

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss von Sirtuin 6 auf die Autophagie in Hepatozyten – Untersuchungen zur
Wechselwirkung mit den nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Merlin Zöpf
aus Offenbach am Main

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Einleitung.....	1
2. Literaturdiskussion	4
2.1 Autophagie - ein lang bekanntes Konzept	4
2.2 Autophagie und Erkrankungen	5
2.3 Der biologische Ablauf der Autophagie.....	6
2.4 Das Autophagieprotein p62 (SQSTM1)	7
2.5 Der Autophagie-Marker MAP1LC3B (Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta).....	11
2.6 Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor α (PPAR α)	12
2.7 Der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR)	14
2.8 Sirtuin 6.....	15
3. Material und Methoden.....	17
3.1 Material.....	17
3.1.1 Antikörper	17
3.1.2 Primer	18
3.1.3 Chemikalien	18
3.1.4 Zellkulturmedien und Puffer	20
3.1.5 Kits.....	22
3.1.6 Geräte.....	22
3.1.7 Gebrauchsmaterialien.....	24
3.1.8 Software.....	25
3.2 Methoden.....	26
3.2.1 Zelltoxizitätsmessung mittels CellTiterGlo	26
3.2.2 Zellkultur	26
3.2.3 Zellzahlbestimmung	27

3.2.4 SDS-Page.....	27
3.2.5 Western Blot	28
3.2.6 LC-3 turnover Assay	29
3.2.7 p62 turnover Assay	29
3.2.8 Immunfluoreszenzfärbung	29
3.2.9 RNA-Isolation.....	30
3.3 cDNA	31
3.3.1 Quantitative Echt-Zeit PCR.....	31
3.3.2 Monodansylcadaverin-Färbung	32
4. Ergebnisse	33
4.1 Einfluss einer SIRT6-Expression auf den Autophagiemarker p62	33
4.2 Einfluss der Agonisten für nukleäre Rezeptoren auf das Überleben von SIRT6-exprimierenden und -defizienten HepG2-Zellen	34
4.3 Einfluss der Agonisten für die nukleäre Rezeptoren PPAR α und FXR auf das Proteinlevel und die Genexpression der Autophagiemarker p62 und LC-3	37
4.3.1 Untersuchung der p62-Proteinmenge im Western Blot.....	37
4.3.2 Einfluss einer PPAR α -Stimulation auf die Expression der p62-mRNA	40
4.3.3 Nachweis des zellulären p62-Proteins mittels Immunfluoreszenzfärbung	42
4.3.4 Untersuchung der LC-3-Proteinmenge im Western Blot.....	45
4.3.5 Nachweis des zellulären LC-3-Proteins mittels Immunfluoreszenzfärbung...	48
4.4 Einfluss einer PPAR α und FXR Stimulation auf den autophagischen Fluss in SIRT6 exprimierenden und defizienten HepG2-Zellen	50
4.4.2 Untersuchung der autophagischen Aktivität mit Hilfe des p62- Proteinabbaus	62
4.4.3 Einfluss der SIRT6-Expression und der Agonisten für nukleäre Rezeptoren auf die Bildung autophagischer Vakuolen.....	68
4.5 Einfluss der SIRT6-Expression auf die Expression der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR.....	70
4.5.1 Untersuchung der PPAR α -Proteinmenge im Western-Blot.....	70

4.5.2 Subzelluläre Lokalisation des PPAR α -Proteins in SIRT6-exprimierenden und -defizienten HepG2-Zellen	71
4.5.3 Expression von PPAR α -Zielgenen in Abhängigkeit von der SIRT6-Expression	73
4.5.4 Untersuchung der FXR-Proteinmenge im Western-Blot	76
4.5.5 Subzelluläre Lokalisation des FXR-Proteins in SIRT6-exprimierenden und -defizienten HepG2-Zellen	77
4.5.6 Expression von FXR-Zielgenen in Abhängigkeit von der SIRT6-Expression	79
5. Diskussion	84
5.1 SIRT6 beeinflusst die p62-Expression	84
5.2 Die SIRT6-Expression beeinflusst die Autophagieregulation der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR	86
5.3 Eine SIRT6-Expression hat Einfluss auf den autophagischen Fluss in HepG2-Zellen	88
5.4 Einfluss von SIRT6 auf die Expression der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR	90
6. Zusammenfassung	92
Literatur	94

Abkürzungsverzeichnis

Atg	autophagy related
ATP	Adenosintriphosphat
BafA1	Bafilomycin A1
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
CYP7A1	Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A Member 1
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FDA	Food and Drug Administration
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
GABARAP	gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GABARAPL1/2	gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein protein-like 1/2
GLUT-1	Glukose-Transporter 1
HBSS	Hanks´ Balanced Salt Solution
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIF1alpha	hypoxia-inducible factor 1-alpha
IL-8	Interleukin 8
K67	N,N'-[2-(2-Oxopropyl)-1,4-naphthalindiyl]bis(4-ethoxybenzolsulfonamid)
Keap1	kelch like ECH associated protein 1
KIR	Keap1-Interaktionsregion
LC3	light chain 3
LDH	Laktatdehydrogenase
LIR	LC-3-Interaktionsregion
MAP1LC3A	Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha
MDC	Monodansylcadaverin
MiT/Tfe	microphthalmia/transcription factor E
mTORC1	mechanistic target of rapamycin complex 1

NAD+	Nikotinamidadenindinukleotid
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
NCOA2	Nuclear Receptor Coactivator 2
Nf-κB	nukleärer Faktor, der an den Promotor leichter Kappa-Ketten von B-Lymozyten bindet
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OCA	Obeticholsäure
p62	Sequestosom1;SQSTM1
PB1	Phox1 und Bem1p
PBC	primär biliäre Cholangitis
PBS	Phospahte Buffered Saline
PBS-EDTA	Phosphate Buffered Saline-ethylene diamine tetraacetic acid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PPRE	PPAR-response elements
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RP-II	RNA-Polymerase 2
SAA-4	Serum Amyloid A4
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-Page	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SHP	small heterodimer partner
SIRT6	Sirtuin 6
SULT2A1	Sulfotransferase Family 2A Member 1
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF6	Tumornekrosefaktor Rezeptor-assoziiierter Faktor 6
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UBA	Ubiquitin-assoziierte Domän
UGT2B4	UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B4
ULK1/2	unc-51-like Kinase 1/2

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modellvorstellung der transkriptionellen Aktivierung oder Hemmung der nukleären Rezeptoren PPARalpha oder FXR zur Autophagiekoordination in der Leber	2
Abbildung 2: Funktionelle Domänen p62.....	8
Abbildung 3: Das Konjugationssystem von LC-3.....	12
Abbildung 4: Einfluss einer SIRT6 Expression auf die Proteinmenge von p62.....	33
Abbildung 5: Einfluss einer SIRT6-Expression auf die Genexpression von p62.....	34
Abbildung 6: Einfluss des PPAR α Agonisten GW 7647 auf das zelluläre Überleben von HepG2-Zellen in Abhängigkeit von der SIRT6-Expression	35
Abbildung 7: Einfluss des FXR Agonisten GW 4064 auf das zelluläre Überleben von HepG2-Zellen in Abhängigkeit von der SIRT6-Expression.....	36
Abbildung 8: Einfluss des Agonisten für PPAR α (GW 7647) auf die zelluläre p62-Proteinmenge.....	38
Abbildung 9: Einfluss des Agonisten für FXR (GW 4064) auf die zelluläre p62-Proteinmenge.....	39
Abbildung 10: Einfluss des PPAR α -Agonisten auf die Gen-Expression der p62-mRNA.....	41
Abbildung 11: Einfluss des PPAR α -Agonisten auf die Gen-Expression der p62-mRNA.....	41
Abbildung 12: Einfluss des FXR-Agonisten auf die Gen-Expression der p62-mRNA	42
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung von p62 nach Behandlung von HepG2 Zellen e7/e8 (SIRT6 +/+) und 1.23/2.39 (SIRT6 -/-) mit dem Agonisten für den nukleären Rezeptor PPAR α	43
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von p62 nach Behandlung von HepG2 Zellen e7/e8 (SIRT6 +/+) und 1.23/2.39 (SIRT6 -/-) mit dem Agonisten für den nukleären Rezeptor FXR.....	44
Abbildung 15: Einfluss des Agonisten für PPAR α (GW 7647) auf die zelluläre LC-3-Proteinmenge.....	46
Abbildung 16: Einfluss des Agonisten für FXR (GW 4064) auf die zelluläre LC-3-Proteinmenge.....	47
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung von LC-3 nach Behandlung von HepG2 Zellen e7 (SIRT6 +/+) und 1.23 (SIRT6 -/-) mit den Agonisten für die nukleäre Rezeptoren PPAR α und FXR.....	49

Abbildung 18: Auswertung des LC-3 Turnover Assays nach Stimulation des FXR-Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression unter Hungerbedingungen	52
Abbildung 19: Auswertung des LC-3 Turnover Assays nach Stimulation des PPAR α -Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression.....	54
Abbildung 20: Auswertung des LC-3 Turnover Assays nach Stimulation des PPAR α -Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression unter Hungerbedingungen	56
Abbildung 21: Auswertung des LC-3 Turnover Assays nach Stimulation des FXR-Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression.....	58
Abbildung 22: Auswertung des LC-3 Turnover Assays nach Stimulation des FXR-Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression unter Hungerbedingungen	60
Abbildung 23: Auswertung des p62-Proteinabbaus nach Stimulation des PPAR α -Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression.....	63
Abbildung 24: Auswertung des p62-Proteinabbaus nach Stimulation des PPAR α -Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression unter Hungerbedingungen	64
Abbildung 25: Auswertung des p62-Proteinabbaus nach Stimulation des FXR-Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression.....	65
Abbildung 26: Auswertung des p62-Proteinabbaus nach Stimulation des FXR-Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression unter Hungerbedingungen	66
Abbildung 27: Monodansylcadaverine-Färbung von SIRT6-exprimierenden und -defizienten HepG2-Zellen.....	69
Abbildung 28: Basale Level des nukleären Rezeptor PPAR α (oben) und nach einer 3-stündigen Hungerepisode (unten)	70
Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung von PPAR α nach Behandlung der HepG2 Zellen e7 (SIRT6 +/+) und 1.23 (SIRT6 -/-) mit dem Agonisten für PPAR α	72
Abbildung 30: Einfluss des PPAR α -Agonisten auf die mRNA-Expression von CYP7A1	74
Abbildung 31: Einfluss des PPAR α -Agonisten auf die mRNA-Expression von SAA-4	75
Abbildung 32: Basale Level des nukleären Rezeptor FXR (oben) und nach einer 3-stündigen Hungerepisode (unten)	76
Abbildung 33: Behandlung der HepG2 Zellen e7 (SIRT6 +/+) und 1.23 (SIRT6 -/-) mit dem Agonisten für FXR und Immunfluoreszenzfärbung für FXR.....	78
Abbildung 34: Einfluss des FXR-Agonisten auf die mRNA-Expression von SHP	80
Abbildung 35: Einfluss des FXR-Agonisten auf die mRNA-Expression von CYP7A181	

Abbildung 36: Einfluss des FXR-Agonisten auf die mRNA-Expression von SULT2A182

Abbildung 37: Einfluss des FXR-Agonisten auf die mRNA-Expression von UGT2B483

Abbildung 38: Einfluss einer SIRT6-Expression auf das p62-Protein.....84

Abbildung 39: Einfluss einer SIRT6-Expression auf die Autophagieregulation der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR86

Abbildung 40: Modellvorstellung der Funktion von SIRT6 bei der Autophagiekoordination in HepG2-Zellen.....92

Anmerkung:

Für eine bessere Übersicht wurden den Zellklonen in den Abbildungen mit Balkendiagramm Farben nach dem abgebildeten Schema zu geordnet.



Einleitung

Grundlage für die Fragestellung dieser Arbeit bildete die Publikation von Lee et al. 2014 in Nature (1). Unter der Überschrift *Nutrient-sensing nuclear receptor coordinate autophagy* stellten die Forscher ihre Erkenntnisse zusammen. Sie untersuchten die Kernrezeptoren Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor- α (PPAR α) und Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Autophagie.

Autophagie ist ein bedeutsamer Prozess, der innerhalb von Zellen zur Aufrechterhaltung eines gleichbleibenden Energieflusses beiträgt. Durch Autophagie werden beschädigte Zellorganellen abgebaut. Dieses intrazelluläre „Recycling“ versorgt die Zellen mit lebensnotwendigen Bau- und Nährstoffen wie Aminosäuren, Kohlenhydraten und Fetten. Besonders in sehr stoffwechselaktivem Gewebe wie der Leber nimmt die Autophagie eine zentrale Rolle im Metabolismus ein. Herrscht ein Nährstoffmangel in der Zelle, wird die Autophagie heraufreguliert, um das Überleben der Zelle zu sichern. Im gegensätzlichen Fall des Überflusses an Nährstoffen wird sie herabreguliert.

Diese Regulation findet unter anderem über die Kernrezeptoren PPAR α und FXR statt. PPAR α wird von freien Fettsäuren aktiviert. Diese entstehen im Organismus bei Nährstoffmangel im Rahmen der Lipolyse. Durch die Aktivierung von PPAR α werden Glykolyse und Lipogenese herabreguliert und Glukoneogenese sowie Fettsäureoxidation heraufreguliert. Der FXR-Rezeptor dagegen wird von Gallensäuren aus dem entero-hepatischen Kreislauf aktiviert, welche vermehrt nach der Nahrungsaufnahme anfallen. Durch die Aktivierung des FXR-Rezeptors werden Glukoneogenese und Fettsäureoxidation herabreguliert. Eine weitere wichtige Konsequenz ist die direkte Regulation des Schlüsselenzyms der Cholesterinbiosynthese CYP7A1. Es wird durch die Aktivierung des FXR-Rezeptors verringert transkribiert.

In ihren Experimenten untersuchten Lee et al. die Auswirkungen auf die Autophagieregulation in murinen Hepatozyten, die sie durch Hungern, Nahrungszufuhr oder die Aktivität der genannten Rezeptoren, beeinflussten. Diese Untersuchungen wurden durch in vivo-Versuche mit PPAR α und FXR *Knock-out*-Mäusen ergänzt. Die Autoren konnten zeigen, dass Zellen, die im ernährten Zustand die Autophagie herabregulierten, durch pharmakologische Aktivierung des PPAR α -Rezeptors diese wieder heraufregulierten. Diese Fähigkeit geht bei PPAR α *Knock-out*-Mäusen

verloren. Die Induktion der Autophagie durch Hungern wurde ebenfalls teilweise beeinträchtigt.

Ein umgekehrter Effekt zeigte sich beim Gallensäure-Rezeptor. Hierfür wurden Hepatozyten durch Glukosemangel gehungert, was die Autophagie induzierte. Durch pharmakologische Aktivierung des Gallensäurerezeptors konnte diese Induktion unterdrückt werden. Dieser Effekt ging auch bei FXR *Knock-out*-Mäusen verloren. Diese zeigten zusätzlich im gefütterten Zustand einen Teildefekt in der Unterdrückung der Autophagie in der Leber.

Lee et al. zogen aus ihren Erkenntnissen die Schlussfolgerung, dass PPAR α und FXR entgegengesetzte Wirkungen auf die Autophagieregulation haben.

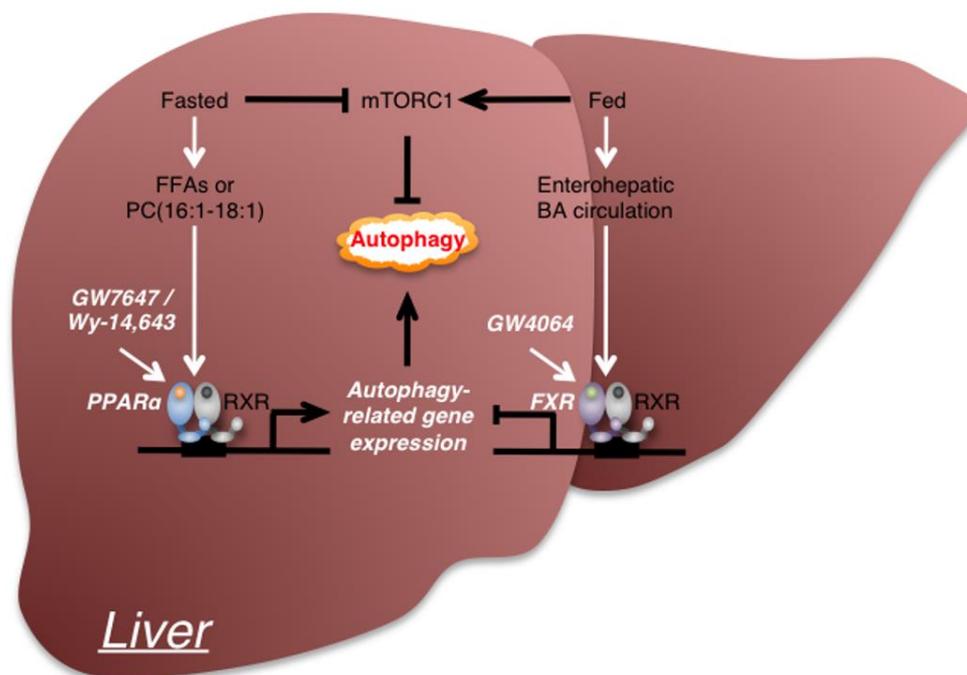


Abbildung 1: Modellvorstellung der transkriptionellen Aktivierung oder Hemmung der nukleären Rezeptoren PPAR α oder FXR zur Autophagiekoordination in der Leber

Die Abbildung zeigt das von Lee et al. vorgeschlagene Modell zur Autophagiekoordination in der Leber durch die transkriptionelle Aktivierung oder Hemmung der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR. In diesem Modell nehmen sie gegensätzliche Wirkungen ein. Eine Aktivierung von PPAR α durch freie Fettsäuren im Hungerzustand oder synthetisch durch GW 7647 bewirkt eine Aktivierung von autophagie-relevanten Genen. FXR hingegen wird durch Gallensäuren nach der Nahrungsaufnahme oder synthetisch durch GW 4064 aktiviert und führt zu einer Hemmung der genannten Gene. PPAR α und FXR konkurrieren um die Bindung an RXR. Quelle der Abbildung (1)

Die Autoren stellten PPAR α und FXR auch als mögliche Ziele für die Autophagiemodulation zu therapeutischen Zwecken in Aussicht, was insbesondere für die Leber als stoffwechselaktives Organ von Bedeutung wäre. Es ist bereits bekannt,

dass eine Störung in der Autophagie im Zusammenhang mit vielen Lebererkrankungen wie Fibrose, HCC, ALD, NAFLD und NASH steht.

SIRT6 ist eine NAD⁺-abhängige Histon-Deacetylase, die vielfältige Wirkungen im Organismus ausübt, wie zum Beispiel die Lebensspanne, die Tumorgenese, aber auch Inflammation und den Glukose-Metabolismus. Basierend auf den Erkenntnissen von Lee et al. wird im Rahmen dieser Arbeit eine Autophagie-modulierende Wirkung von SIRT6 untersucht. Da bereits eine Interaktion von SIRT6 mit PPAR α beschrieben wurde, könnte eine Interaktion von SIRT6 mit den nukleären Rezeptoren für die Autophagieregulation von Bedeutung sein. Diese These wird in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von SIRT6-defizienten Leberzellen und synthetischen Agonisten der Rezeptoren analysiert.

2. Literaturdiskussion

2.1 Autophagie - ein lang bekanntes Konzept

Der Begriff Autophagie stammt aus dem Altgriechischen („autophagos“) und kann mit „Selbstverzehrung“ übersetzt werden. In der Wissenschaft wurde Autophagie nachweislich das erste Mal 1859 erwähnt und war die Bezeichnung für die folgende Vorstellung: Der menschliche Körper besitzt ein Selbsternährungs-System, das bei Nahrungsknappheit in der Lage ist, sich selbst zu verzehren, um das individuelle Überleben zu sichern (2). Der Kern dieser Vorstellung ist, verglichen mit dem heutigen Stand der Wissenschaft, weiterhin gültig und beschreibt in einfachen Worten das Konzept der Autophagie. Es dauerte nach der ersten Verwendung des Begriffes ein Jahrhundert bis de Duve ihn im Zusammenhang mit der Entdeckung des Lysosoms nannte (2). Zu diesem Zeitpunkt war das wissenschaftliche Interesse an Autophagie gering. Für großes Aufsehen sorgte die Entdeckung von fünfzehn Autophagie-Genen in Hefen durch Ohsumi und Tsukada im Jahr 1993 (3). Daraufhin kam es zu einem starken Wissenszuwachs auf dem Forschungsgebiet der Autophagie. Die Entdeckung von Ohsumi wurde 2016 mit dem Nobel-Preis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet (4).

Im heutigen zellbiologischen Verständnis dient Autophagie als Überbegriff für jeden Pfad, der Material aus dem Zytosol zu dem Lysosomen transportiert (5). Diese Pfade werden in drei Kategorien eingeteilt: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie. Die Makroautophagie ist der Hauptpfad, um zytosolische Komponenten zu den Lysosomen zu transportieren und ist, wenn im Folgenden Autophagie steht, gemeint (6).

Die Hauptfunktion der Autophagie ist die Bereitstellung von Nährstoffen für lebende Zellen während eines Nährstoffmangels oder anderer Formen von Stress, wie zum Beispiel der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies. Die Autophagie galt zunächst als unselektiver Prozess, der bei Nährstoffmangel zytoplasmatische Bestandteile zu Baustoffkomponenten wie Aminosäuren zerlegt. Zusätzlich existieren auch selektive Signalwege, die der Zelle den gezielten Abbau von Strukturen durch Bindung an das Adaptorprotein p62 erlauben (2) (4).

Neben der unselektiven und selektiven Autophagie ist weiterhin der Begriff der basalen Autophagie geläufig. Diese Form der Autophagie tritt unter nährstoffreichen

Bedingungen auf. Pro Stunde werden in der Leber durch die basale Autophagie etwa 1 - 1,5% der zellulären Proteine degradiert (5). Bisher ist unklar, inwieweit die basale Autophagie zur Energieproduktion und Synthese von Makromolekülen durch Bereitstellung von Aminosäuren, Glukose und freien Fettsäuren beiträgt. Sie kann aber als intrazelluläre Qualitätskontrolle angesehen werden, die insbesondere für postmitotische Zellen wie Neuronen und Hepatozyten essenziell für die Homöostase ist (5). Für diese beiden Zelltypen gibt es wachsende Evidenz im Zusammenhang mit der Pathophysiologie von Krankheiten, über die der folgende Abschnitt einen Überblick gibt.

2.2 Autophagie und Erkrankungen

Autophagie spielt in äußerst stoffwechselintensiven Organen wie dem Gehirn und der Leber eine wichtige Rolle. Sie fungiert als intrazelluläre Qualitätskontrolle, die fehlerhafte oder beschädigte Organellen und Zellbestandteile erkennt und dem Recycling zuführt. Dies ist ein wichtiger Beitrag zur Homöostase der Zelle. Eine Fehlfunktion in der Autophagie ist daher als pathophysiologischer Ansatzpunkt für Erkrankungen von hoher Relevanz.

Die Inaktivierung der selektiven Autophagie führt in kurzer Zeit zum Anstieg von oxidativem Stress und der Akkumulation von p62 positiven Aggregaten. Diese zellbiologischen Erscheinungen sind mit bekannten Lebererkrankungen wie chronischer Virushepatitis, alkoholischer Steatohepatitis, der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) und dem HCC verbunden (6). Die p62 positiven Aggregate sind ein Hauptbestandteil von Mallory-Denk-Körpern. Diese sind ein histologisches Korrelat bei alkoholtoxischer Hepatitis und Steatohepatitis (6). In Experimenten an Mäusen konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Aktivierung von Autophagie die Steatose der Leber abmildern kann (7) und zu einem Abbau von Mallory-Denk-Körpern führt (8).

Bei chronischem Alkoholmissbrauch konnte ebenfalls ein Zusammenhang mit Autophagie hergestellt werden. Der Langzeitkonsum von Alkohol erhöht den pH-Wert in Lysosomen. Dies hat eine Änderung der Enzymfunktion zur Folge, welche zu einem gestörten autophagischen Fluss führt (9) (10).

Bei viralen Erkrankungen der Leber gibt es ebenfalls Hinweise auf eine Interaktion mit Autophagie. Es konnte bei viraler Hepatitis eine erhöhte Menge an p62 festgestellt

werden. Bei chronischer HBV- oder HCV-Infektion konnte in der Zellkultur und in Experimenten mit Mäusen gezeigt werden, dass Autophagie von Viren für die Replikation genutzt wird (6). Bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion wurde eine sechsfach erhöhte Menge an autophagischen Vakuolen im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt (11). Ein weiterer Zusammenhang zwischen gestörter Autophagie und Lebererkrankung besteht bei der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD). Die Lipophagie, ein Begriff für den Abbau von Lipidtropfen durch Autophagie, spielt vor allem für die Energieproduktion in der Leber eine wichtige Rolle (12). Weiterhin kann die Autophagie als körpereigener Schutzmechanismus gegen die Entstehung von NAFLD dienen. Doch scheinen die Einflüsse des metabolischen Syndroms die selektive Autophagie zu unterdrücken und so die Akkumulation von Lipidtropfen zu ermöglichen (6).

Betrachtet man die Rolle der Autophagie in der Tumorentstehung, ist es stark kontextabhängig, ob sie als pro- oder antitumoröser Prozess angesehen werden kann. Vor der Tumorgenese scheint der Autophagie eine zytoprotektive Rolle zuzukommen, die tumorsuppressives Potential hat. Jedoch können auch prä maligne Zellen von der Autophagie profitieren, indem sie sich unter suboptimalen Bedingungen entwickeln und besser mit therapieinduziertem Stress umgehen können (4). Beim hepatozellulären Karzinom konnte gezeigt werden, dass die Autophagie durch Beseitigung dysfunktionaler Mitochondrien die Transformation zu malignen Zellen verhindern kann. Ist es hingegen bereits zur Entwicklung eines HCC gekommen, kann die Autophagie das Überleben der Tumorzellen verbessern, die Metastasierung ermöglichen und die Therapieresistenz verstärken (13).

2.3 Der biologische Ablauf der Autophagie

Der allgemeine Ablauf der Autophagie wird in folgende Abschnitte eingeteilt: Induktion, Bildung, Elongation, Reifung bzw. Schließung des Autophagosom und Fusion (14). Der schnelle Wissenszuwachs auf dem Gebiet der Autophagie führt stetig zur Entdeckung weiterer regulatorischer Proteine und Signale für die Teilschritte. An dieser Stelle wird daher auf eine detaillierte Ausführung verzichtet. Eine genauere Ausführung findet sich in den Kapiteln für p62 und LC3.

Als stärkster Induktor für die Autophagie gilt ein Aminosäurenmangel in der Zelle (5).

Dadurch dissoziiert mTORC1 vom Induktionskomplex und die resultierende Dephosphorylierung von Kinasen wie ULK1/2 führt über weitere Signalwege zur Bildung des Phagophors (auch Isolationsmembran genannt). Das Phagophor ist als Vorläufer des Autophagosoms zu sehen. Die Elongation bezeichnet dabei die Phase des Wachstums der Phagophorenmembran. Auf der Membran sitzen dabei verschiedene Proteinkomplexe, die diesen Prozess unterstützen. Die wachsende Membran umfließt einen Bereich des Zytoplasmas, der gelöstes Material und Zellorganellen enthalten kann. Diese so genannte Reifung der Membran endet mit dem Membranschluss. Die so gebildete Struktur wird Autophagosom genannt. Das Autophagosom ist ein transientes, doppel-membraniges Organell, das den Abbau und den Transport zum Lysosom vermittelt (15). Im letzten Schritt, der Fusion, verschmelzen die äußere Membran des Autophagosoms mit einem Lysosom zum Autolysosom. Das Autolysosom ist ein Organell mit einfacher Membran. Es enthält unter anderem lysosomale Enzyme, die den eingeschlossenen Inhalt abbauen (5). Die Membran des sich bildenden Phagophors trägt unter anderem sogenannte Autophagie-Rezeptoren, die eine Rolle bei der Selektivität der Autophagie spielen. Für den Vorgang selbst, aber auch für die Quantifizierung der Autophagie sind die Proteine LC-3 und p62 von großer Bedeutung, die im Folgenden näher betrachtet werden.

2.4 Das Autophagieprotein p62 (SQSTM1)

Sequestosom 1 (auch bekannt als p62; SQSTM1) ist ein multifunktionales Protein, das in verschiedenen zellulären Prozessen involviert ist. Beim Menschen ist das Gen für p62 auf dem Chromosom 5 lokalisiert und das Protein ist in allen Geweben exprimiert (16). Innerhalb der Zelle findet sich p62 im Zytoplasma, im Zellkern, den Mitochondrien, den Autophagosomen und Lysosomen. Dort fungiert es als Knotenpunkt verschiedener Signalwege und als selektiver Autophagie-Adaptor. Das Protein p62 ist an der Aktivierung von mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) während der Nahrungswahrnehmung beteiligt, sowie der NF- κ B-Aktivierung bei Entzündung und Apoptose und der Aktivierung des Keap1-Nrf2 Signalweges als Antwort auf oxidativen Stress (17).

Während der Autophagie dient p62 als Rezeptorprotein. Die zum Abbau durch Autophagie bestimmten Substrate sind mit Ubiquitin markiert. Durch die Interaktion von p62 und Ubiquitin formieren sich Aggregate, die vom Phagophor umflossen

werden. Durch eine direkte Interaktion von p62 und LC-3, welches auf der Membran sitzt, werden die Aggregate an diese gebunden. Im weiteren Verlauf wird p62 im Autolysosom abgebaut (18). Die Expression von p62 wird als Antwort auf metabolischen Stress, oxidativen Stress und Entzündung durch Genregulatoren wie Nrf2, NF- κ B und Transkriptionsfaktoren der MiT/TFe Familie heraufreguliert (17). Das gebildete Protein besitzt verschiedene funktionelle Domänen (Abb. 2).

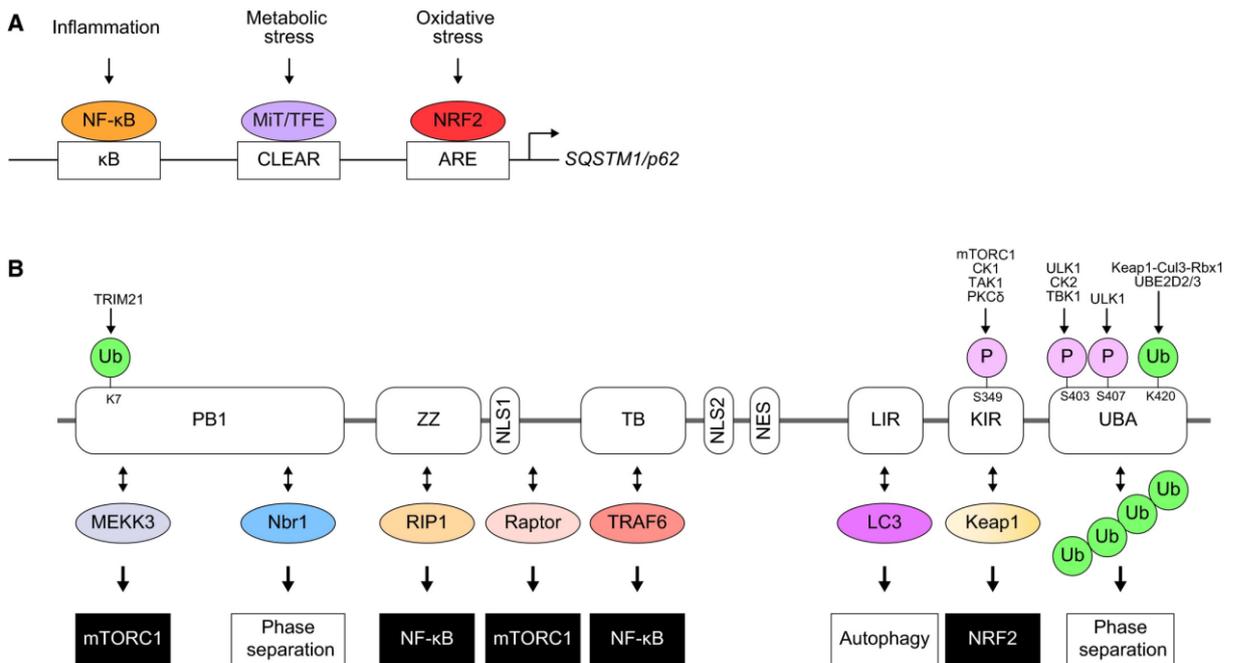


Abbildung 2: Funktionelle Domänen p62

A: Die Genexpression von p62 wird durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, MiT/TFE und NRF2 als Reaktion auf Entzündung, metabolischen oder oxidativen Stress heraufreguliert.

B: Gezeigt sind die verschiedenen funktionellen Domänen von p62 mit ihren Interaktionspartnern und assoziierten Prozessen. Quelle der Abbildung (19)

Dazu zählen unter anderem Phox1 und Bem1p (PB1), Zinkfinger, ein Tumornekrosefaktor Rezeptor-assoziiertes Faktor 6 (TRAF6) bindendes Motiv, eine LC-3-Interaktionsregion (LIR), eine Keap1 Interaktionsregion (KIR) und eine Ubiquitin-assoziierte (UBA) Domäne. Durch eine Homodimerisierung der UBA-Domäne wird p62 inaktiv gehalten und eine Interaktion mit Ubiquitin verhindert.

Um seine diversen Funktionen zu erfüllen, unterliegt p62 zahlreichen post-translationalen Modifikationen (16). Eine Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen wie zum Beispiel ULK1 erhöht die Bindungsaffinität von p62 zu den Ubiquitin-Ketten. Eine weitere Phosphorylierung durch mTORC1 führt zu einer höheren Bindungsaffinität von p62 gegenüber Keap1. Daraufhin dissoziiert Nrf2 von Keap1,

und an dieser Stelle bindet p62. Nrf2 transloziert in den Nukleus und induziert die Transkription von Genen, die der Zelle helfen, sich vor oxidativem und metabolischem Stress zu schützen (18). Dies ist die Verbindung von p62 zur sogenannten Keap1-Nrf2-Achse. Diese Achse wurde im Zusammenhang mit der Krebsentwicklung und der metabolischen Umprogrammierung der Zellen u.a. beim HCC beschrieben (18). Die Keap1-Nrf2-Achse ist wie oben dargestellt eine zytoprotektive Reaktion auf oxidativen Stress (18). Bei Untersuchungen in autophagie-gestörten Modellen in Mäusen oder Hepatitis-C-positiven humanen HCC-Zellen wurde eine dauerhafte Phosphorylierung von p62 entdeckt (20). Dadurch ist auch Nrf2 dauerhaft aktiviert, und die assoziierten Gene werden vermehrt transkribiert. Dies führt in der Zelle zu metabolischen Veränderungen. Die Glutathion-Synthese, der Glukose- und Aminosäure-Stoffwechsel, wird heraufreguliert und somit das Wachstum von Tumorzellen begünstigt. Des Weiteren wird der Glucuronat-Stoffwechsel erhöht, was die Konjugation mit Glucuronsäure anti-tumoröser Medikamente fördert und somit zu einer Therapieresistenz führen kann.

Die Toleranz von HCC-Zellen gegenüber Sorafenib oder Cisplatin konnte mit der Behandlung von K67 reduziert werden. Dies wird darauf zurückgeführt, dass K67 an eine Tasche von Keap1 bindet, welche die Bindungsstelle von phosphoryliertem p62 und Nrf2 ist (18). Da Nrf2 die p62-Expression induzieren kann, besteht ein positiver Feedback-Mechanismus, der durch die permanente Aktivierung von Nrf2 verstärkt wird. Dieser Zusammenhang ist im HCC untersucht, aber auch in weiteren malignen Entitäten wurde die Assoziation zwischen abnormaler p62-Expression und Krebsentstehung (wie zum Beispiel in Nieren, Lunge, Brust und Pankreas) beobachtet (18).

Je nach vorherrschenden Bedingungen ist die Zelle auf eine feinabgestimmte Balance zwischen katabolen und anabolen Stoffwechselwegen angewiesen (17). Der mTORC1-Signalweg nimmt dabei eine wichtige regulierende Rolle ein. Er kontrolliert das Zellwachstum, die Proteinsynthese und auch die Autophagie. Der Zusammenhang zwischen p62 und dem mTORC1-Signalweg beruht auf der Interaktion der Untereinheit Raptor des mTORC1-Komplexes mit einer Domäne von p62 in Abhängigkeit vom Aminosäure-Level der Zelle.

Bei hohem Aminosäure-Level in der Zelle ist der mTORC1-Komplex aktiv. Er fördert das Zellwachstum, während die Autophagie herabreguliert ist. Diese Herabregulation wird zum Beispiel durch die Phosphorylierung von ULK1, einer autophagie-

initiierenden Kinase, bewirkt. Im Zustand des Aminosäure-Mangels in der Zelle ist der Komplex inaktiv, das Zellwachstum wird begrenzt und die Autophagie aktiviert (18). Liegt p62 in der phosphorylierten Form vor, kommt es zur Interaktion mit der Untereinheit Raptor des mTORC1-Komplexes an der Lysosomenmembran. Dies rekrutiert die Ubiquitin-Ligase TRAF6 und mTORC1 zu dieser Membran. Die Ubiquitinierung durch p62-TRAF6 führt schließlich zur Aktivierung von mTORC1 (17). Eine Fehlfunktion in diesem Signalweg trägt ebenfalls zur verbesserten Proliferationsrate von Krebszellen bei. Durch den oben beschriebenen Signalweg ist das dauerhaft aktivierte p62 in der Lage, auch eine anhaltende Aktivierung von mTORC1 zu bewirken. Die Krebszellen profitieren dabei von den Signalwegen, die durch mTORC1 aktiviert werden (17).

p62 ist nicht nur aufgrund seiner oben beschriebenen Funktionen innerhalb verschiedener Signalwege interessant. p62 ist darüber hinaus ein gut etablierter Marker in der Autophagie-Forschung (21). Da p62 während der Autophagie abgebaut wird, dient es als Index für die autophagische Degradation. Im Allgemeinen bedeutet dies, dass eine Hemmung der Autophagie zu einer Akkumulation von p62 führt und eine Aktivierung zu einer verminderten Proteinmenge. Dies ist sowohl im Western-Blot als auch in immunhistochemischen Methoden nachweisbar.

Wie in 2.2 bereits ausgeführt, ist die Beteiligung von p62 an der Entstehung von Erkrankungen vor allem der Leber sowie bei Krebs gut bekannt. Darüber hinaus besteht auch Wissen in der Entwicklung neurodegenerativer und skelettaler Erkrankungen, wobei die Rolle von p62 dort offensichtlicher ist als im Vergleich zu Krebs (4).

Bei Morbus Paget, einer Erkrankung mit Störung im Knochenumbau, wurde eine starke Assoziation mit Mutationen im p62-Gen gefunden (16). Ähnliche Mutationen sind auch bei der amyotrophen Lateralsklerose entdeckt worden (16). In Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen nehmen die Autophagie bzw. p62 eine zentrale Rolle ein, da sie zwei Hauptmerkmale der Neurodegeneration abbauen: defekte Mitochondrien und falsch gefaltete Proteinaggregate. p62 hat hierbei eine Schlüsselrolle inne, da es zum physiologischen Abbau dieser Proteine und Organellen beiträgt, gleichzeitig aber auch bei einer Störung der Autophagie als diagnostischer Marker in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen fungieren kann (4).

2.5 Der Autophagie-Marker MAP1LC3B (Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta)

In Hefen ist die Initiierung von Autophagie, die Erkennung und Bindung von Zielstrukturen sowie die Vesikelbildung von Atg8 abhängig. In Eukaryonten existieren aktuell sieben Atg8-orthologe Proteine. Zu diesen zählen: Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha (MAP1LC3A, auch LC3A abgekürzt, mit zwei Splice-Varianten MAP1LC3B (abgekürzt: LC3B) und MAP1LC3C, GABA type A receptor-associated protein (GABARAP), GABARAP-like 1 und GABARAP-like 2. Von diesen Proteinen ist LC3B das am meisten studierte Protein. Für die anderen Proteine dieser Familie wurde eine ähnliche Funktion angenommen. Jedoch weisen neue Erkenntnisse daraufhin, dass die LC3/GABARAP-Proteine eigenständige Funktionen besitzen, die in autophagie-unabhängigen Mechanismen eine Rolle spielen (22). Auf diese wird im Folgenden nicht eingegangen, sondern nur die Funktion von LC3B (zur Vereinfachung LC-3 genannt) während der Autophagie betrachtet.

Im Ablauf der Autophagie taucht LC-3 erst bei der Elongation der Phagophorenmembran auf. Bei der Elongation sind zwei Konjugationssysteme involviert: Atg12-Atg5-Atg16L1 und Atg8/LC-3 (Abb. 3) (14).

Die Vorläuferform von LC-3 wird durch das Abtrennen des C-terminalen Glycins durch die Cystein-Protease Atg4 zu LC-3 I prozessiert. Der Komplex aus Atg12-Atg5-Atg16L1 konjugiert an diesen Rest Phosphatidylethanolamin (PE). Diese lipidierte Form von LC-3 wird LC-3 II genannt. Die Lipidierung von LC-3 wird bei Nahrungsmangel oder Stress der Zelle forciert. Die LC-3 II-Form ist membrangebunden und kann durch Atg4 wieder zu LC-3 dekonjugiert werden. Das bedeutet, dass LC-3 im Gegensatz zu p62 während der Autophagie nicht abgebaut, sondern in seine unkonjugierte Form zurückgeführt wird.

Die meisten Rezeptoren für Autophagie besitzen eine LC3-Interaktions-Region (LIR). Diese erlaubt es den Rezeptoren, ihre Substrate, die LC3 tragen, zur Phagophorenmembran zu bewegen. Zu diesen Rezeptoren zählt unter anderem auch p62 (15).

Nur die lipidierte, membrangebundene Form LC-3 II kann p62 an das Autophagosom heranziehen. Aufgrund dieses Wissens hat sich LC-3 mit seinen beiden Varianten LC-3 I und LC-3 II als Marker für Autophagie etabliert.

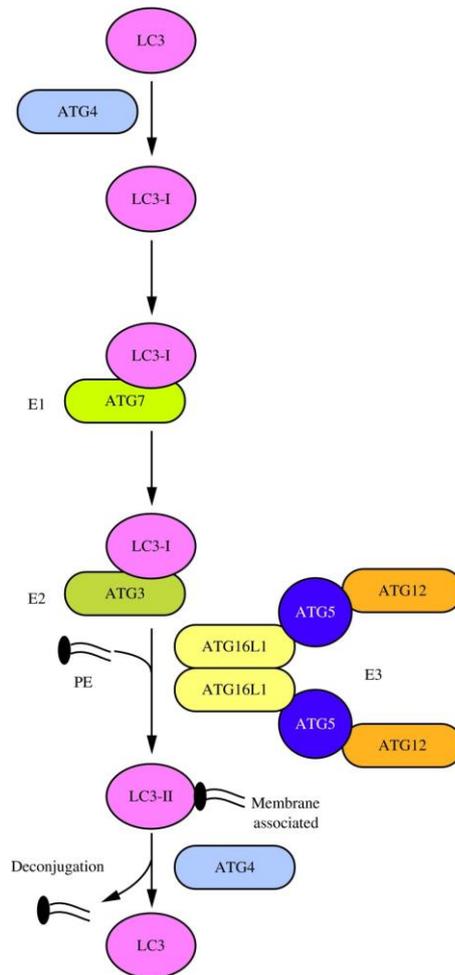


Abbildung 3: Das Konjugationssystem von LC-3

LC-3 wird durch die Cystein-Protease Atg4 zu LC-3 I prozessiert. Die Konjugation von LC-3 I mit Phosphatidylethanolamin (PE) erfolgt durch einen Komplex aus Atg12-Atg5-Atg16L1 zur membrangebundenen Form LC-3 II. Diese kann durch Atg4 wieder zu LC-3 dekonjugiert werden. Quelle der Abbildung (14)

2.6 Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor α (PPAR α)

Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) sind intrazelluläre Rezeptoren, die durch Liganden aktiviert werden und als Transkriptionsfaktoren die Genexpression von Genen regulieren. Sie gehören zu den nukleären Rezeptoren und besitzen drei Subtypen: PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ . Als erster Subtyp wurde PPAR α 1990 identifiziert. Die Namensgebung erfolgte aufgrund der Eigenschaft, von Chemikalien aktiviert zu werden, die bekannt dafür waren, die Peroxisomen-Proliferation in Nagetieren zu induzieren. Im Gegensatz dazu aktivieren die anderen Subtypen nicht die Peroxisomen-Proliferation. Obgleich sich die Subtypen in Struktur

und Sequenz sehr ähnlich sind, weisen sie eine unterschiedliche Gewebeexpression und Ligandenspezifität auf. Im Folgenden wird nur der Subtyp PPAR α behandelt (23). PPAR α besteht aus vier funktionellen Domänen, und deren Aktivität wird durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Ubiquitinierung bestimmt. Wird PPAR α durch einen Liganden aktiviert, bildet er ein Heterodimer mit RXR (Retinoid-X-Rezeptor). Der Komplex aus PPAR α -RXR erkennt und bindet an sogenannte PPAR-response elements (PPREs), welche direkt in der Genregulations-Region liegen. PPAR α kann nach DNA-Bindung eine Vielzahl von Genen kontrollieren, die zu einem großen Teil am Lipid-Stoffwechsel beteiligt sind. Eine Beteiligung an der mitochondrialen und peroxisomalen Fettsäureoxidation, an Synthese und Abbau von Triglyceriden, dem Lipoprotein-Metabolismus, der Glukoneogenese und zahlreichen weiteren Stoffwechselwegen konnte bisher nachgewiesen werden. Daher ist PPAR α vor allem in Gewebe exprimiert, das auf eine hohe Rate an Fettsäureoxidation angewiesen ist, wie zum Beispiel im Herz, in der Leber und der Skelettmuskulatur. Hier fungiert PPAR α als Hauptregulator der Fettsäure-Homöostase (23). Im Folgenden wird daher genauer auf die Funktion von PPAR α innerhalb der Leber als zentrales Organ des Energiemetabolismus eingegangen.

Dabei lässt sich die Funktion zunächst auf ein allgemeines Prinzip reduzieren: PPAR α kann als äußerst sensibler intrazellulärer Lipid-Sensor angesehen werden, der den Gehalt an Intermediaten des Fettsäurestoffwechsels sehr genau wahrnehmen und darauf reagieren kann. Während Nahrungsknappheit oder Fasten wird die Fettsäureoxidation forciert, um dadurch Substrate für andere Gewebe zur Energiegewinnung zu generieren. Im umgekehrten Fall von Nahrungsüberfluss kann auch die Speicherung über die Lipogenese gesteuert werden (23). Dieser Aufgabe liegen die zahlreichen Zielgene zugrunde, die PPAR α als Transkriptionsfaktor reguliert. Durch seine Schlüsselrolle als Regulator im Fettstoffwechsel ist PPAR α auch in der Erforschung von Krankheiten und möglicher Therapien interessant. So konnte nachgewiesen werden, dass in der Leber von Patienten mit NAFLD oder HCV-Infektion eine reduzierte Expression von PPAR α vorliegt (24).

PPAR α ist als therapeutische Zielstruktur bei Fettsäurestoffwechselstörungen von Interesse. Eine seit vielen Jahren bekannte Wirkstoffgruppe, die Fibrate, wird bereits zur Therapie bei Dyslipidämien eingesetzt. Die Fibrate wirken dabei über eine unselektive Aktivierung der PPARs. Die einzelnen Wirkstoffe dieser Gruppe unterscheiden sich in ihrer Selektivität zu den Subtypen. So hat zum Beispiel Fenofibrat eine zehnfach höhere Selektivität zu PPAR α gegenüber PPAR γ (25). In der

Anwendung reduzieren Fibrate die Serum-Triglyceridspiegel um bis zu 50%, den LDL-Spiegel um bis zu 20%, und führen zu einer moderaten Erhöhung des HDLs.

In der europäischen Leitlinie für das Management der Dyslipidämien werden Fenofibrat und Bezafibrat als Behandlungsoption für Patienten mit Hypertriglyceridämie erwähnt. Die Gruppe der Statine ist hier als Erstlinientherapie genannt, Fenofibrat oder Bezafibrat können aber in der Primärprävention und bei Hochrisiko-Patienten als Kombinationstherapie mit Statinen (Empfehlungsgrad IIb) erwogen werden (26). Die nächste Generation an Wirkstoffen mit Einfluss auf PPAR α befinden sich bereits in präklinischen und klinischen Studien. Von den sogenannten selektiven PPAR α -Modulatoren (SPPAR α) erhofft man sich eine stärkere Wirksamkeit und reduzierte Nebenwirkungen (23). Im März 2018 wurde eine Phase-3-Studie von Pemafibrat (SPPAR α) in der Behandlung von Typ-2-Diabetes-Patienten mit Hypertriglyceridämie veröffentlicht. Dabei konnte eine Reduktion der Triglycerid-Menge um bis zu 45% im Vergleich zur Placebo-Gruppe nachgewiesen werden (27). Eine Untersuchung für die Senkung des kardiovaskulären Risikos steht noch aus.

2.7 Der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR)

Der Farnesoid-X-Rezeptor gehört, wie auch die PPAR, zur Untergruppe der metabolischen, nukleären Rezeptoren. Namensgebend war bei seiner Entdeckung die Aktivierung durch Farnesol, er wird aber auch durch körpereigene Gallensäuren aktiviert. FXR nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Energie-Homöostase ein, da er als Regulator an Stoffwechselwegen der drei Hauptnährstoffklassen Fette, Kohlenhydrate und Proteine beteiligt ist (28).

FXR bindet an die DNA, an sogenannte FXR-response elements, entweder als Monomer oder, in Analogie zu PPAR α , als Heterodimer mit RXR. Darüber reguliert er eine Vielzahl von Genen, die an der Gallensäure-Synthese, an Sekretion und Transport, sowie am Fett- und Glukose-Metabolismus sowie der Verstoffwechslung von Proteinen beteiligt sind. Dadurch trägt er auch zur Inter-Organ-Kommunikation über den enterohepatischen Kreislauf bei (29). Die Gewebsexpression von FXR findet vorwiegend in der Leber, dem Intestinaltrakt und der Niere statt, weniger in Fettgewebe und Herz. Da die Expression vor allem in der Leber sehr hoch ist, wird ihr eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Leber-Pathologien zugesprochen. Bei Patienten mit

NAFLD konnte bisher eine geringere FXR-Expression festgestellt werden (29). Eine Aktivierung von FXR durch eine Obeticholsäure-Behandlung von Patienten mit NASH verbesserte diese (28).

Die Verbindung zwischen dem metabolischen System und Inflammation wird auch als Metaflammation bezeichnet. Das Konzept der Metaflammation stellt eine Beziehung zwischen einer Form der Entzündung, getriggert durch ein Überangebot an Nährstoffen, her (30). FXR wird in diesem Zusammenhang auch als Regulator der Metaflammation genannt (28). Die Rolle von FXR im Zusammenhang mit der Tumorgenese ist gewebeabhängig. Es liegen Erkenntnisse vor, dass FXR im Intestinaltrakt als Tumorsuppressor fungiert, in der Lunge und der Brust hingegen als Protoonkogen (29).

FXR ist ähnlich wie auch PPAR α interessant als pharmakologischer Angriffsort für verschiedene metabolische Erkrankungen wie Steatosis hepatis, Diabetes und Dyslipidämie. Es wird sowohl an synthetischen als auch natürlich vorkommenden Substanzen, die als geeignete Wirkstoffe in Betracht kommen, geforscht. Von den Wirkstoffen ist Obeticholsäure (OCA) bereits von der amerikanischen Zulassungsbehörde für die Behandlung von primär biliärer Cholangitis zugelassen und wird in klinischen Studien für Patienten mit NASH weiter untersucht. Die Untersuchung geeigneter Wirkstoffe brachte weitere Erkenntnisse zur Aktivierung von FXR. Sie begünstigt die Leberregeneration, hat positive Effekte auf die Hepatokarzinogenese und protektive Eigenschaften bei Atherosklerose und Nierenerkrankungen (29).

2.8 Sirtuin 6

SIRT6 ist eine NAD⁺-abhängige Histon-Deacetylase die zur Familie der Sirtuine gehört. In Säugetieren bestehen diese aus sieben verschiedenen Subtypen (31). SIRT6 ist dabei vornehmlich im Nukleus und Nukleolus lokalisiert (32). SIRT6 kontrolliert eine Vielzahl an zellulären Strukturen und Signalwegen. Diese können mit den Oberbegriffen Lebensdauer, Entzündung, Metabolismus und Karzinogenese zusammengefasst werden. An SIRT6-defizienten Mäusen zeigen sich diese Aufgaben im Phänotyp deutlich: verkürzte Lebensdauer, Entwicklung von Tumoren und metabolische Störungen wie Hypoglykämien (32).

SIRT6 hat einen positiven Einfluss auf Genom-Stabilität, DNA-Reparatur und den Telomer-Metabolismus (31). Eine SIRT6-Defizienz führt demnach über einen Verlust

von Telomersequenzen und Akkumulation von DNA-Schäden zu einem vorzeitigen Zelltod. Hingegen kann eine Überexpression von SIRT6 die Lebenserwartung von Mäusen erhöhen (32). Im Rahmen von Entzündungsreaktionen kann SIRT6 sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen haben. In Pankreas-Krebszellen konnte nachgewiesen werden, dass SIRT6 die Expression von IL-8 und TNF- α induziert (31).

In metabolische Stoffwechselprozesse ist SIRT6 auf vielfältige Weise involviert, vor allem aber im Glukose- und Fettstoffwechsel. Im Fettstoffwechsel von Mäusen führt die Abwesenheit von SIRT6 zu einer Akkumulation von Triglyzeriden - ein Zustand, der mit der Steatohepatitis und der Fettleber in Verbindung gebracht werden kann. Eine Defizienz von SIRT6 führt auf Genebene zu einer reduzierten Expression von Genen für die β -Oxidation und einer erhöhten Expression von Genen für die Triglyzerid-Synthese (33).

Im Glukosestoffwechsel ist SIRT6 an der Regulation der Glykolyse und der Glukoneogenese beteiligt (33). In Mäusen mit einer Defizienz für SIRT6 wurden starke Hypoglykämien festgestellt. Dies wurde auf eine erhöhte Glukoseaufnahme in den Muskel und das Fettgewebe zurückgeführt, da die Abwesenheit von SIRT6 mit einer erhöhten Expression des membrangebundenen Glukose-Transporter-1 (GLUT1) vergesellschaftet ist (33). Gleichzeitig wurde in der Leber dieser Maus-Modelle eine höhere Expression von Genen für die Glukoneogenese festgestellt. Dies kann als Gegenregulation der Leber aufgrund der Hypoglykämien interpretiert werden.

Die geschilderte Rolle im Glukosemetabolismus stellt eine interessante Verbindung zur Karzinogenese her. SIRT6 unterdrückt normalerweise die Glykolyse durch die Interaktion mit HIF1 α . Hier fungiert SIRT6 als Repressor von HIF1 α mit der Folge, dass wichtige Gene für die Glykolyse wie GLUT-1, LDH und Phosphofruktokinase-1 und Pyruvatehydrogenasekinase-1 verringert exprimiert werden (33). In einigen Krebszellen ist SIRT6 jedoch herabreguliert, was eine erhöhte Glukoseaufnahme und vermehrte Glykolyse zur Folge hat. Dies kann verglichen werden mit der erhöhten Aufnahme von Glukose und Verstoffwechslung in der aeroben Glykolyse von Tumorzellen (Warburg-Effekt) (31).

Es wird vermutet, dass SIRT6 neben seiner Wirkung als Tumorsuppressor, in anderen Zellarten auch als Tumoraktivator wirken könnte (31).

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer
Aktin (I-19)-HRP	Santa Cruz	Sc-1616
FXR	Perseus Proteomics	PP-A9033A-00
LC-3B	Novus	NB100-2220
LC-3B (2G6)	nanotools	0260-100
p62(SQSTM1) (D-3)	Santa Cruz	Sc-28359
PPAR α	Abcam	ab97609
PPAR α	LS-Bio	LS-C344153
SIRT6	Cell Signaling	2590S
SIRT6 (D8D12)	Cell Signaling	12486

Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer
Alexa Fluor 555 goat anti-mouse	Invitrogen	A21424
Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit	Life technologies	A21428
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse	Life technologies	A11029
Anti-mouse	Sigma	A2179
Anti-rabbit	Sigma	A3937

3.1.2 Primer

Name	Ausrichtung	Sequenz (5'->3')	Annealing Temperatur
SIRT6 (EX-8)	Forward	GAT CAA CGG CTC TAT CCC CG	61,4° C
	Reverse	GCC TTG GCC TTC ACC CTT T	58,8° C
p62	Forward	CCC ACA GGG CTG AAG GAA	58,2° C
	Reverse	CAT CTG GGA GAG GGA CTC AAT C	62,1° C
CYP7A1	Forward	AAT TCC ATA CCT GGG CTG TG	57,3° C
	Reverse	GTG GTA TTT CCA TCC ATC GG	57,3° C
SAA-4	Forward	CTT GCC ACC GTC ATT GTC CT	59,4° C
	Reverse	AGT CCC AAG TCC CTT GTA CG	59,4° C
SHP	Forward	AGG CCT CCA AGC CGC CTC CCA CAT TGG GC	>75° C
	Reverse	GCA GGC TGG TCG GAA ACT TGA GGG T	67,9° C
SULT2A1	Forward	TGG ATG CCC ATG AGA GAG GAG	61,8° C
	Reverse	ATG CTC TGA AAG GAG CTG TTC TTG A	61,3° C
UGT2B4	Forward	GGA GCA GCT GTT AGT TTG GAC TTC	62,7° C
	Reverse	CGC ATG ACA AAT TCA ATC CAG A	56,5° C

3.1.3 Chemikalien

Chemikalie

Albumin (Bovine, Fraktion V)

Hersteller

Serva Electrophoresis GmbH,

Heidelberg, Deutschland

Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aqua	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Aqua-Polymount	Polysciences, Inc., Warrington, USA
beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Bis-Acrylamid, Fertiglösung 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CDP-Star (Tropix)	Applied Biosystems Group, Foster City, USA
CellTiter-Glo 2.0 Assay	Promega, Fitchburg, USA
Diethanolamin	Applied Biosystems Group, Foster City, USA
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Apotheke Universitätsmedizin Mainz, Deutschland
Fetales Kälber Serum (gibco)	life technologies, Carlsbad, USA
HBSS (gibco)	life technologies, Carlsbad, USA
Hoechst 33342	invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham ,USA
I-Block	Applied Biosystems Group, Foster City, USA
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Carl-Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid, 0,9% Lösung	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Nitro-Block II (tropix)	Applied Biosystems Group, Foster City, USA

PageRuler Prestained Protein	
Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd	Polysciences, Inc., Warrington, USA
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
SuperSignal West Pico	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tetramethylethyldiamin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
TRIS	Carl-Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasser (nuklease-frei)	Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.4 Zellkulturmedien und Puffer

Zellkulturmedien

DMEM mit Zusatz von:

- 10% fetales Kälberserum
- 1% Penicillin-Streptomycin
- 1% HEPES
- 1% L-Glutamin

Hunger-Medium:

- HBSS

Puffer	Komponenten
10x Laemmli-Puffer	- Tris: 30,25g - Glycin: 144g

	<ul style="list-style-type: none"> - destilliertes Wasser: 850ml - 10% SDS: 100ml <p>Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen, kein pH einstellen</p>
10x PBS	<ul style="list-style-type: none"> - NaCl: 80g - KCl: 2g - Na₂HPO₄: 14,4g - KH₂PO₄: 2,4g <p>Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen</p>
10x Western-Blot Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - Tris: 30,25g - Glycin: 144g <p>Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen</p>
1x Western-Blot Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - 10x Western-Blot Puffer: 100ml - Methanol: 200ml <p>Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen</p>
2x Ladepuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 10% SDS: 40ml - 1 M Tris/HCl pH 6,8: 10ml - Mercaptoethanol: 10ml - Glycerol: 20ml - Bromphenolblau: 0,2 mg <p>Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen</p>
Assay-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - Diethanolamin: 10,6g - destilliertes Wasser: 900ml <p>Mit HCl pH auf 9,5 einstellen, anschließend mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2 M MgCl₂: 500 µl
I-Block-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> - I-Block: 2g (in 500ml 1xPBS bei 65° C lösen)

	<ul style="list-style-type: none"> - Abkühlen lassen - Mit 1xPBS auf 1 Liter auffüllen - Tween 20: 1ml
Wasch-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - 10x PBS: 100ml - Tween 20: 1ml <p>Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen</p>

3.1.5 Kits

Transfektions-Kit für Reporter-gen-Assay:

K2 Transfection System (Biontexas Laboratories GmbH, München)

RNA-Isolation:

Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent Technologies, Texas)

cDNA:

iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien)

3.1.6 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Abzug	2-453-DAND	Küttermann Systemlabor, Uelze, Deutschland
Blot-Kammer	Mini Trans-Blot Cell	Bio Rad, CA, USA
Chemilumineszenz- und Durchlichtdetektor	ChemiDoc MP	Bio Rad, CA, USA
Elektrophorese	EPS 601	Amersham pharmacia biotech, Schweden
Gefrierfach	1.economic, computer control 2.Premium NoFrost	1.Bosch, Stuttgart, Deutschland 2.Liebherr, Biberach, Deutschland

Gel-Gießkammer	Mighty Small, SE 200 Series	Hoefer, Inc., Richmond, CA, USA
Inkubatoren	1.WTB binder 2.MCO-18 AIC (UV)	1. Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland 2.SANYO Electric Co.,Ltd., Japan
Kühlschrank	1.Comfort NoFrost 2.Premium 3946-25 3.Sikafrost Comfort 4.Kirsch	1.+2. Liebherr, Biberach, Deutschland 3. Siemens, München, Deutschland 4.Bosch, Stuttgart, Deutschland
Laufkammer für SDS-Page	SE250	Hoefer, Inc., Richmond, CA, USA
Lichtmikroskope	1.DMIL 2.Wilovert 30	1.Leica, Wetzlar, Deutschland 2.Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer	MR 30001	Heidolph, Schwabach, Deutschland
ph-Messgerät	SevenEasy	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Pipetten	Research plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage	AG204 DeltaRange	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Sterilwerkbank	1. LaminAir S 2010 2. Nunc TopSafe 3. HERASafe	1. Heto-Holten, Allerød, Dänemark 2.BIOAIR, Euroclone SpA, Italien 3. Kendro Laboratory

		Products GmbH, Langensfeld, Deutschland
Tischschüttler	1.MTS 4 2.Unimax 1010	1. IKA Works, Inc., Wilmington, NC, USA 2.Heidolph, Schwabach, Deutschland
Tischvortex	1.RS-VA-10 2.MS 3 digital	1.Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland 2.IKA Works, Inc., Wilmington, NC, USA
Tischzentrifuge	C-1200	National Labnet Co., Woodbridge, NJ, USA
Waage	HG	Shinko Denshi, Japan
Wasserbad	1.Typ 1002 2.TYP WB 10	1.Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland 2.P-D Industriegesellschaft, Prüfgerätewerk Dresden, Deutschland
Zähler		IVO
Zählkammer	Neubauer improved	La fontaine
Zentrifuge	1.Megafuge 1.OR 2.Biofuge fresco	1.+2.Heraeus, Hanau, Deutschland

3.1.7 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser	Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
Einmalpipetten (5, 10, 25ml)	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

Gel blotting Papier	Schleicher&Schuelle Bioscience GmbH, Dassel, Deutschland
Glasgefäße	Schott, Mainz, Deutschland
Multikavitätenplatte (96well)	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger, 8 Kavitäten (BD Falcon)	BD Biosciences, Bedford, USA
Parafilm	Bemis, Neenah, USA
Pasteur-Pipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Pipettier Spitzen (0,1-10, 200, 1.000µL) TipOne	StarLab GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
PVDF-Membran	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflasche (25cm ² , 75cm ²)	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte (6-well)	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (Falcon)	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

3.1.8 Software

Bio Rad CFX Manager

Image Lab

LSM Image Examiner Zeiss

Microsoft Office Excel

Microsoft Office Power Point

Microsoft Office Word

Tecan i-control

ZEN

3.2 Methoden

3.2.1 Zelltoxizitätsmessung mittels CellTiterGlo

CellTiterGlo wird verwendet, um die Zellvitalität in einer Multi-Well-Platte zu bestimmen. Die Methode basiert auf der Quantifizierung des ATP-Gehalts, welcher gleichzusetzen ist mit der Anwesenheit metabolisch aktiver Zellen. Zur Quantifizierung wird die Luciferase-Reaktion verwendet. Bei dieser wird Luciferin mit ATP und Sauerstoff durch das Enzym Luciferase und Magnesium unter Aussendung von Lumineszenz umgesetzt. Die Lumineszenz kann detektiert und dadurch ein Rückschluss auf die Zellvitalität gezogen werden.

Für die Zelltoxizitätsmessung wurden die Zellen in einer *96-well* Platte ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen beider Agonisten sowie einer DMSO-Kontrolle über 24 und 48 Stunden behandelt. Pro Kavität wurden 8.000 Zellen ausgesät. Nach der Behandlung wurde 100 µl *CellTiterGlo*-Reagenz zugegeben. Anschließend inkubierte das Reagenz für zwei Minuten auf dem Schüttler, um die Zellyse zu induzieren. Darauf folgte eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Messung erfolgte mit dem *infinite M200* und der Software *tecan i-control*.

3.2.2 Zellkultur

Für die Zellkulturexperimente wurde die Zelllinie HepG2 verwendet, diese stammt von einem hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen Jungen. Da in dieser Doktorarbeit vor allem der Einfluss von SIRT6 auf die Autophagieregulation untersucht werden soll, wurden mir freundlicherweise SIRT6 *knock-out* HepG2 Zellen von [REDACTED] zur Verfügung gestellt. Sie wurden im Rahmen seiner naturwissenschaftlichen Doktorarbeit in der AG [REDACTED] mit der CRISPR/Cas-9 Methode generiert. Es wurden die Kontroll-Stämme e7 und e8 und die *Knock-out*-Stämme 1.23 und 2.39 ausgewählt. Bei der HepG2 Zelllinie handelt es sich um ausschließlich adhärent wachsende Zellen. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator mit dem Nährmedium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) kultiviert und alle zwei Tage nach mikroskopischer Konfluenzbeurteilung gesplittet. Das verbrauchte Medium wurde unter der Werkbank abgesaugt und die toten Zellen mit PBS-EDTA entfernt. Zur Ablösung vom Boden wurden die Zellen für 5 Minuten im Inkubator mit Trypsin

behandelt und dann leicht gegen die Zellkulturflasche geklopft. Darauf folgte die Teilung im festgelegten Verhältnis und die Zugabe von frischem Medium.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung für die Experimente wurde mit der Neubauer Zählkammer durchgeführt. Die Methode basiert auf der Färbung toter Zellen mit Trypanblau. Eine Zellsuspension wurde hier im Verhältnis 1:4 mit Trypanblau versetzt und in der Zählkammer unter dem Mikroskop betrachtet. Pro Kammer wurden vier Felder nicht angefärbter Zellen ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 4 und dem Volumenfaktor 10.000 errechnete sich die Zellzahl pro Milliliter.

3.2.4 SDS-Page

Die *SDS-Page* ist eine Standardmethode zur Auftrennung von Proteinen aus einem Gemisch. Da Proteine verschiedene elektrische Ladungen tragen, resultiert eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Um diesen Effekt zu verhindern, werden die Proteine mit dem Detergens SDS versetzt. Es denaturiert die Proteine und führt zur Bildung einer gleichmäßig verteilten negativen Ladung. Nun ist die Wanderung im elektrischen Feld nur noch von der Molekülmasse abhängig.

Zu diesem Zweck wurden die verwendeten Proteinproben aus den Experimenten mit einem zweifachen Ladepuffer versetzt. Dieser enthielt neben dem SDS auch Mercaptoethanol zur Spaltung von Disulfidbrücken und Bromphenolblau als Farbstoff. Dem Probengemisch wurde zusätzlich 0,5 µl Benzoylperoxid zugesetzt. Dies setzte die Viskosität herab und degradierte vorhandene DNA und RNA. Anschließend wurde die Probe für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden. Dies bestand aus zwei Teilen, einem Sammelgel und einem Trenngel. Die Probe wanderte für etwa 30 Minuten bei einer Spannung von 20 mA pro Gel im Sammelgel. Wenn die Lauffront das Trenngel erreichte, wurde die Spannung auf 30mA pro Gel hoch reguliert. Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurden Trenngele mit verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Die Porengröße hing dabei von der Acrylamidkonzentration im Gel ab.

Um die Proteingröße zu bestimmen, wurde zusätzlich zu den Proben ein Molekularmarker (*PageRuler*) aufgetragen.

3.2.5 Western Blot

Mit dem Western Blot können Proteine qualitativ und semiquantitativ aus einer Probe bestimmt und nachgewiesen werden. Nachdem die Proteine mit der SDS-PAGE ihrer Größe nach in einer Gel-Matrix aufgetrennt wurden, erfolgte der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran. Diese Membran verfügt über eine hohe Proteinbindungskapazität. Aufgrund ihrer stark hydrophoben Eigenschaften wurde die Membran vor der Verwendung mit Methanol aktiviert. Danach wurde das Gel mit der PVDF-Membran und Filterpapier senkrecht in eine Halterung eingespannt. Diese Halterung wurde mit Blotpuffer und einer Kühleinheit in eine Kammer gestellt. Der Transfer fand unter ständiger Bewegung mit einem Rührmagnet bei einer Stromstärke von 350 mA für die Dauer von 90 Minuten statt. Im Anschluss wurde die Membran mit einfacher PBS gewaschen und dann mit einer Blocklösung (*I-Block*) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden freie unspezifische Bindungsstellen auf der Membran besetzt. Darauf folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, der spezifisch gegen das Zielprotein gerichtet ist. Er wurde in 5 ml Blocklösung angesetzt. Die Konzentration richtete sich je nach Antikörper und lag zwischen 1:1000 und 1:2.500. Die Membran inkubierte über Nacht, rollend und bei 4 °C.

Nach der Erst-Antikörper-Inkubation wurde die Membran mit 1x PBS/Tween dreimal für je 15 Minuten auf dem Schüttler gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der Zweit-Antikörper war mit einer alkalischen Phosphatase für die Nachweisreaktion gebunden. Die Membran wurde mit der Zweit-Antikörper-Lösung, angesetzt 1:15.000 in Blocklösung, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler behandelt und in der Folge ebenfalls dreimal mit einfacher PBS/Tween für je 15 Minuten gewaschen. Für die Detektion der Proteine wurde die Reaktion der alkalischen Phosphatase, die an den Zweit-Antikörper gebunden ist, verwendet. Um ein ideales Milieu für das Enzym zu schaffen, wurde die Membran zweimal für fünf Minuten auf dem Schüttler mit Assay-Puffer behandelt. Zur Signalverstärkung folgte noch eine Behandlung mit *Nitroblock II* (1:200 in Assaypuffer) für zehn Minuten und abschließend die Inkubation mit der Substratlösung *CDP-Star* (1:1.000 in Assaypuffer). Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit erfolgte die Entwicklung und Chemilumineszenzdetektion im *ChemiDoc*-Gerät.

Um den Proteingehalt der Proben untereinander zu vergleichen, wurde im Anschluss eine Immundetektion von Aktin auf den Membranen durchgeführt. Die Membran wurde drei Mal für je 15 Minuten auf dem Schüttler mit 1x PBS/Tween und dann erneut für

eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blocklösung behandelt. Der Erst-Antikörper für Aktin ist direkt mit einer Peroxidase gekoppelt und wurde 1:2.500 in Blocklösung angesetzt. Diese inkubierte über Nacht bei 4°C rollend. Danach folgten wieder drei Mal 15 Minuten einfache PBS/Tween auf dem Schüttler. Das Substrat für die Peroxidase *SuperSignal WestPico* wurde 1:1 gemischt und die Membran damit für fünf Minuten benetzt. Abschließend erfolgte die Detektion im *ChemiDoc*-Gerät.

3.2.6 LC-3 turnover Assay

Die Methode und ihre Auswertung ist unter 4.4 Einfluss einer PPAR α und FXR Stimulation auf den autophagischen Fluss in SIRT6 exprimierenden und defizienten HepG2-Zellen beschrieben.

3.2.7 p62 turnover Assay

Die Methode und ihre Auswertung ist unter 4.4.2 Untersuchung der autophagischen Aktivität mit Hilfe des p62-Proteinabbaus beschrieben.

3.2.8 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung ist ein Verfahren zum Nachweis von Antigenen in Zellen oder Geweben. Das Prinzip der Methode beruht auf der Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Erst-Antikörper bindet das Zielantigen. Der Zweit-Antikörper ist gegen die Tierspezies des Erst-Antikörpers gerichtet und mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Dieses Signal kann unter einem Mikroskop ausgelesen werden und gibt Hinweise über die Konzentration und Lokalisation des Antigens.

Die Zellen wurden in 8er chamber slides mit je 20.000 Zellen pro Kammer in 500 μ l Medium ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je nach Experiment erfolgte eine Behandlung mit den Agonisten über verschiedene Zeiträume. Nach Abschluss der Behandlung wurde das Medium entfernt und mit PBS gewaschen. Für die anschließende Färbung ist es erforderlich, die Zellen zu fixieren. Die Art der Fixierung richtet sich nach dem gesuchten Antigen und basiert auf Erfahrungswerten. Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit eiskaltem Methanol, 4% PFA oder einer Kombination aus beidem fixiert. Dies erforderte jeweils eine unterschiedliche Einwirkdauer und Temperatur. Nach Abschluss der Fixation wurde das Agens entfernt

und die Zellen mit PBS dreimal für je fünf Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Für eine bessere Färbung von Antigenen im Zytoplasma erfolgte eine Vorbehandlung mit 0,2% Saponin für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde Blocklösung (5% BSA (bovines Serumalbumin) und 0,2% Triton in PBS gelöst) für 30 Minuten bei Raumtemperatur eingesetzt. Das Detergens Triton X-100 verbessert das Eindringen der Antikörper in die Zelle. Der Erst-Antikörper wird in Blocklösung je nach Verdünnung angesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend werden ungebundenen Antikörper in drei Waschschritten mit PBS/Tween 0,1% für je fünf Minuten auf dem Schüttler entfernt. Der Zweit-Antikörper, markiert mit Fluoreszenzfarbstoff, wird nach Tierspezies des Erst-Antikörpers ausgewählt und 1:200 verdünnt in Block-Lösung angesetzt. Dafür wird der Kernfarbstoff Hoechst 1:5.000 dazu pipettiert. Dies inkubiert für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Es folgten wieder drei Waschschrritte mit PBS/Tween 0,1% für je fünf Minuten auf dem Schüttler und ein abschließender Waschschrtritt mit Aqua dest. Die Kammern der chamber slides wurden entfernt und die fixierten und gefärbten Proben auf dem Objektträger mit Mounting Medium und einem Deckglas abgedeckt. Dies verhindert ein Austrocknen der Proben und verlangsamt das Verblässen des Fluoreszenzfarbstoffes. Die Proben wurden im Dunkeln bei 4°C bis zur Auswertung aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) und der Software ZEN. Bei jedem 8er chamber slide wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Diese wurde nur mit dem Zweit-Antikörper behandelt, um eine unspezifische Anfärbung auszuschließen bzw. zu erkennen.

3.2.9 RNA-Isolation

Für die Untersuchung der Genexpression wurde die quantitative Echt-Zeit PCR verwendet. Diese erforderte eine vorhergehende RNA-Isolation aus den behandelten Zellen. Die Zellen wurden in 6-well Platten zu je 600.000 ausgesät und über Nacht im Inkubator belassen. Darauf erfolgte je nach Experiment eine unterschiedliche Behandlung mit den Agonisten. Für die RNA Isolation wurde das Absolutely RNA Miniprep Kit von Agilent Technologies mit dem beiliegenden Protokoll verwendet. Zu dem Lyse-Buffer wurden pro ml 7µL Mercaptoethanol pipettiert. Das Medium der Zellen wurde entfernt und mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 350µL des Lyse-Buffers pro well lysiert und mit einem sterilen Zell-Scraper abgelöst. Das

entstehende Zelllysate wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und gevortext. Nun folgt die RNA-Isolation wie im Protokoll des Herstellers Revision A beschrieben. Abweichend davon wurde im letzten Schritt der Isolation der Elution Buffer zweimal mit je 20µL eingesetzt, um eine bessere RNA-Ausbeute zu erhalten. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop ND-100 und der Software i-tecan ermittelt. Der Nanodrop wurde mit Wasser und Elutionspuffer geeicht und anschließend die Messung durchgeführt. Das Ergebnis wurde in ng/µL ausgegeben.

3.3 cDNA

Um die isolierte RNA in der quantitativen Echt-Zeit PCR zu analysieren, wurde diese mit reverser Transkription zu cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte mit dem iScript cDNA Synthesis Kit von Biorad und den Angaben des Protokolls Version D.

3.3.1 Quantitative Echt-Zeit PCR

Die quantitative Echt-Zeit PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA. Die Besonderheit hier liegt in der Echtzeit Messung der entstehenden Fluoreszenz. Der verwendete Farbstoff SYBR Green bindet doppelsträngige DNA. Der entstehende Farbstoff-Komplex emittiert grünes Licht. Durch den Vergleich mit einem sogenannten Haushaltsgen kann die relative Expression des untersuchten Gen-Abschnitts bestimmt werden. In diesen Experimenten wurde dafür die RNA-Polymerase II verwendet. Der sogenannte Master Mix wird für jedes Primer-Paar des zu untersuchenden DNA-Abschnitts angesetzt. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

SYBR Green 2x MIX	12,5µL
Primer (forward und reverse, 1:25 verdünnt in Wasser)	1µL
Wasser	6,5µL
totales Volumen	20µL

Dieser Ansatz gilt pro Probe und wird mit der entsprechenden Anzahl zu untersuchender Proben multipliziert. In allen quantitativen Echt-Zeit PCRs wurden Doppelwerte gemessen und pro Primer eine No template-control mitgeführt. Die verwendeten Primer sind unter Material aufgeführt. Diese wurden in nukleasefreiem

Wasser in einer Konzentration von 100 pmol/ μ L angesetzt und für den Master Mix wie angegeben verdünnt. Die cDNA Probe wurde 1:5 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt.

In eine weiße 96-well Platte der Firma BioRad wurden 5 μ L cDNA-Probe und 20 μ L Master Mix pipettiert. Für die No-template-control wurde statt cDNA nukleasefreies Wasser hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer PCR-Folie zugeklebt und in der Zentrifuge für wenige Sekunden bis 1000 Umdrehungen anzentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die quantitative Echtzeit-PCR im CFX Connect Real-Time System der Firma BioRad. Dafür wurde folgendes Temperaturprotokoll programmiert:

1. Schritt: Initiale Denaturierung bei 95° C für 10 Minuten
 2. Schritt: Denaturierung bei 95° C für 30 Sekunden
 3. Schritt: Primer Annealing bei 55° C für 30 Sekunden
 4. Schritt: Elongation bei 72° C für 30 Sekunden
- Wiederholung ab Schritt 2 für insgesamt 40 Zyklen.

Die gewonnenen Daten wurden mit der Software Bio Rad CFX Manager ausgewertet.

3.3.2 Monodansylcadaverin-Färbung

Mithilfe der Monodansylcadaverin-Färbung (MDC) können in vitalen Zellen autophagische Vakuolen angefärbt werden. Die Färbung basiert auf der Interaktion zwischen MDC und Lipidstrukturen der Doppellipidmembran von autophagischen Vakuolen. Der Farbstoff reichert sich in azidischen Kompartimenten (Lysosomen und Endosomen) an. Die MDC-Färbung markiert eher Autolysosome als die frühe Form von Autophagosomen (34).

Die Zellen wurden in 8er Deckglas chamber-slides mit einer Dichte von 40.000 Zellen pro well in 500 μ L Medium ausgesät und über Nacht im Inkubator belassen. Am nächsten Tag erfolgte eine 24-stündige Behandlung mit den Agonisten. Das MDC wurde in Methanol gelöst und in einer Endkonzentration von 50 μ M auf die Zellen gegeben. Dieser Schritt erfolgte auf dem LSM, und die Zellen wurden mit einer Wärmeplatte konstant bei 37°C gehalten.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss einer SIRT6-Expression auf den Autophagiemarker p62

Als Ausgangspunkt für die geplanten Experimente wurden zunächst vier Zellklone ausgewählt: Zwei mit einer SIRT6-Expression (e7 und e8) und zwei SIRT6-defiziente Zellklone, in denen mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode das *SIRT6*-Gen deletiert wurde (Knock-out Klone 1.23 und 2.39). Diese wurden wie im Methodenteil beschrieben kultiviert und ohne weitere Behandlung für die Untersuchung der SIRT6-Proteinmenge mittels Western-Blot aufbereitet. Zusätzlich wurde in diesem Zellmodell die Proteinmenge des zentralen Autophagieproteins p62 untersucht.

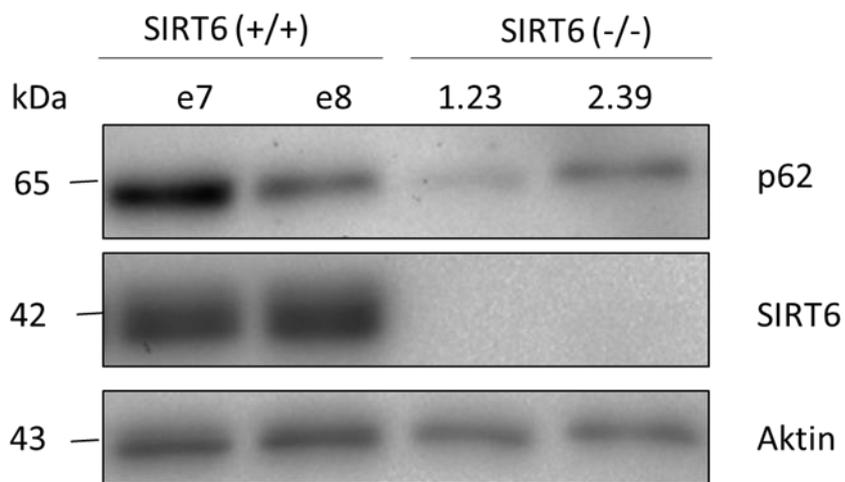


Abbildung 4: Einfluss einer SIRT6 Expression auf die Proteinmenge von p62

HepG2-Klone e7 und e8 (SIRT6 +/+), sowie 1.23 und 2.39 (SIRT6 -/-) wurden unbehandelt auf p62 und SIRT6 im Western-Blot untersucht. Die Aufnahme erfolgte mittels ChemiDoc und die Auswertung mit ImageLab.

Der Western-Blot zeigt einen Unterschied in der Menge von p62 in Abhängigkeit der SIRT6-Expression. Die SIRT6-exprimierenden Zellen zeigen intensivere Banden im Vergleich zu den SIRT6-defizienten Zellen.

Zusätzlich wurde dies auch auf Gen-Ebene mit der quantitativen Echtzeit-PCR untersucht.

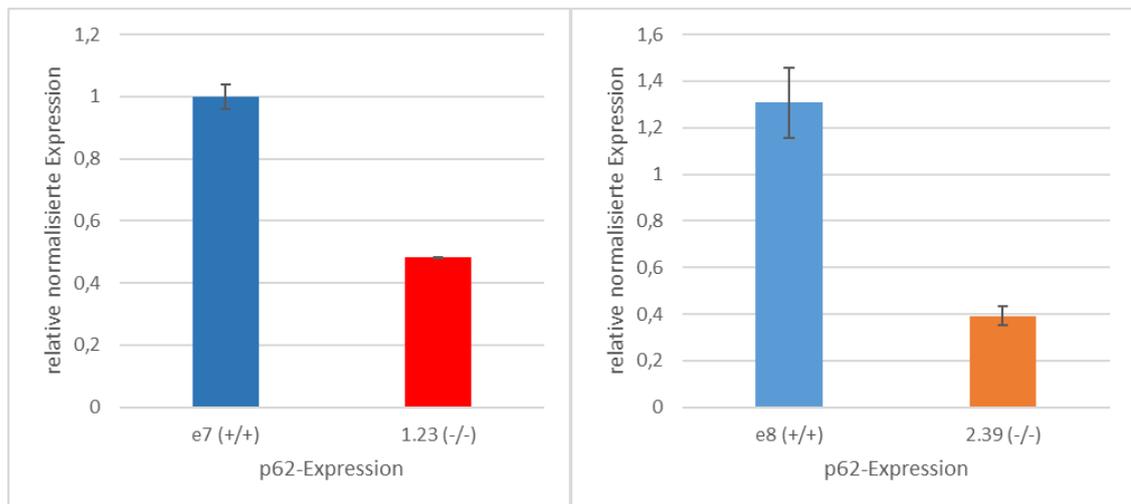


Abbildung 5: Einfluss einer SIRT6-Expression auf die Genexpression von p62

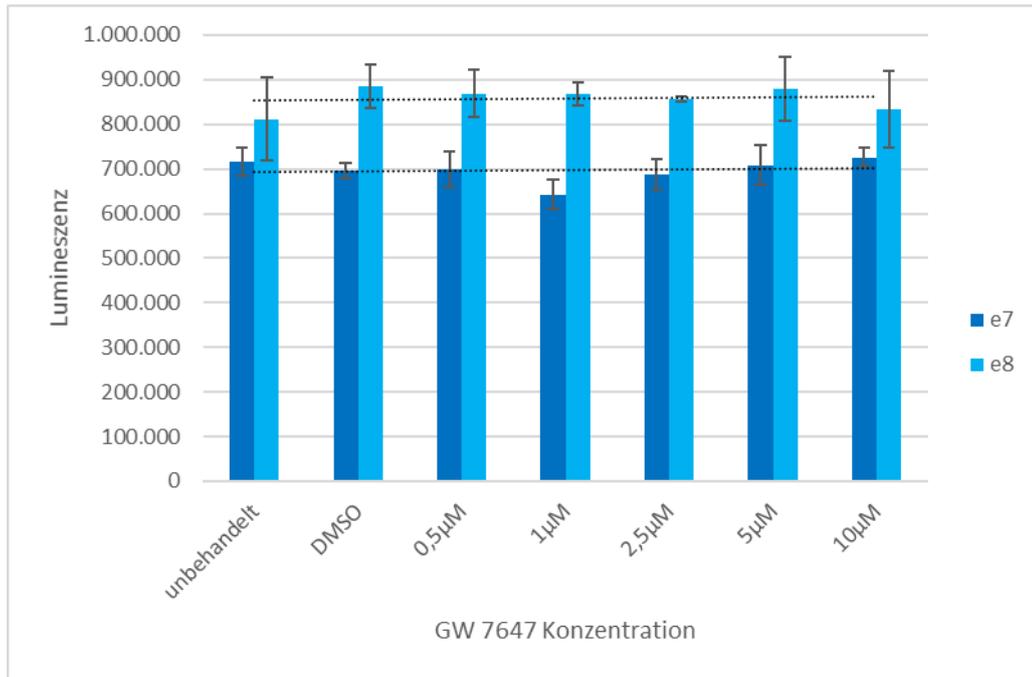
HepG2-Klone e7 und e8 (SIRT6 +/+), sowie 1.23 und 2.39 (SIRT6 -/-) wurden unbehandelt auf die Genexpression von p62 untersucht. Nach der RNA-Isolation wurde diese in cDNA transformiert und mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR gemessen. Die Daten wurden mit dem Housekeeping-Gen RPII normalisiert und die p62-Expression zum Wildtyp e7 in Relation gesetzt.

Auf Gen-Ebene zeigt sich in den unbehandelten Zellen eine eindeutige Tendenz. Die SIRT6-defizienten Zellen haben eine um die Hälfte reduzierte p62-Expression im Vergleich zu den SIRT6-exprimierenden Zellen.

4.2 Einfluss der Agonisten für nukleäre Rezeptoren auf das Überleben von SIRT6-exprimierenden und -defizienten HepG2-Zellen

Um für die folgenden Experimente einen Konzentrationsbereich der PPAR α - und FXR-Agonisten festzulegen, der für die Zellen nicht toxisch ist, wurde ein Zellviabilitätsassay durchgeführt. Wie im Methodenteil beschrieben, fand der CellTiter Glo 2.0 Verwendung. Die eingesetzten Konzentrationen orientierten sich an den Experimenten von Lee et al. Die beiden Agonisten waren in DMSO gelöst. Als Kontrollen dienen daher unbehandelte Zellen und DMSO. Die Messungen wurden in je zwei Zellpaaren über 24 Stunden durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Lumineszenzmessung und die statistische Auswertung mit Excel. Pro Konzentration wurden vier Messwerte zu einem Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

a)



b)

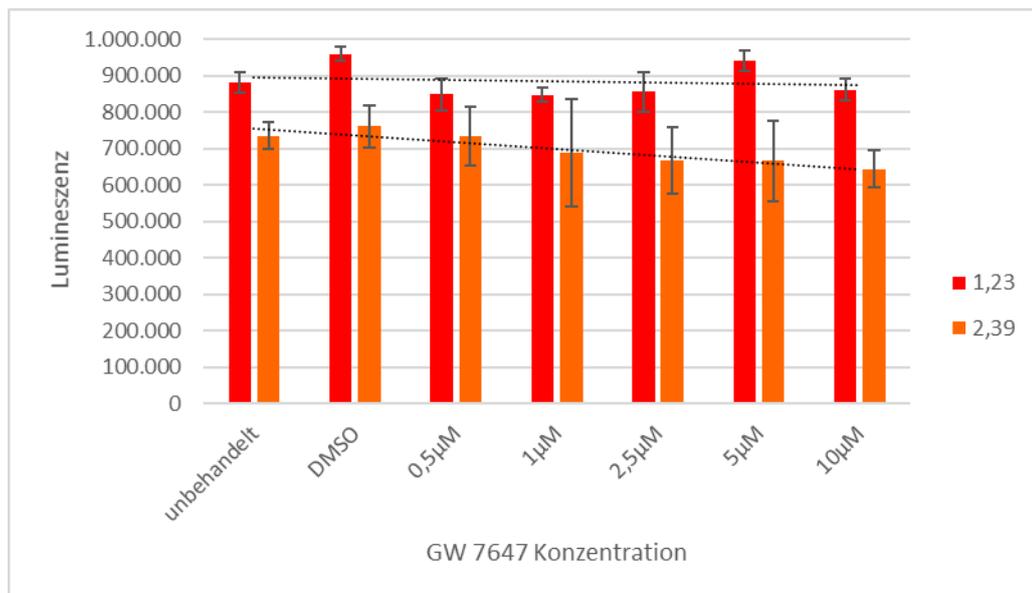


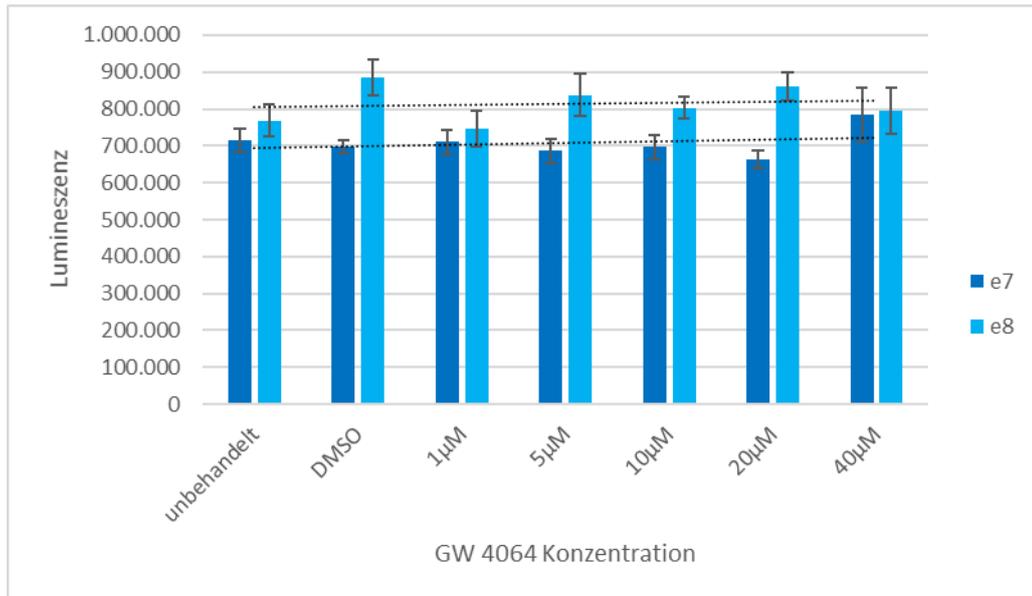
Abbildung 6: Einfluss des PPAR α Agonisten GW 7647 auf das zelluläre Überleben von HepG2-Zellen in Abhängigkeit von der SIRT6-Expression

a) HepG2-Zellen mit SIRT6-Expression (e7, e8)

b) SIRT6-defiziente HepG2-Zellen (1.23, 2.39)

Der Agonist für PPAR α (GW 7647) wurde in aufsteigender Konzentration über 24 Stunden getestet. Als Kontrolle dienten unbehandelte sowie mit DMSO behandelte Zellen. Es folgte die Zugabe von 100µl CellTiterGlo-Reagenz. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Messung der Lumineszenz mit dem infinite M200 und der Software tecan i-control.

c)



d)

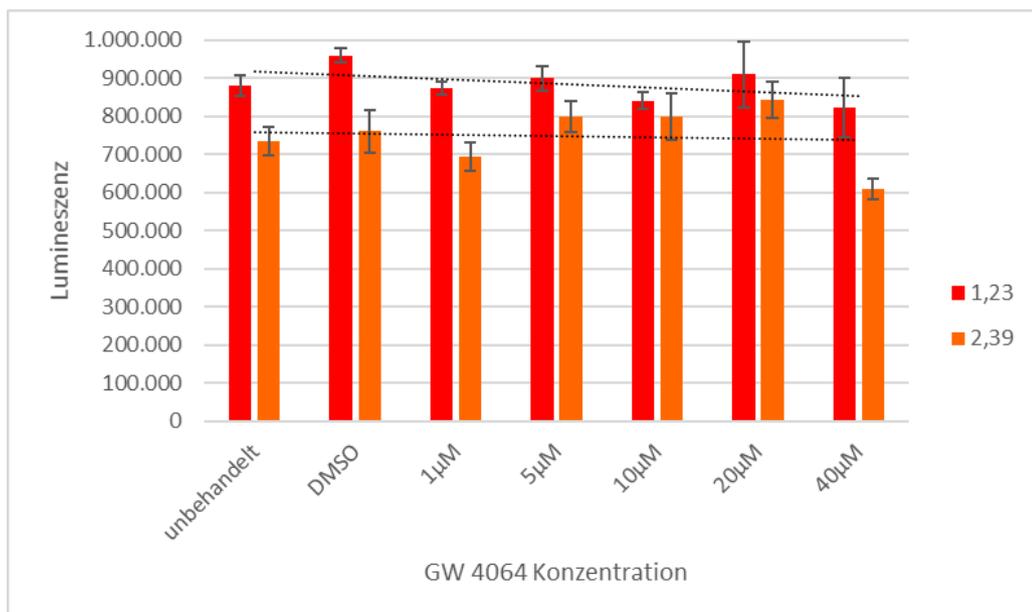


Abbildung 7: Einfluss des FXR Agonisten GW 4064 auf das zelluläre Überleben von HepG2-Zellen in Abhängigkeit von der SIRT6-Expression

c) HepG2-Zellen mit SIRT6-Expression (e7, e8)

d) SIRT6-defiziente HepG2-Zellen (1.23, 2.39)

Der Agonist für FXR (GW 4064) wurde in aufsteigender Konzentration über 24 Stunden getestet. Als Kontrolle dienten unbehandelte sowie mit DMSO behandelte Zellen. Es folgte die Zugabe von 100µl CellTiterGlo-Reagenz. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Messung der Lumineszenz mit dem infinite M200 und der Software tecan i-control.

Das Zellviabilitätsassay zeigt eine sehr schwache toxische Wirkung der Agonisten bei steigender Konzentration. Die Wildtyp-Stämme tolerieren hohe Konzentrationen beider Agonisten ohne hohen Zellverlust. Die lineare Trendlinie in Abb. 6a) und Abb. 7c) bleibt nahezu waagrecht. Die SIRT6-defizienten Zellen 1.23 und 2.39 reagieren im Vergleich dazu eher mit einem Verlust der Zellviabilität. Der Agonist für PPAR α (GW 7647) zeigt in Abb. 6b) mit steigender Konzentration einen Verlust der Zellviabilität. Der Agonist für FXR (GW 4064) wirkt ebenfalls bei steigender Konzentration toxisch auf die SIRT6-defizienten Zellen. Die Untersuchungen zeigen jedoch nur einen sehr gering ausgeprägten toxischen Effekt, sodass in den folgenden Experimenten mit den jeweils mittleren Konzentrationen gearbeitet werden kann.

4.3 Einfluss der Agonisten für die nukleäre Rezeptoren PPAR α und FXR auf das Proteinlevel und die Genexpression der Autophagiemarker p62 und LC-3

4.3.1 Untersuchung der p62-Proteinmenge im Western Blot

In den Experimenten von Kapitel 4.1 wurde der Einfluss einer SIRT6-Expression auf das Autophagieprotein p62 untersucht. Um eine Verbindung zwischen SIRT6 und der Autophagie-nukleäre Rezeptoren-Achse zu untersuchen, wurden die Zellen einer Behandlung zur Stimulation der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR unterzogen. Dafür wurden die Erkenntnisse aus dem Viabilitätsassay und den Experimenten von Lee et al. verwendet. Die Zellen wurden mit je drei Konzentrationen behandelt. Für den PPAR α -Agonist waren dies 0,5 μ M, 1 μ M und 2 μ M und für den FXR-Agonisten 5 μ M, 10 μ M und 20 μ M. Als Kontrolle wurde DMSO mitgeführt, da die Agonisten in dieser Substanz gelöst wurden. Die Wirkdauer betrug 24 Stunden. Während dieser zeigten sich im Mikroskop keine morphologischen Auffälligkeiten der Zellen. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen mit zweifachem Probenpuffer lysiert. Anschließend wurde das Zelllysate in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die auf die Membran übertragenen Proteine wurden mit einem Antikörper für p62 und SIRT6 inkubiert. Als Kontrolle diente ein Aktin-Antikörper. Die Bandenintensität wurde mit dem Image Lab-Programm ausgewertet. Die gemessene Bandenintensität für p62 wurde mit der Intensität der Aktinbanden normalisiert.

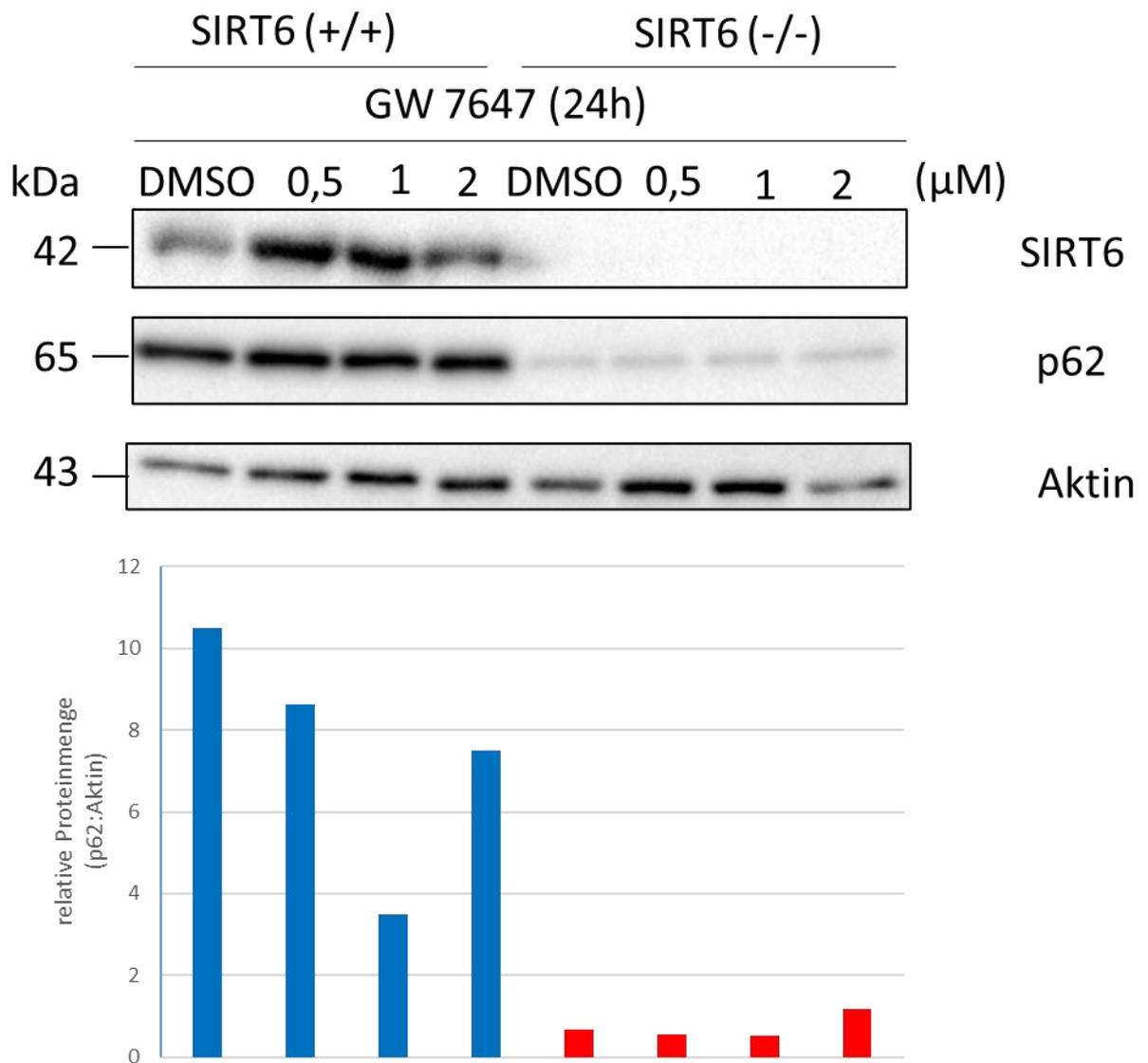


Abbildung 8: Einfluss des Agonisten für PPAR α (GW 7647) auf die zelluläre p62-Proteinmenge
 HepG2-Klone e7 (SIRT6 +/+) und 1.23 (SIRT6 -/-) wurden mit dem Agonisten für den nukleären Rezeptor PPAR α mit den Konzentrationen 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M und DMSO als Kontrolle über 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden im Western-Blot die Proteinmengen von p62, SIRT6 und Aktin detektiert. Die Aufnahme erfolgte mittels ChemiDoc und die Quantifizierung der Banden mit ImageLab.

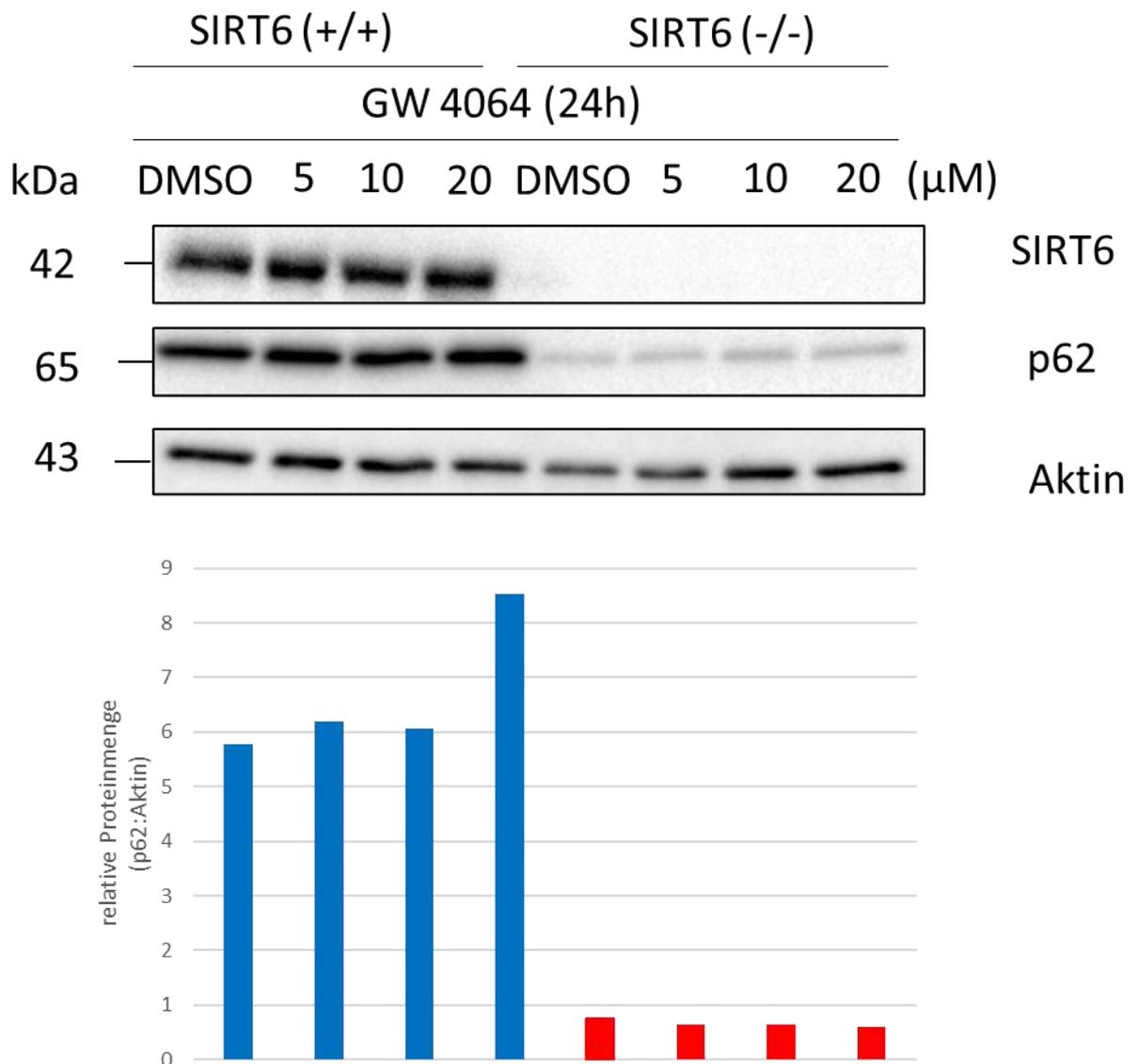


Abbildung 9: Einfluss des Agonisten für FXR (GW 4064) auf die zelluläre p62-Proteinmenge

HepG2-Klone e7 (SIRT6 +/+) und 1.23 (SIRT6 -/-) wurden mit dem Agonisten für den nukleären Rezeptor FXR mit den Konzentrationen 5μM, 10μM, 20μM und DMSO als Kontrolle über 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden im Western-Blot die Proteinmengen von p62, SIRT6 und Aktin detektiert. Die Aufnahme erfolgte mittels ChemiDoc und die Quantifizierung der Banden mit ImageLab.

Im Western Blot zeigte sich ein großer Unterschied für p62 zwischen den SIRT6 exprimierenden und defizienten Zellen. Die SIRT6 exprimierenden Zellen zeigen nach Stimulation des PPARα-Rezeptors (Abb. 8) und FXR-Rezeptors (Abb. 9) sehr starke Bandenintensitäten für p62 im Vergleich zu den defizienten Zellen. In der Quantifizierung nach Normalisierung mit Aktin ergibt sich für die DMSO-Kontrolle in Abb. 8 ein zehnfacher Unterschied in der relativen Proteinmenge für das p62-Signal zwischen SIRT6-exprimierenden und -defizienten Zellen. Die Unterschiede werden mit

steigender Konzentration des PPAR α -Agonisten etwas geringer. Dieser Trend ist bei den SIRT6-defizienten Zellen nicht zu beobachten.

Nach Behandlung der Zellen mit dem Agonisten für den FXR-Rezeptor (Abb. 9) zeigt sich tendenziell ein höherer Unterschied der p62-Proteinmenge bei steigender Konzentration des Agonisten bei den SIRT6-exprimierenden Zellen. Dieser Effekt zeigt sich nicht bei den SIRT6-defizienten Zellen. Für die SIRT6-exprimierenden Zellen wurde eine leichte Zunahme der Bandenintensität von SIRT6 zwischen der Kontrolle und der Behandlung mit dem PPAR α -Agonisten beobachtet. Bei der Behandlung mit dem FXR-Agonisten wurde keine Zunahme der Bandenintensität beobachtet.

4.3.2 Einfluss einer PPAR α -Stimulation auf die Expression der p62-mRNA

Um zu untersuchen, ob eine verringerte Gen- und Proteinexpression oder eine verstärkte p62-Degradation für die geringere p62-Proteinmenge verantwortlich ist, wurde im folgenden Experiment die mRNA-Expression untersucht.

Hierzu wurden die Zellklone erneut mit den Agonisten für nukleäre Rezeptoren behandelt. Die Behandlung erstreckte sich 24 Stunden mit 1 μ M für den PPAR α -Agonisten und 10 μ M für den FXR-Agonisten. Daraufhin erfolgten wie im Methodenteil beschrieben die RNA-Isolation, cDNA-Synthese und quantitative Echt-Zeit-PCR. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Bio-Rad CFX-Manager im Normalized expression (Delta-Delta Cq) mode. Hierbei wurden immer Doppelwerte analysiert und mit dem Housekeeping-Gen RPII verrechnet. Die graphische Darstellung erfolgte relativ zu Null mit der DMSO-Wildtyp-Probe als Kontrolle.

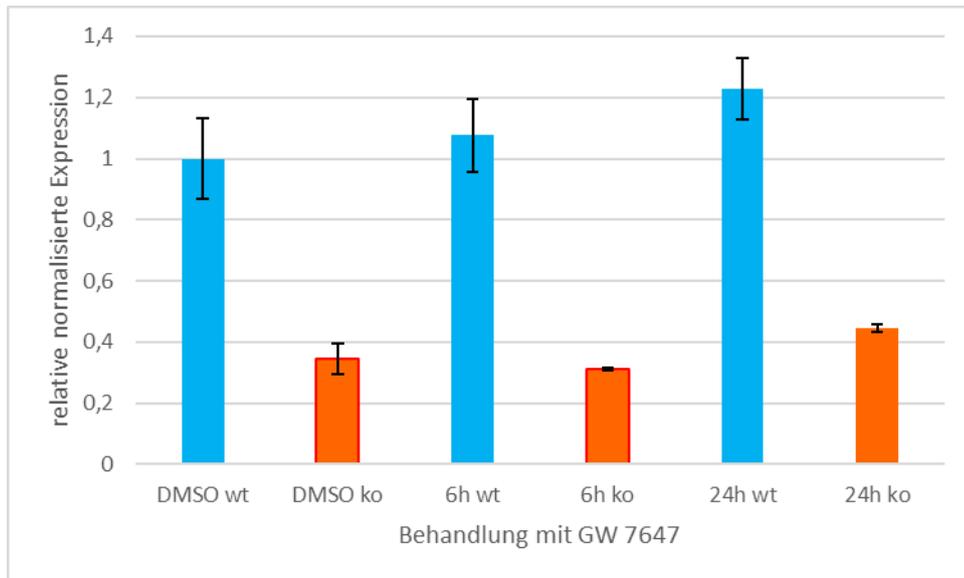


Abbildung 10: Einfluss des PPAR α -Agonisten auf die Gen-Expression der p62-mRNA

HepG2 Klone e8 (+/+) und 2.39 (-/-) wurden mit dem Agonisten für PPAR α über 24h mit einer Konzentration von 1 μ M behandelt. Nach der RNA-Isolation wurde diese in cDNA umgeschrieben und mithilfe der quantitativen RT-PCR gemessen. Die Daten wurden mit dem Housekeeping-Gen RPII normalisiert und die p62-Expression zur Wildtyp DMSO-Kontrolle in Relation gesetzt.

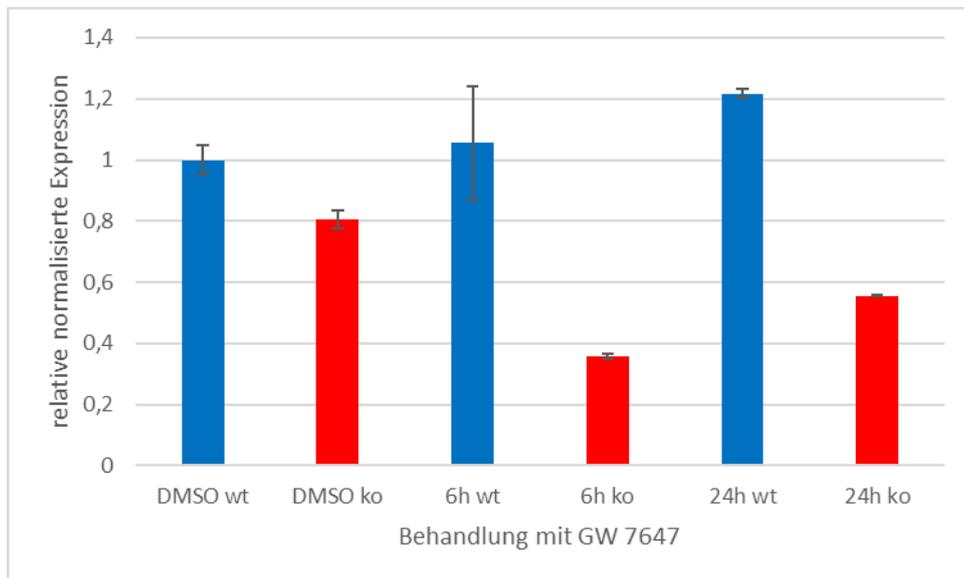


Abbildung 11: Einfluss des PPAR α -Agonisten auf die Gen-Expression der p62-mRNA

HepG2 Klone e7 (+/+) und 1.23 (-/-) wurden mit dem Agonisten für PPAR α über 24h mit einer Konzentration von 1 μ M behandelt. Nach der RNA-Isolation wurde diese in cDNA umgeschrieben und mithilfe der quantitativen RT-PCR gemessen. Die Daten wurden mit dem Housekeeping-Gen RPII normalisiert und die p62-Expression zur Wildtyp DMSO-Kontrolle in Relation gesetzt.

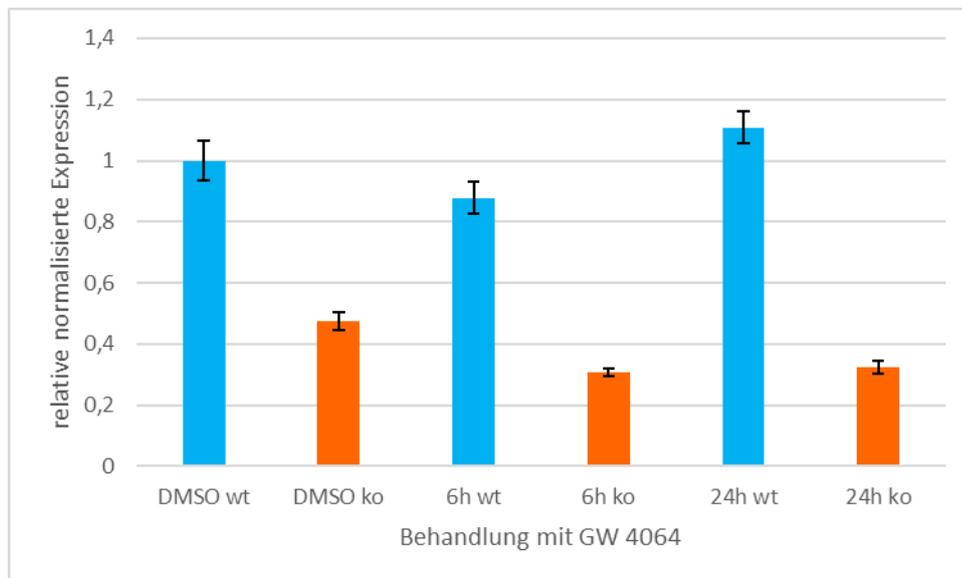


Abbildung 12: Einfluss des FXR-Agonisten auf die Gen-Expression der p62-mRNA

HepG2 Klone e8 (+/+) und 2.39 (-/-) wurden mit den Agonisten für FXR über 24h mit einer Konzentration von 10µM behandelt. Nach der RNA-Isolation wurde diese in cDNA umgeschrieben und mithilfe der quantitativen RT-PCR gemessen. Die Daten wurden mit dem Housekeeping-Gen RPII normalisiert und die p62-Expression zur Wildtyp DMSO-Kontrolle in Relation gesetzt.

Die unbehandelten Proben der Zellklone zeigten einen bis zu zweifachem Unterschied in der p62-Expression. Die SIRT6-defizienten Zellen wiesen eine um die Hälfte reduzierte p62-Expression in den unbehandelten Proben in beiden Behandlungen auf. Die Behandlung mit dem Agonisten für PPARα führte zu einem Anstieg der p62-Expression in den SIRT6-exprimierenden Zellen. Dieser Effekt war bei den SIRT6-defizienten Zellen nicht zu beobachten.

4.3.3 Nachweis des zellulären p62-Proteins mittels Immunfluoreszenzfärbung

Zur Darstellung der zellulären Lokalisation des p62-Proteins erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellklone.

Wie schon beschrieben, wurden die Zellen für 24 Stunden mit einer Konzentration von 1µM für den PPARα-Agonisten und 10µM für den FXR-Agonisten behandelt. Als Kontrolle diente eine DMSO-Behandlung. Das Protokoll zur Immunfärbung ist im Methodenteil beschrieben. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt. Die Bildbearbeitung erfolgte mithilfe der ZEN Software.

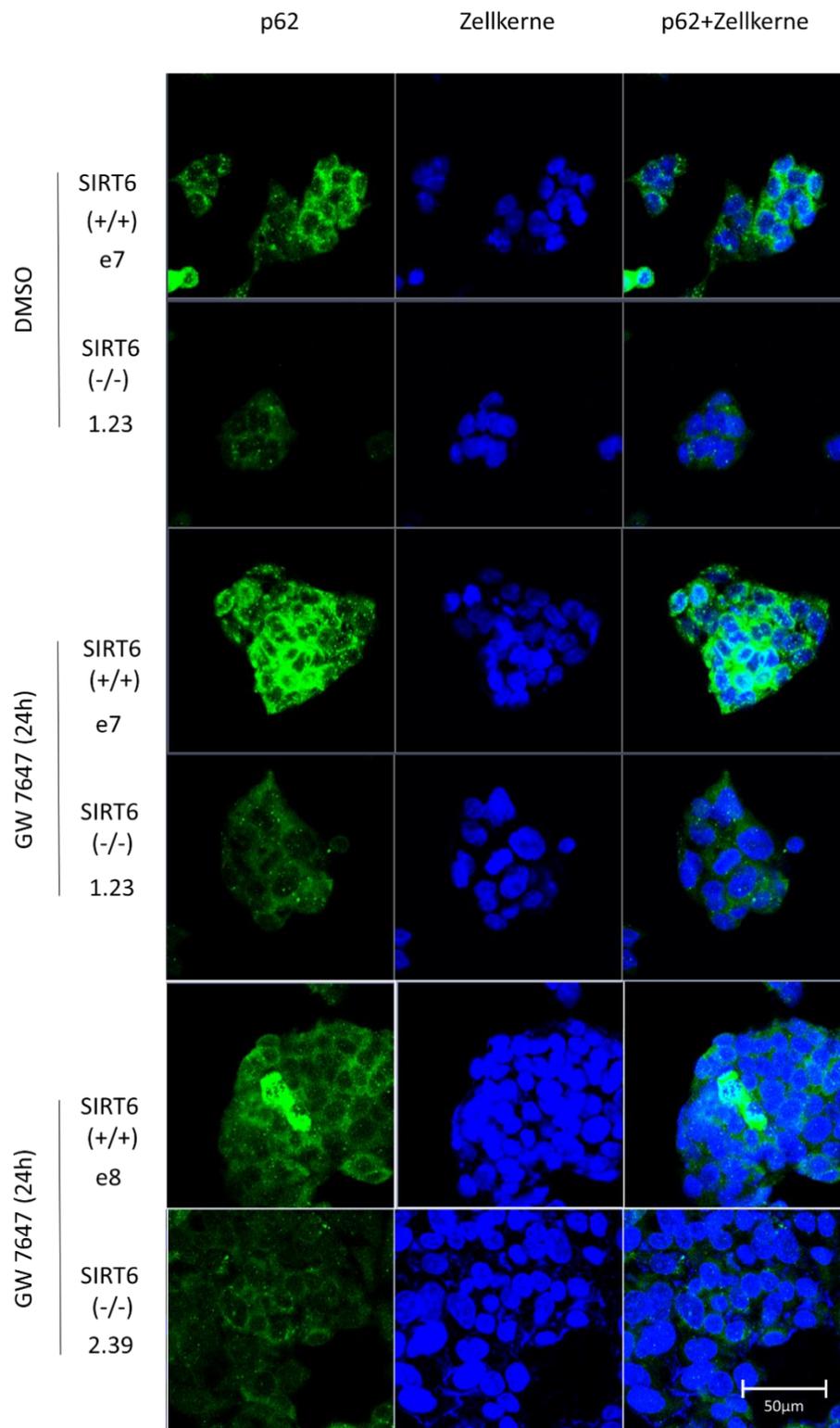


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung von p62 nach Behandlung von HepG2 Zellen e7/e8 (SIRT6 +/+) und 1.23/2.39 (SIRT6 -/-) mit dem Agonisten für den nukleären Rezeptor PPAR α

Die HepG2 Zellen wurden für 24 Stunden mit dem Agonisten für den nukleären Rezeptor PPAR α (GW 7647, 1 μ M) behandelt. Als Kontrolle wurde eine DMSO-Behandlung durchgeführt. Das p62-Signal ist grün dargestellt, das Kernsignal blau. Die eingefügte Skala entspricht 50 μ m. Nach der Fixierung erfolgte die Behandlung mit dem Erst-Antikörper für p62 und danach mit dem Zweit-Antikörper Alexa Fluor 555 (goat anti-mouse) und dem Kernfarbstoff Hoechst. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und der Software ZEN erstellt.

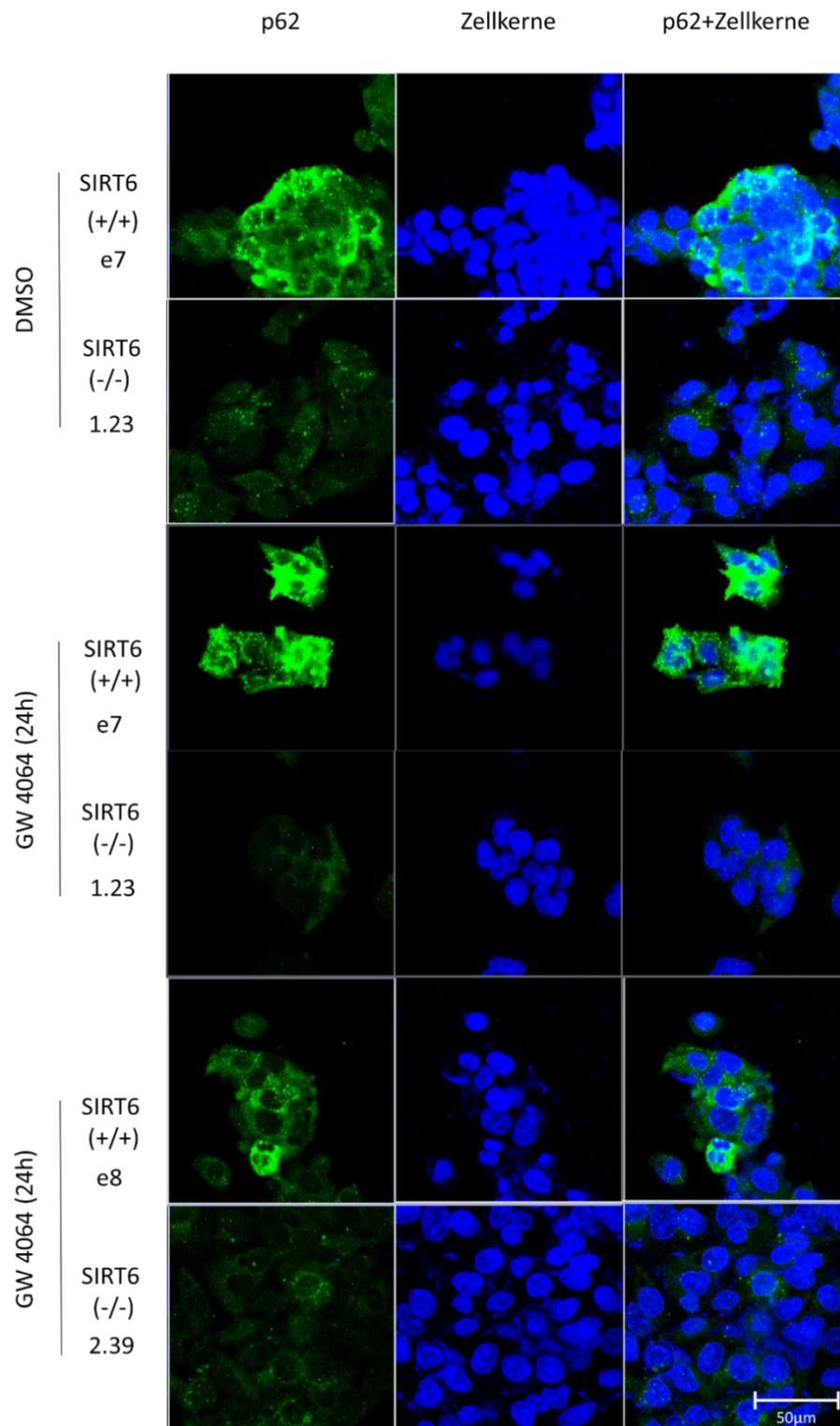


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von p62 nach Behandlung von HepG2 Zellen e7/e8 (SIRT6 +/+) und 1.23/2.39 (SIRT6 -/-) mit dem Agonisten für den nukleären Rezeptor FXR

Die HepG2 Zellen wurden für 24 Stunden mit dem Agonisten für den nukleären Rezeptor FXR (GW 4064, 10µM) behandelt. Als Kontrolle wurde eine DMSO-Behandlung durchgeführt. Das p62-Signal ist grün dargestellt, das Kernsignal blau. Die eingefügte Skala entspricht 50µm. Nach der Fixierung erfolgte die Behandlung mit dem Erst-Antikörper für p62 und danach mit dem Zweit-Antikörper Alexa Fluor 555 (goat anti-mouse) und dem Kernfarbstoff Hoechst. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und der Software ZEN erstellt.

In allen abgebildeten Aufnahmen zeigen SIRT6-exprimierende Zellen ein stärkeres Immunfluoreszenz-Signal für p62 im Vergleich zu SIRT6-defizienten Zellen. Bei den unbehandelten Kontrollen ist der Signalunterschied am deutlichsten erkennbar. In den SIRT6-exprimierenden Zellen ist die p62-Fluoreszenz punktförmig im Zytosol zu erkennen. Die SIRT6-defizienten Zellen zeigen dagegen ein sehr diffuses, schwaches Signal im Zytosol. Sowohl die Behandlung mit den Agonisten für PPAR α als auch für FXR hat keinen qualitativen Einfluss auf den Unterschied der Immunfluoreszenzsignale. In beiden Behandlungen gibt es intensivere, punktförmige Signale für p62 bei den SIRT6-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den SIRT6-Defizienten.

4.3.4 Untersuchung der LC-3-Proteinmenge im Western Blot

Neben p62 ist LC-3 ein weiterer etablierter Autophagiemarker. Während der Autophagie befindet es sich auf der Phagophorenmembran und dient hier als Bindestelle für Substrate der Autophagie, die beispielsweise mit p62 markiert sind. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob eine SIRT6-Expression und eine Behandlung mit den Agonisten der nukleären Rezeptoren Einfluss auf die LC-3-Proteinmenge in HepG2-Zellen hat. Hierfür wurden die Proben aus dem Experiment unter dem Kapitel 4.3.1 verwendet.

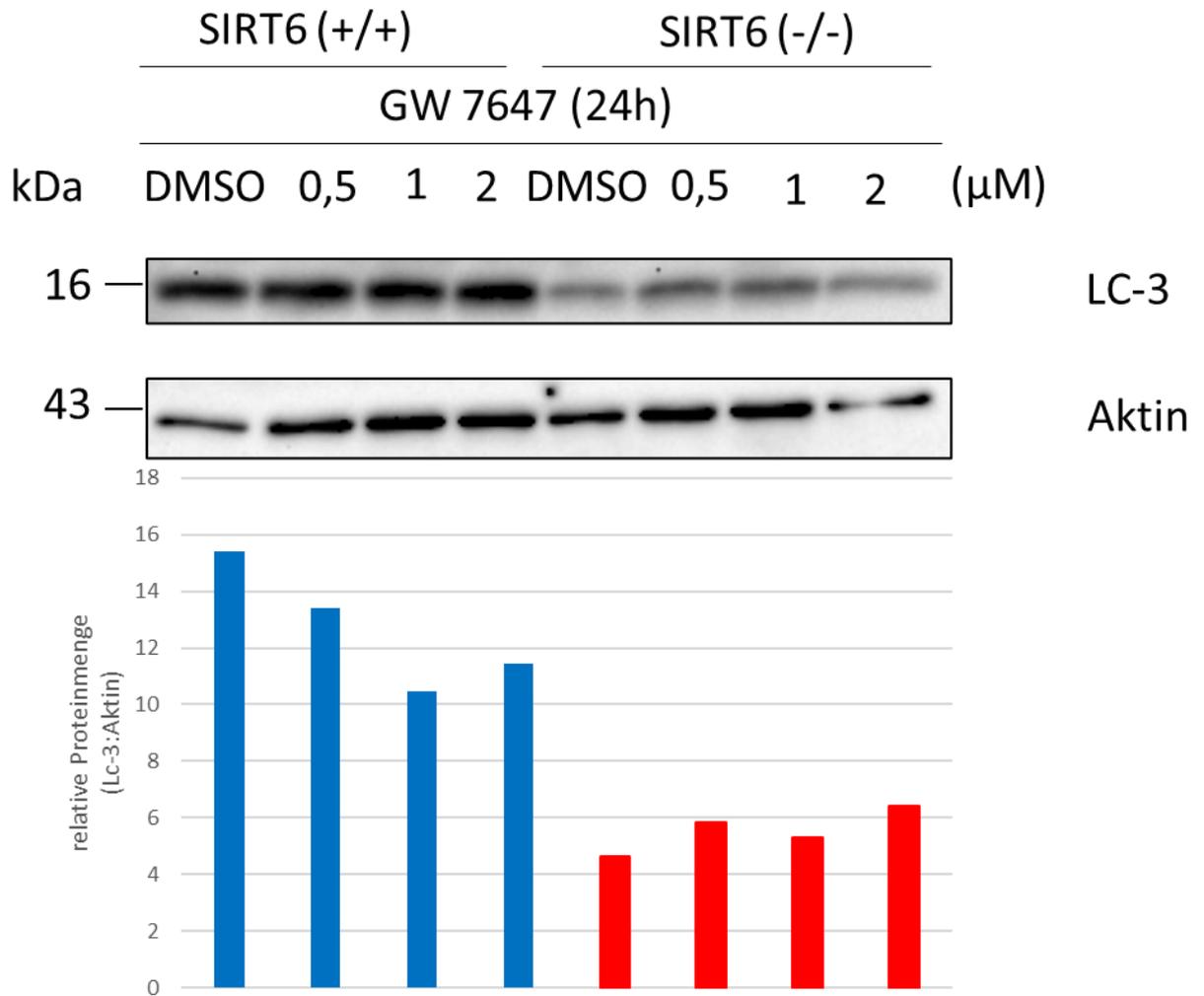


Abbildung 15: Einfluss des Agonisten für PPAR α (GW 7647) auf die zelluläre LC-3-Proteinmenge

HepG2-Klone e7 (SIRT6 +/+) und 1.23 (SIRT6 -/-) wurden mit dem Agonisten für den nukleären Rezeptor PPAR α mit den Konzentrationen 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M und DMSO als Kontrolle über 24h behandelt. Anschließend wurden im Western Blot die Proteinmengen von LC-3 und Aktin detektiert. Die Aufnahme erfolgte mittels ChemiDoc und die Quantifizierung der Banden mit ImageLab.

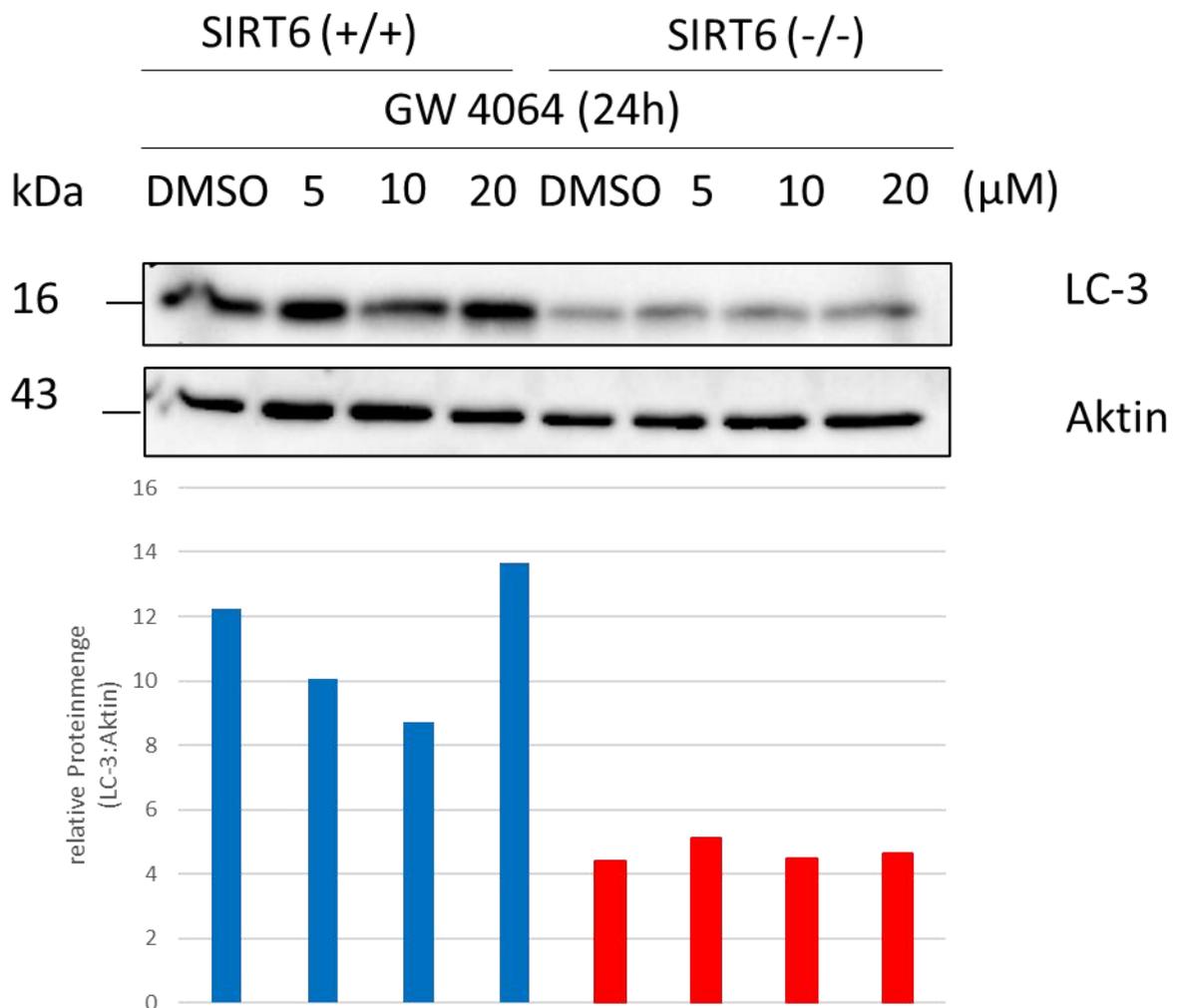


Abbildung 16: Einfluss des Agonisten für FXR (GW 4064) auf die zelluläre LC-3-Proteinmenge
HepG2-Klone e7 (SIRT6 +/+) und 1.23 (SIRT6 -/-) wurden mit dem Agonisten für den nukleären Rezeptor FXR mit den Konzentrationen 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M und DMSO als Kontrolle über 24h behandelt. Anschließend wurden im Western Blot die Proteinmengen von LC-3 und Aktin detektiert. Die Aufnahme erfolgte mittels ChemiDoc und die Quantifizierung der Banden mit ImageLab.

Die Western-Blot Untersuchungen für LC-3 zeigen eine geringere Menge bei den SIRT6-defizienten Zellen. Die Behandlung mit dem PPAR α - Agonisten (Abb. 15) in steigender Konzentration führte zu einer tendenziellen Abnahme an LC-3 bei den SIRT6-exprimierenden Zellen. In den SIRT6-defizienten Zellen lässt sich keine Veränderungen der LC-3 Menge durch die Behandlung erkennen. Die Behandlung mit dem FXR-Agonisten (Abb. 16) zeigt ähnliche Effekte. Während sich bei den SIRT6-defizienten Zellen keine Änderung der LC-3-Menge durch die steigende Konzentration darstellt, weisen die SIRT6-exprimierenden Zellen eine sinkende Tendenz auf.

4.3.5 Nachweis des zellulären LC-3-Proteins mittels Immunfluoreszenzfärbung

Zur Darstellung der zellulären Lokalisation des LC-3-Proteins erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellklone. Hierdurch soll dargestellt werden, inwieweit eine Stimulation der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR in Abhängigkeit von einer SIRT6-Expression die Immunfluoreszenzfärbung für LC-3 beeinflussen. Die Behandlung erfolgte über 24 Stunden mit einer Konzentration von 1 μ M für den PPAR α -Agonisten und 10 μ M für den FXR-Agonisten. Als Kontrolle diente eine DMSO-Behandlung. Das Protokoll zur Immunfärbung ist im Methodenteil beschrieben. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt. Die Bildbearbeitung erfolgte mithilfe der ZEN Software.

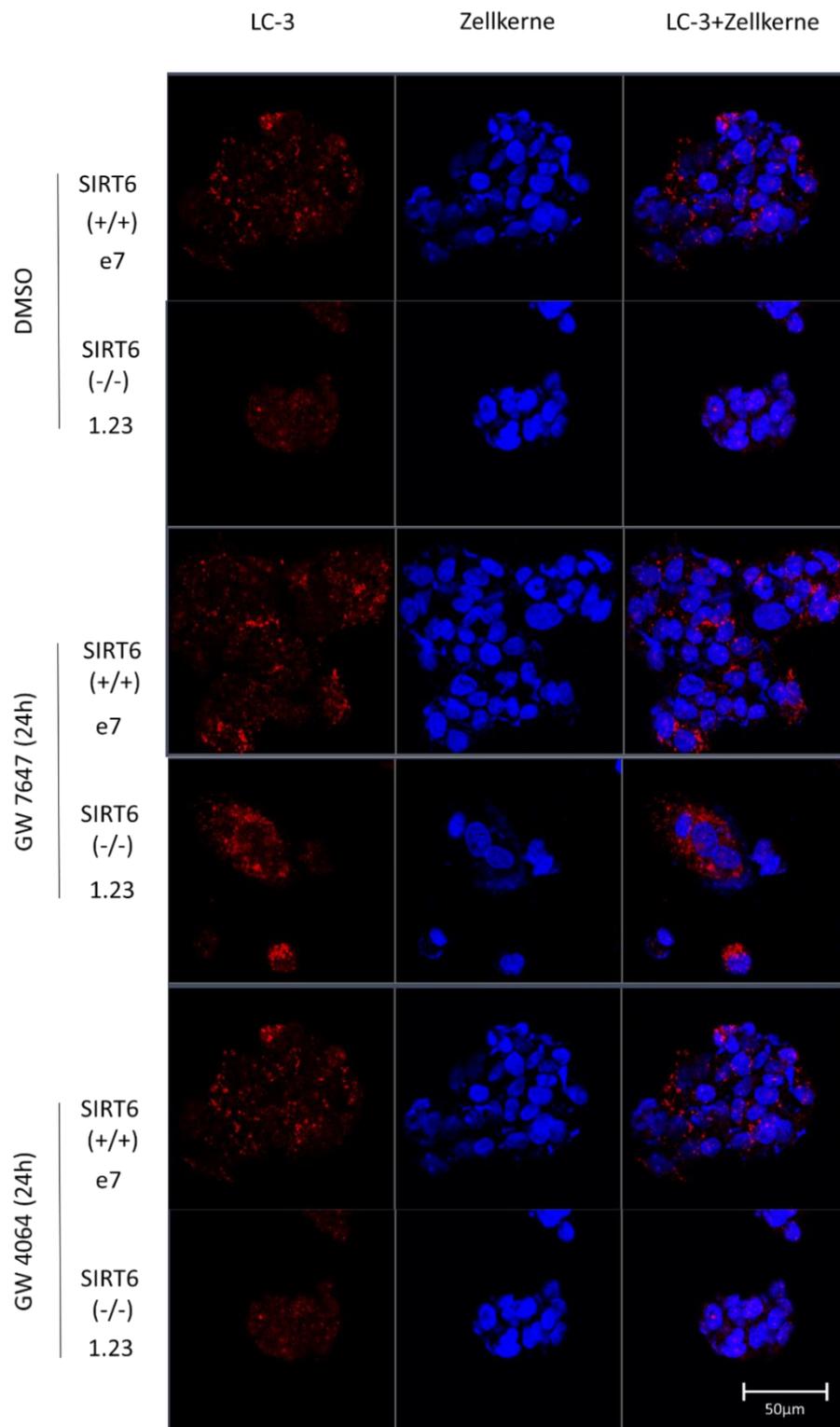


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung von LC-3 nach Behandlung von HepG2 Zellen e7 (SIRT6 +/+) und 1.23 (SIRT6 -/-) mit den Agonisten für die nukleäre Rezeptoren PPAR α und FXR
 Die HepG2 Zellen wurden über 24 Stunden mit den Agonisten für nukleäre Rezeptoren PPAR α (GW 7647, 1µM) und FXR (GW 4064, 10µM) behandelt. Als Kontrolle wurde eine DMSO-Behandlung durchgeführt. Das LC-3-Signal ist rot dargestellt, das Kernsignal blau. Die eingefügte Skala entspricht 50µm. Nach der Fixierung erfolgte die Behandlung mit dem Erst-Antikörper für LC-3 und danach mit dem Zweit-Antikörper Alexa Fluor 555 (goat anti-mouse) und dem Kernfarbstoff Hoechst. Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und der Software ZEN erstellt.

In der Immunfärbung ist die LC-3-Fluoreszenz punktförmig im Zytosol zu erkennen. In allen abgebildeten Aufnahmen zeigen SIRT6-exprimierende Zellen ein stärkeres Immunfluoreszenz-Signal für LC-3 im Vergleich zu SIRT6-defizienten Zellen. Sowohl die Behandlung mit den Agonisten für PPAR α als auch für FXR hat keinen qualitativen Einfluss auf den Unterschied der Immunfluoreszenzsignale.

4.4 Einfluss einer PPAR α und FXR Stimulation auf den autophagischen Fluss in SIRT6 exprimierenden und defizienten HepG2-Zellen

Um den Einfluss der Agonisten für PPAR α und FXR in Abhängigkeit von der SIRT-6 Expression auf den autophagischen Fluss zu untersuchen, wurde der LC-3 Turnover Assay angewendet.

Dafür wurden die Zellklone in HBSS-Medium für fünf Stunden gehungert oder im nährstoffreichen DMEM-Medium belassen. Dazu erfolgte jeweils eine 24-stündige Behandlung mit einem Agonisten für PPAR α oder FXR und in ausgewählten Proben zusätzlich eine Behandlung mit Bafilomycin A1 (100nM für fünf Stunden).

Der LC-3 Turnover Assay ist eine von vielen Möglichkeiten, Autophagie in Zellen zu untersuchen. Da die Interpretation komplex ist und einige Nebeneffekte beachtet werden müssen, wird sie im Folgenden genauer beschrieben.

Für diesen Assay ist die prozessierte Form von LC-3, auch LC-3 II genannt, ausschlaggebend. Durch die Konjugation mit Phosphatidylethanolamin (PE) wird LC-3 I zu LC-3 II. Diese Form befindet sich sowohl an der Innen- als auch Außenmembran von Autophagosomen. Durch die Konjugation besitzt LC-3 II ein höheres Molekulargewicht (16kD) als LC-3 I (14kD). Das angefügte PE erhöht jedoch die Hydrophobizität, was in der SDS-PAGE eine schnellere Migration von LC-3 II zur Folge hat. Daher befindet sich die LC-3 II-Bande im Western Blot unterhalb der LC-3 I-Bande, trotz größeren Molekulargewichts. Der Gehalt an LC-3 II korreliert gut mit der Anzahl an Autophagosomen, oder, präziser betrachtet, mit der Menge an Autophagie-Membranen, die LC-3 II gebunden haben. Nach der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen zu Autolysosomen wird LC-3 II an der Außenmembran durch Atg4 abgespalten und an der Innenmembran durch lysosomale Enzyme abgebaut. Dies bildet die biochemische Grundlage des Turnover Assays. Hier wird sich die Abbaurate

von LC-3 II in Lysosomen zu Nutze gemacht. Dieser Abbau kann mit verschiedenen Substanzen blockiert werden.

In dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck Bafilomycin A1 eingesetzt. Bafilomycin A1 gehört zur Substanzklasse der Makrolid-Antibiotika. Es ist ein starker Inhibitor der vakuolären H⁺ ATPase. Diese kontrolliert beziehungsweise regelt den pH-Wert in Lysosomen und Endosomen. Die Hemmung verhindert die Ansäuerung in den genannten Kompartimenten und dadurch die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen zu Autolysosomen. Dies führt zu einer Akkumulation von Autophagosomen und einer Blockierung der Bildung von Autolysosomen. Das LC-3 II, welches an die Autophagosomen gebunden ist und normalerweise durch lysosomale Enzyme im Autolysosom abgebaut wird, akkumuliert ebenfalls.

Um den Effekt eines Gens oder einer Behandlung auf die Autophagie zu untersuchen, ist im LC-3 Turnover Assay die Differenz in der Behandlung (oder der An- bzw. Abwesenheit eines Gens) mit und ohne Bafilomycin A1 zu vergleichen. Die Differenz zwischen Proben mit und ohne Bafilomycin A1 repräsentieren den Gehalt an LC-3 II, der zum Abbau an die Lysosomen transportiert wird. Dies kann auf eine Erhöhung oder Erniedrigung des autophagischen Flusses im untersuchten Kontext hinweisen.

Die folgende Abbildung zeigt ein LC-3 Turnover Assay mit einer kurzen Erläuterung der Interpretation und Berechnung:

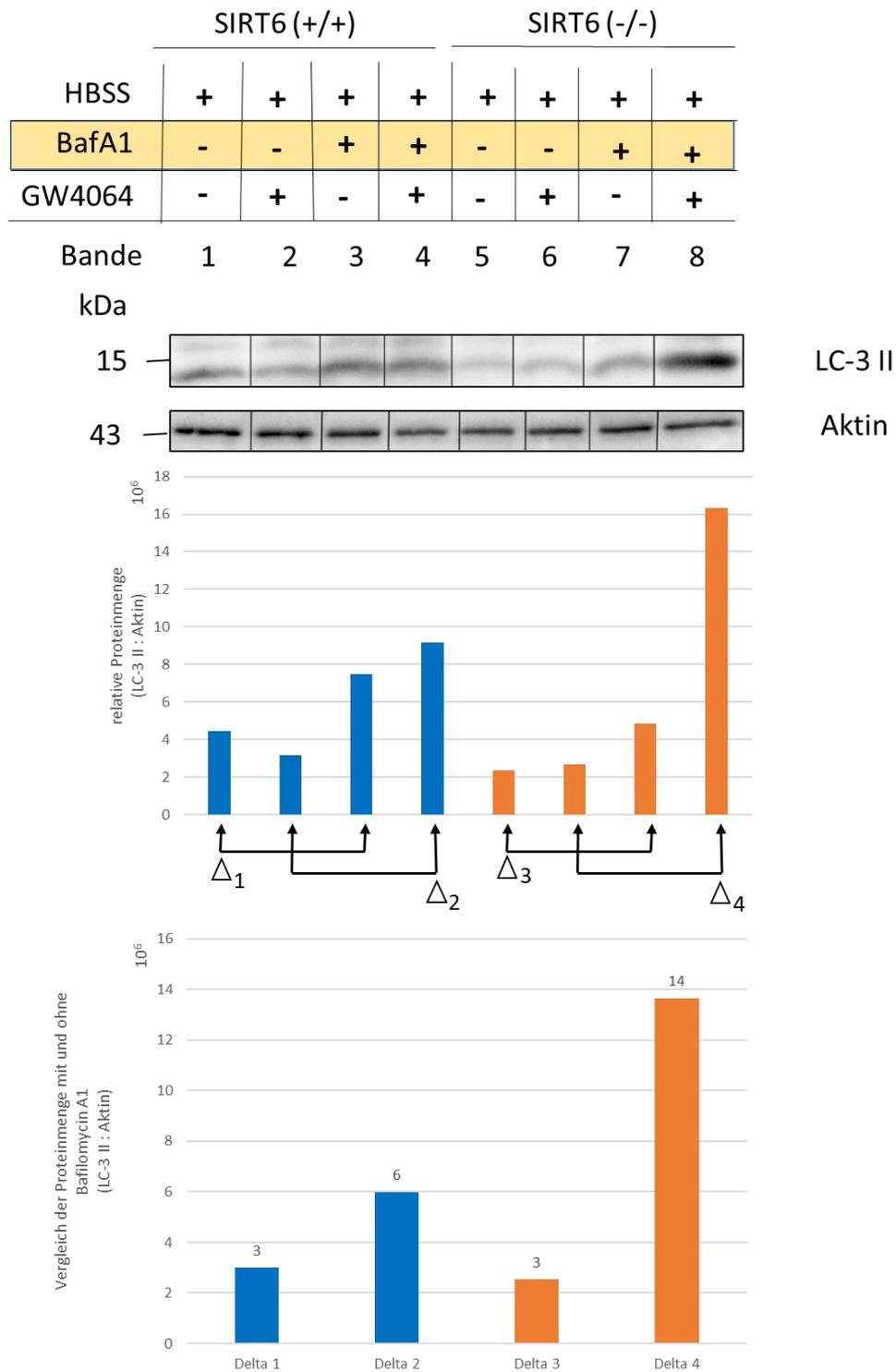


Abbildung 18: Auswertung des LC-3 Turnover Assays nach Stimulation des FXR-Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression unter Hungerbedingungen

HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (e7, Bande 1-4) oder Defizienz (2.39, Bande 5-8) wurden einer fünfstündigen Hungerepisode in HBSS (+) ausgesetzt. Dazu erfolgte in ausgewählten Proben eine Behandlung mit Bafilomycin A1 mit einer Konzentration von 100nM über fünf Stunden (Bande 3 und 4, 7 und 8) und eine 24-stündige Behandlung mit dem FXR-Agonisten GW 4064 mit einer Konzentration von 10 μ M (Bande 2 und 4, 6 und 8). Zur Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten mit dem ImageLab-Programm ausgewertet. Die LC-3-II Banden wurden mit den zugehörigen Aktin-Banden normalisiert und die relative Menge des LC-3-II Proteins berechnet.

Um den Unterschied, den ein Gen oder eine Behandlung im LC-3 Turnover bewirkt, darzustellen, werden die Unterschiede (Delta) in den Proben mit und ohne Bafilomycin A1 und dem zu betrachtenden Aspekt verglichen (Abb.18).

Autophagischer Fluss unter Hungerbedingungen in Abhängigkeit von SIRT6

Delta 1 von Bande 1 zu 3: 3×10^6

Delta 3 von Bande 5 zu 7: 3×10^6

Da Delta 1 gleich Delta 3 ist, lässt sich daraus folgern, dass die SIRT6-exprimierenden und -defizienten Zellen den autophagischen Fluss während einer Hunger-Episode gleich stark erhöht haben und es zu keinen nennenswerten Unterschieden kommt.

Wirkung des FXR-Agonisten in Abhängigkeit von SIRT6 unter Hungerbedingungen auf den autophagischen Fluss

Delta 2 von Bande 2 zu 4: 6×10^6

Delta 4 von Bande 6 zu 8: 14×10^6

Da $\Delta 4 > \Delta 2$ ist, lässt sich folgern, dass die SIRT6-defizienten Zellen den autophagischen Fluss nach Stimulation des FXR Rezeptors unter Hungerbedingungen stärker erhöhen als SIRT6-exprimierende. Die Berechnung ergibt einen circa zweifach erhöhten autophagischen Fluss der SIRT6-defizienten Zellen im Vergleich zu den SIRT6-exprimierenden Zellen.

Um zu untersuchen, wie sich eine SIRT6-Expression, eine synthetische Stimulation der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR sowie eine Hungerepisode auf den autophagischen Fluss auswirken, wurden folgende Behandlungen durchgeführt: HepG2-Zellen mit einer SIRT6-Expression oder Defizienz wurden im nährstoffreichen DMEM-Medium belassen oder einer fünfstündigen Hungerepisode im aminosäurefreien HBSS-Medium ausgesetzt. Dazu erfolgte in ausgewählten Proben eine 24-stündige Behandlung mit dem Agonisten für den PPAR α -Rezeptor GW 7647 (1 μ M), dem Agonisten für den FXR-Rezeptor GW 4064 (10 μ M) und Bafilomycin A1 (100nM) über fünf Stunden. Durch den Vergleich von Proben mit und ohne Bafilomycin A1-Behandlung auf die Proteinmenge von LC-3 II kann der Einfluss auf den autophagischen Fluss dargestellt werden.

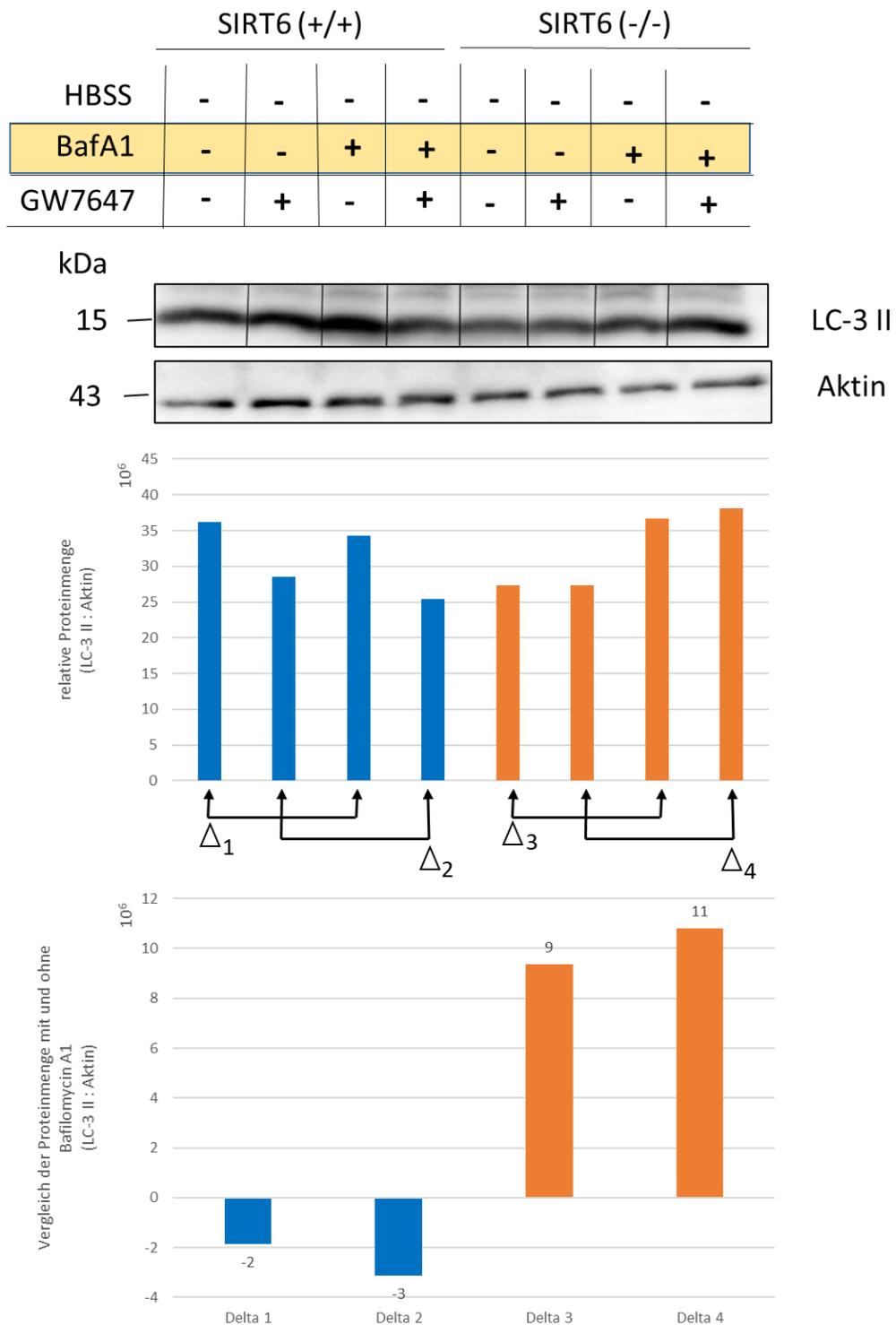


Abbildung 19: Auswertung des LC-3 Turnover Assays nach Stimulation des PPAR α -Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression

HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (e7, Bande 1-4) oder Defizienz (2.39, Bande 5-8) wurden im nährstoffreichen DMEM-Medium (HBSS -) untersucht. Dazu erfolgte in ausgewählten Proben eine Behandlung mit Bafilomycin A1 mit einer Konzentration von 100nM über fünf Stunden (Bande 3 und 4, 7 und 8) und eine 24-stündige Behandlung mit dem PPAR α -Agonisten GW 7647 mit einer Konzentration von 1 μ M (Bande 2 und 4, 6 und 8). Zur Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten mit dem ImageLab-Programm ausgewertet. Die LC-3-II Banden wurden mit den zugehörigen Aktin-Banden normalisiert und die relative Menge des LC-3-II Proteins berechnet.

Bei Zellen mit einer SIRT6-Expression in nährstoffreichem Medium kommt es nicht zu einer Zunahme des autophagischen Flusses unter basalen Bedingungen (Abb. 19, Delta 1 ist negativ). Eine Stimulation des PPAR α -Rezeptors mit GW 7647 zeigt ebenfalls keine Zunahme (Abb. 19, Delta 2 ist negativ). Die SIRT6-defizienten Zellen zeigen in nährstoffreichem Medium eine Zunahme des autophagischen Flusses unter basalen Bedingungen (Abb. 19, Delta 3 ist positiv). Dieser Effekt wird durch die Stimulation des PPAR α -Rezeptors mit GW 7647 verstärkt (Abb.19, Delta 4 ist positiv).

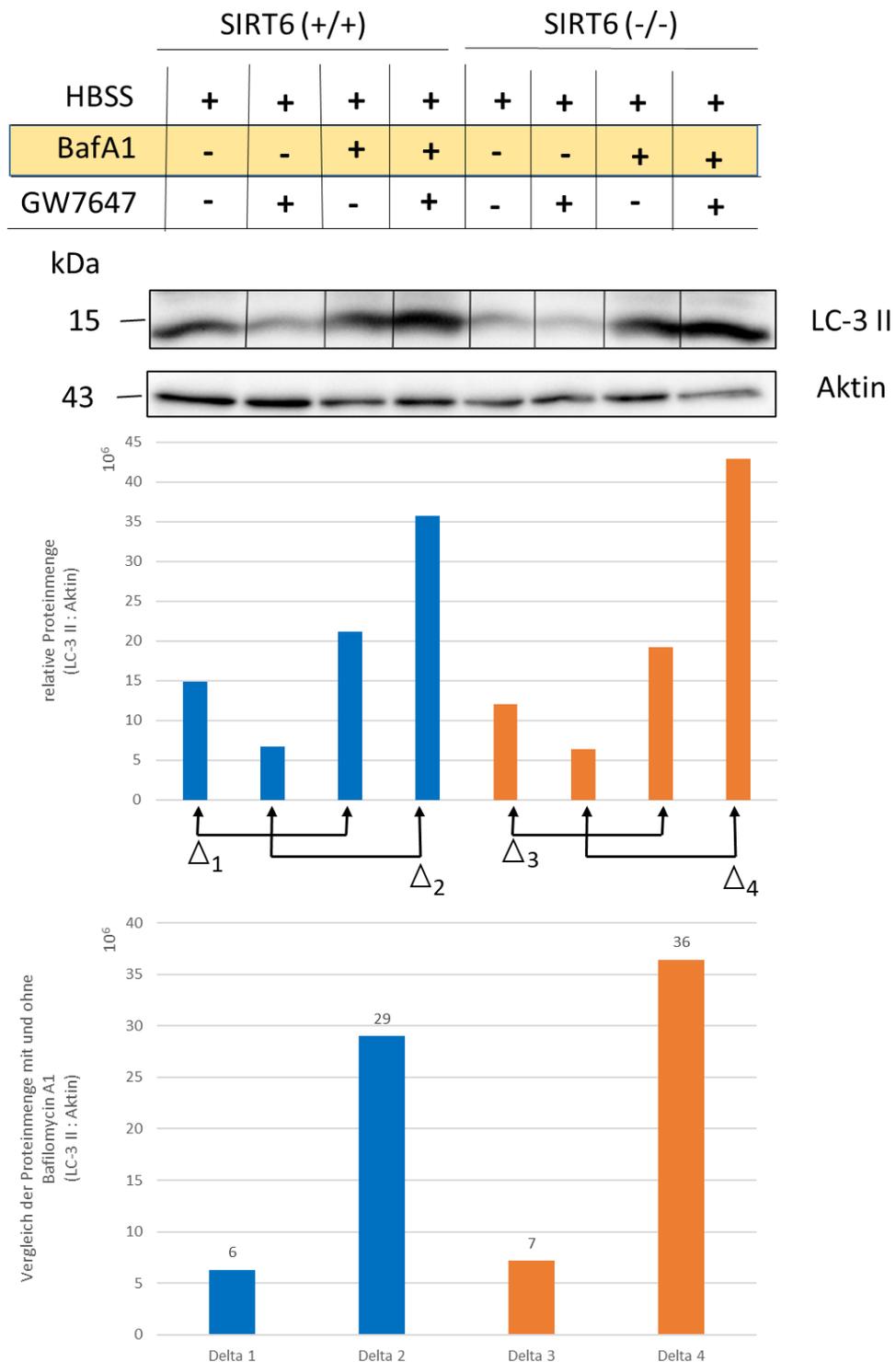


Abbildung 20: Auswertung des LC-3 Turnover Assays nach Stimulation des PPAR α -Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression unter Hungerbedingungen

HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (e7, Bande 1-4) oder Defizienz (2.39, Bande 5-8) wurden alle einer fünfstündigen Hungerepisode in HBSS (+) ausgesetzt. Dazu erfolgte in ausgewählten Proben eine Behandlung mit Bafilomycin A1 mit einer Konzentration von 100nM über fünf Stunden (Bande 3 und 4, 7 und 8) und eine 24-stündige Behandlung mit dem PPAR α -Agonisten GW 7647 mit einer Konzentration von 1 μ M (Bande 2 und 4, 6 und 8). Zur Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten mit dem ImageLab-Programm ausgewertet. Die LC-3-II Banden wurden mit den zugehörigen Aktin-Banden normalisiert und die relative Menge des LC-3-II Proteins berechnet.

Die SIRT6-exprimierenden Zellen zeigen unter Hungerbedingungen einen Anstieg des autophagischen Flusses (Abb. 20, Delta 1 = 6×10^6), dieser wird durch die Stimulation des PPAR α -Rezeptors noch verstärkt (Abb. 20, Delta 2 = 29×10^6).

Bei den SIRT6-defizienten Zellen steigt unter Hungerbedingungen ebenfalls der autophagische Fluss an (Abb. 20, Delta 3 = 7×10^6), die Stimulation des PPAR α -Rezeptors führt dabei zu einem stärkeren Anstieg im Vergleich zu den SIRT6-exprimierenden Zellen (Abb.20, Delta 4 = 36×10^6).

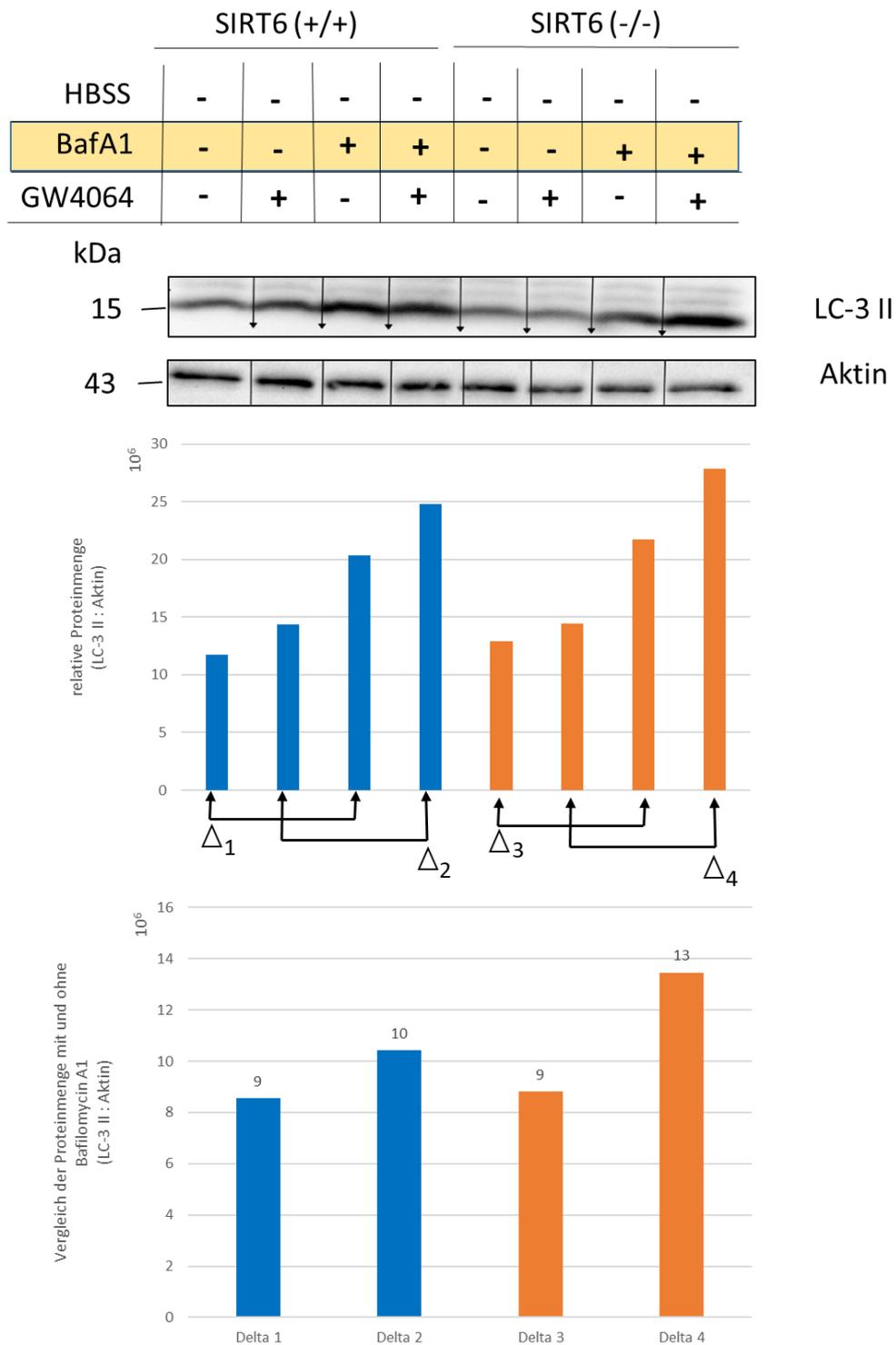


Abbildung 21: Auswertung des LC-3 Turnover Assays nach Stimulation des FXR-Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression

HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (e7, Bande 1-4) oder Defizienz (2.39, Bande 5-8) wurden im nährstoffreichen DMEM-Medium (HBSS -) untersucht. Dazu erfolgte in ausgewählten Proben eine Behandlung mit Bafilomycin A1 mit einer Konzentration von 100nM über fünf Stunden (Bande 3 und 4, 7 und 8) und eine 24-stündige Behandlung mit dem FXR-Agonisten GW 4064 mit einer Konzentration von 10µM (Bande 2 und 4, 6 und 8). Zur Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten mit dem ImageLab-Programm ausgewertet. Die LC-3-II Banden wurden mit den zugehörigen Aktin-Banden normalisiert und die relative Menge des LC-3-II Proteins berechnet.

Unter basalen Bedingungen im nährstoffreichen DMEM-Medium zeigen sowohl die SIRT6-exprimierenden als auch die defizienten Zellen einen Anstieg im autophagischen Fluss (Abb. 21, Delta 1 und 3 jeweils 9×10^6). Eine zusätzliche Behandlung mit dem Agonisten für den FXR-Rezeptor führt in den SIRT6-exprimierenden Zellen zu einem sehr geringen Anstieg des autophagischen Flusses, bei den SIRT6-defizienten fällt dieser stärker aus (Abb. 21, Delta 4 = 13×10^6).

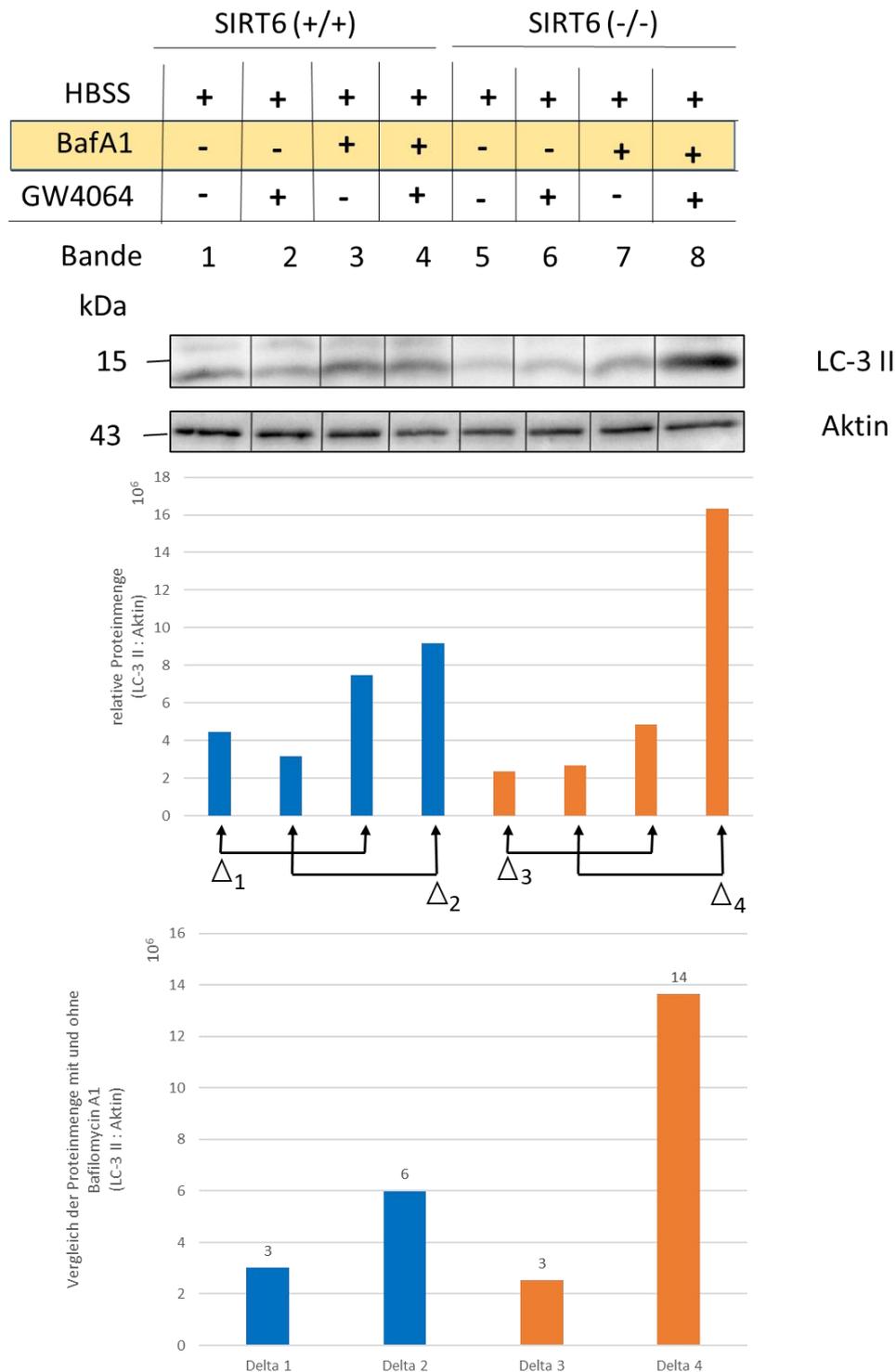


Abbildung 22: Auswertung des LC-3 Turnover Assays nach Stimulation des FXR-Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression unter Hungerbedingungen

HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (e7, Bande 1-4) oder Defizienz (2.39, Bande 5-8) wurden alle einer fünfstündigen Hungerepisode in HBSS (+) ausgesetzt. Dazu erfolgte in ausgewählten Proben eine Behandlung mit Bafilomycin A1 mit einer Konzentration von 100nM über fünf Stunden (Bande 3 und 4, 7 und 8) und eine 24-stündige Behandlung mit dem FXR-Agonisten GW 4064 mit einer Konzentration von 10µM (Bande 2 und 4, 6 und 8). Zur Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten mit dem ImageLab-Programm ausgewertet. Die LC-3-II Banden wurden mit den zugehörigen Aktin-Banden normalisiert und die relative Menge des LC-3-II Proteins berechnet.

Die SIRT6-exprimierenden Zellen zeigen unter Hungerbedingungen einen Anstieg des autophagischen Flusses, ebenso die SIRT6-defizienten Zellen (Abb. 22, Delta 1 und 3 jeweils 3×10^6). Die Behandlung mit dem Agonisten für den FXR-Rezeptor erhöht den autophagischen Fluss unter Hungerbedingungen sowohl bei den SIRT6-exprimierenden als auch defizienten Zellen. Jedoch zeigt die Berechnung einen zweifach erhöhten autophagischen Fluss in den defizienten Zellen (Abb.22, Delta 4 = 14×10^6).

Aus den Abbildungen 19-22 lassen sich folgende Aussagen zusammenfassen:

I. Einfluss der SIRT6-Expression auf die autophagische Aktivität unter Standard-Kulturbedingungen

Die SIRT6-Expression hat keinen Einfluss auf den autophagischen Fluss unter den Standard-Kulturbedingungen, da in den Abbildungen 19 und 21 Delta 1 zu Delta 3 nahezu gleich war. Einzige Ausnahme ist Abbildung 19, hier kam es zu einem negativen Delta bei den SIRT6-exprimierenden Zellen.

II. Einfluss der SIRT6-Expression auf die autophagische Aktivität unter Hungerbedingungen

Die SIRT6-Expression hat keinen Einfluss auf den autophagischen Fluss unter Hungerbedingungen, da in den Abbildungen 20 und 22 Delta 1 zu Delta 3 nahezu gleich war.

III. Wirkung der Agonisten für nukleäre Rezeptoren auf den autophagischen Fluss unter Standard- und Hungerbedingungen in Abhängigkeit einer SIRT6-Expression

Sowohl eine Behandlung mit dem Agonisten für PPAR α als auch für FXR führte zu einer Zunahme des autophagischen Flusses in SIRT6-exprimierenden und defizienten Zellen (vgl. Abbildung 19-22 Delta 2 und Delta 4). Einzige Ausnahme stellt hier Abbildung 19 dar, in der es bei den SIRT6-exprimierenden Zellen zu keiner Zunahme kam. Unter Hungerbedingungen und einer Behandlung mit den Agonisten für nukleäre Rezeptoren viel die Zunahme des autophagischen Flusses bei SIRT6-defizienten

Zellen stets stärker aus (vgl. Abbildung 20 und 22 Delta 2 zu Delta 4) als bei den SIRT6-exprimierenden Zellen.

4.4.2 Untersuchung der autophagischen Aktivität mit Hilfe des p62-Proteinabbaus

Eine weitere Möglichkeit, die Autophagie zu quantifizieren, ist die Untersuchung des Abbaus des p62-Proteins im Western Blot.

Im Gegensatz zu LC-3 II wird p62 während der Autophagie abgebaut. Eine Hochregulation der Autophagie durch z.B. einen Stimulus wie ein Hunger-Medium geht mit einer Abnahme der Bandenintensität im Western-Blot einher. Auch hier wird Bafilomycin A1 eingesetzt. Da p62 während der Autophagie an LC-3 II gebunden ist, erfolgt durch die Zugabe von Bafilomycin A1 auch eine Akkumulation von p62. Durch die Zugabe von Autophagie-Aktivatoren oder -inhibitoren sowie Bafilomycin A1 kann der p62-Abbau untersucht werden, welcher als Index für die autophagische Degradierung dient. Der Unterschied im p62-Signal zwischen Banden mit und ohne Bafilomycin A1-Behandlung repräsentiert den Gehalt an p62, der im Autolysosom abgebaut worden wäre. Um den Abbau des p62-Proteins im Western Blot zu untersuchen, wurden die unter 4.4.1 generierten Proben erneut aufgetragen und mit einem p62-spezifischen Antikörper die Proteinmenge detektiert.

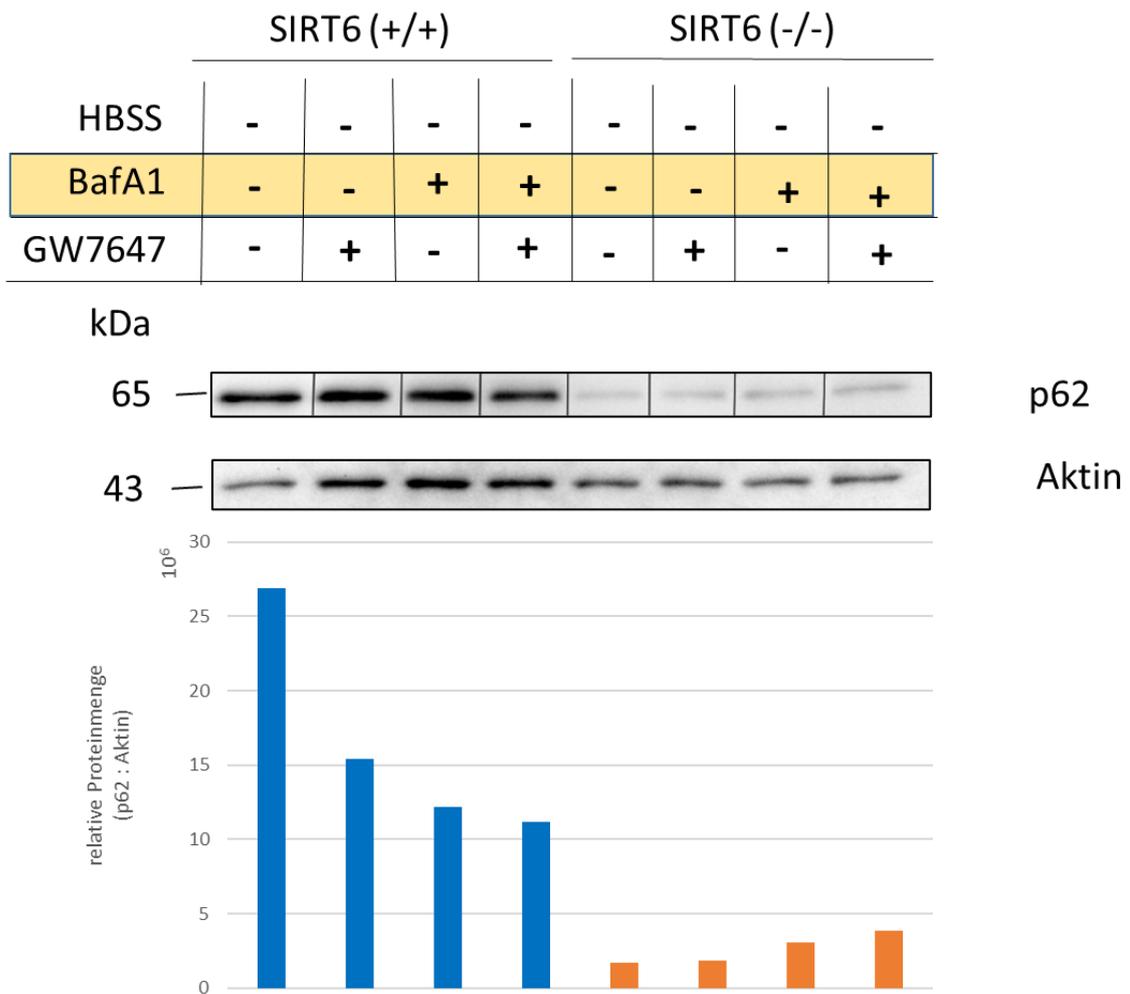


Abbildung 23: Auswertung des p62-Proteinabbaus nach Stimulation des PPAR α -Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression

HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (e7, Bande 1-4) oder Defizienz (2.39, Bande 5-8) wurden im nährstoffreichen DMEM-Medium (HBSS -) untersucht. Dazu erfolgte in ausgewählten Proben eine Behandlung mit Bafilomycin A1 mit einer Konzentration von 100nM über fünf Stunden (Bande 3 und 4, 7 und 8) und eine 24-stündige Behandlung mit dem PPAR α -Agonisten GW 7647 mit einer Konzentration von 1 μ M (Bande 2 und 4, 6 und 8). Zur Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten mit dem ImageLab-Programm ausgewertet. Die p62-Banden wurden mit den zugehörigen Aktin-Banden normalisiert und die relative Menge des p62-Proteins berechnet.

Die SIRT6-exprimierenden Zellen zeigen eine höhere p62-Proteinmenge im Vergleich zu den SIRT6-defizienten. Die SIRT6-defizienten Zellen zeigen keinen Einfluss einer Behandlung mit Bafilomycin A1 oder einer Stimulation des PPAR α -Rezeptors auf die p62-Proteinmenge. Unter den nährstoffreichen Bedingungen kommt es zu einer Abnahme von p62 in den SIRT6-exprimierenden Zellen (Abb. 23, Abnahme zwischen Bande 1 und 3). Da die Banden mit Zugabe von Bafilomycin A1 (Bande 3 und 4) sehr

viel geringere p62-Proteinmengen zeigen, obwohl hier eine Akkumulation erwartet wird, ist keine weitere Aussage aus diesem Blot möglich.

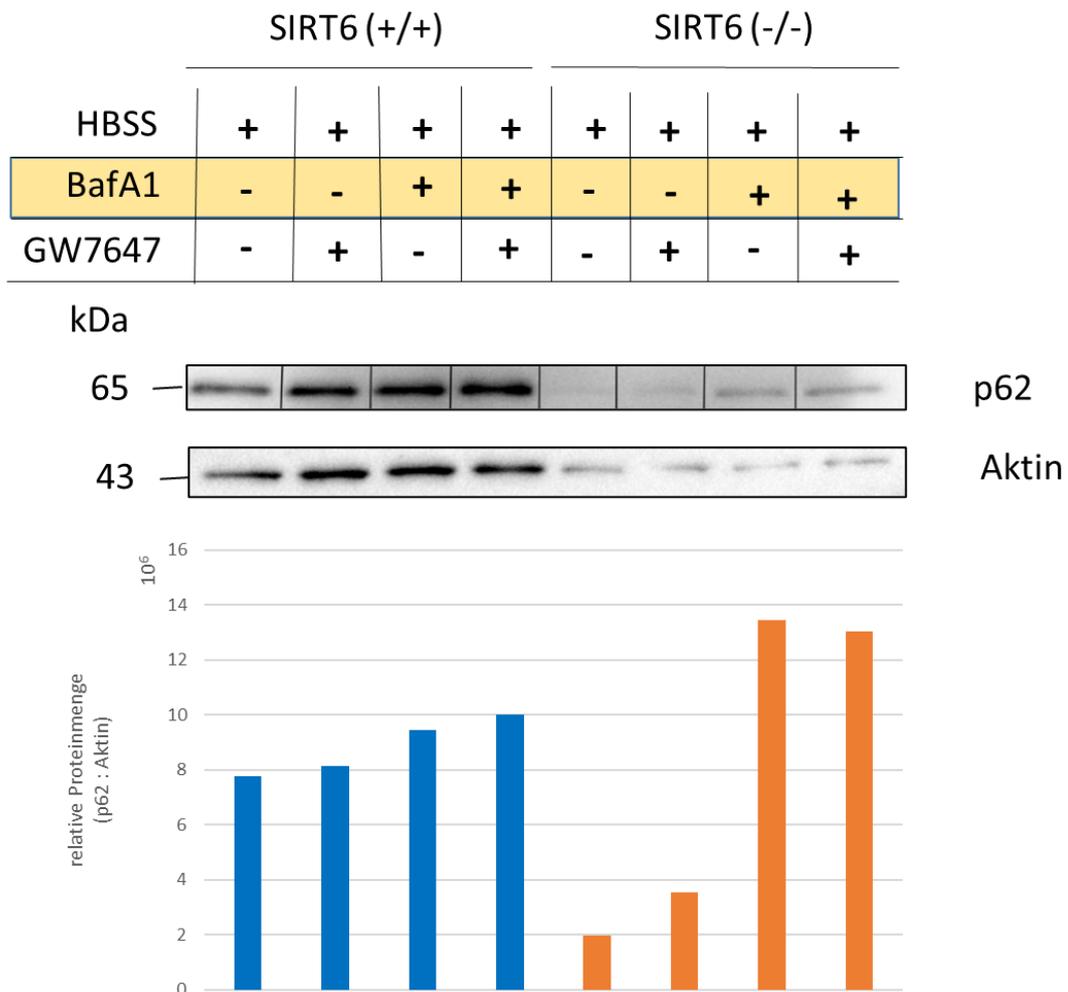


Abbildung 24: Auswertung des p62-Proteinabbaus nach Stimulation des PPAR α -Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression unter Hungerbedingungen

HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (e7, Bande 1-4) oder Defizienz (2.39, Bande 5-8) wurden alle einer fünfstündigen Hungerepisode in HBSS (+) ausgesetzt. Dazu erfolgte in ausgewählten Proben eine Behandlung mit Bafilomycin A1 mit einer Konzentration von 100nM über fünf Stunden (Bande 3 und 4, 7 und 8) und eine 24-stündige Behandlung mit dem PPAR α -Agonisten GW 7647 mit einer Konzentration von 1 μ M (Bande 2 und 4, 6 und 8). Zur Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten mit dem ImageLab-Programm ausgewertet. Die p62-Banden wurden mit den zugehörigen Aktin-Banden normalisiert und die relative Menge des p62-Proteins berechnet.

Die SIRT6-exprimierenden Zellen zeigen eine höhere p62-Proteinmenge im Vergleich zu den SIRT6-defizienten. Unter Hungerbedingungen kommt es zu einer leichten Zunahme von p62 in den SIRT6-exprimierenden Zellen (Abb. 24, Zunahme von Bande 1 zu 3). Dies repräsentiert eine höhere Menge an p62, das im Lysosom abgebaut worden wäre, und die autophagische Degradierung ist durch die Hungerbedingungen

gesteigert. Auch die Behandlung mit dem PPAR α -Agonisten führt zu einer leicht gesteigerten autophagischen Degradierung (Abb. 24, Zunahme von Bande 2 zu 4). Bei den SIRT6-defizienten Zellen kommt es zu einem sprunghaften Anstieg in den Banden 7 und 8 in Abbildung 24. Die starke Zunahme der Banden kann als Resultat der Normalisierung bei geringem Aktin-Signal gewertet werden.

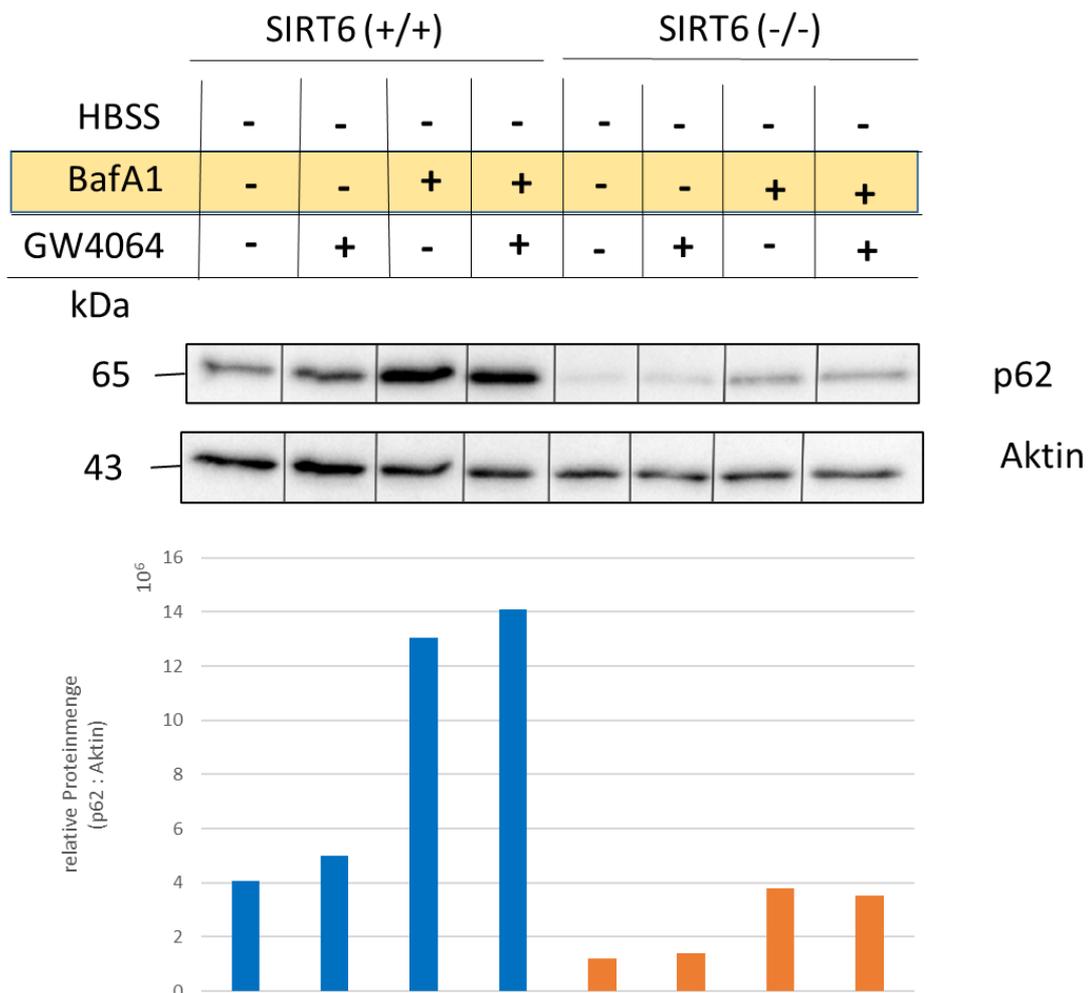


Abbildung 25: Auswertung des p62-Proteinabbaus nach Stimulation des FXR-Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression

HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (e7, Bande 1-4) oder Defizienz (2.39, Bande 5-8) wurden im nährstoffreichen DMEM-Medium (HBSS -) untersucht. Dazu erfolgte in ausgewählten Proben eine Behandlung mit Bafilomycin A1 mit einer Konzentration von 100nM über fünf Stunden (Bande 3 und 4, 7 und 8) und eine 24-stündige Behandlung mit dem FXR-Agonisten GW 4064 mit einer Konzentration von 10 μ M (Bande 2 und 4, 6 und 8). Zur Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten mit dem ImageLab-Programm ausgewertet. Die p62-Banden wurden mit den zugehörigen Aktin-Banden normalisiert und die relative Menge des p62-Proteins berechnet.

Die SIRT6-exprimierenden Zellen zeigen eine höhere p62-Proteinmenge im Vergleich zu den SIRT6-defizienten. Unter Standard-Kulturbedingungen kommt es durch die Zugabe von Bafilomycin A1 zu einer starken Zunahme der p62-Menge (Abb. 25,

Zunahme von Bande 1 zu 3). Dies ist bei den SIRT6-defizienten Zellen schwächer ausgeprägt (Abb. 25, geringere Zunahme von Bande 5 zu 7). Eine Behandlung mit dem FXR-Agonisten führt ebenfalls zu einer Zunahme der p62-Proteinmenge (Abb. 25, Zunahme von Bande 2 zu 4). Dies weist darauf hin, dass mehr p62 im Lysosom abgebaut worden wäre, und dass demnach die Behandlung die autophagische Aktivität gesteigert hat. Dies ist bei den SIRT6-defizienten Zellen viel geringer ausgeprägt (Abb. 25, schwächere Zunahme von Bande 6 zu 8).

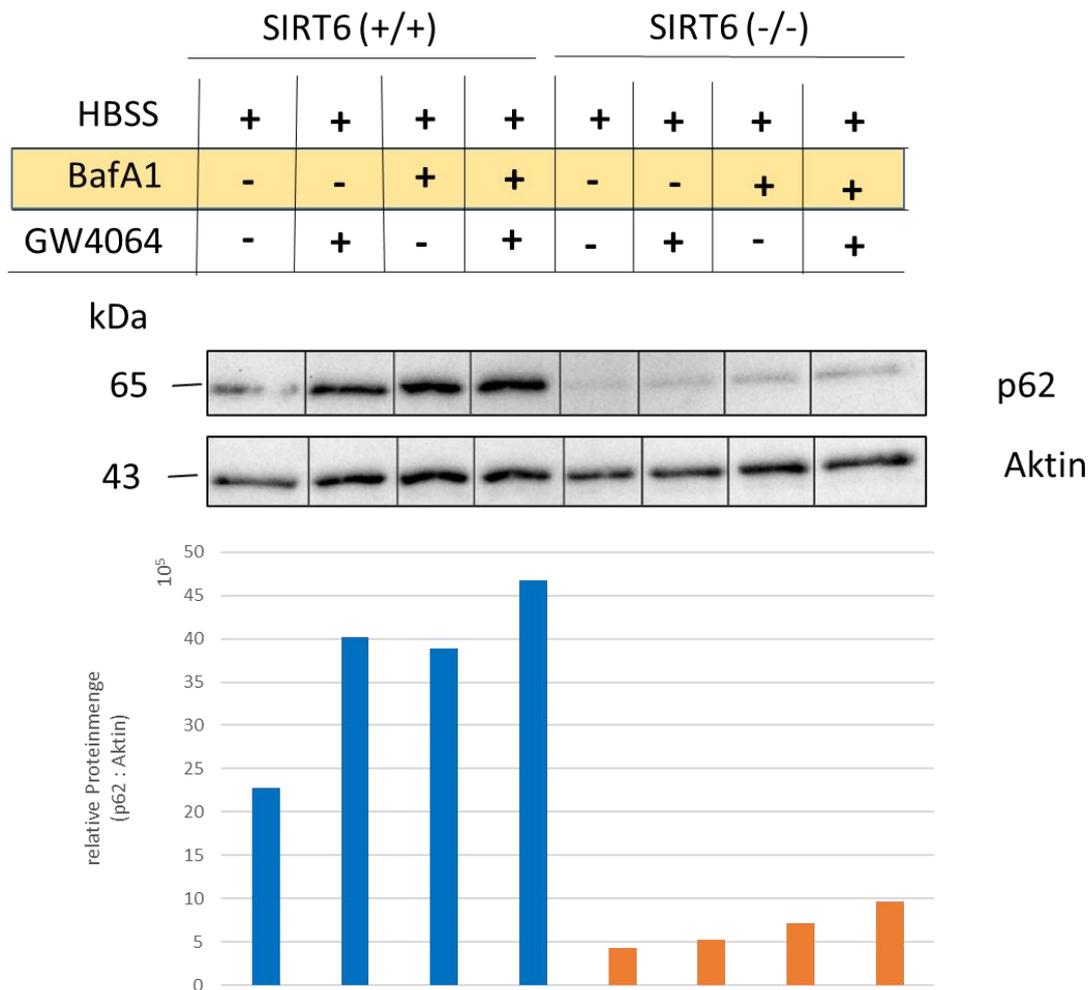


Abbildung 26: Auswertung des p62-Proteinabbaus nach Stimulation des FXR-Rezeptors in Abhängigkeit einer SIRT6 Expression unter Hungerbedingungen

HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (e7, Bande 1-4) oder Defizienz (2.39, Bande 5-8) wurden alle einer fünfstündigen Hungerepisode in HBSS (+) ausgesetzt. Dazu erfolgte in ausgewählten Proben eine Behandlung mit Bafilomycin A1 mit einer Konzentration von 100nM über fünf Stunden (Bande 3 und 4, 7 und 8) und eine 24-stündige Behandlung mit dem FXR-Agonisten GW 4064 mit einer Konzentration von 10 μ M (Bande 2 und 4, 6 und 8). Zur Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten mit dem ImageLab-Programm ausgewertet. Die p62-Banden wurden mit den zugehörigen Aktin-Banden normalisiert und die relative Menge des p62-Proteins berechnet.

Die SIRT6-exprimierenden Zellen zeigen eine höhere p62-Proteinmenge im Vergleich zu den SIRT6-defizienten. Unter den Hungerbedingungen reagieren die SIRT6-exprimierenden Zellen mit einer Zunahme der p62-Proteinmenge bei Bafilomycin A1-Zugabe (Abb. 26, Zunahme von Bande 1 zu 3). Dies weist daraufhin, dass mehr p62 im Lysosom abgebaut wird und die autophagische Degradierung durch die Hungerbedingungen zunimmt. Bei den SIRT6-defizienten Zellen fällt die Zunahme an p62 sehr viel geringer aus (Abb.26, Bande 5 zu 7). Eine Behandlung mit dem FXR-Agonisten führt ebenfalls zu einer Zunahme der p62-Proteinmenge (Abb. 26, Zunahme von Bande 2 zu 4). Dies weist daraufhin, dass mehr p62 im Lysosom abgebaut worden wäre und dass demnach die Behandlung die autophagische Aktivität gesteigert hat. Aufgrund der sehr schwachen p62-Expression ist dies bei den SIRT6-defizienten Zellen geringer ausgeprägt (Abb.26, schwächere Zunahme von Bande 6 zu 8).

Aus den Abbildungen 23-26 lassen sich folgende Aussagen zusammenfassen:

I. Einfluss einer SIRT6-Expression auf die p62-Proteinmenge unter Standard- und Hungerbedingungen

In allen gezeigten Abbildungen (Ausnahme: Abbildung 24) ist die p62-Proteinmenge in SIRT6-defizienten Zellen stets geringer im Vergleich zu SIRT6-exprimierenden Zellen. Die Zugabe von Bafilomycin A1 führt zu einer Erhöhung der p62-Proteinmenge durch Akkumulation. Dies ist in SIRT6-exprimierenden Zellen ebenfalls stärker ausgeprägt als in SIRT6-defizienten Zellen (mit Ausnahme von Abb. 24).

II. Wirkung der Agonisten für nukleäre Rezeptoren auf den p62-Proteinabbau unter Standard- und Hungerbedingungen in Abhängigkeit einer SIRT6-Expression

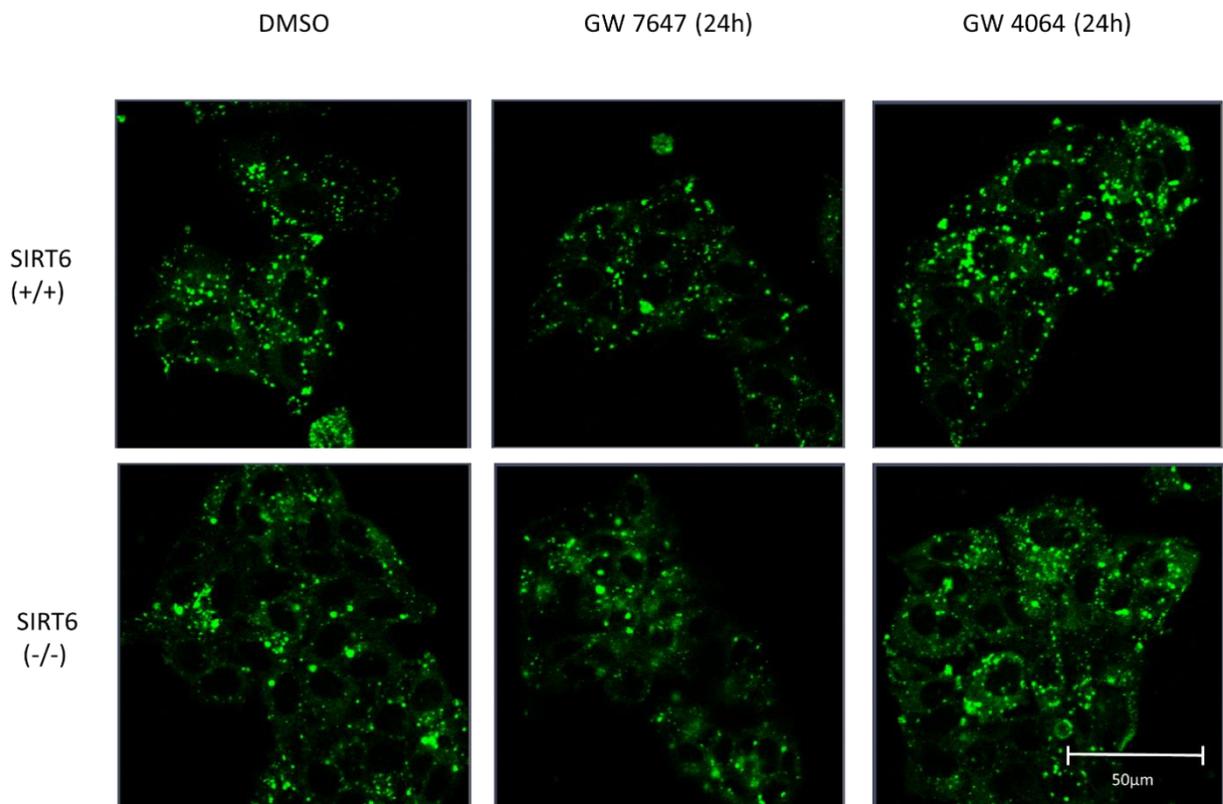
Sowohl die Behandlung mit dem Agonisten für PPAR α als auch für FXR führte zu einer Zunahme des p62-Proteinabbaus, der gleichzusetzen ist mit einer erhöhten autophagischen Aktivität, in SIRT6-exprimierenden Zellen. Einzige Ausnahme stellt hier Abbildung 23 dar, in der es bei den SIRT6-exprimierenden Zellen zu keiner Zunahme kam. In SIRT6-defizienten Zellen hat eine Behandlung mit den Agonisten für nukleäre Rezeptoren oder Hungerbedingungen kaum Einfluss auf den p62-

Proteinabbau bzw. in einem viel geringeren Umfang als bei SIRT6-exprimierenden Zellen.

4.4.3 Einfluss der SIRT6-Expression und der Agonisten für nukleäre Rezeptoren auf die Bildung autophagischer Vakuolen

Mithilfe der Monodansylcadaverine-Färbung (MDC) können in vitalen Zellen autophagische Vakuolen angefärbt werden. Dies ist im Methodenteil genauer beschrieben.

a)



b)

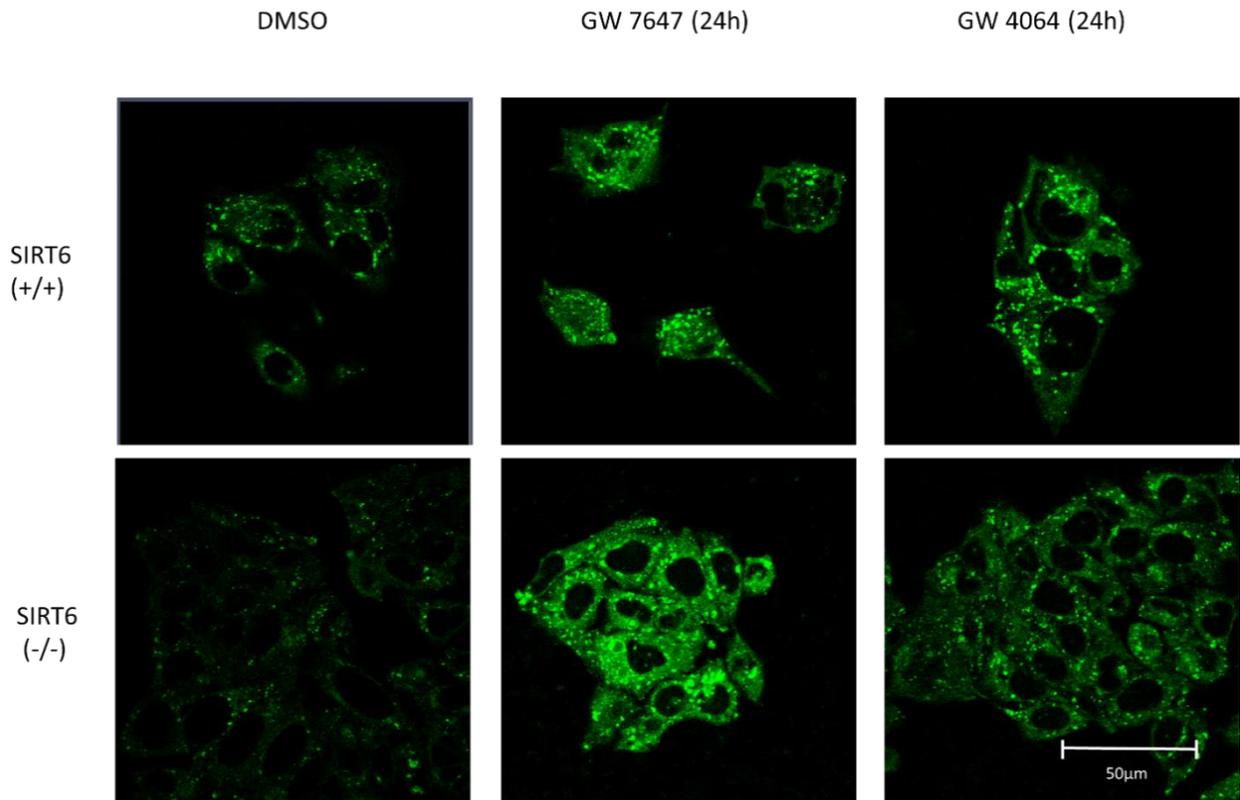


Abbildung 27: Monodansylcadaverine-Färbung von SIRT6-exprimierenden und -defizienten HepG2-Zellen

HepG2 Zellen e7 (SIRT6 +/+) und 1.23 (SIRT6 -/-) in a) und e8 (SIRT6 +/+) und 2.39 (SIRT6 -/-) in b) wurden mit den Agonisten für die nukleären Rezeptoren PPAR α (GW 7647, 1 μ m) und FXR (GW 4064, 10 μ m) für 24 Stunden behandelt. Die MDC-Färbung (50 μ M) erfolgte mit einer Wärmeplatte auf dem LSM. Die Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und der Software ZEN. Das MDC-Signal ist grün dargestellt. Die eingefügte Skala entspricht 50 μ m.

Die MDC-Färbungen weisen auf einen Unterschied zwischen den SIRT6-exprimierenden und -defizienten Zellen hin. Die oberen Reihen zeigen jeweils die SIRT6-exprimierenden Zellen. Das grüne Signal entspricht dabei den durch MDC angefärbten Strukturen. In den oberen Bildreihen ist das Signal kompakt-punktförmig. Im Gegensatz dazu ist das Signal in den SIRT6-defizienten Zellen eher diffus zu sehen. Zwar sind auch in den unteren Bildreihen punktförmige Signale zu sehen, diese sind jedoch stärker von einem diffusen Signal begleitet als es bei den SIRT6-exprimierenden Zellen der Fall ist. Die Behandlung mit den Agonisten für den nukleären Rezeptor PPAR α führt dabei zu einer leichten Zunahme des Signals, während dies nach der Stimulation des FXR-Rezeptors nicht zu beobachten ist.

4.5 Einfluss der SIRT6-Expression auf die Expression der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR

Da SIRT6 als Histon-Deacetylase die Expression von Genen beeinflussen kann, wurde im Folgenden untersucht, ob eine SIRT6-Expression die Proteinmenge und Zielgene von PPAR α und FXR beeinflusst.

4.5.1 Untersuchung der PPAR α -Proteinmenge im Western-Blot

Um zu untersuchen, wie sich eine SIRT6-Expression auf die Proteinmenge von PPAR α auswirkt, wurden zwei Zellklonpaare unter basalen Bedingungen auf das PPAR α -Protein im Western-Blot untersucht. Um die Proteinmenge von PPAR α zu stimulieren, wurde ein Zellklonpaar zusätzlich einer dreistündigen Hungerepisode ausgesetzt.

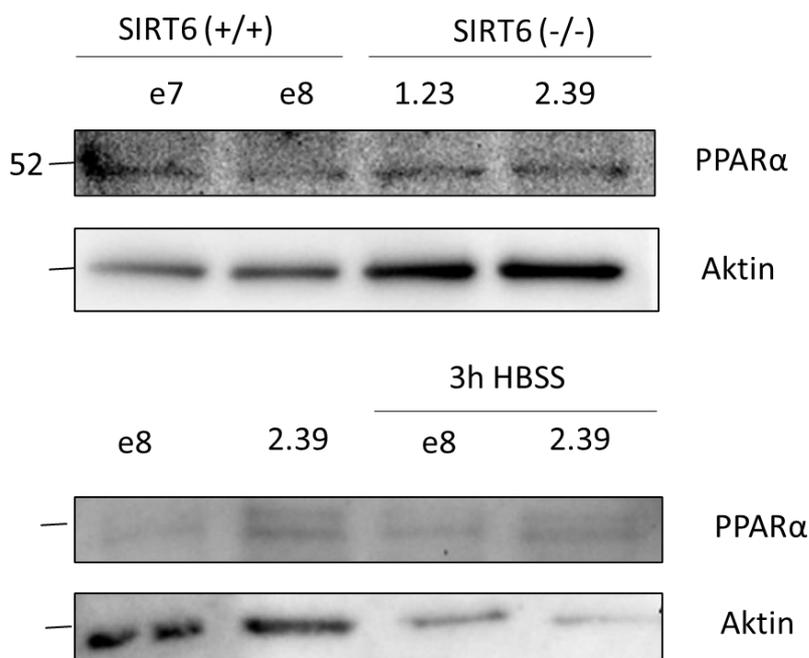


Abbildung 28: Basale Level des nukleären Rezeptor PPAR α (oben) und nach einer 3-stündigen Hungerepisode (unten)

Oben: HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (+/+, e7, e8) bzw. einer -Defizienz (-/-, 1.23, 2.39) wurden unbehandelt auf PPAR α im Western-Blot untersucht. Die Auswertung erfolgte im ChemiDoc. Unten: HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (e8) bzw. einer -Defizienz (2.39) wurden für drei Stunden im HBSS-Medium inkubiert und anschließend auf PPAR α im Western-Blot untersucht. Die Aufnahme erfolgte mittels ChemiDoc und die Quantifizierung der Banden mit ImageLab.

Im oberen Western-Blot zeigten sich Unterschiede zwischen SIRT6-exprimierenden und SIRT6-defizienten Zellen im Signal für PPAR α . Wenn der Aktin-Standard zu Grunde gelegt wird, ergibt sich für die SIRT6-exprimierenden Zellen eine höhere Proteinmenge von PPAR α im Vergleich zu den Defizienten. Der untere Western Blot zeigt die Auswirkungen der Hungerepisode. Hier zeigt sich eine höhere Proteinmenge für PPAR α nach der Hungerepisode, wobei ein Unterschied zwischen SIRT6-exprimierenden und -defizienten Zellen nicht ersichtlich ist.

4.5.2 Subzelluläre Lokalisation des PPAR α -Proteins in SIRT6-exprimierenden und -defizienten HepG2-Zellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass PPAR α ein nukleärer Rezeptor ist, der bei Aktivierung aus dem Zytoplasma in den Nukleus transloziert. Um zu untersuchen, ob SIRT6 einen Einfluss auf die Lokalisation des PPAR α -Proteins bzw. die Wirkung des Agonisten für den PPAR α -Rezeptor hat, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Für diesen Versuch wurden die HepG2-Zellen über einen Zeitraum von sechs bzw. 24 Stunden mit dem Agonisten für PPAR α inkubiert. Im Anschluss folgte die Immunfluoreszenzfärbung.

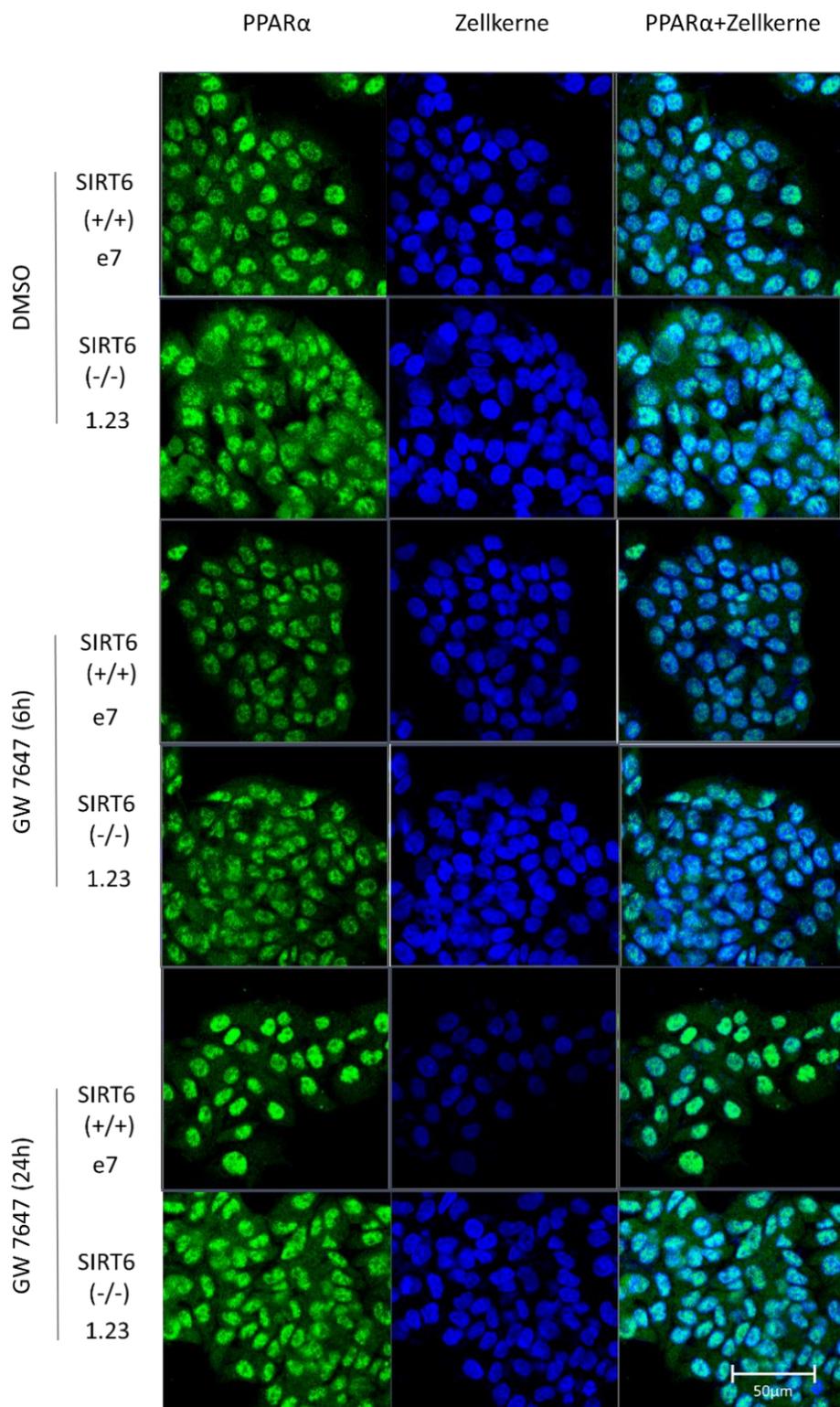


Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung von PPAR α nach Behandlung der HepG2 Zellen e7 (SIRT6 +/+) und 1.23 (SIRT6 -/-) mit dem Agonisten für PPAR α

Die HepG2 Zellen wurden über sechs oder 24 Stunden mit dem Agonisten für den PPAR α Rezeptor (GW 7647, 1 μ M) behandelt. Als Kontrolle wurde eine DMSO-Behandlung durchgeführt. Nach der Fixierung erfolgte die Behandlung mit dem Erst-Antikörper für PPAR α und danach mit dem Zweit-Antikörper Alexa Fluor 488 (goat anti-mouse) und dem Kernfarbstoff Hoechst. Die Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und der Software ZEN. Das PPAR α -Signal ist grün dargestellt, das Kernsignal blau. Die eingefügte Skala entspricht 50 μ m.

Die Immunfärbung zeigt einen Unterschied im Immunfluoreszenzsignal zwischen SIRT6-exprimierenden und -defizienten Zellen. In der Kontrollfärbung ist bei beiden Zellklonen ein diffuses Signal im Zytoplasma zu sehen. Mit Beginn der Behandlung verstärkt sich das Signal für PPAR α bei SIRT6-exprimierenden Zellen im Kern. Nach der 24-stündigen Behandlung stammt das Signal fast ausschließlich aus dem Kern. Im Vergleich dazu bleibt das Signal bei SIRT6-defizienten Zellen auch mit der Behandlung diffus und das Signal im Kern schwächer.

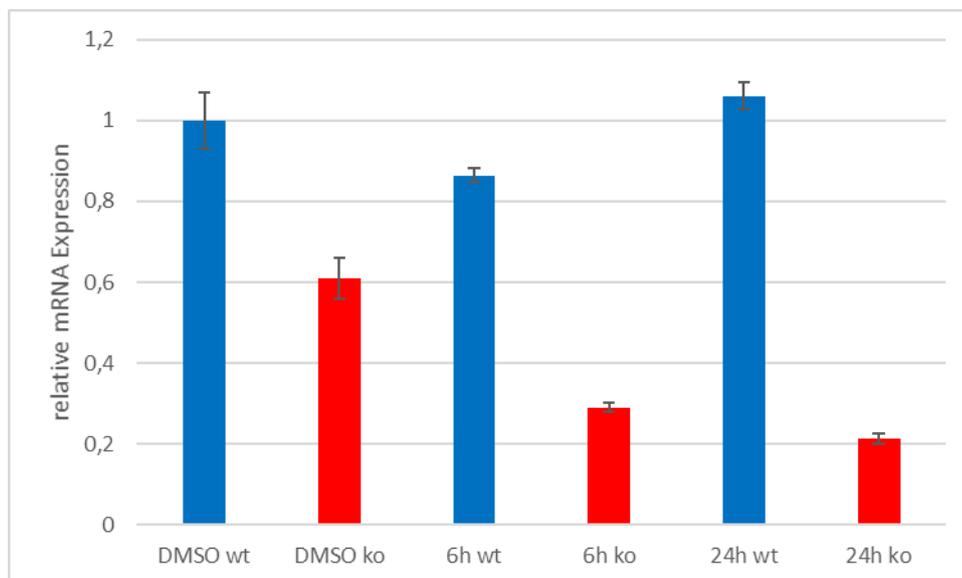
4.5.3 Expression von PPAR α -Zielgenen in Abhängigkeit von der SIRT6-Expression

Um den Einfluss einer SIRT6-Expression auf die transkriptionelle Aktivität des nukleären Rezeptors PPAR α zu untersuchen, wurden zunächst Zielgene, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, ausgewählt. Dazu gehören CYP7A1 und SAA-4, die mittels RT-PCR untersucht wurden.

CYP7A1

Das Gen CYP7A1 codiert für das Enzym Cholesterol-7 α -Hydroxylase. Es gehört zu der Cytochrom P450 Familie und spielt eine wichtige Rolle im Cholesterol-Metabolismus. Hier ist es für den ersten und zugleich geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gallensäuresynthese verantwortlich.

a)



b)

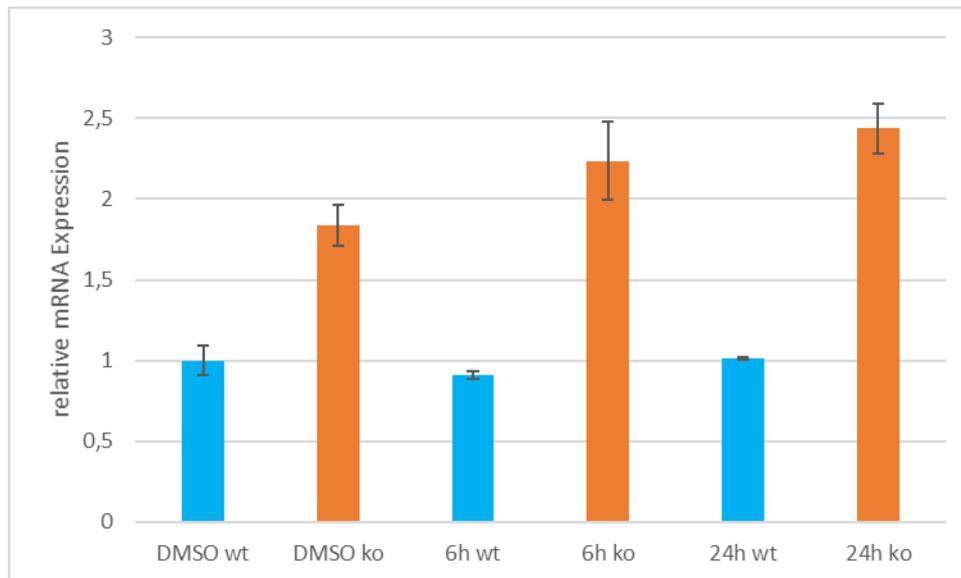


Abbildung 30: Einfluss des PPAR α -Agonisten auf die mRNA-Expression von CYP7A1

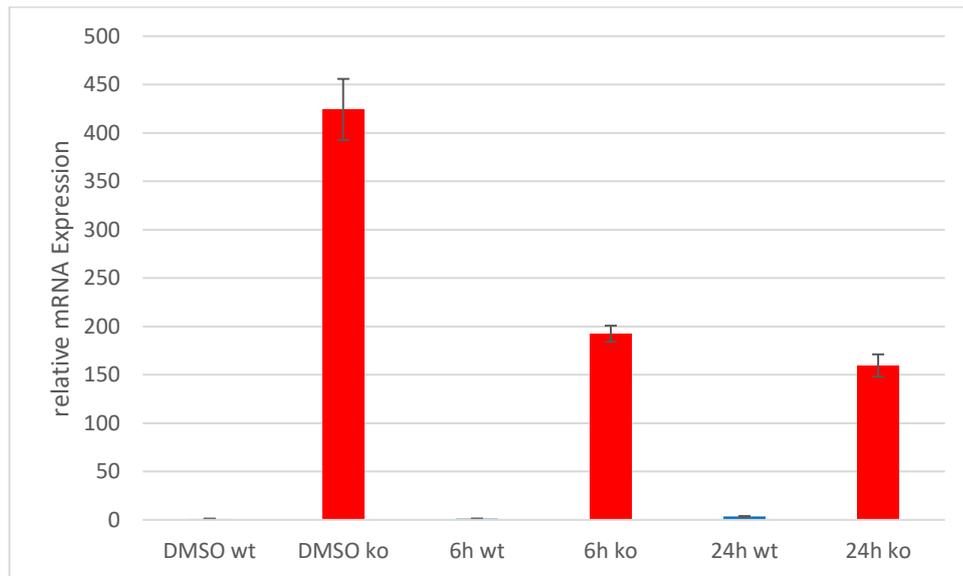
HepG2 Klone e7 (+/+) und 1.23 (-/-) in a) und e8 (+/+) und 2.39 (-/-) in b) wurden mit den Agonisten für PPAR α über 24h mit einer Konzentration von 1 μ M behandelt. Nach der RNA-Isolation wurde diese in cDNA umgeschrieben und mithilfe der quantitativen RT-PCR gemessen. Die Daten wurden mit dem Housekeeping-Gen RPII normalisiert und die CYP7A1-Expression zur Wildtyp DMSO-Kontrolle in Relation gesetzt.

Die RT-PCR zeigt in dem Zellklon-Paar e7/1.23 (Abb. 30a) für die SIRT6-exprimierenden Zellen eine höhere mRNA-Expression von CYP7A1 im Vergleich zu den SIRT6-defizienten Zellen. Bei den SIRT6-exprimierenden Zellen ändert sich die mRNA-Expression von CYP7A1 durch die Behandlung mit dem PPAR α -Agonisten kaum, während die SIRT6-defizienten eine Abnahme zeigen. Das zweite Zellklon-Paar e8/2.39 (Abb. 30b) zeigt für die SIRT6-defizienten Zellen eine höhere mRNA-Expression von CYP7A1 im Vergleich zu den SIRT6-exprimierenden. Eine Behandlung mit dem PPAR α -Agonisten führt bei den SIRT6-defizienten Zellen zu einer Zunahme der mRNA-Expression von CYP7A1, während es bei den SIRT6-exprimierenden Zellen zu keiner Veränderung kommt.

SAA-4

Das Protein SAA-4 ist eine Variante von Serum-Amyloid A, ein Akute-Phase-Protein, welches unter anderem in der Leber synthetisiert wird. Die Varianten SAA-1 und SAA-2 sind induzierbar, zum Beispiel von inflammatorischen Zytokinen. SAA-4 hingegen wird konstitutiv produziert.

a)



b)

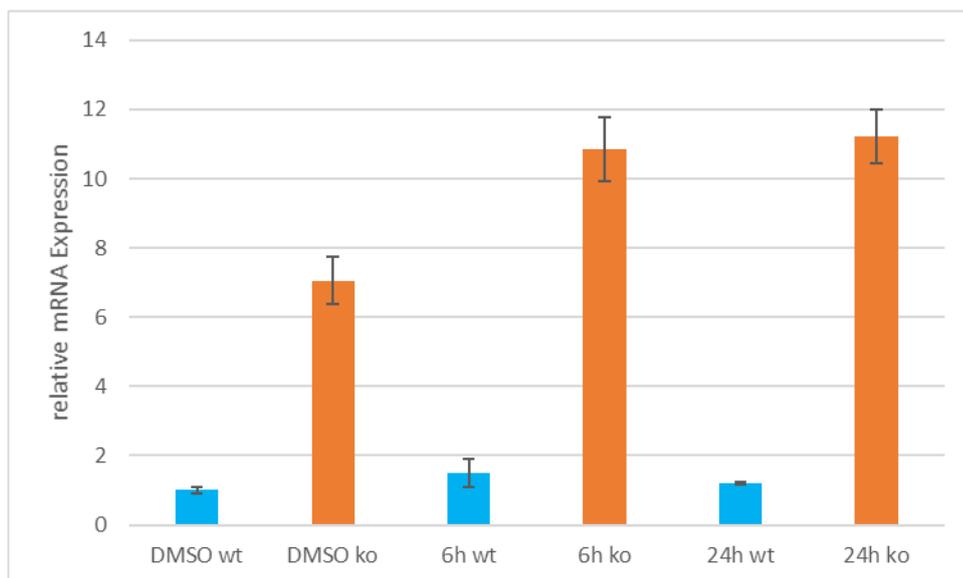


Abbildung 31: Einfluss des PPAR α -Agonisten auf die mRNA-Expression von SAA-4

HepG2 Klone e7 (+/+) und 1.23 (-/-) in a) und e8 (+/+) und 2.39 (-/-) in b) wurden mit den Agonisten für PPAR α über 24h mit einer Konzentration von 1 μ M behandelt. Nach der RNA-Isolation wurde diese in cDNA umgeschrieben und mithilfe der quantitativen RT-PCR gemessen. Die Daten wurden mit dem Housekeeping-Gen RPII normalisiert und die SAA-4-Expression zur Wildtyp DMSO-Kontrolle in Relation gesetzt.

In den untersuchten Zellklonen zeigt sich in der RT-PCR ein starker Unterschied in der SAA-4 Expression. In beiden untersuchten Zellklon-Paaren zeigen die SIRT6-defizienten Zellen eine stark erhöhte mRNA-Expression von SAA-4 im Vergleich zu den SIRT6-exprimierenden. Eine Behandlung mit dem PPAR α -Agonisten führt bei den SIRT6-exprimierenden Zellen zu keiner Veränderung in der mRNA-Expression. Bei

den SIRT6-defizienten Zellen kommt es in einem Zellklonpaar (Abb. 31a) zu einer Abnahme in der Expression, bei einem anderen Zellklonpaar (Abb. 31b) hingegen zu einer Zunahme.

4.5.4 Untersuchung der FXR-Proteinmenge im Western-Blot

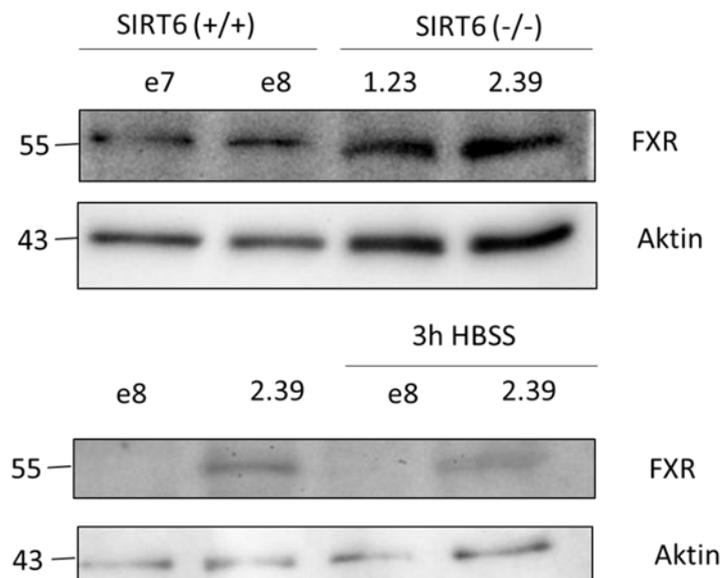


Abbildung 32: Basale Level des nukleären Rezeptor FXR (oben) und nach einer 3-stündigen Hungerepisode (unten)

Oben: HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (+/+, e7, e8) bzw. einer Defizienz (-/-, 1.23, 2.39) wurden unbehandelt auf FXR im Western-Blot untersucht. Die Auswertung erfolgte im ChemiDoc. Unten: HepG2-Klone mit einer SIRT6-Expression (e8) bzw. einer Defizienz (2.39) wurden für drei Stunden im HBSS-Medium inkubiert und anschließend auf FXR im Western-Blot untersucht. Die Aufnahme erfolgte mittels ChemiDoc und die Quantifizierung der Banden mit ImageLab.

Im oberen Western-Blot zeigen die SIRT6-defizienten Zellen eine leicht intensivere Bande im Vergleich zu den SIRT6-exprimierenden Zellen.

Der untere Western Blot zeigt die Auswirkungen der Hungerepisode. Hier zeigt sich erneut eine leicht erhöhte Proteinmenge für FXR vor der Hungerepisode bei den SIRT6-defizienten Zellen. Durch die Hungerepisode kommt es zu keiner Veränderung. Das Signal für FXR bei den SIRT6-exprimierenden Zellen ist kaum messbar, während es bei den SIRT6-defizienten Zellen erneut stärker ist.

4.5.5 Subzelluläre Lokalisation des FXR-Proteins in SIRT6-exprimierenden und -defizienten HepG2-Zellen

Für diesen Versuch wurden die HepG2-Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit dem Agonisten für FXR inkubiert. Im Anschluss folgte die Immunfluoreszenzfärbung. Aus der Literatur ist bekannt, dass FXR ein nukleärer Rezeptor ist, der bei Aktivierung aus dem Zytoplasma in den Nukleus transloziert.

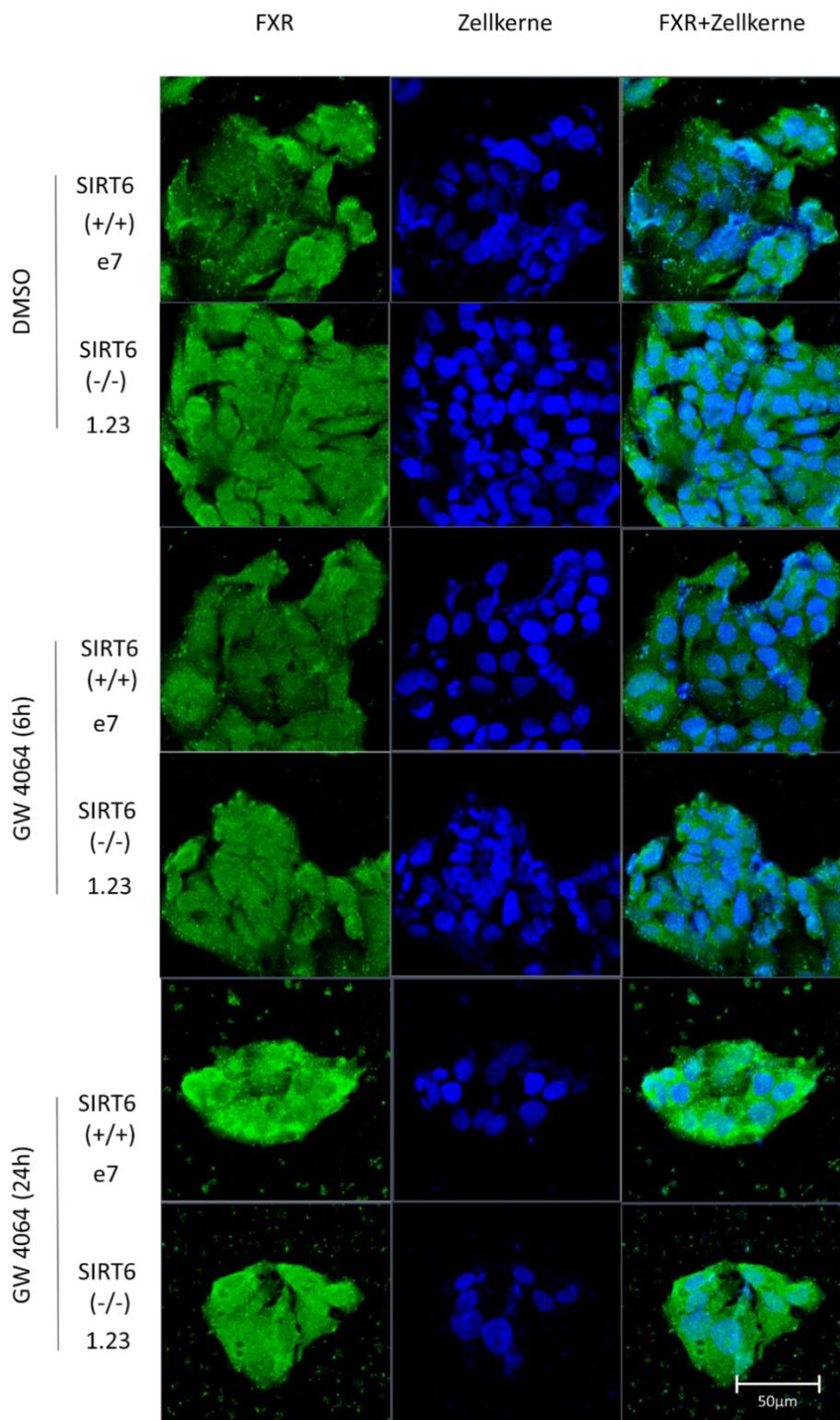


Abbildung 33: Behandlung der HepG2 Zellen e7 (SIRT6 +/+) und 1.23 (SIRT6 -/-) mit dem Agonisten für FXR und Immunfluoreszenzfärbung für FXR

Die HepG2 Zellen wurden über 6 oder 24 Stunden mit dem Agonisten für den FXR Rezeptor (GW 4064, 10µM) behandelt. Als Kontrolle wurde eine DMSO-Behandlung durchgeführt. Nach der Fixierung erfolgte die Behandlung mit dem Erst-Antikörper für FXR und danach mit dem Zweit-Antikörper Alexa Fluor 488 (goat anti-mouse) und dem Kernfarbstoff Hoechst. Die Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und der Software ZEN. Das FXR-Signal ist grün dargestellt, das Kernsignal blau. Die eingefügte Skala entspricht 50µm.

Die Immunfärbung für den FXR-Rezeptor zeigt ein durchgehendes Signal im gesamten Zytoplasma und Zellkern der Zellen. Dies ist sowohl bei SIRT6-exprimierenden als auch -defizienten Zellen der Fall. Zu einem Unterschied kommt es in der Färbung nach der 24-stündigen Behandlung. Hier weisen SIRT6-exprimierende Zellen ein intensiveres Signal im Zytosol auf. Die SIRT6-defizienten Zellen haben im Gegensatz dazu ein insgesamt schwächeres Signal im Zytosol.

4.5.6 Expression von FXR-Zielgenen in Abhängigkeit von der SIRT6-Expression

Um den Einfluss einer SIRT6-Expression auf die transkriptionelle Aktivität des nukleären Rezeptors FXR zu untersuchen, wurden zunächst Zielgene, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, ausgewählt. Dazu gehören SHP, CYP7A1, SULT2A1 und UGT2B4, die mittels RT-PCR untersucht wurden.

Von einer Auswahl dieser Zielgene wurden Primer bestellt und RT-PCR-Analysen durchgeführt. Die Daten wurden mit dem Housekeeping-Gen RPII normalisiert und die Expression zur Wildtyp DMSO-Kontrolle in Relation gesetzt.

SHP

Der small heterodimer partner (SHP) zählt zu den nukleären Rezeptoren. Er kann an eine Vielzahl von nukleären Rezeptoren binden und eine Transkription von Genen inhibieren. Eine Aktivierung von FXR durch Gallensäure führt zur Aktivierung von SHP.

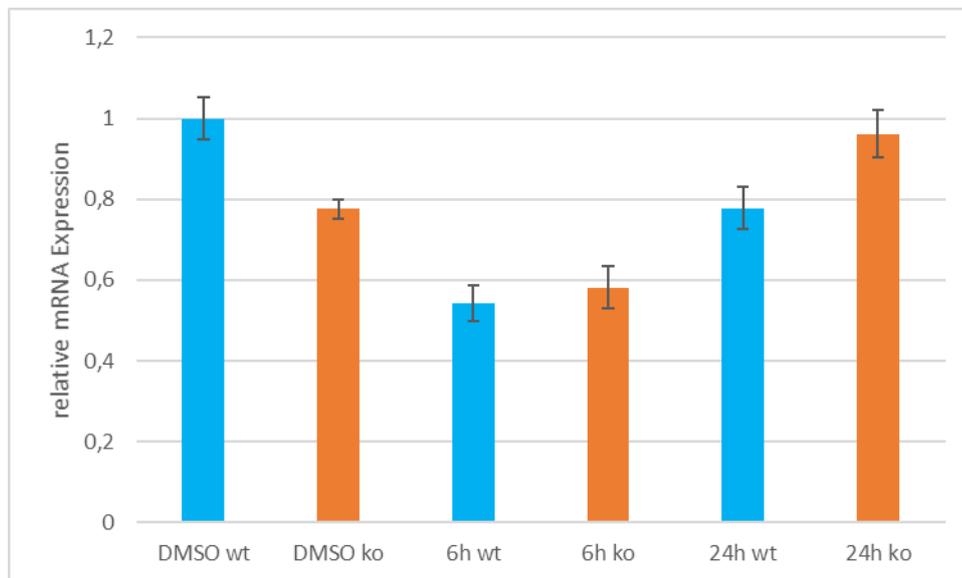


Abbildung 34: Einfluss des FXR-Agonisten auf die mRNA-Expression von SHP

HepG2 Klone e8 (+/+) und 2.39 (-/-) wurden mit den Agonisten für FXR über 24h mit einer Konzentration von 10µM behandelt. Nach der RNA-Isolation wurde diese in cDNA umgeschrieben und mithilfe der quantitativen RT-PCR gemessen. Die Daten wurden mit dem Housekeeping-Gen RPII normalisiert und die SHP-Expression zur Wildtyp DMSO-Kontrolle in Relation gesetzt.

Die RT-PCR dieses Zellklonpaares zeigt keine großen Unterschiede der mRNA von SHP im unbehandelten Zustand. Durch eine Behandlung mit dem Agonisten des FXR-Rezeptors kommt es bei den SIRT6-exprimierenden Zellen zu einer Abnahme der Expression. Bei den SIRT6-defizienten Zellen führt die Behandlung zu einer Zunahme der Expression nach 24 Stunden.

CYP7A1

Das Gen CYP7A1 codiert für das Enzym Cholesterin-7alpha-Hydroxylase. Es gehört zu der Cytochrom P450 Familie und spielt eine wichtige Rolle im Cholesterin-Metabolismus. Hier ist es für den ersten und zugleich geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gallensäuresynthese verantwortlich.

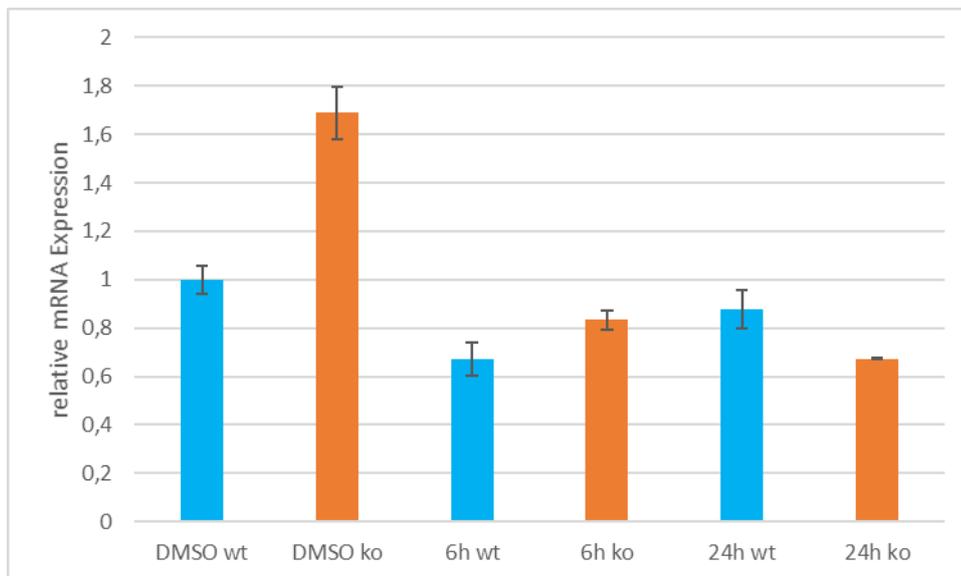


Abbildung 35: Einfluss des FXR-Agonisten auf die mRNA-Expression von CYP7A1

HepG2 Klone e8 (+/+) und 2.39 (-/-) wurden mit den Agonisten für FXR über 24h mit einer Konzentration von 10 μ M behandelt. Nach der RNA-Isolation wurde diese in cDNA umgeschrieben und mithilfe der quantitativen RT-PCR gemessen. Die Daten wurden mit dem Housekeeping-Gen RPII normalisiert und die CYP7A1-Expression zur Wildtyp DMSO-Kontrolle in Relation gesetzt.

Die RT-PCR von CYP7A1 zeigt für die SIRT6-defizienten Zellen eine stärkere mRNA-Expression im unbehandelten Zustand, die durch die Behandlung mit dem FXR-Agonisten abnimmt. Im Vergleich dazu zeigen die SIRT6-exprimierenden Zellen kaum Veränderung in der mRNA-Expression durch die Behandlung.

SULT2A1

SULT2A1 ist ein Gen, das für eine Sulfotransferase kodiert. Diese Enzymgruppe überträgt Sulfogruppen, wodurch Zwischenprodukte von Stoffwechselwegen wie z.B. Steroide und Gallensäuren hydrophil werden und daraufhin ausgeschieden werden können.

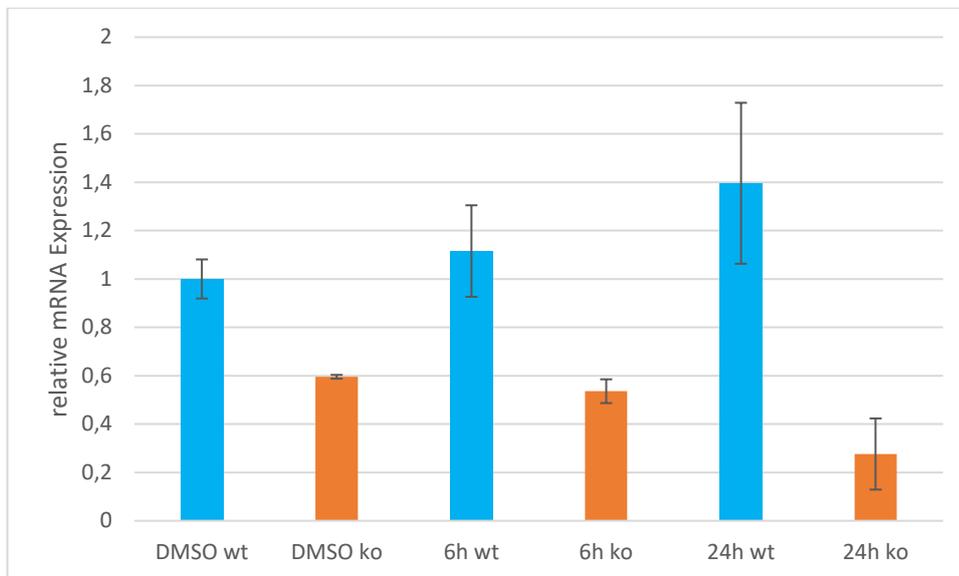


Abbildung 36: Einfluss des FXR-Agonisten auf die mRNA-Expression von SULT2A1

HepG2 Klone e8 (+/+) und 2.39 (-/-) wurden mit den Agonisten für FXR über 24h mit einer Konzentration von 10 μ M behandelt. Nach der RNA-Isolation wurde diese in cDNA umgeschrieben und mithilfe der quantitativen RT-PCR gemessen. Die Daten wurden mit dem Housekeeping-Gen RPII normalisiert und die SULT2A1-Expression zur Wildtyp DMSO-Kontrolle in Relation gesetzt.

Die RT-PCR von SULT2A1 zeigt bei SIRT6-exprimierenden Zellen eine stärkere mRNA-Expression im unbehandelten Zustand und eine Zunahme nach der Behandlung mit dem Agonisten für FXR. Die SIRT6-defizienten Zellen zeigen hingegen eine Abnahme der mRNA-Expression für SULT2A1.

UGT2B4

Das Gen UGT2B4 kodiert für eine UDP-Glukuronyltransferase. Diese konjugieren hydrophobe Moleküle, wie zum Beispiel Bilirubin mit Glucuronsäure. Dies erhöht die Hydrophilie und ermöglicht eine bessere Ausscheidung. Neben körpereigenen Substanzen werden auch Arzneimittel durch diese Konjugation eliminiert.

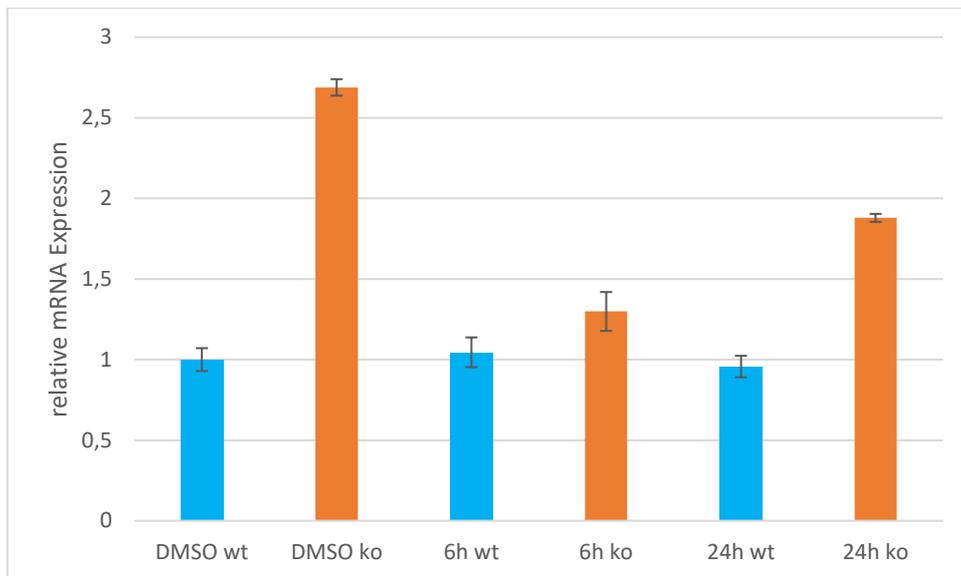


Abbildung 37: Einfluss des FXR-Agonisten auf die mRNA-Expression von UGT2B4

HepG2 Klone e8 (+/+) und 2.39 (-/-) wurden mit den Agonisten für FXR über 24h mit einer Konzentration von 10µM behandelt. Nach der RNA-Isolation wurde diese in cDNA umgeschrieben und mithilfe der quantitativen RT-PCR gemessen. Die Daten wurden mit dem Housekeeping-Gen RPII normalisiert und die UGT2B4-Expression zur Wildtyp DMSO-Kontrolle in Relation gesetzt.

Die RT-PCR zeigt bei SIRT6-exprimierenden Zellen eine geringere mRNA-Expression von UGT2B4 im Vergleich zu SIRT6-defizienten Zellen. Eine Behandlung mit dem Agonisten für FXR ändert die mRNA-Expression von UGT2B4 bei SIRT6-exprimierenden Zellen nicht, während es bei den SIRT6-defizienten zu einer Abnahme kommt.

5. Diskussion

5.1 SIRT6 beeinflusst die p62-Expression

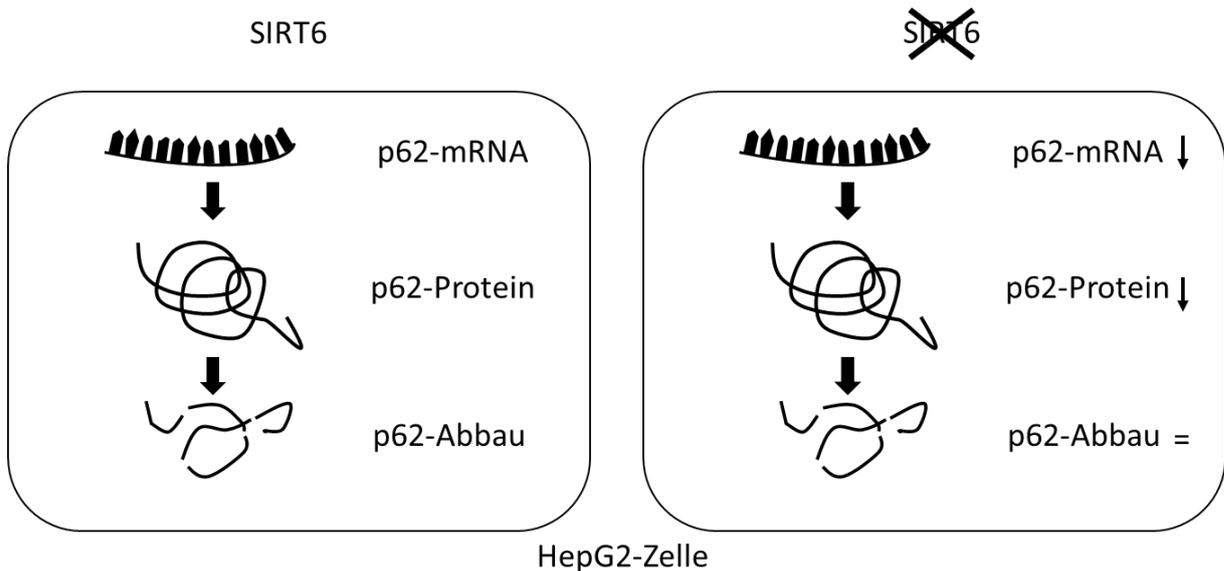


Abbildung 38: Einfluss einer SIRT6-Expression auf das p62-Protein

In den Experimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die p62-Expression in SIRT6-defizienten Zellen reduziert ist. Bei Experimenten mit Quantifizierung der Proteinmenge war diese ebenfalls in den defizienten Zellen reduziert. Mit dem p62-Proteinabbau konnte gezeigt werden, dass dieser Unterschied nicht auf einen erhöhten Abbau von p62 während der Autophagie zurückzuführen ist. (Eigene Abbildung)

p62 hat eine zentrale Funktion bei der Autophagie und ist hierfür ein wichtiger und etablierter Marker (34). Im Rahmen dieser Arbeit wurde er daher neben LC-3 II in allen Experimenten untersucht. Dabei zeigte sich in nahezu allen Experimenten der gleiche Effekt: Sobald SIRT6-exprimierende und SIRT6-defiziente Zellen auf die p62-Proteinmenge verglichen wurden, war in den SIRT6-defizienten Zellen stets eine geringere p62-Proteinmenge nachzuweisen. Dieser Effekt lässt sich auf verschiedenen Ebenen nachweisen.

Die Western-Blot-Untersuchung von unbehandelten SIRT6-defizienten und SIRT6-exprimierenden Zellen zeigt eine intensivere p62-Bande in den SIRT6-exprimierenden Zellen (Abb. 4). Dies zeigt sich auch in allen weiteren Experimenten unter dem Einsatz von Western-Blots (vgl. Abb. 8-9, 23-26). In Experimenten mit Quantifizierung zeigen sich bis zu 10-fache Unterschiede (vgl. Abb. 8-9, 23-26) in der relativen Proteinmenge für das p62-Signal zwischen SIRT6-exprimierenden und -defizienten Zellen. In der Immunfluoreszenz-Färbung wird dieser Unterschied

visualisiert (34). Hier zeigen die SIRT6-exprimierenden Zellen ein intensives, punktförmiges Signal im Zytosol, während das Signal bei SIRT6-defizienten Zellen stets schwächer und diffuser ist (Abb.13 und 14). Auf der Genexpressions-Ebene tritt dieser Effekt ebenfalls auf. Dort haben SIRT6-defiziente Zellen eine bis zu 50% reduzierte Expression im Vergleich zu SIRT6-exprimierenden Zellen (Abb.5). Dieser Effekt bleibt auch nach Aktivierung der nukleären Rezeptoren erhalten (Abb.10-12). Die Untersuchung des p62-Proteinabbaus zeigt zudem, dass dieser Unterschied nicht durch eine erhöhte autophagische Degradation zu erklären ist. Die Zugabe von Bafilomycin A1 führt normalerweise zu einer Akkumulation von p62, da der Abbau im Lysosom verhindert wird (35). Die Banden von unbehandelten SIRT6-defizienten Zellen in Bezug auf p62 zeigen jedoch kaum eine Zunahme (vgl. Abb. 23, 25 und 26).

Zusammengenommen lässt dies den Rückschluss zu, dass eine SIRT6-Defizienz zu einer erniedrigten RNA-Expression und geringeren p62-Proteinmenge in HepG2-Zellen führt. Dies ist eine sehr interessante Entdeckung, erschwert aber die Interpretation der weiteren Experimente, die unter anderem auf dem Vergleich mit der p62-Proteinmenge beruhen. Dies wird unter 5.2/5.3 diskutiert.

5.2 Die SIRT6-Expression beeinflusst die Autophagieregulation der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR

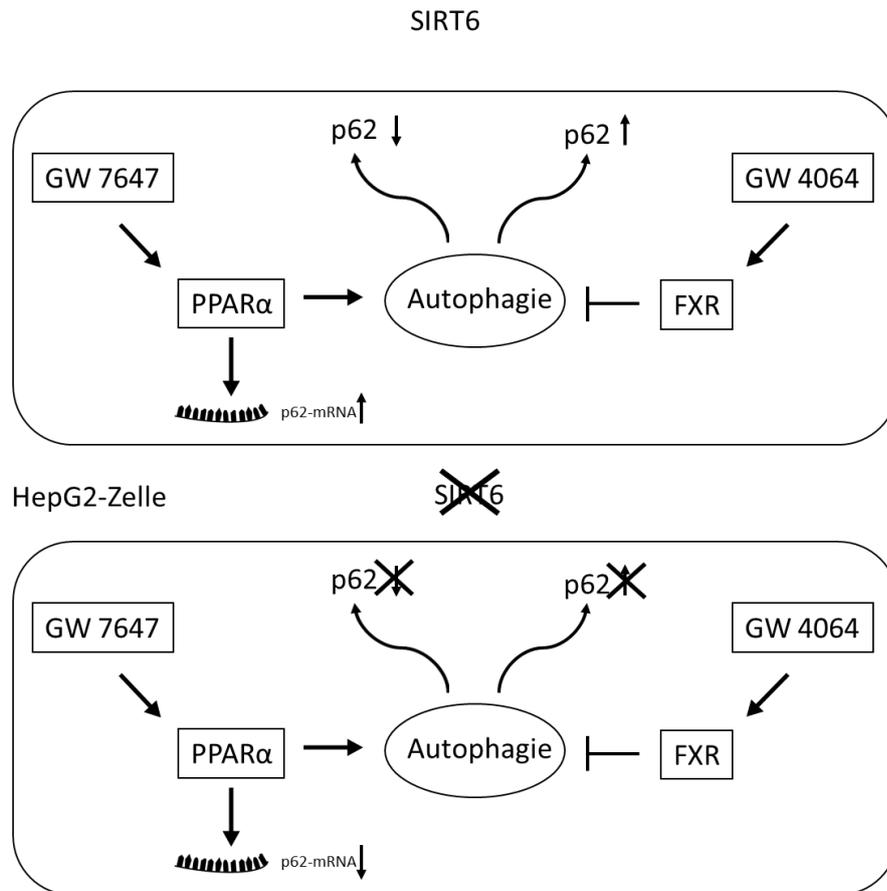


Abbildung 39: Einfluss einer SIRT6-Expression auf die Autophagieregulation der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR

Die SIRT6-defizienten Zellen weisen die abgebildeten Unterschiede zu den SIRT6-exprimierenden auf. Bei der Behandlung mit dem Agonisten für PPAR α bleibt die erwartete p62-Proteinabnahme aus, während es auf Genebene nicht zu einem Anstieg der p62-Expression kommt, wie er bei den SIRT6-exprimierenden Zellen gezeigt werden konnte. Die Behandlung mit dem Agonisten für FXR führt in SIRT6-defizienten Zellen nicht zum erwarteten Anstieg des p62-Proteins. (Eigene Abbildung)

Durch die Experimente von Lee et al. war bereits der Effekt einer synthetischen Aktivierung der nukleären Rezeptoren bekannt: GW7647, der Agonist von PPAR α , induziert den autophagischen Fluss; GW 4064, der Agonist von FXR, unterdrückt ihn (1).

In den Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigt sich, dass die SIRT6-Expression eine Rolle bei der Wirkung der Agonisten spielt. Die SIRT6-exprimierenden Zellen zeigten auf Proteinebene die zu erwartende Wirkung, während diese bei den SIRT6-defizienten Zellen ausblieb. Bei einer Behandlung mit den Agonisten für PPAR α , die den autophagischen Fluss aktiviert, war eine Abnahme

der p62-Menge zu beobachten, während sich bei SIRT6-defizienten Zellen kein Effekt zeigte (Abb. 8). Dies wiederholt sich auch in der Untersuchung des p62-Proteinabbaus (Abb. 23). Hier kommt es unter Einfluss des Agonisten für PPAR α zu einer Abnahme der p62-Menge in den SIRT6-exprimierenden Zellen, während dies bei den SIRT6-defizienten Zellen ausbleibt. Wurden die Zellen zusätzlich dem Stressor Hunger ausgesetzt, steigt die p62-Menge unerwarteterweise in den SIRT6-exprimierenden Zellen an. Dies ist jedoch eine vorbeschriebene Falle bei dieser Untersuchung, da HepG2-Zellen auf eine Hungerepisode ab vier Stunden mit einer Hochregulation von p62 reagieren (36).

Auf Genexpressionsebene zeigt sich ebenfalls ein Unterschied durch die SIRT6-Expression. Eine Behandlung mit dem Agonisten für PPAR α über 24 Stunden führt zu einer leichten Zunahme der Expression von p62 in SIRT6-exprimierenden Zellen, während es auf die SIRT6-defizienten Zellen keinen Effekt hat bzw. zu einer Abnahme der Expression führt (vgl. Abb. 10 und 11).

Auch bei der Untersuchung eines weiteren Autophagiemarker, LC-3, zeigt die Behandlung mit dem PPAR α -Agonisten in den SIRT6-defizienten Zellen keinen Effekt (Abb. 15), während die SIRT6-exprimierenden Zellen eine leichte Abnahme in der LC-3-Menge mit steigender Konzentration des Agonisten zeigen. Hier würde eine Zunahme in der LC-3-Menge erwartet werden. Jedoch kann der in diesem Western-Blot eingesetzte Antikörper nur LC-3 detektieren und nicht zwischen LC-3 I und LC-3 II unterscheiden. Daher lässt sich aus diesem Western-Blot keine weitere Schlussfolgerung ziehen, außer, dass es keinen Effekt auf die Gesamtmenge bei den SIRT6-defizienten Zellen gibt.

Bei dem zweiten untersuchten nukleären Rezeptor FXR zeigen sich ähnliche Effekte wie bei PPAR α . Die Behandlung mit dem Agonisten für FXR inhibiert den autophagischen Fluss (1). Daher wird eine Zunahme der p62-Menge nach FXR-Stimulation erwartet. Wie in Abb. 9 zu sehen ist, steigt die p62-Menge mit zunehmender Konzentration in SIRT6-exprimierenden Zellen. Dies ist bei den SIRT6-defizienten Zellen nicht der Fall und wiederholt sich in der Untersuchung des p62-Proteinabbaus (Abb. 25). Hier kann der Rückschluss gezogen werden, dass sich in den SIRT6-exprimierenden Zellen mit der Behandlung des FXR-Agonisten mehr p62 zum Abbau in den Autolysosomen befindet als im Vergleich zu den SIRT6-defizienten (Abb. 25). Werden die Zellen zusätzlich gehungert, zeigt sich der gleiche Effekt (Abb. 26). Auf das weitere Markerprotein LC-3 hat die Behandlung mit dem FXR-Agonisten in SIRT6-defizienten Zellen erneut keinen Einfluss (Abb. 16).

In den durchgeführten Experimenten scheint SIRT6 einen Effekt auf die Autophagie-Proteine LC-3 und p62 bei synthetischer Aktivierung der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR zu vermitteln. In SIRT6-defizienten Zellen kommt es, im Gegensatz zu den SIRT6-exprimierenden, zu keinen relevanten Änderungen auf Proteinebene von p62 und LC-3 bei einer Behandlung mit den Agonisten. Auf Genebene konnte gezeigt werden, dass es bei einer synthetischen Aktivierung von PPAR α zu einer höheren Expression von p62 in SIRT6-exprimierenden Zellen im Vergleich zu SIRT6-defizienten Zellen kommt. Dies gibt einen Hinweis auf die Beteiligung des SIRT6-Proteins bei der Autophagie in HepG2-Zellen. Jedoch ist hierbei zu beachten, dass wie unter 5.1 diskutiert bei SIRT6-defizienten Zellen bereits eine Herabregulation der p62-Expression nachgewiesen werden konnte.

5.3 Eine SIRT6-Expression hat Einfluss auf den autophagischen Fluss in HepG2-Zellen

Die experimentelle Untersuchung der Autophagie stellt eine große Herausforderung dar, da es sich dabei um einen dynamischen Prozess handelt. Viele der eingesetzten Untersuchungsmethoden messen allerdings statisch, das heißt die Proteinmenge zu einem definierten Zeitpunkt. Im Rahmen der Autophagie-Forschung wurden daher weitere Methoden entwickelt, um diese Problematik zu umgehen. Aktuell wird daher zur Quantifizierung der autophagischen Aktivität empfohlen, den autophagischen Fluss im experimentellen System zu messen. Dieser ist definiert als die Menge an autophagischer Degradation. Hierfür haben sich der *LC-3 Turnover Assay* und der *p62 Degradation Assay* als Methode etabliert. (21, 35)

Unter basalen Konditionen (Standard-Kulturbedingungen) ergab sich kein Unterschied zwischen SIRT6-exprimierenden und -defizienten Zellen (vgl. Abb.19 und 21) im *LC-3 Turnover Assay*. Auch der Stressor Hunger sorgte in den beiden Zelllinien für einen gleichen Anstieg des LC-3 Turnovers, welches mit dem autophagischen Fluss gleichzusetzen ist (vgl. Abb. 20 und 22). Interessanterweise führt die Behandlung mit den beiden Agonisten für PPAR α und FXR zu einem weitaus stärkeren LC-3 Turnover in SIRT6-defizienten Zellen (vgl. Abb. 19-22). Sowohl der Agonist für PPAR α , für den ein Anstieg des Turnovers erwartet wurde, als auch der Agonist für FXR, für den dieser Anstieg nicht erwartet wurde, riefen diesen Effekt in SIRT6-defizienten Zellen hervor.

Daraus ließe sich schlussfolgern, dass SIRT6 keinen Einfluss auf die basale Autophagie hat, bei der Induktion der Autophagie jedoch eine regulierende Rolle einnehmen könnte.

Im *p62 Degradation Assay* zeigten die SIRT6-exprimierenden Zellen in Abb. 23 unter der Behandlung mit dem PPAR α -Agonisten einen Abfall der p62-Menge. Dies bedeutet, dass in den Autolysosomen weniger p62 abgebaut worden wäre und der autophagische Fluss daher vermindert ist. Dies steht im Kontrast zur erwarteten Wirkung, da der PPAR α -Agonist eigentlich den autophagischen Fluss erhöhen sollte. Jedoch zeigte die Behandlung mit Bafilomycin A1 ebenfalls keinen Anstieg der p62-Proteinmenge, was aufgrund der akkumulierenden Wirkung im Lysosom zu erwarten gewesen wäre. Die Verwertbarkeit dieses Blots ist daher in Frage zu stellen. Auf die SIRT6-defizienten Zellen hatte die Behandlung keinen Effekt. Der zusätzliche Stressor Hunger führte in den SIRT6-exprimierenden Zellen zu einem leichten Anstieg, allerdings ist dies wie unter 5.2 bereits beschrieben, wahrscheinlich auf eine Hochregulation der p62-Expression während einer Hungerepisode zurückzuführen. Die Behandlung mit dem FXR-Agonisten führte in den SIRT6-exprimierenden Zellen zu einem Anstieg der p62-Menge. Da der Abbau durch die Behandlung mit Bafilomycin A1 im Autolysosomen blockiert wurde, symbolisiert der Vergleich mit und ohne Bafilomycin A1 die Menge an p62, die im Autolysosom abgebaut worden wäre (Abb. 25) (21). Dies ist in den SIRT6-exprimierenden Zellen eindeutig nachweisbar, während dieser Effekt bei den SIRT6-defizienten Zellen ausbleibt. Dies unterstützt die unter 5.1 und 5.2 genannten Schlussfolgerungen, dass die SIRT6-Expression einen Einfluss auf p62 und die Wirkung der nukleären Rezeptoren hat.

Die in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu den unter 5.1 und 5.2 ausgeführten Ergebnissen. Hierzu sind zwei Anmerkungen zu beachten: Die Experimente, die zu den Schlussfolgerungen unter 5.2 führten, haben nicht den autophagischen Fluss gemessen, sondern Proteinmengen zu definierten Zeitpunkten. Dazu kommt, dass der Autophagiemarker p62, wie unter 5.1 behandelt, nachweislich auf Protein- und Genebene in SIRT6-defizienten Zellen herabreguliert ist und daher die Interpretation der Untersuchung des p62-Proteinabbaus erschwert.

In einem weiteren Experiment konnte zudem gezeigt werden, dass es einen Unterschied im Verhalten der autophagischen Vakuolen gibt. Die MDC-Färbung färbt insbesondere die Autolysosomen, also Autophagosomen die bereits mit Lysosomen fusionierten. Hier zeigte sich in den SIRT6-defizienten Zellen (vgl. Abb. 27 a und b) ein

eher diffuses Signal im Vergleich zu dem eher punktförmigen Signal bei SIRT6-exprimierenden Zellen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich daher die Schlussfolgerung ziehen, dass es zwischen SIRT6-exprimierenden und SIRT6-defizienten Zellen zu einem Unterschied im autophagischen Fluss kommt. Zwar ist das basale LC-3 Turnover bei beiden Zelltypen gleich, sobald jedoch durch eine Behandlung mit den Agonisten Einfluss auf den autophagischen Fluss genommen wird, reagieren die SIRT6-defizienten Zellen mit einem stärkeren LC-3 Turnover. Eine mögliche Erklärung wäre, dass SIRT6 bei der Regulation der Induktion oder Repression der durch die Agonisten angestoßenen oder unterdrückten Autophagie eine Rolle spielt.

5.4 Einfluss von SIRT6 auf die Expression der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR

Unter 5.2 wurde bereits diskutiert, wie SIRT6 einen Einfluss auf die Rezeptoren PPAR α und FXR im Rahmen der Autophagieregulation haben könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, inwieweit SIRT6 einen Einfluss auf die Rezeptoren unabhängig von der Autophagieregulation haben könnte.

Für den nukleären Rezeptor PPAR α zeigte sich dabei auf Proteinebene eine leicht höhere Proteinmenge von PPAR α bei den SIRT6-exprimierenden Zellen (Abb.28). Auf Genebene wurden zwei Zielgene von PPAR α , CYP7A1, das für das gleichnamige Schlüsselenzym im Cholesterol- und Gallensäuren-Metabolismus kodiert, und SAA-4, ein Akute-Phase-Protein, untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Aktivierung von PPAR α zu einer Herabregulierung von CYP7A1 führt (25). Für CYP7A1 konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 30 a und b). Die Untersuchung für SAA-4 zeigte jedoch einen starken Unterschied. Das Expressionslevel in SIRT6-defizienten Zellen ist sechs- bis über 100fach stärker gewesen (Abb. 31 a und b). Dies ist ein interessantes Ergebnis und sollte Anlass für weitere Untersuchungen geben. Innerhalb der SAA-Gruppe zählen die Unterformen SAA-1 und SAA-2 zu den induzierbaren Zytokinen, während die Unterform SAA-4 konstitutiv produziert wird (37). Da SIRT6 auch bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielt (32), sollten hier weitere Experimente folgen, die sich dem Zusammenhang von SIRT6-Defizienz und SAA-4 Genregulation widmen.

Die durchgeführte Immunfluoreszenzfärbung für PPAR α (Abb.29) zeigt in den unbehandelten Kontrollen keinen Unterschied. Die Behandlung mit dem Agonisten für PPAR α führt in den SIRT6-exprimierenden Zellen zu einem zunehmenden Kernsignal, wohingegen das Signal bei den SIRT6-defizienten Zellen eher diffus und weniger stark aus dem Kern stammt. Daraus könnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine SIRT6-Expression eine Rolle bei der Aktivierung und Translokation von PPAR α spielt. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass SIRT6 eine Rolle bei der Aktivierung von PPAR α spielt. Es konnte gezeigt werden, dass SIRT6 an den Koaktivator NCOA2 (Nuclear Receptor Coactivator 2) von PPAR α bindet. Durch Deacetylierung von NCOA2 nimmt dessen Aktivität ab und führt zu einer Stimulation der PPAR α -Aktivität in der Leber (38).

Für den nukleären Rezeptor FXR wurden die gleichen Experimente durchgeführt. Auf Proteinebene zeigt sich im Western-Blot eine leicht höhere Proteinmenge für FXR bei SIRT6-defizienten Zellen (Abb. 32). Auf Genebene zeigte die Untersuchung der FXR-Zielgene SHP, CYP7A1, SULT2A1 und UGT2B4 diverse Unterschiede zwischen SIRT6-exprimierenden und -defizienten Zellen (vgl. Abb. 34-37). Die durchgeführte Immunfluoreszenzfärbung zeigt für SIRT6-exprimierenden Zellen nach einer Behandlung mit dem Agonisten ein intensiveres Signal im Vergleich zu den SIRT6-defizienten Zellen (Abb. 33). Insgesamt scheint eine SIRT6-Expression anhand der vorliegenden Daten keinen Einfluss auf den FXR-Rezeptor zu haben. Aus der Literatur ist dies auch nicht bekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass ein anderes Sirtuin-Protein, SIRT1, eine Rolle in der Regulation von FXR spielt. In SIRT1-defizienten Mäusen kam es zu gesteigerter FXR-Acetylierung und erhöhter Expression von Genen der Lipogenese (28).

6. Zusammenfassung

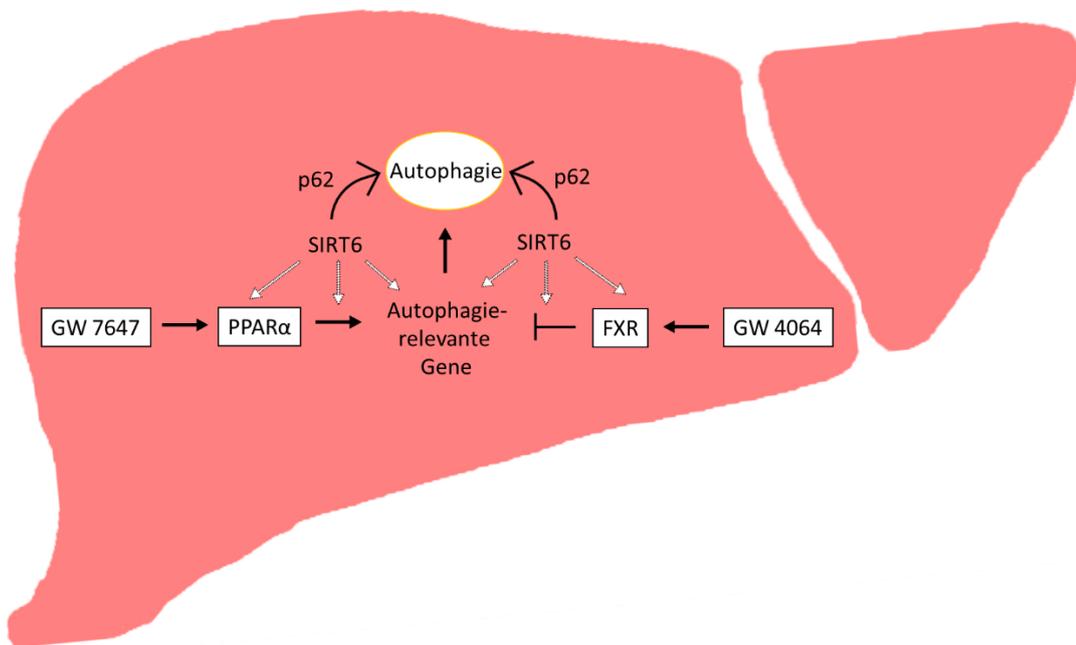


Abbildung 40: Modellvorstellung der Funktion von SIRT6 bei der Autophagiekoordination in HepG2-Zellen

In HepG2-Zellen beeinflusst eine SIRT6-Expression die Autophagie. Das wichtige Autophagieprotein p62 ist auf Genebene in SIRT-defizienten Zellen herabreguliert und die p62-Proteinmenge erniedrigt. Dies ist eine Erklärung für den Einfluss von SIRT6 auf die Autophagie. Mögliche zusätzliche Ansatzpunkte von SIRT6 in diesem Modell sind mit weißen Pfeilen dargestellt und sollten in zukünftigen Experimenten untersucht werden. (Eigene Abbildung)

In den Experimenten dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass SIRT6 einen Einfluss auf die Expression des Autophagieproteins p62 hat. In HepG2-Zellen führt eine SIRT6-Defizienz zu niedrigeren Mengen der p62-mRNA als auch des p62-Proteins. Es konnte zudem gezeigt werden, dass dies nicht auf einen erhöhten Abbau während der Autophagie in Autolysosomen zurückzuführen ist. Lee et al. zeigten in ihren Experimenten, dass die nukleären Rezeptoren für PPAR α und FXR die Autophagie koordinieren. In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals die Rolle einer SIRT6-Expression bei der Koordination der Autophagie durch diese nukleären Rezeptoren untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine SIRT6-Defizienz zu einem verminderten Ansprechen der Autophagiemarker p62 und LC-3 bei synthetischer Aktivierung von PPAR α und FXR führt. Ebenfalls zeigt sich ein Anstieg in der p62-Expression in Abhängigkeit von einer SIRT6-Expression bei synthetischer

Aktivierung von PPAR α . Die so gewonnen Erkenntnisse wurden in einem umfangreichen Versuchsaufbau zur Messung des autophagischen Flusses weiter untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass es unter basalen Konditionen zu keinem Unterschied im autophagischen Fluss in Abhängigkeit von einer SIRT6-Expression kommt. Auch der Stressor Hunger führte zu keinen Unterschieden. Jedoch führte die synthetische Aktivierung der nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR zu einem stärkeren Anstieg des autophagischen Flusses in Zellen mit einer SIRT6-Defizienz. Dieser Anstieg im autophagischen Fluss konnte durch die Kombination des Stressors Hunger und der synthetischen Aktivierung verstärkt werden. Diese Daten geben einen Hinweis darauf, dass SIRT6 eine regulatorische Funktion bei der Autophagie-Koordination durch die nukleären Rezeptoren PPAR α und FXR in HepG2-Zellen spielt.

Dies sollte gewiss Anlass für weitere Experimente geben. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten sollten auch in weiteren Zellmodellen wie z.B. primären Hepatozyten aus Knockout-Mäusen überprüft werden. Auch sind weitere Experimente nötig, um zu untersuchen, wo der mögliche Einfluss von SIRT6 bei der Autophagie-Koordination ansetzt. Die experimentelle Untersuchung von Autophagie bietet dabei einige technische und methodische Herausforderungen. Diese sollten unbedingt angegangen werden, da dieser Bereich der Grundlagenforschung enormes Potential für zukünftige diagnostische Tests und Therapiemöglichkeiten bietet.

Literatur

1. Lee JM, Wagner M, Xiao R, Kim KH, Feng D, Lazar MA et al. Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy. *Nature* 2014; 516(7529):112–5. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nature13961.pdf>.
2. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol* 2018; 20(5):521–7 [Stand: 28.02.2020]. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41556-018-0092-5.pdf>.
3. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1993; 333(1-2):169–74. doi: 10.1016/0014-5793(93)80398-e.
4. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19(6):349–64. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41580-018-0003-4.pdf>.
5. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011; 147(4):728–41. Verfügbar unter: <http://www.cell.com/article/S0092867411012761/pdf>.
6. Ueno T, Komatsu M. Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14(3):170–84. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2016.185.pdf>.
7. Lin C-W, Zhang H, Li M, Xiong X, Chen X, Chen X et al. Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice. *J Hepatol* 2013; 58(5):993–9. doi: 10.1016/j.jhep.2013.01.011.
8. Harada M, Hanada S, Toivola DM, Ghori N, Omary MB. Autophagy activation by rapamycin eliminates mouse Mallory-Denk bodies and blocks their proteasome inhibitor-mediated formation. *Hepatology* 2008; 47(6):2026–35. doi: 10.1002/hep.22294.
9. Kharbanda KK, McVicker DL, Zetterman RK, Donohue TM. Ethanol consumption alters trafficking of lysosomal enzymes and affects the processing of procathepsin L in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1291(1):45–52. doi: 10.1016/0304-4165(96)00043-8.

10. Kharbanda KK, McVicker DL, Zetterman RK, MacDonald RG, Donohue TM. Flow cytometric analysis of vesicular pH in rat hepatocytes after ethanol administration. *Hepatology* 1997; 26(4):929–34. doi: 10.1002/hep.510260419.
11. Rautou P-E, Cazals-Hatem D, Feldmann G, Mansouri A, Grodet A, Barge S et al. Changes in autophagic response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Pathol* 2011; 178(6):2708–15. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.021.
12. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009; 458(7242):1131–5. doi: 10.1038/nature07976.
13. Huang F, Wang B-R, Wang Y-G. Role of autophagy in tumorigenesis, metastasis, targeted therapy and drug resistance of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 2018; 24(41):4643–51. doi: 10.3748/wjg.v24.i41.4643.
14. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20(3):460–73. doi: 10.1089/ars.2013.5371.
15. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal* 2017; 36(13):1811–36. Verfügbar unter: <https://www.embopress.org/doi/pdf/10.15252/emboj.201796697>.
16. Sánchez-Martín P, Komatsu M. p62/SQSTM1 - steering the cell through health and disease. *J Cell Sci* 2018; 131(21). Verfügbar unter: <https://jcs.biologists.org/content/joces/131/21/jcs222836.full.pdf>.
17. Sánchez-Martín P, Saito T, Komatsu M. p62/SQSTM1: 'Jack of all trades' in health and cancer. *The FEBS Journal* 2019; 286(1):8–23. Verfügbar unter: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/febs.14712>.
18. Ichimura Y, Komatsu M. Activation of p62/SQSTM1-Keap1-Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Pathway in Cancer. *Front. Oncol.* 2018; 8:210. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00210/pdf>.
19. Taniguchi K, Yamachika S, He F, Karin M. p62/SQSTM1-Dr. Jekyll and Mr. Hyde that prevents oxidative stress but promotes liver cancer. *FEBS Lett* 2016; 590(15):2375–97. Verfügbar unter: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/1873-3468.12301>.

20. Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O et al. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of Cell Biology* 2011; 193(2):275–84. doi: 10.1083/jcb.201102031.
21. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18(9):1865. Verfügbar unter: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/9/1865/pdf>.
22. Schaaf MBE, Keulers TG, Vooijs MA, Rouschop KMA. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J* 2016; 30(12):3961–78. doi: 10.1096/fj.201600698R.
23. Bougarne N, Weyers B, Desmet SJ, Deckers J, Ray DW, Staels B et al. Molecular Actions of PPAR α in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocr Rev* 2018; 39(5):760–802. Verfügbar unter: <https://academic.oup.com/edrv/article/39/5/760/5055100>.
24. Kersten S, Stienstra R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie* 2017; 136:75–84. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908416303613>.
25. Ghonem NS, Assis DN, Boyer JL. Fibrates and cholestasis. *Hepatology* 2015; 62(2):635–43. Verfügbar unter: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/hep.27744>.
26. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2020; 41(1):111–88. Verfügbar unter: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-pdf/41/1/111/32651596/ehz455.pdf>.
27. Araki E, Yamashita S, Arai H, Yokote K, Satoh J, Inoguchi T et al. Effects of Pemafibrate, a Novel Selective PPAR α Modulator, on Lipid and Glucose Metabolism in Patients With Type 2 Diabetes and Hypertriglyceridemia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Diabetes Care* 2018; 41(3):538–46. Verfügbar unter: <https://care.diabetesjournals.org/content/diacare/41/3/538.full.pdf>.
28. Massafra V, van Mil SWC. Farnesoid X receptor: A "homeostat" for hepatic nutrient metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of*

- Disease 2018; 1864(1):45–59. Verfügbar unter:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443917303587>.
29. Han CY. Update on FXR Biology: Promising Therapeutic Target? *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19(7):2069. Verfügbar unter:
<https://www.mdpi.com/1422-0067/19/7/2069/pdf>.
30. Egger G. In search of a germ theory equivalent for chronic disease. *Prev Chronic Dis* 2012; 9:E95. Verfügbar unter:
https://www.cdc.gov/pcd/issues/2012/11_0301.htm.
31. Vitiello M, Zullo A, Servillo L, Mancini FP, Borriello A, Giovane A et al. Multiple pathways of SIRT6 at the crossroads in the control of longevity, cancer, and cardiovascular diseases. *Ageing Research Reviews* 2017; 35:301–11. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163716301817>.
32. Khan RI, Nirzhor SSR, Akter R. A Review of the Recent Advances Made with SIRT6 and its Implications on Aging Related Processes, Major Human Diseases, and Possible Therapeutic Targets. *Biomolecules* 2018; 8(3):44. Verfügbar unter:
<https://www.mdpi.com/2218-273X/8/3/44/pdf>.
33. Kugel S, Mostoslavsky R. Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6. *Trends Biochem Sci* 2014; 39(2):72–81. doi: 10.1016/j.tibs.2013.12.002.
34. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016; 12(1):1–222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.
35. Jiang P, Mizushima N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods* 2015; 75:13–8. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202314003843>.
36. Sahani MH, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy* 2014; 10(3):431–41. doi: 10.4161/auto.27344.
37. Buck M de, Gouwy M, Wang JM, van Snick J, Opdenakker G, Struyf S et al. Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their

Concentration-Dependent Functions During Host Insults. *Curr Med Chem* 2016; 23(17):1725–55. doi: 10.2174/0929867323666160418114600.

38. Naiman S, Huynh FK, Gil R, Glick Y, Shahar Y, Touitou N et al. SIRT6 Promotes Hepatic Beta-Oxidation via Activation of PPAR α . *Cell Reports* 2019; 29(12):4127-4143.e8. Verfügbar unter: <http://www.cell.com/article/S221112471931558X/pdf>.

Danksagung

Lebenslauf