktoren in Abwesenheit von SIRT6 wurde der Prozess der Aktivierung dendritischer Zellen untersucht. Bei SIRT6-defizienten dendriti-

schen Zellen im unreifen Zustand zeigte sich dabei eine Veränderung der Regulation der Endozytoseaktivität und der Expression co-stimulatorischer Moleküle.

In vielen humanen Tumorgeweben sowie in allen untersuchten humanen Hepatomzelllinien zeigte sich im Vergleich zu normalen primären Hepatozyten eine verminderte Expression von SIRT6. Re-Expression von SIRT6 in HepG2 Zellen führte zu einer Sensitivierung gegenüber CD95-vermittelter und Chemotherapie-induzierter Apoptose.

In einer Co-Immünpräzipitation von SIRT6 in primären humanen Hepatozyten mit anschließender Identifikation der co-präzipitierten Proteine mittels LC-MS-gestützter quantitativer Genomanalyse wurden etwa 100 physiologische Interaktionspartner identifiziert, deren funktionale Annotation unter anderem eine Involvierung von SIRT6 in den Prozess der RNA-Prozessierung aufzeigte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es in Abwesenheit von SIRT6 zu Veränderungen des Epigenoms, der Expression onkofetaler Gene, der Zirkadianen Rhythmik und der Apoptosesensitivität kommt, die an die Eigenschaften von Tumorzellen erinnern und unter anderem für die Tumorgenese relevant sein können. Da der Verlust von SIRT6 zu einem Zustand führt, den mal als förderlich für die maligne Transformation von Zellen bezeichnen kann, kann SIRT6 die Rolle eines Tumorsuppressors zugeschrieben werden.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
1.1	Bekannte Substrate und physikalische Interaktionen von SIRT6.	4
1.2	Zelluläre Funktionen von SIRT6 und deren Einfluss auf den Organismus und Erkrankungen.	7
1.3	Äußere Erscheinung gleichaltriger Sirt6 ^{wt} und Sirt6 ^{ko} Mäuse.	8
1.4	Regelsystem der zellulären zirkadianen Genexpressions-Uhr im SCN bei Säugetieren.	12
1.5	SIRT6- und SIRT1-abhängige zirkadiane Funktionen.	13
1.6	Modell der Rolle von SIRT6 in Tumorgenese und –progression.	16
1.7	Die Chronologie von Veränderungen der DNA-Methylierung und Expression von Micro-RNAs in der humanen Hepatokarzinogenese.	20
1.8	Stufen der Hepatokarzinogenese und ihnen zugrunde liegende molekulare Veränderungen in der Expression verschiedener Faktoren.	21
2.1	Namen von verwendeten Mausstämmen, Allelen oder Stammzellen sowie deren Herkunft.	36
2.2	Oligonucleotid-Primer zur Genotypisierung im Stamm KO- <i>Sirt6</i> -Fwa.	41
2.3	Oligonucleotid-Primer zur Genotypisierung im EUCOMM-System.	42
2.4	Oligonucleotid-Primer und deren Verwendung im EUCOMM-System	42
2.5	Oligonucleotid-Primer zum Nachweis humaner Gensequenzen.	45
2.6	Oligonucleotid-Primer zum Nachweis muriner Gensequenzen.	46
2.7	Rezepte zur Herstellung von jeweils 4 SDS-Minigelen (ca. 8 X 6 cm) verschiedener Konzentrationen.	65

3.1	Nachweis des <i>Sirt6</i> -Knockouts in Mäusen des Stammes KO- <i>Sirt6</i> -Fwa.	86
3.2	Schema des Allels <i>Sirt6</i> ^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} („ <i>knockout-first allele</i> “) des embryonalen JM8-Stammzellklons mit konditionalem Potential.	88
3.3	Allgemeines Schema der Rekombinationsschritte im EUCOMM-System.	90
3.4	Genotypisierungen während verschiedener Zuchtschritte zur Erzeugung und Erhaltung des Allels <i>Sirt6</i> ^{tm1c(EUCOMM)Wtsi} (<i>Sirt6</i> -flox).	93
3.5	Genotypisierungen während verschiedener Zuchtschritte zur Erzeugung von Mäusen mit konditionalem <i>Sirt6</i> - <i>Knockout</i> in Hepatozyten im Stamm KO- <i>Sirt6</i> -EUCOMM X <i>AlbuminCre</i> .	97
3.6	Nachweis der Rekombination von <i>Sirt6</i> -tm1c zu <i>Sirt6</i> -tm1d und des Verlusts von SIRT6 in Hepatozyten im Stamm KO- <i>Sirt6</i> -EUCOMM X <i>AlbuminCre</i> .	99
3.7	Zuchtschritte zur Erzeugung von Mäusen mit konditionalem <i>Sirt6</i> - <i>Knockout</i> in Adipozyten im Stamm KO- <i>Sirt6</i> -EUCOMM X <i>AdipoqCreER</i> ^{T2} .	101
3.8	Adipozyten-spezifische, CreER ^{T2} -vermittelte Rekombination von <i>Sirt6</i> -tm1c („ <i>Sirt6</i> -flox“) zu <i>Sirt6</i> -tm1d in weißem Fettgewebe nach Induktion mit Tamoxifen.	102
3.9	Vergleich des Körpergewichts von jeweils 15 <i>Sirt6</i> ^{wt} und <i>Sirt6</i> ^{ko} Tieren des Stammes KO- <i>Sirt6</i> -Fwa.	103
3.10	Unterschiede im Blutbild von <i>Sirt6</i> ^{wt} und <i>Sirt6</i> ^{ko} Mäusen des Stammes KO- <i>Sirt6</i> -Fwa.	104
3.11	Unterschiede in der Fetteinlagerung der Leber und im Blutglukosespiegel in <i>Sirt6</i> ^{wt} und <i>Sirt6</i> ^{ko} Mäusen des Stammes KO- <i>Sirt6</i> -Fwa.	105
3.12	Metabolische Analyse in Hepatozyten aus <i>Sirt6</i> ^{wt} und <i>Sirt6</i> ^{ko} Mäusen.	106
3.13	Wirkungsmechanismen der Inhibitoren 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG), 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) und Rotenon (ROT).	108
3.14	Beeinflussung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) mit 2,4-Dinitrophenol.	110
3.15	Beeinflussung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) mit 2-Deoxy-D-Glukose.	111
3.16	Messung der Aufnahme des Glukoseanalogons 2-NBDG in Hepatozyten aus <i>Sirt6</i> ^{wt} und <i>Sirt6</i> ^{ko} Mäusen mittels FACS.	114
3.17	Untersuchung der Phosphorylierung von PKB/Akt in Hepatozyten aus <i>Sirt6</i> ^{wt} und <i>Sirt6</i> ^{ko} Mäusen.	115

3.18	Untersuchung des Körpergewichts in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht bei Mäusen mit leberspezifischem <i>Sirt6-Knockout</i> .	117
3.19	Untersuchung des Blutglukosewertes in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht bei Mäusen mit leberspezifischem <i>Sirt6-Knockout</i> .	118
3.20	Untersuchung der Sekretion von IL-16 und IL-17 durch Milzzellen aus <i>Sirt6^{wt}</i> und <i>Sirt6^{ko}</i> Mäusen nach Stimulation mit Concanavalin A (ConA).	119
3.21	Untersuchung der Endozytoseaktivität dendritischer Zellen aus <i>Sirt6^{wt}</i> und <i>Sirt6^{ko}</i> Mäusen durch die Aufnahme von Dextran-FITC.	121
3.22	Untersuchung der Endozytoseaktivität dendritischer Zellen aus <i>Sirt6^{wt}</i> und <i>Sirt6^{ko}</i> Mäusen durch die Aufnahme von Dextran-FITC.	122
3.23	Untersuchung der Reifung dendritischer Zellen aus <i>Sirt6^{wt}</i> und <i>Sirt6^{ko}</i> Mäusen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS).	124
3.24	Untersuchung der Sekretion von IL-12(p70), IL-6 und IL-10 durch Dendritische Zellen aus <i>Sirt6^{wt}</i> und <i>Sirt6^{ko}</i> Mäusen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS).	125
3.25	Acetylierung von Lysinresten des Histons H3 in <i>Sirt6^{wt}</i> und <i>Sirt6^{ko}</i> -Hepatozyten.	127
3.26	Globale DNA-Methylierung in <i>Sirt6^{ko}</i> Mäusen im Vergleich zu <i>Sirt6^{wt}</i> Tieren.	128
3.27	Validierung von Microarray Daten aus <i>Sirt6^{ko}</i> Hepatozyten durch RT-PCR.	129
3.28	Auswertung der in <i>Sirt6^{ko}</i> -Hepatozyten stärker exprimierten Transkripte anhand der Kategorie „GO - Biologische Prozesse“.	131
3.29	Auswertung der in <i>Sirt6^{ko}</i> -Hepatozyten schwächer exprimierten Transkripte anhand der Kategorie „GO - Biologische Prozesse“.	132
3.30	Expression von Genen der zirkadianen Uhr in primären Hepatozyten aus <i>Sirt6^{wt}</i> und <i>Sirt6^{ko}</i> Mäusen <i>in vitro</i> nach Serumschock.	135
3.31	Expression von Genen der zirkadianen Uhr in der Leber von <i>Sirt6^{wt}</i> und <i>Sirt6^{ko}</i> Mäusen.	136
3.32	Vergleich der Expression von Genen der zirkadianen Uhr in der Leber von Mäusen leberspezifischem <i>Sirt6-Knockout</i> mit Mäusen mit konstitutivem <i>Sirt6-Knockout</i> .	138
3.33	Untersuchung der Expression potentiell durch <i>Sirt6</i> regulierter Faktoren in	139

	Sirt6 ^{ko} Hepatozyten.	
3.34	Untersuchung der Expression der von H19 abstammenden Micro-RNA miR-675 sowie AFP und IGF-2 in in Hepatozyten und Seren von Sirt6 ^{wt} und Sirt6 ^{ko} Mäusen.	140
3.35	Untersuchung der Expression von H19 und Igf-2 in Hepatozyten aus Mäusen mit leberspezifischem <i>Sirt6 knockout</i> .	141
3.36	Untersuchung der Expression von <i>SIRT6</i> in verschiedenen humanen Tumorgeweben.	143
3.37	Korrelation der Expression von <i>SIRT6</i> und potentiell durch SIRT6 regulierter Gene in humanen Hepatomzelllinien.	145
3.38	Untersuchung des Einflusses einer SIRT6-Überexpression auf die Expression von Alpha-Fetoprotein (AFP) in Hep3B Zellen.	146
3.39	Korrelation der SIRT6-Expression mit der Größe der CD44+/CD133+ Population in Huh-7 Zellen.	148
3.40	Korrelation der SIRT6-Expression mit der Expression von CD133 in Huh-7 Zellen.	149
3.41	Untersuchung der Überexpression von SIRT6 in HepG2 Zellen.	150
3.42	Untersuchung des Einflusses der SIRT6 Überexpression auf Proliferation und 2D-Koloniebildung von humanen Hepatomzelllinien.	152
3.43	Untersuchung der Apoptosesensitivität von HepG2 Zellen in Antwort auf verschiedene Stimuli in Abhängigkeit von SIRT6.	153
3.44	Überprüfung der Immunpräzipitation von SIRT6.	155
3.45	Einordnung der mit SIRT6 co-immunpräzipitierten Proteine anhand der Kategorie „GO - Biologische Prozesse“.	156

Abbildungsnachweis

Folgende Abbildungen wurden anderen wissenschaftlichen Veröffentlichungen entnommen:

Abbildung 1.1. (Seite 4)

Nachgedruckt aus: Gertler, A. A. & Cohen, H. Y.: SIRT6, a protein with many faces. *Biogerontology* 14, 629–39 (2013)²⁴. Originaltitel der Abbildung: „Fig. 1 SIRT6’s known substrates and physical interactions.“ (S. 630). Copyright 2013, mit freundlicher Genehmigung von Springer Science and Business Media.

Abbildung 1.2. (Seite 7)

Nachgedruckt aus: Kugel, S. & Mostoslavsky, R.: Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6. *Trends Biochem. Sci.* 39, 72–81 (2014)⁴⁷. Originaltitel der Abbildung: „Figure 1. Sirtuin 6 (SIRT6) cellular functions and their impact on organismal biology and disease.“ (S. 74). Copyright 2014, mit Erlaubnis von Elsevier.

Abbildung 1.4. (Seite 12)

Nachgedruckt aus: Fu, L. & Lee, C. C.: The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat. Rev. Cancer* 3, 350–61 (2003)⁶³. Originaltitel der Abbildung: „Figure 1 | Mammalian core circadian gene feedback loops.“ (S. 352). Copyright 2003, mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd.

Abbildung 1.5. (Seite 13)

Nachgedruckt aus: Masri, S. *et al.*: Partitioning Circadian Transcription by SIRT6 Leads to Segregated Control of Cellular Metabolism. *Cell* 158, 659–672 (2014)⁶⁴. Titel der Originalabbildung: „Figure 7. SIRT6 versus SIRT1-Dependent Circadian Functions“ (S. 670). Copyright 2014, mit Erlaubnis von Elsevier.

Abbildung 1.6. (Seite 16)

Nachgedruckt aus: Sebastián, C. *et al.*: The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell* 151, 1185–99 (2012)⁴². (A): Graphical Abstract ([http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(12\)01351-7](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(12)01351-7)); (B): Titel der Originalabbildung: „Figure 7. SIRT6 Functions as a Tumor Suppressor In Vivo (L)“ (S. 1194). Copyright 2012, mit Erlaubnis von Elsevier.

Abbildung 1.7. (Seite 20)

Nachgedruckt aus: Pogribny, I. P. & Rusyn, I.: Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 342, 223–30 (2014)⁸⁴. Originaltitel der Abbildung: „Fig. 1. The chronology of DNA methylation and miRNA alterations in human multistage hepatocarcinogenesis.“ (S. 227). Copyright 2014, mit Erlaubnis von Elsevier.

Abbildung 1.8. (Seite 21)

Nachgedruckt aus: Liu, M., Jiang, L. & Guan, X.-Y.: The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein Cell* 5, 673–91 (2014)⁸¹. Das Copyright liegt bei den Autoren; dieser Artikel wurde mit offenem Zugriff („open access“) publiziert.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ab	<i>Antibody</i> ; Antikörper	E	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
	Adra2a	<i>Adrenergic receptor, alpha 2a</i>		EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	
	AFP	Alpha-Fetoprotein		EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	
	Amp	Ampicillin		ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	
	Amy2	Amylase 2		EUCOMM	<i>European Conditional Mouse Mutagenesis Program</i>	
	AP	Alkalische Phosphatase		EuMMCR	<i>European Mouse Mutant Cell Repository</i>	
	APS	Ammoniumpersulfat		ESC	<i>Embryonic stem cell</i> ; Embryonale Stammzelle	
	Arntl	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like</i>		F	FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
B	bp	<i>base pairs</i> ; Basenpaare	FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> ; Fetales Kalberserum		
	C	CCG	<i>Clock Controlled Gene</i>	G	GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
CDC20		<i>Cell division cycle 20</i>	GPC-3		Glypican 3	
Cdk4		<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>	Gsn		Gelsolin	
Cdkn1c		<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)</i>	GSTM		Glutathione S-transferase, mu	
cDNA		<i>complementary DNA</i>	H		H/E	Hämatoxylin/Eosin
Co-IP		Co-Immunpräzipitation			HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ConA		Concanavalin A			HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
CycB1		Cyclin B1			I	Ig(G)
Cyp3a41	<i>Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 41A</i>	IGF-2	<i>Insulin-like Growth Factor 2</i>			
D	Cry	<i>Cryptochrome</i>	IL	Interleukin		
	DC	<i>Dendritic Cell</i> ; Dendritische Zelle				
	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium				
	DMP	Dimethyl-Pimelimidate				
	DMSO	Dimethylsulfoxid				
	DNA	Desoxyribonucleinsäure				
	E	ECAR	<i>Extracellular Acidification Rate</i>			
<i>E.coli</i>		<i>Escherichia coli</i>				

K	Kan	Kanamycin	P	Per1	<i>Period circadian clock 1</i>
	Keg1	<i>Kidney expressed gene 1</i>		PI	Protease Inhibitor
	KO	<i>knockout</i>		PIC	Protease Inhibitor Cocktail
L	LB	Luria Bertani Medium	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	
	LPS	Lipopolysaccharid	R	RNA	Ribonucleinsäure
M	5-mC	5-Methylcytosin		RP-II	RNA-Polymerase II
	mAb	<i>monoclonal Antibody</i>		RT-PCR	<i>Real Time-PCR</i>
	MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>	S	Scd	Stearoyl-Coenzyme A desaturase
	miR	Micro-RNA, miRNA		SCN	<i>Suprachiasmatic Nucleus, Nucleus suprachiasmaticus</i>
	Mup1	<i>Major urinary protein 1</i>		SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate; Natriumdodecylsulfat</i>
	N	MyoM2	Myomesin 2	Sqle	<i>Squalene epoxidase</i>
		2-NBDG	(2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose)	SIRT	Sirtuin = „ <i>Silent mating type Information Regulation 2-in</i> “
Nr1d1		<i>Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i>	Slco1a1	<i>Solute carrier organic anion transporter family, member 1a1</i>	
NRIgG		<i>Normal Rabbit IgG</i>	SPF	Spezifiziert pathogenfrei	
NTC		<i>No Template Control</i>	T	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
O	Ob-r	<i>Obese-Receptor, (auch: Leptin-Rezeptor, Lepr)</i>		W	WT
	OCR	<i>Oxygen Consumption Rate</i>	Wtsi		<i>Wellcome Trust Sanger Institute</i>
P	pAb	<i>polyclonal Antibody</i>	Z	ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung
	PAGE	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>			
	PCR	<i>Polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion</i>			
	Pdgfra	<i>Platelet derived growth factor receptor, alpha</i>			
	Pdk4	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4</i>			
	Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin			

Literaturverzeichnis

1. 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).
2. Haigis, M. C. & Guarente, L. P. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* **20**, 2913–21 (2006).
3. Michishita, E. & Park, J. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4623–4635 (2005).
4. Yamamoto, H., Schoonjans, K. & Auwerx, J. Sirtuin functions in health and disease. *Mol. Endocrinol.* **21**, 1745–55 (2007).
5. Liszt, G., Ford, E., Kurtev, M. & Guarente, L. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **280**, 21313–20 (2005).
6. Mostoslavsky, R. *et al.* Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* **124**, 315–29 (2006).
7. McCord, R. a *et al.* SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging (Albany. NY)*. **1**, 109–21 (2009).
8. Michishita, E. *et al.* SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* **452**, 492–6 (2008).
9. Jiang, H. *et al.* SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature* **496**, 110–3 (2013).
10. Kanfi, Y. *et al.* Regulation of SIRT6 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett.* **582**, 543–8 (2008).
11. 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**, 224–36 (2010).
12. 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).
13. Dávalos, A. *et al.* miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 9232–7 (2011).

14. Elhanati, S. *et al.* Multiple regulatory layers of SREBP1/2 by SIRT6. *Cell Rep.* **4**, 905–12 (2013).
15. 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).
16. Pan, P. W. *et al.* Structure and biochemical functions of SIRT6. *J. Biol. Chem.* **286**, 14575–87 (2011).
17. Gil, R., Barth, S., Kanfi, Y. & Cohen, H. Y. SIRT6 exhibits nucleosome-dependent deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.* **41**, 8537–45 (2013).
18. Feldman, J. L., Baeza, J. & Denu, J. M. Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by mammalian sirtuins. *J. Biol. Chem.* **288**, 31350–6 (2013).
19. Ardestani, P. & Liang, F. Sub-cellular localization , expression and functions of Sirt6 during the cell cycle in HeLa cells. *Nucleus* **3**, 442–451 (2012).
20. Miteva, Y. V & Cristea, I. M. A proteomic perspective of Sirtuin 6 (SIRT6) phosphorylation and interactions and their dependence on its catalytic activity. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 168–83 (2014).
21. Thirumurthi, U. *et al.* MDM2-mediated degradation of SIRT6 phosphorylated by AKT1 promotes tumorigenesis and trastuzumab resistance in breast cancer. *Sci. Signal.* **7**, ra71 (2014).
22. Sauve, A. & Schramm, V. Sir2 Regulation by Nicotinamide Results from Switching between Base Exchange and Deacetylation Chemistry. *Biochemistry* **42**, (2003).
23. Jackson, M. D., Schmidt, M. T., Oppenheimer, N. J. & Denu, J. M. Mechanism of nicotinamide inhibition and transglycosidation by Sir2 histone/protein deacetylases. *J. Biol. Chem.* **278**, 50985–98 (2003).
24. Gertler, A. A. & Cohen, H. Y. SIRT6, a protein with many faces. *Biogerontology* **14**, 629–39 (2013).
25. Yasuda, M., Wilson, D. R., Fugmann, S. D. & Moaddel, R. Synthesis and characterization of SIRT6 protein coated magnetic beads: identification of a novel inhibitor of SIRT6 deacetylase from medicinal plant extracts. *Anal. Chem.* **83**, 7400–7 (2011).
26. Kokkonen, P. *et al.* Studying SIRT6 regulation using H3K56 based substrate and small molecules. *Eur. J. Pharm. Sci.* **63**, 71–6 (2014).

27. Kawahara, T. L. a *et al.* SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell* **136**, 62–74 (2009).
28. Michishita, E. *et al.* Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6. *Cell Cycle* **8**, 2664–6 (2009).
29. Yang, B., Zwaans, B. M. M., Eckersdorff, M. & Lombard, D. B. The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac in vivo to promote genomic stability. *Cell Cycle* **8**, 2662–3 (2009).
30. Mao, Z. *et al.* SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science* **332**, 1443–6 (2011).
31. Simeoni, F. *et al.* Proteomic analysis of the SIRT6 interactome: novel links to genome maintenance and cellular stress signaling. *Sci. Rep.* **3**, 3085 (2013).
32. Lee, N. *et al.* Comparative interactomes of SIRT6 and SIRT7: Implication of functional links to aging. *Proteomics* **14**, 1610–22 (2014).
33. Kaidi, A., Weinert, B. T., Choudhary, C. & Jackson, S. P. Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. *Science* **329**, 1348–53 (2010).
34. Mao, Z. *et al.* Sirtuin 6 (SIRT6) rescues the decline of homologous recombination repair during replicative senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 11800–5 (2012).
35. Toiber, D. *et al.* SIRT6 recruits SNF2H to DNA break sites, preventing genomic instability through chromatin remodeling. *Mol. Cell* **51**, 454–68 (2013).
36. Tennen, R. I., Bua, D. J., Wright, W. E. & Chua, K. F. SIRT6 is required for maintenance of telomere position effect in human cells. *Nat. Commun.* **2**, 433 (2011).
37. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705 (2007).
38. Kawahara, T. L. A. *et al.* Supplemental Data: SIRT6 Links Histone H3 Lysine 9 Deacetylation to NF-kappaB-Dependent Gene Expression and Organismal Life Span. **136**, (2009).
39. Zhong, L. *et al.* The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell* **140**, 280–93 (2010).

40. Marquardt, J. U., Fischer K. *et al.* Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology* **58**, 1054–64 (2013).
41. Kawahara, T. L. a *et al.* Dynamic chromatin localization of Sirt6 shapes stress- and aging-related transcriptional networks. *PLoS Genet.* **7**, e1002153 (2011).
42. Sebastián, C. *et al.* The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell* **151**, 1185–99 (2012).
43. 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.* **287**, 41903–13 (2012).
44. 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).
45. 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).
46. Tao, R., Xiong, X., DePinho, R. a, Deng, C.-X. & Dong, X. C. FoxO3 transcription factor and Sirt6 deacetylase regulate low density lipoprotein (LDL)-cholesterol homeostasis via control of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (Pcsk9) gene expression. *J. Biol. Chem.* **288**, 29252–9 (2013).
47. Kugel, S. & Mostoslavsky, R. Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 72–81 (2014).
48. Hu, C.-J. *et al.* Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3514–26 (2006).
49. Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. & Denko, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* **3**, 187–97 (2006).
50. Seagroves, T. N. *et al.* Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3436–44 (2001).
51. Schwer, B. *et al.* Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21790–4 (2010).
52. Kanfi, Y. *et al.* SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity. *Aging Cell* **9**, 162–73 (2010).

53. Dominy, J. E. *et al.* The deacetylase Sirt6 activates the acetyltransferase GCN5 and suppresses hepatic gluconeogenesis. *Mol. Cell* **48**, 900–13 (2012).
54. Xiong, X., Tao, R., DePinho, R. a & Dong, X. C. Deletion of hepatic FoxO1/3/4 genes in mice significantly impacts on glucose metabolism through downregulation of gluconeogenesis and upregulation of glycolysis. *PLoS One* **8**, e74340 (2013).
55. Puigserver, P. *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**, 550–5 (2003).
56. 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).
57. Wang, C.-H., Leung, C.-H., Liu, S.-C. & Chung, C.-H. Safety and effectiveness of rosiglitazone in type 2 diabetes patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *J. Formos. Med. Assoc.* **105**, 743–52 (2006).
58. Nan, Y.-M. *et al.* Rosiglitazone prevents nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Scand. J. Gastroenterol.* **44**, 358–65 (2009).
59. Ferré, P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S43–50 (2004).
60. Ko, C. H. & Takahashi, J. S. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* **15 Spec No**, R271–7 (2006).
61. Hastings, M. H., Reddy, A. B. & Maywood, E. S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 649–61 (2003).
62. Takahashi, J. S., Hong, H.-K., Ko, C. H. & McDearmon, E. L. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 764–75 (2008).
63. Fu, L. & Lee, C. C. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 350–61 (2003).
64. Masri, S. *et al.* Partitioning Circadian Transcription by SIRT6 Leads to Segregated Control of Cellular Metabolism. *Cell* **158**, 659–672 (2014).
65. Salminen, A. & Kaarniranta, K. NF-kappaB signaling in the aging process. *J. Clin. Immunol.* **29**, 397–405 (2009).
66. 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).

67. Mahlknecht, U., Ho, A. D. & Voelter-Mahlknecht, S. Chromosomal organization and fluorescence in situ hybridization of the human Sirtuin 6 gene. *Int. J. Oncol.* **28**, 447–56 (2006).
68. Van Meter, M., Mao, Z., Gorbunova, V. & Seluanov, A. SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells. *Cell Cycle* **10**, 3153–3158 (2011).
69. Khongkow, M. *et al.* SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer. *Carcinogenesis* **34**, 1476–86 (2013).
70. Liu, Y. *et al.* Inhibition of SIRT6 in prostate cancer reduces cell viability and increases sensitivity to chemotherapeutics. *Protein Cell* **4**, 702–710 (2013).
71. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA. Cancer J. Clin.* **55**, 74–108 (2005).
72. El-Serag, H. B. & Rudolph, K. L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* **132**, 2557–76 (2007).
73. Elsharkawy, A. M. & Mann, D. a. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology* **46**, 590–7 (2007).
74. Hanahan, D. & Weinberg, R. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
75. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
76. Frank, S. A. & Nowak, M. A. Problems of somatic mutation and cancer. *Bioessays* **26**, 291–9 (2004).
77. Jiricny, J. & Marra, G. DNA repair defects in colon cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 61–9 (2003).
78. Akhavan-Niaki, H. & Samadani, A. A. DNA methylation and cancer development: molecular mechanism. *Cell Biochem. Biophys.* **67**, 501–13 (2013).
79. Orr, J. A. & Hamilton, P. W. Histone acetylation and chromatin pattern in cancer. A review. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **29**, 17–31 (2007).
80. Thorgeirsson, S. S. & Grisham, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* **31**, 339–46 (2002).
81. Liu, M., Jiang, L. & Guan, X.-Y. The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein Cell* **5**, 673–91 (2014).

82. Lin, C. H. *et al.* Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res.* **61**, 4238–43 (2001).
83. Calvisi, D. F. *et al.* Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Invest.* **117**, 2713–22 (2007).
84. Pogribny, I. P. & Rusyn, I. Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **342**, 223–30 (2014).
85. Adinolfi, M. & Lessof, M. H. Cancer, oncogenes and oncofetal antigens. *Q. J. Med.* **54**, 193–204 (1985).
86. Zhou, L., Liu, J. & Luo, F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **12**, 1175–81 (2006).
87. Nakatsura, T. & Nishimura, Y. Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs* **19**, 71–7 (2005).
88. Liu, H. *et al.* Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **16**, 4410–5 (2010).
89. Biran, H., Ariel, I., de Groot, N., Shani, A. & Hochberg, A. Human imprinted genes as oncodevelopmental markers. *Tumour Biol.* **15**, 123–34 (1994).
90. Sasaki, H., Ishihara, K. & Kato, R. Mechanisms of Igf2/H19 imprinting: DNA methylation, chromatin and long-distance gene regulation. *J. Biochem.* **127**, 711–5 (2000).
91. Kim, K. S. & Lee, Y. I. Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **119**, 143–8 (1997).
92. Sohda, T. *et al.* In situ detection of insulin-like growth factor II (IGF2) and H19 gene expression in hepatocellular carcinoma. *J. Hum. Genet.* **43**, 49–53 (1998).
93. Wu, J., Qin, Y., Li, B., He, W. & Sun, Z. Hypomethylated and hypermethylated profiles of H19DMR are associated with the aberrant imprinting of IGF2 and H19 in human hepatocellular carcinoma. *Genomics* **91**, 443–50 (2008).
94. Schwienbacher, C. *et al.* Gain of imprinting at chromosome 11p15: A pathogenetic mechanism identified in human hepatocarcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5445–9 (2000).
95. Iizuka, N., Oka, M., Tamesa, T., Hamamoto, Y. & Yamada-Okabe, H. Imbalance in expression levels of insulin-like growth factor 2 and H19 transcripts linked to progression of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* **24**, 4085–9 (2004).

96. Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.* **8**, 519–530 (1927).
97. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–33 (2009).
98. Levine, A. J. & Puzio-Kuter, A. M. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* **330**, 1340–4 (2010).
99. Beyoğlu, D. & Imbeaud, S. Tissue metabolomics of hepatocellular carcinoma: Tumor energy metabolism and the role of transcriptomic classification. *Hepatology* **58**, 229–238 (2013).
100. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105–11 (2001).
101. Ben-Porath, I. *et al.* An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.* **40**, 499–507 (2008).
102. Fausto, N. & Campbell, J. S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech. Dev.* **120**, 117–30 (2003).
103. Zheng, Y.-W. *et al.* The CD133(+)CD44(+) Precancerous Subpopulation of Oval Cells Is a Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Stem Cells Dev.* **23**, 2237–49 (2014).
104. Ma, S., Lee, T. K., Zheng, B.-J., Chan, K. W. & Guan, X.-Y. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene* **27**, 1749–58 (2008).
105. Chiba, T. *et al.* Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* **44**, 240–51 (2006).
106. Marquardt, J. U. *et al.* Human hepatic cancer stem cells are characterized by common stemness traits and diverse oncogenic pathways. *Hepatology* **54**, 1031–42 (2011).
107. Distler, U. *et al.* Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nat. Methods* **11**, 167–70 (2014).
108. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–13 (2009).

109. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. a. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).
110. Morris, K. M., Aden, D. P., Knowles, B. B. & Colten, H. R. Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2. *J. Clin. Invest.* **70**, 906–13 (1982).
111. Uchida, Y. *et al.* Analogy between sphere forming ability and stemness of human hepatoma cells. *Oncol. Rep.* **24**, 1147–1151 (2010).
112. Sassmann, A., Offermanns, S. & Wettschureck, N. Tamoxifen-inducible Cre-mediated recombination in adipocytes. *Genesis* **48**, 618–625 (2010).
113. Crouch, S. P., Kozlowski, R., Slater, K. J. & Fletcher, J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **160**, 81–8 (1993).
114. Pettitt, S. J. *et al.* Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat. Methods* **6**, 493–5 (2009).
115. Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503–12 (1987).
116. Capecchi, M. R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 507–12 (2005).
117. Friedel, R. H., Seisenberger, C., Kaloff, C. & Wurst, W. EUCOMM--the European conditional mouse mutagenesis program. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **6**, 180–5 (2007).
118. Postic, C. & Magnuson, M. a. DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age. *Genesis* **26**, 149–150 (2000).
119. Wu, M. *et al.* Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C125–36 (2007).
120. Seegert, D. *et al.* Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease. *Gut* **48**, 326–32 (2001).
121. Pène, J. *et al.* Chronically Inflamed Human Tissues Are Infiltrated by Highly Differentiated Th17 Lymphocytes. *J. Immunol.* **180**, 7423–7430 (2008).

122. Glass, W. G., Sarisky, R. T. & Vecchio, A. M. Del. Not-so-sweet sixteen: the role of IL-16 in infectious and immune-mediated inflammatory diseases. *J. Interferon Cytokine Res.* **26**, 511–20 (2006).
123. Cruikshank, W. W., Kornfeld, H. & Center, D. M. Interleukin-16. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 757–66 (2000).
124. Costa, V. S., Mattana, T. C. C. & da Silva, M. E. R. Unregulated IL-23/IL-17 immune response in autoimmune diseases. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **88**, 222–6 (2010).
125. Kitani, A. & Xu, L. Regulatory T cells and the induction of IL-17. *Mucosal Immunol.* **1 Suppl 1**, S43–6 (2008).
126. Dwyer, J. M. & Johnson, C. The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. *Clin. Exp. Immunol.* **46**, 237–49 (1981).
127. Dudek, A. M., Martin, S., Garg, A. D. & Agostinis, P. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Front. Immunol.* **4**, 438 (2013).
128. Balsalobre, A. Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. *Science (80-.).* **289**, 2344–7 (2000).
129. Balsalobre, a, Damiola, F. & Schibler, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**, 929–37 (1998).
130. Lui, J. & Finkelstein, G. An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R189–96 (2008).
131. Marks, A. G., Carroll, J. M., Purnell, J. Q. & Roberts, C. T. Plasma distribution and signaling activities of IGF-II precursors. *Endocrinology* **152**, 922–30 (2011).
132. Tennen, R. I. & Chua, K. F. Chromatin regulation and genome maintenance by mammalian SIRT6. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 39–46 (2011).
133. Zhong, L. & Mostoslavsky, R. SIRT6: a master epigenetic gatekeeper of glucose metabolism. *Transcription* **1**, 17–21 (2010).
134. Lombard, D. B. Sirtuins at the breaking point: SIRT6 in DNA repair. *Aging (Albany. NY).* **1**, 12–6 (2009).
135. Zhu, Z. *et al.* Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **126**, 2067–78 (2010).

136. Pang, R. W. C. & Poon, R. T. P. Cancer stem cell as a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Curr. Cancer Drug Targets* **12**, 1081–94 (2012).
137. Chan, A. W. H., Tong, J. H. M., Chan, S. L., Lai, P. B. S. & To, K.-F. Expression of stemness markers (CD133 and EpCAM) in prognostication of hepatocellular carcinoma. *Histopathology* **64**, 935–50 (2014).
138. Yilmaz, G., Akyol, G., Cakir, A. & Ilhan, M. Investigation of diagnostic utility and expression profiles of stem cell markers (CD133 and CD90) in hepatocellular carcinoma, small cell dysplasia, and cirrhosis. *Pathol. Res. Pract.* **210**, 419–25 (2014).
139. Fischer, K. Functional analysis of the ageing-related gene Sirt6 in knockout models (Masterarbeit im Studiengang 'Biomedizin'). *Am FB Biol. der Johannes Gutenberg-Universität Mainz* (2010).
140. Silva, J. C., Gorenstein, M. V, Li, G.-Z., Vissers, J. P. C. & Geromanos, S. J. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 144–56 (2006).
141. Beghé, C., Wilson, A. & Ershler, W. B. Prevalence and outcomes of anemia in geriatrics: a systematic review of the literature. *Am. J. Med.* **116 Suppl** , 3S–10S (2004).
142. Roth, M., Wang, Z. & Chen, W. Y. Sirtuins in hematological aging and malignancy. *Crit. Rev. Oncog.* **18**, 531–47 (2013).
143. Khazaei, T., McGuigan, A. & Mahadevan, R. Ensemble modeling of cancer metabolism. *Front. Physiol.* **3**, 135 (2012).
144. Golpour, M. *et al.* Human fibroblast switches to anaerobic metabolic pathway in response to serum starvation: a mimic of warburg effect. *Int. J. Mol. Cell. Med.* **3**, 74–80 (2014).
145. Xiao, C. *et al.* SIRT6 deficiency results in severe hypoglycemia by enhancing both basal and insulin-stimulated glucose uptake in mice. *J. Biol. Chem.* **285**, 36776–84 (2010).
146. Chang, L., Chiang, S.-H. & Saltiel, A. R. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol. Med.* **10**, 65–71 (2005).
147. Alessi, D., Andjelkovic, M. & Caudwell, B. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **15**, 6541–6551 (1996).

148. Chu, C. W. *et al.* Manifestations of hypercholesterolaemia, hypoglycaemia, erythrocytosis and hypercalcaemia in patients with hepatocellular carcinoma: report of two cases. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 807–10 (1999).
149. Yamaguchi, M. *et al.* Case report: Insulin-like growth factor II expression in hepatocellular carcinoma with alcoholic liver fibrosis accompanied by hypoglycaemia. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 47–51 (1998).
150. Ishida, S. *et al.* Big insulin-like growth factor II-producing hepatocellular carcinoma associated with hypoglycemia. *Intern. Med.* **34**, 1201–6 (1995).
151. Okushin, K. *et al.* IGF-II Producing Hepatocellular Carcinoma Treated with Sorafenib: Metabolic Complications and a Foresight to Molecular Targeting Therapy to the IGF Signal. *Case Rep. Gastroenterol.* **6**, 784–9 (2012).
152. Saigal, S., Nandeesh, H. P., Malhotra, V. & Sarin, S. K. A case of hepatocellular carcinoma associated with troublesome hypoglycemia: management by cytoreduction using percutaneous ethanol injection. *Am. J. Gastroenterol.* **93**, 1380–1 (1998).
153. Thipaporn, T., Bubpha, P. & Varaphon, V. Hepatocellular carcinoma with persistent hypoglycemia: successful treatment with corticosteroid and frequent high carbohydrate intake. *J. Med. Assoc. Thai.* **88**, 1941–6 (2005).
154. Yano, Y. *et al.* A case of well-differentiated hepatocellular carcinoma arising in primary biliary cirrhosis. *Kobe J. Med. Sci.* **49**, 39–43 (2003).
155. Dynkevich, Y. *et al.* Tumors, IGF-2, and hypoglycemia: insights from the clinic, the laboratory, and the historical archive. *Endocr. Rev.* **34**, 798–826 (2013).
156. Lawrence, M. C., McKern, N. M. & Ward, C. W. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 699–705 (2007).
157. Garofalo, C. *et al.* Efficacy of and resistance to anti-IGF-1R therapies in Ewing's sarcoma is dependent on insulin receptor signaling. *Oncogene* **30**, 2730–40 (2011).
158. Frasca, F. *et al.* The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Arch. Physiol. Biochem.* **114**, 23–37 (2008).
159. Kanfi, Y. *et al.* The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature* **483**, 218–21 (2012).
160. Mellman, I. & Steinman, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**, 255–8 (2001).

161. Diebold, S. S. Determination of T-cell fate by dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* **86**, 389–97 (2008).
162. Gee, K., Guzzo, C., Che Mat, N. F., Ma, W. & Kumar, A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **8**, 40–52 (2009).
163. Pulendran, B. Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunol. Res.* **29**, 187–96 (2004).
164. Garrett, W. S. *et al.* Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* **102**, 325–34 (2000).
165. Olex, A. L., Hiltbold, E. M., Leng, X. & Fetrow, J. S. Dynamics of dendritic cell maturation are identified through a novel filtering strategy applied to biological time-course microarray replicates. *BMC Immunol.* **11**, 41 (2010).
166. Türeci, O. *et al.* Cascades of transcriptional induction during dendritic cell maturation revealed by genome-wide expression analysis. *FASEB J.* **17**, 836–47 (2003).
167. Chen, Y. *et al.* Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 812–9 (2007).
168. Tan, M. *et al.* Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **146**, 1016–28 (2011).
169. Tamaru, H. & Selker, E. U. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**, 277–83 (2001).
170. Bird, A. Molecular biology. Methylation talk between histones and DNA. *Science* **294**, 2113–5 (2001).
171. Schlesinger, Y. *et al.* Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat. Genet.* **39**, 232–6 (2007).
172. Straif, K. *et al.* Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *Lancet. Oncol.* **8**, 1065–6 (2007).
173. Kalsbeek, A., la Fleur, S. & Fliers, E. Circadian control of glucose metabolism. *Mol. Metab.* **3**, 372–83 (2014).
174. Ratajczak, M. Z. Igf2-H19, an imprinted tandem gene, is an important regulator of embryonic development, a guardian of proliferation of adult pluripotent stem cells, a regulator of longevity, and a ‘passkey’ to cancerogenesis. *Folia Histochem. Cytobiol.* **50**, 171–9 (2012).

175. Müller, M. *et al.* Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest.* **99**, 403–13 (1997).
176. Luco, R. F. *et al.* Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* **327**, 996–1000 (2010).
177. Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R. & Misteli, T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* **144**, 16–26 (2011).
178. Zhou, H.-L., Luo, G., Wise, J. A. & Lou, H. Regulation of alternative splicing by local histone modifications: potential roles for RNA-guided mechanisms. *Nucleic Acids Res.* **42**, 701–13 (2014).
179. Chen, J. & Weiss, W. A. Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy. *Oncogene* **34**, 1–14 (2015).

Eidesstattliche Erklärung

Danksagung

Lebenslauf

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit erschienen bereits in folgender Publikation:

„Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients.“

Marquardt JU*, **Fischer K***, Baus K, Krupp M, Linke M, Teufel A, Zechner U, Strand D, Thorgeirsson SS, Galle PR, Strand S

* Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen

Hepatology; 2013 Sep; 58(3):1054-64

Posterpräsentationen und Vorträge

„SIRT6 - an epigenetic regulator during HCC development?“

Fischer K, Baus K, Marquardt JU, Linke M, Zechner U, Galle PR, Strand S

Liver Cancer, DKFZ, Heidelberg, 05.-07. Juli 2012

Poster und Vortrag

„Loss Of The Epigenetic Regulator SIRT6 During Hepatocarcinogenesis.“

Fischer K, Marquardt JU, Baus K, Linke M, Zechner U, Thorgeirsson SS, Galle P, Strand S

ILCA - Sixth Annual Conference, Berlin, 14.-16. Sept. 2012

ePoster