

# **"Die humanen Sir2-Orthologe SIRT1 und SIRT2 als Substrate Cyklin-abhängiger Kinasen"**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-  
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von Diplom-Biologe

**Ruwin Pandithage**

aus

Colombo/Sri Lanka

Berichter:      Universitätsprofessor Dr. Bernhard Lüscher

PD. Dr. Christoph Peterhänsel

Tag der mündlichen Prüfung:      14.12.2006

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Großeltern

## Zusammenfassung

Das Protein SIRT2 ist eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase und eins von sieben humanen Sirtuinen. Die Zugehörigkeit zur Sirtuin Familie wird über eine 200 bis 275 Aminosäuren umfassende katalytische Domäne, auch *core*-Domäne oder Sirtuin-Homologie-Domäne genannt, definiert.

SIRT2 ist ein überwiegend zytoplasmatisches Protein, das unter anderem mit den mikrotubulären Strukturen des Zytoskelettes kolokalisiert. Es deacetyliert spezifisch *in vivo* und *in vitro*  $\alpha$ -Tubulin an Lysin 40 und in der späten G2-Phase des Zellzykluses Histon H4 an Lysin 16. Die Deacetylierung von  $\alpha$ -Tubulin wird mit der Destabilisierung der Tubulinstrukturen und somit einer gesteigerten Mikrotubuli-Dynamik assoziiert. Aufgrund dieser spezifischen  $\alpha$ -Tubulin Deacetylierung und der Kolokalisierung mit den mikrotubulären Fasern, wurden mögliche Einflüsse auf die Zellmotilität und auf den Zellzyklus in Bezug auf die Bildung des Spindelapparates postuliert. Dennoch sind bisher keine biologischen Effekte von SIRT2 bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es die zuvor in einem Festphasenphosphorylierungs-Screen festgestellte Phosphorylierung von SIRT2 durch Cyklin-abhängige Kinasen (CDK) zu charakterisieren und die Funktion dieser Modifikation zu bestimmen. Letztendlich sollte die biologische Funktion von SIRT2 in Abhängigkeit der Phosphorylierung untersucht werden. In einem Aminosäuresequenzvergleich wurde eine potenzielle CDK-Konsensus-Phosphorylierungssequenz, S<sub>331</sub>PKK, am C-Terminus von SIRT2 ermittelt. Bei dem im Festphasenphosphorylierungs-Screen gefundenen SIRT2-Fragment handelte es sich ebenfalls um ein C-terminales Fragment mit der potenziellen CDK-Konsensus-Phosphorylierungsstelle.

Auf Grund dieser Befunde wurden Serin 331-Mutanten von SIRT2 *in vitro* und *in vivo* Kinase Assays eingesetzt, um die Zielaminosäuren der Phosphorylierung zu bestimmen. Dabei konnte Serin 331 als einzige Zielaminosäure der Cyklin/CDK-vermittelten Phosphorylierung identifiziert werden. Um die Funktion dieser Modifikation zu bestimmen, wurden SIRT2 und seine Mutanten *in vitro* und *in vivo* Analysen zur Ermittlung der Stabilität, der subzellulären Lokalisation und der Aktivität in Abhängigkeit von der Phosphorylierung eingesetzt. Die Untersuchungen

zeigten, dass die Phosphorylierung von Serin 331 durch Cyclin/CDK-Komplexe die enzymatische Aktivität von SIRT2 inhibiert. Darauf folgende Untersuchungen zur Bestimmung der Biologischen Funktion von SIRT2 zeigten, dass das Migrationsverhalten von Neuronen und das Adhäsionsverhalten von HEK293 Zellen in Abhängigkeit von der Phosphorylierung signifikant beeinflusst werden. So führt die Überexpression von SIRT2 und der nicht inhibierbaren SIRT2-S331A Mutante in Neuronen zu verkürzten Axonen und in HEK293 Zellen zu einer verstärkten Ablösung der Zellen vom Untergrund.

Weitere Sequenzanalysen mit den übrigen humanen Sirtuinen zeigten, dass auch SIRT1, 6 und 7 potenzielle CDK-Konsensusstellen, C-terminal der katalytischen Domäne, besitzen. SIRT1 ist das am besten charakterisierte humane Sirtuin. Es reguliert über seine Deacetylase-Aktivität unter anderem den Tumorsuppressor p53. Aufgrund dieser Bedeutung wurde zusätzlich auch eine mögliche Phosphorylierung von SIRT1 durch CDK-Komplexe in dieser Arbeit untersucht. Für SIRT1 konnte bestätigt werden, dass es *in vitro* von Cyclin/CDK-Komplexen phosphoryliert wird und dass diese Modifikation die enzymatische Aktivität steigert.

Diese Ergebnisse beschreiben erstmals eine CDK-abhängige Regulation von SIRT1 und SIRT2.

## Abstract

SIRT2 is a NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase, one of seven human sirtuins. The main characteristic of the sirtuins is their catalytic domain of 200 to 275 amino acids, also sirtuin-homology domain. SIRT2 is a predominantly cytoplasmatic protein, which co-localises with microtubules of the cytoskeleton. In addition SIRT2 is chromatin-associated late in the G2-phase of the cell cycle and in mitosis. SIRT2 deacetylates, both *in vitro* and *in vivo*,  $\alpha$ -tubulin on lysine 40 and also histone H4 on lysine 16. The deacetylation of  $\alpha$ -tubulin is associated with destabilisation of the microtubule filaments and with an increase in the microtubule dynamics. These findings led to the suggestion that SIRT2 can control cell motility. It has been suggested that histone H4 lysine 16 deacetylation is related to the formation of heterochromatic areas during S-phase and in early prophase. These findings suggest that SIRT2 may have at least two important functions in cell physiology, mainly in regulating cytoskeletal organisation and chromatin condensation. However very little is known about the regulation of SIRT2 function in these processes. As SIRT2 was previously found to be a substrate for cyclin dependent kinases (CDKs) in a solid phase phosphorylation screen, the aim of this work was to characterise the phosphorylation of SIRT2 by CDKs and to define the functional relevance of this modification. Moreover, the biological effect of SIRT2 should be clarified. Our results demonstrate that SIRT2 is phosphorylated exclusively on Ser-331 by p35/CDK5, Cyclin E/CDK2 and Cyclin A/CDK2 *in vitro*. *In vivo*, we confirmed that SIRT2 is phosphorylated on Ser-331 by CDK complexes. Moreover, we show that this modification regulates the enzymatic activity of SIRT2. To address the biological consequences of SIRT2 and regulation of SIRT2 through Ser-331 phosphorylation, the effect on cell adherence and neurite outgrowth were studied. SIRT2 expression resulted in a shortening of neurite length in primary murine hippocampal neurons. This effect was dependent on catalytic activity. In particular SIRT2-S331A, that cannot be inhibited by phosphorylation, showed the strongest effect. In addition SIRT2 stimulated detachment of HEK293 cells, again dependent on catalytic activity. These effects correlated with  $\alpha$ -tubulin deacetylation. Together these findings provide the first information regarding post-translational regulation of SIRT2.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>III</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1 Der eukaryotische Zellzyklus .....</b>	<b>1</b>
I.1.1 Cyklin-abhängige Kinasen .....	3
I.1.1. D-Typ-Cyklin/CDK-Komplexe .....	5
I.1.2 Der Cyklin E/CDK2-Komplex .....	5
I.1.3 Die Cyklin A/CDK2 - und Cyklin A/CDK1-Komplexe .....	6
I.1.4 Der Cyklin B/CDK1-Komplex .....	6
I.1.5 Der p35/CDK5-Komplex .....	6
<b>I.2 Das Zytoskelett .....</b>	<b>9</b>
I.2.1 Mikrofilamente.....	9
I.2.2 Mikrotubuli.....	10
I.2.3 Intermediärfilamente.....	12
I.2.4 Das neuronale Zytoskelett.....	13
<b>I.3 Posttranslationale Proteinmodifikationen .....</b>	<b>16</b>
I.3.1 Phosphorylierung .....	16
I.3.2 Acetylierung .....	17
<b>I.4 Chromatin .....</b>	<b>18</b>
I.4.1 Aufbau des Chromatins .....	18
I.4.2 Chromatin Modifikationen und ihre Auswirkungen .....	19

<b>I.5 Histon-Acetyltransferasen (HATs)</b> .....	<b>22</b>
<b>I.6 Histon-Deacetylasen (HDACs)</b> .....	<b>22</b>
I.6.1 Sir2 (silent information regulator 2) .....	24
I.6.2 Sirtuine (SIRTs) .....	28
I.6.2.1 SIRT1 .....	28
I.6.2.2 SIRT2.....	31
I.6.2.3 SIRT3.....	32
I.6.2.4 SIRT6.....	32
I.6.2.5 Inhibitoren der SIR-Proteine.....	33
<b>I.7 Zielsetzung</b> .....	<b>34</b>
<b>II MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>35</b>
<b>II.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial</b> .....	<b>35</b>
<b>II.2 Enzyme und Reaktionskits</b> .....	<b>35</b>
<b>II.3 Vektoren</b> .....	<b>36</b>
II.3.1 Klonierungsvektoren.....	36
II.3.2 Eukaryotische Expressionsvektoren .....	38
II.3.3 Bakterielle Expressionsvektoren.....	41
<b>II.4 Primer</b> .....	<b>42</b>
<b>II.5 Antikörper</b> .....	<b>44</b>
<b>II.6 Zellkultur</b> .....	<b>45</b>
II.6.1 Allgemeine Materialien für Zellkultur.....	45
II.6.2 Eukaryontische Zellen.....	45
II.6.3 Kulturbedingungen .....	46
II.6.4 Kryokonservierung .....	46
II.6.5 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer .....	47

II.6.6	Transiente Transfektion .....	47
II.6.7	Herstellung von stabil exprimierenden Zelllinien .....	48
II.6.8	Adhäsions- Assay.....	48
II.6.9	Durchflusszytometer (FACS) .....	49
II.6.10	Präparation von Zell-Lysaten.....	50
II.6.11	Immunopräzipitation .....	51
II.6.12	<i>In vivo</i> Markierung von Proteinen mit [ <sup>35</sup> S]-Methionin .....	52
II.6.13	<i>In vivo</i> Markierung von Proteinen mit [ <sup>32</sup> P].....	53
<b>II.7</b>	<b>Arbeiten mit prokaryotischen Zellen.....</b>	<b>54</b>
II.7.1	Kulturmedien.....	54
II.7.2	Bakterienstämme.....	55
II.7.3	Transformation .....	56
II.7.4	Isolation von Plasmid-DNS .....	56
II.7.5	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	57
<b>II.8</b>	<b>Arbeiten mit DNS .....</b>	<b>59</b>
II.8.1.	PCR-Amplifikation von DNS-Fragmenten.....	59
II.8.2	DNS-Klonierungstechniken.....	60
II.8.2.1	Restriktionsverdau DNS .....	60
II.8.2.2	Ligation von DNS .....	61
II.8.2.3	Präzipitation von DNS .....	61
II.8.2.4	Konzentrationsabschätzung von DNS.....	62
II.8.2.5	Agarosegelelektrophorese von DNS.....	62
II.8.2.6.	<i>In vitro</i> Mutagenese.....	63
II.8.2.7.	Gateway Klonierung .....	65
II.8.3	Sequenzierung von DNS.....	66
II.8.4	Herstellung von shRNA-Konstrukten.....	67
<b>II.9</b>	<b>Proteinchemische und immunologische Methoden .....</b>	<b>68</b>
II.9.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	68
II.9.2	Immunoblot-Analyse.....	69
II.9.2.1	Western Blot .....	69

II.9.2.2 Immunodetektion von Proteinen nach Western Blot .....	70
II.9.3. Immunofluoreszenz.....	71
II.9.4 Anfärben von Proteinen.....	72
II.9.4.1 Coomassie-Blau Färbung.....	72
II.9.4.2 Colloidal Coomassie-Färbung.....	73
II.9.5 Proteinbestimmung nach Bradford .....	74
II.9.6 Massenspektrometrische Analyse .....	75
<b>II.10 Enzymatische Assays.....</b>	<b>76</b>
II.10.1 <i>In vitro</i> Kinase-Assay .....	76
II.10.2 Histon-Deacetylase Assay (HDAC-Assay).....	78
<b>III ERGEBNISSE .....</b>	<b>80</b>
<b>III.1 Aminosäuresequenzvergleiche zur Ermittlung von potenziellen CDK-Phosphorylierungsstellen von SIRT1 und SIRT2.....</b>	<b>80</b>
<b>III.2 Charakterisierung der SIRT2-Phosphorylierung.....</b>	<b>82</b>
III.2.1 Herstellung von SIRT2-Mutanten .....	83
III.2.2 Charakterisierung der Spezifität einzelner Cyklin-CDK-Kinasekomplexe gegenüber SIRT2 in <i>in vitro</i> Kinase-Assays.....	84
III.2.3 <i>In vivo</i> Phosphorylierung von SIRT2.....	95
III.2.4 Die Aktivität von SIRT2 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung.....	99
III.2.5 Bestimmung der SIRT2 Halbwertszeit in Abhängigkeit von der Phosphorylierung .....	106
III.2.6 Subzelluläre Lokalisation von SIRT2 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung .....	107
III.2.7 Einfluss der SIRT2 Phosphorylierung auf den Zellzyklus.....	109
III.2.8 Einfluss der SIRT2 Phosphorylierung auf das Axonwachstum.....	112
III.2.9 Einfluss der SIRT2 Phosphorylierung auf das Adhäsionsverhalten von HEK293-Zellen .....	114
<b>III.3 Charakterisierung der SIRT1-Phosphorylierung.....</b>	<b>118</b>
III.3.1 Charakterisierung der Spezifität einzelner Cyklin-CDK-Kinasekomplexe gegenüber SIRT1 .....	119

III.3.2 Die Aktivität von SIRT1 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung.....	120
<b>IV DISKUSSION .....</b>	<b>122</b>
<b>IV.1 Einfluss der Cyklin/CDK-vermittelten Phosphorylierung von SIRT2 auf den Zellzyklus .....</b>	<b>122</b>
<b>IV.2 Einfluss der p35/CDK5-vermittelten Phosphorylierung von SIRT2 auf die Zellmotilität.....</b>	<b>125</b>
<b>IV.3 Cyklin/CDK-vermittelte Phosphorylierung von SIRT1.....</b>	<b>129</b>
<b>V. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>130</b>
<b>VI. ANHANG .....</b>	<b>148</b>
Erklärung.....	148
Lebenslauf.....	149
Veröffentlichungen.....	150
Danksagung.....	151

## Abkürzungsverzeichnis

AB	<i>Antibody</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammonium Persulfat
As	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBP	CREB bindendes Protein
CDK	Cyclin abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CMV	Cytomegalie-Virus
cpm	<i>counts per minute</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethlendiamintetraacetat
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin

---

HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
Hebs	<i>Hepes Buffered Saline</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N`-2-Ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	$\beta$ -D-Isopropyl-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
MOPS	3-N-Morpholin-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase-A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RT	Raumtemperatur
RZPD	Resource Center/ Primary Database Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Taq-Pol	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase
Dox.	Doxyzyklin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TSA	Trichostatin A

U	Einheit
rpm	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen-Verhältnis
w/v	Gewicht pro Volumen-Verhältnis
wt	Wildtyp
ZK	Zellkultur

# I. Einleitung

In allen Zellen des Organismus haben verschiedene Proteine die wichtige Funktion die Integrität und die Homöostase der Gewebe und Organe aufrechtzuerhalten. Genetisch bedingte Erkrankungen entstehen durch den Verlust eben dieser Fähigkeit, die Integrität der Gewebe zu erhalten. Bisher konnten einige generelle Faktoren und Mechanismen, die zur Umwandlung von gesunden zu kranken Zellen führen aufgeklärt werden. So führen Fehlregulationen in der Transkription von Genen oder in der Organisation des Zytoskelettes zur Ausbildung von Krankheiten, wie Krebs, oder zu neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer. Daher ist das generelle Verständnis der Regulation dieser Zellprozesse essenziell für die Entwicklung von Therapien gegen genetisch bedingte Erkrankungen.

## I.1 Der eukaryotische Zellzyklus

Die Vermehrung einer Zelle setzt die Verdoppelung wichtiger Zellkomponenten und deren gleichmäßige und vollständige Weitergabe an die Tochterzellen voraus. Dieser Vorgang erfolgt in einem streng kontrollierten Prozess, der als Zellzyklus bezeichnet wird. Die Verdoppelung der genetischen Information und deren anschließende Aufteilung auf zwei Tochterzellen sind die zentralen Vorgänge des Zellzyklus. Beide Vorgänge sind bei höheren eukaryotischen Zellen zeitlich voneinander getrennt (Howard and Pelc, 1951) Die Verdoppelung des Chromosomensatzes erfolgt in der Synthese- oder S-Phase, die Trennung und Verteilung der beiden Schwesterchromatiden auf zwei Tochterkerne erfolgt in der Mitose. Mitose und Synthesephase werden zeitlich und funktionell durch zwei sogenannte *gap*-Phasen voneinander getrennt: die präreplikative G1-Phase und die prämitotische G2-Phase. Die Mitose ist normalerweise mit der Teilung der Zelle (Zytokinese) verknüpft und wird dann als M-Phase bezeichnet. Zusammengefasst wird der Zellzyklus in der Reihenfolge G1-, S-, G2-, M-Phase durchlaufen (Abb.I.1). Die Replikation des Genoms und die Mitose sind in den meisten eukaryontischen Zellen alternierende und

voneinander abhängige Vorgänge, die einer strengen Regulation und Kontrolle unterliegen. So gewährleisten spezifische Kontrollpunkte, sogenannte *checkpoints*, einen zeitlich korrekten und irreversiblen Ablauf des Zyklus. Beispielsweise stellt der *DNA-replication-checkpoint* (R2) sicher, dass die Mitose erst erfolgen kann, wenn die Replikation der DNS abgeschlossen ist und keine Schädigung der DNS vorliegt. Der Übergang von der Metaphase zur Anaphase der Mitose steht unter der Kontrolle eines weiteren *checkpoints*, des Spindelrestriktionspunktes (R3) (Abb.I.1). Dieser erlaubt die Trennung der Schwesterchromatiden erst, wenn alle Chromosomen mit den Polen der mitotischen Spindel verbunden sind. Die Initiation der Replikation wie auch der Beginn der Mitose hängen von der Integrität der DNS ab. Solche speziellen Kontrollpunkte reagieren auf DNS-Schäden mit dem Anhalten des Zellzykluses in der G1- oder G2-Phase oder einer Retardierung der S-Phase. Sie ermöglichen somit die Beseitigung von Schäden, bevor diese bei der Replikation zu Mutationen führen können oder an die Tochterzellen weitergegeben werden. Überschreitet die Reparatur einen bestimmten zeitlichen Schwellenwert, erkennt die Zelle den Schaden als irreparabel und leitet den Zelltod ein. Die *checkpoints* tragen somit entscheidend zur Aufrechterhaltung der Stabilität des Genoms bei (Cenciarelli et al., 1999; Kastan and Bartek, 2004; Steinman, 2002; Weinert, 1997). Neben den endogenen Regulationssignalen greifen aber auch exogene Signale in den Ablauf des Zellzykluses ein (Denhardt and Noda, 1998). Bei einzelligen eukaryontischen Organismen sind dies in erster Linie Umweltfaktoren, wie das Nahrungsangebot. Bei mehrzelligen Organismen sind die Anforderungen an die Proliferationskontrolle komplexer. Hier sind die Zellen Teil eines Gewebes und dürfen sich nur dann teilen, wenn dies zur Bildung des Gewebes während der Embryogenese oder später zu seiner Regeneration angebracht ist. Andere Zellen teilen sich nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen oder zur Wundheilung. Diese Zellen können den Zellzyklus verlassen und später, wenn dies erforderlich wird, wieder in den Zellzyklus eintreten. Die Entscheidung, ob sich eine Zelle teilt, ist je nach Zelltyp oder Zelllinie von der Präsenz verschiedener mitogener und antimitogener Faktoren abhängig (z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone oder Signale durch Zelladhäsion und Zell-Zell-Kontakt). Empfänglich für diese Faktoren sind die Zellen jedoch nur, solange sie sich vor dem sogenannten G1-Restriktionspunkt (R1) in der späten G1-Phase befinden

(Blagosklonny and Pardee, 2002; Pardee, 1974; Pardee, 1989; Planas-Silva and Weinberg, 1997b). So können G<sub>0</sub>-Zellen nach einer Stimulation durch Wachstumsfaktoren wieder in die G<sub>1</sub>-Phase zurückkehren und erneut proliferieren. Dagegen reagieren die Zellen nach dem Überschreiten des Restriktionspunktes nicht mehr auf diese exogenen Faktoren und durchlaufen den begonnenen Zellzyklus bis zur nächsten G<sub>1</sub>-Phase. Jedoch gibt es in vielzelligen Organismen viele Zellen, die ihr proliferatives Potenzial eingebüßt haben. Es sind hochspezialisierte, terminal differenzierte Zellen wie beispielsweise Neuronen, oder Skelettmuskelzellen. Diese haben den Zellzyklus während der Entwicklung des Organismus irreversibel verlassen und reagieren nicht mehr auf mitogene Signale. Die zentralen Elemente der Zellzykluskontrolle sind die Cykline, die Cyklin-abhängigen Kinasen (Cyclin-dependent Kinases, CDKs) und die spezifischen CDK-Inhibitoren. Die oszillierende Aktivität der Kinasen ist die Voraussetzung für das Durchlaufen des Zellzykluses. Die bereits erwähnten endogenen *checkpoint*-Signale und die exogenen proliferativen und antiproliferative Signale wirken regulierend auf die CDK-Aktivität ein und werden so in die Kontrolle des Zellzykluses integriert. (Ekholm and Reed, 2000; Pines and Rieder, 2001; Planas-Silva and Weinberg, 1997a; Sherr, 1996; Sherr, 2000). Eine Deregulation der aufeinander abgestimmten Maschinerie der Zellteilung führt zu einer unkontrollierten Teilung der Zelle und ist ein bestimmendes Charakteristikum von Tumoren (Kastan and Bartek, 2004).

### **I.1.1 Cyklin-abhängige Kinasen**

Wie bereits erwähnt stellen die CDKs zusammen mit ihren Aktivatoren, den Cyklinen, die zentralen Elemente der Zellzykluskontrolle dar. Die CDKs sind Prolin-abhängige Serin-Threonin Kinasen. Die zeitlich präzise Regulation der Aktivität dieser Kinasen stellt den geordneten und störungsfreien Ablauf des Zellzyklus sicher (Ekholm and Reed, 2000; Morgan, 1997; Pines and Rieder, 2001; Sherr, 1996; Sherr, 2000). Die intrazellulären Konzentrationen vieler Cykline unterliegen während des Zellzykluses dramatischen Schwankungen. Die Cykline werden zu bestimmten Zeitpunkten im Zellzyklus exprimiert und anschließend protolytisch abgebaut (Chun et al., 1996). Diese Oszillation der Cyklin-Menge im Verlauf eines Zyklus trägt wesentlich zur

phasenspezifischen Aktivierung und Deaktivierung der CDKs bei (Siehe Abb.I.1). Dagegen bleibt die Konzentration der CDKs weitgehend konstant. Die oszillierende Aktivität der Cyklin-abhängige Kinasen wird unter anderem durch die Bindung der regulatorischen Untereinheit, den Cyklinen, vermittelt (McGowan, 2003; Pines and Rieder, 2001; Sherr, 1996). Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Regulation der CDKs ist die Bindung und Inaktivierung durch spezifische Inhibitoren. Es existieren zwei Inhibitorfamilien die Cip/Kip- und INK-Familie (Ruas and Peters, 1998; Sherr and Roberts, 1995). Die CDKs bilden eine Familie von Proteinen ähnlicher Größe (34 bis 40 kDa) und konservierter Sequenz (>40% Homologie) (De Bondt et al., 1993). Die Cykline bilden demgegenüber eine Familie von Proteinen variabler Größe (35 bis 90 kDa), deren Mitglieder auf der Ebene der Primärstruktur nur mäßig verwandt sind. Die Sequenzhomologie konzentriert sich auf einen Bereich von etwa 100 Aminosäuren, die sogenannte Cyklin-Box, die für die Bindung und Aktivierung der CDKs notwendig ist (Kobayashi et al., 1992; Lees and Harlow, 1993). Durch die Bindung der Cyklin-Untereinheit erfährt die Kinase dabei eine Konformationsänderung, die gefolgt von gezielten Phosphorylierungen durch CDK-aktivierende Kinasen und Dephosphorylierungen durch Phosphatasen zur Funktionsbereitschaft führt (Jeffrey et al., 1995; Jeffrey et al., 2000; Kim et al., 1996). In Säugerzellen wurden neun Cyclin-abhängige Kinasen (CDK1 bis 9) und zehn Cyklin-Klassen (A-H, K und T) identifiziert (Grana and Reddy, 1995; Morgan, 1997). Die Kinasen assoziieren in unterschiedlichen Kombinationen mit den verschiedenen Cyklinen. Die Aktivität dieser Komplexe kennzeichnet die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Eine direkte Funktion bei der Regulation des Zellzyklus ist jedoch nur für einen Teil dieser CDKs (CDK 1, 2, 4, 6 und 7) und Cykline (A, B, D, E und H) nachgewiesen worden. Andere CDK-Komplexe spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Transkriptionsmaschinerie (Morgan, 1997; Oelgeschlager, 2002) oder in der Neuronendifferenzierung (Nguyen et al., 2002). Zudem werden einige CDKs durch nicht-Cyklin Aktivatoren stimuliert, wie zum Beispiel CDK5, der durch p35 aktiviert wird (Tsai et al., 1994). Im Folgenden werden die Funktionen der wichtigsten Cyklin-CDK-Komplexe und des CDK5-p35-Komplexes beschrieben.

### **I.1.1. D-Typ-Cyclin/CDK-Komplexe**

Die D-Typ-Cykline (Cyklin D1, D2 und D3) sind die ersten Cykline, die nach der Stimulierung ruhender (G0-Zellen) Zellen mit Wachstumsfaktoren exprimiert werden. In kontinuierlich proliferierenden Zellen ist ihre Konzentration häufig nahezu konstant. Da die Synthese der D-Cykline in hohem Maße von Wachstumsfaktoren abhängig ist und die D-Cykline metabolisch instabil sind, fällt ihre Konzentration nach dem Entzug von Wachstumsfaktoren rasch wieder ab (Sherr, 1993; Sherr, 1995). Die Funktion der D-Cykline besteht darin, mitogene und antimitogene Signale während der G0- und G1-Phase in die Kontrolle des Zellzykluses zu integrieren. D-Cykline binden und aktivieren die Kinasen CDK4 und CDK6 (Sherr, 1995; Sherr and Roberts, 1999). Die Cyklin D/CDK-Komplexe regulieren die Expression von Genen, die für den Übergang von der G1- in die S-Phase (z.B. Cyklin E) verantwortlich sind. So phosphorylieren sie zusammen mit dem Cyklin E/CDK2 Komplex das Rb Tumorsuppressorprotein (Retinoblastoma-Protein) und inaktivieren es. Dies führt zur Aktivierung von Genen, die das Überschreiten des G1-Restriktionspunktes und so die Progression in die S-Phase bewirken (Ekholm and Reed, 2000; Harbour and Dean, 2000; Sherr, 2000).

### **I.1.2 Der Cyklin E/CDK2-Komplex**

Cyclin E wird in proliferierenden Zellen selektiv am Übergang von der G1- zur S-Phase exprimiert (Ekholm et al., 2001). Das Protein bildet einen Komplex mit seinem katalytischem Partner CDK2, von dessen Aktivierung der Eintritt in die S-Phase abhängt. Das bekannteste Cyklin E/CDK2 Substrat ist Rb, das Schlüsselprotein für den Übergang in die S-Phase, welches final durch die Cyklin E/CDK2 inaktiviert wird (Dulic et al., 1992; McGowan, 2003; Ohtsubo et al., 1995; Resnitzky et al., 1994; Zhao et al., 1998). Das Rb-Protein kontrolliert über die Bindung an den Transkriptionsfaktor E2F die Transkription von Genen, die unter anderem für die Progression in die S-Phase, den Nukleotid-Metabolismus und die Replikation der DNS verantwortlich sind. Zudem kontrolliert Rb auch die Cyklin E und A Expression (Frolov et al., 2003; Yam et al., 2002).

### I.1.3 Die Cyklin A/CDK2 - und Cyklin A/CDK1-Komplexe

Cyclin A wird in steigenden Mengen während der S-, G2- und frühen M-Phase exprimiert und tritt zunächst im Komplex mit CDK2 auf, in der G2-Phase und der M-Phase auch im Komplex mit CDK1 (Draetta et al., 1989; Pagano et al., 1992; Pines and Hunter, 1990; Tsai et al., 1991). Cyclin A wird vor Eintritt in die Metaphase abgebaut. Cyclin A ist als Partner von CDK2 für die Fortführung der Replikation erforderlich (Girard et al., 1991; Pagano et al., 1992; Resnitzky et al., 1995). Dagegen ist für die Initiation der Mitose die Cyclin A/CDK1-Aktivität essenziell. So sind Substrate von Cyclin A/CDK1 für den Übergang am *DNA-replication-checkpoint* (R2) in die Mitose-Phase und für den Aufbau des Spindelapparats verantwortlich (Furuno et al., 1999; Knoblich and Lehner, 1993; McGowan, 2003; Pagano et al., 1992).

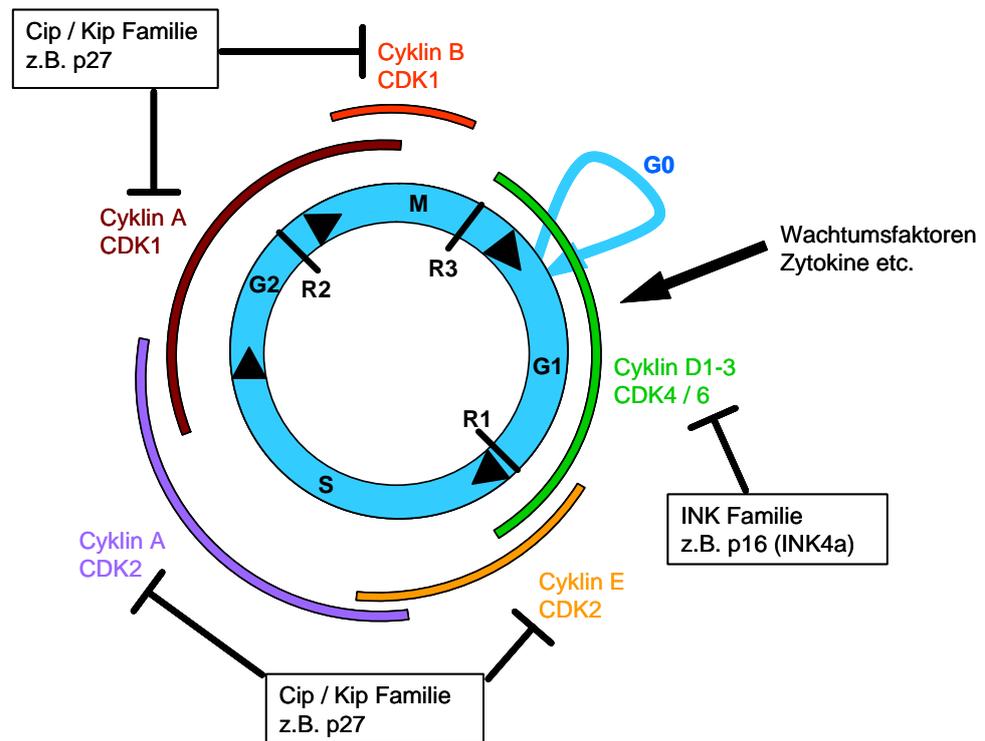
### I.1.4 Der Cyklin B/CDK1-Komplex

Cyclin B akkumuliert am Ende der G2-Phase und bildet zusammen mit CDK1 einen Komplex, der auch als *m-phase-promoting-factor* bezeichnet wird (Pines and Hunter, 1990). Die Aktivierung dieses Komplexes ist für den irreversiblen Übergang in die Mitose notwendig. Die Cyclin B/CDK1-Substrate sind unter anderem in der Auflösung der Kernhülle, beim Aufbau des Spindelapparats und der Verteilung bzw. Umorganisation des Golgi-Apparats involviert (Draviam et al., 2001; Nigg, 1993). Vor dem Eintritt in die Telophase ist die Inaktivierung des Cyclin B/CDK1-Komplexes die Voraussetzung für den ordnungsgemäßen Abschluss der Mitose (McGowan, 2003; Pines and Rieder, 2001).

### I.1.5 Der p35/CDK5-Komplex

Obwohl CDK5 eine 60 % Homologie zu CDK1 und CDK2 besitzt, konnte bisher keine Zellzyklus-regulierende Funktion nachgewiesen werden (Meyerson et al., 1992). CDK5 wird exklusiv nur von den nicht-Cyklin Regulatorproteinen p35 und p39 aktiviert. Das Protein p39 wird ausschließlich im Kleinhirn (Cerebellum) exprimiert (Lew et al.,

1994), während p35 in verschiedenen Geweben, aber besonders hoch im Neuronen des Zentralnervensystem (ZNS) exprimiert wird (Tsai et al., 1994). Diese Neurone sind permanent postmitotisch. Die Aktivierung von CDK5 erfolgt durch die Bindung an p35 bzw. p39, die über ihre Myristol-Anker an der Zellmembran fixiert sind (Tsai et al., 1994). Zudem wurde in neurotoxisch gestressten Neuronen und in den Gehirnen von Alzheimer Patienten die Komplexe p25/CDK5 und p29/CDK5 gefunden. Dabei handelt es sich um die Spaltprodukte von p35 und p39, die frei im Zytoplasma vorkommen. Die Bindung von p25 bzw. p29 an CDK5 führt ebenfalls zu aktivem CDK5. Zudem ist p25 bzw. p29 signifikant stabiler als p35 und p39. Besonders die Akkumulation von p25/CDK5 wird mit der Alzheimer Erkrankung in Verbindung gebracht (Patrick et al., 1999). So konnte in neuronalen Zelllinien nachgewiesen werden, dass die Akkumulation von p25/CDK5 zur Zerstörung des neuronalen Zytoskeletts führt. Diese Zerstörung des Zytoskeletts erfolgte durch die Hyperphosphorylierung und die damit verbundene Inaktivierung von Tau, welches im nicht-phosphoryliertem Zustand an Mikrotubuli bindet und durch einen bisher noch nicht verstandenen Mechanismus diese stabilisiert (Baumann et al., 1993; Dhavan and Tsai, 2001; Hamdane et al., 2003; Michaelis et al., 2002; Patrick et al., 1999; Tsai et al., 1994). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass p35/CDK5 durch die Phosphorylierung weiterer Substrate die neuronale Migration, das Axon- und Neuritenwachstum und die Zelladhäsion reguliert. Alle diese Effekte stehen im Zusammenhang mit der Kontrolle der Mikrotubuli- und Aktindynamik des neuronalen Zytoskeletts (Alexander et al., 2004; Dhavan and Tsai, 2001; Gilmore et al., 1998; Hahn et al., 2005; Hamdane et al., 2003; Nikolic et al., 1996; Tanaka et al., 2004).



**Abb.I.1. Cyclin-abhängige Kinasen im Zellzyklus.** Somatische Zellzyklen haben einander ablösende Synthese- (S) und Mitose (M) Phasen, die durch *gap*-Phasen (G1 und G2) unterbrochen werden. Nach einer Teilung (M-Phase) und dem Eintritt in die G1-Phase reagieren Säugerzellen bis zu dem Restriktionspunkt 1 (R1) in der späten G1-Phase auf extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren und Cytokine. Diese sowohl propoliferativ als auch antipoliferativ wirkenden Faktoren entscheiden über den Eintritt in die S-Phase. An jedem der Restriktionspunkte kann der Zellzyklus blockiert werden. An dem Restriktionspunkt 1 (R1) überprüft die Zelle die Bedingungen für den Eintritt in die S-Phase. Ist die Zelle einmal in die S-Phase eingetreten kann der Zellzyklus nicht mehr über extrazelluläre Faktoren beeinflusst werden. An dem Restriktionspunkt 2 (R2) kontrolliert die Zelle die fehlerlose Verdoppelung der DNS, wird diese Bedingungen erfüllt kann die Zelle in die M-Phase eintreten. An dem Spindelrestriktionspunkt (R3) wird vor der Chromatidentrennung die Verknüpfung der Chromosomen mit den Polen der mitotischen Spindel überprüft. In der G1-Phase akkumulieren die Cyclin D/CDKs auf mitogene Signale hin und bewirken mit Cyklin E/CDK2 den Eintritt in die S-Phase. Während der S-Phase wird verstärkt Cyklin A/CDK2 gebildet, das wiederum durch Cyklin A/CDK1 in der G2-Phase abgelöst wird. In die M-Phase wird der Cyklin B/CDK1 komplex gebildet. Die Cyclin/CDK-Komplexe werden durch spezifische Inhibitoren reguliert.

## I.2 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett setzt sich aus einem komplexen Netzwerk von Proteinfilamenten zusammen. Dieses umfasst hauptsächlich drei Klassen: Mikrofilamente (6 nm), Mikrotubuli (20-25 nm) und Intermediärfilamente (10 nm), die sich in ihrem Aufbau und ihrer Funktion unterscheiden. Zudem gibt es eine Vielzahl von Proteinen, die mit den Proteinfilamenten assoziieren und so die Proteinfilamente miteinander oder mit anderen Zellkomponenten verbinden. Daneben modulieren sie die Interaktionen und den Aufbau der Proteinfilamente. Das Zytoskelett ist zusammen mit diesen assoziierten Proteinen verantwortlich für die Form und Struktur der Zelle, zudem für die intrazellulären Transportprozesse (Endo- und Exocytose, Vesikeltransport), für die Zelladhäsion, die Zellmigration und die Chromatidentrennung (Chen et al., 2005b; Kodama et al., 2004; Lee and Van Vactor, 2003; Schmit and Lambert, 1988; Tanaka and Kirschner, 1991).

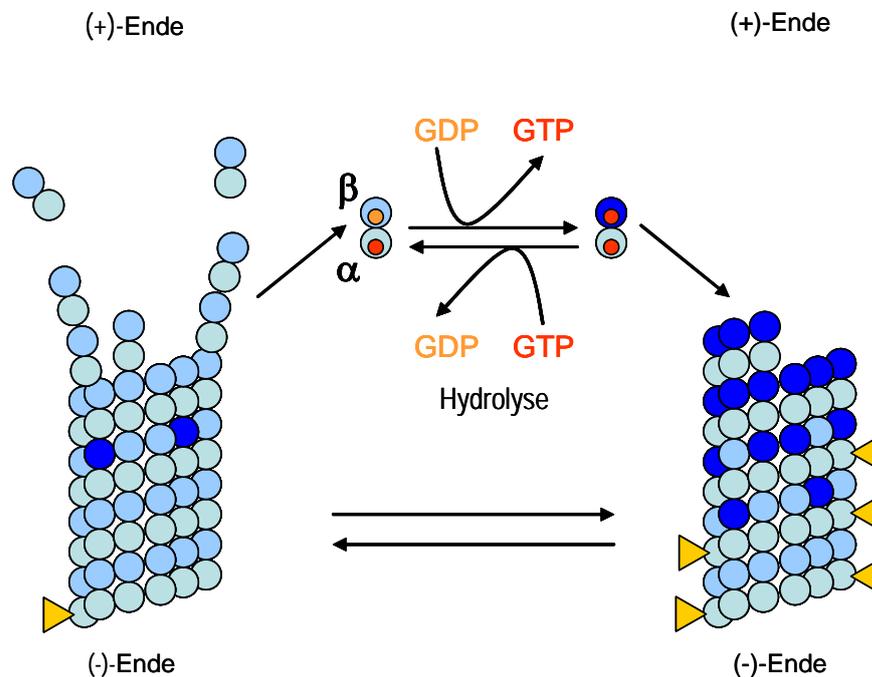
### I.2.1 Mikrofilamente

Die Mikrofilamente (F-Aktin) sind die kleinsten Filamente und setzen sich aus dem monomeren Aktin (G-Aktin) zusammen. Aktin wurde bisher in allen eukaryontischen Zellen gefunden und seine Sequenz wurde während der Evolution stark konserviert. (Carlier, 1989). Mikrofilamente besitzen eine Polarität, die durch unterschiedliche Kinetik des Einbaus von Monomeren an den Enden entsteht. Es gibt somit ein schnell und langsam wachsendes Ende (Valetti et al., 1999). Die Mikrofilamente bilden im Zusammenspiel mit dem Mikrotubuli-Netzwerk die Basis für Bewegungen in allen eukaryotischen Zellen. Im Zytoplasma liegen die Mikrofilamente in Form von linearen Bündeln, zweidimensionalen Netzwerken und dreidimensionalen Gels vor. Mikrofilamente kommen zwar in der gesamten Zelle vor, sind aber in peripheren Regionen nahe der Plasmamembran stark angereichert. Dort ist ein dreidimensionales Aktinnetzwerk über Aktin-bindende Proteine und durch direkte Bindung an integrale Membranproteine mit der Plasmamembran verankert. Dieser sogenannte Zellkortex gibt der äußeren Oberfläche der Zelle mechanische Stabilität (Bray et al., 1992).

## I.2.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind hohle, zylindrische Polymere, die aus den zwei GTP-bindenden Proteinen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, die ein Heterodimer bilden, aufgebaut sind. Mikrotubuli besitzen eine intrinsische Polarität, mit einem *in vitro* schnell wachsenden plus- und einem langsam wachsenden minus-Ende. *In vivo* ist die Mikrotubuli-Polymerisation auf die plus-Enden beschränkt, während die Depolymerisation an beiden Enden erfolgen kann. Die Mikrotubulidynamik, die auch als dynamische Instabilität bezeichnet wird (Mitchison and Kirschner, 1984), charakterisiert einen Mechanismus, bei dem einzelne Mikrotubuli ständig zwischen Wachstum und Abbau wechseln. Diese dynamische Instabilität beruht auf der unterschiedlichen Art der GTP-Bindung an die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten des dimeren Tubulins. Das  $\alpha$ -Tubulin-gebundene GTP wird während der Polymerisierung zum Mikrotubulus nicht hydrolysiert (irreversibel gebunden), während dessen das  $\beta$ -Tubulin-gebundene GTP nach dem Einbau in den wachsenden Mikrotubulus zu GDP hydrolysiert wird und das GDP-tragende Tubulin dann eine geringere Affinität zu weiteren Tubulin-Molekülen aufweist. Wenn die Polymerisation schneller fortschreitet als die GTP-Hydrolyse an den  $\beta$ -Untereinheiten, wächst der Mikrotubulus. In dem bevorzugt wachsenden Ende (plus-Ende) liegt die GTP-Bindungstelle oben und das GTP ist noch nicht hydrolysiert. Dem entsprechend sind am langsam wachsenden minus-Ende die  $\alpha$ -Untereinheiten terminal gelegen (Abb.I.2). Daher findet sowohl der Wachstum als auch der Abbau am plus-Ende wesentlich häufiger statt als am minus-Ende. Der Übergang von Wachstum zu Deassemblierung (*engl. catastrophe*) und der Übergang von Deassemblierung zu Wachstum (*engl. rescue*) wird durch viele Faktoren beeinflusst. Insbesondere muss eine kritische Konzentration an verfügbaren  $\alpha$ -/ $\beta$ -Tubulin-Dimeren vorliegen, damit es zum Aufbau von Mikrotubuli kommt. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass bei überschreiten einer bestimmten Konzentration und in Anwesenheit von GTP dieser Zusammenbau spontan verläuft (Dammermann et al., 2003; Dent and Gertler, 2003; Desai and Mitchison, 1997; Nogales, 2001). Außerdem sind spezifische Mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAPs) und Modifikationen der  $\alpha$ -/ $\beta$ -Tubulin-Dimere (Dent and Gertler, 2003; Westermann and Weber, 2003) an der Stabilisierung und

Destabilisierung von Mikrotubuli beteiligt. So wird zum Beispiel in Neuronen acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin mit stabilen und deacetyliertes mit dynamischen Mikrotubuli assoziiert. Die Funktion dieser Modifikationen steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Bindung von MAPs, welche die betroffenen Mikrotubuli weiter stabilisieren bzw. destabilisieren. Allerdings sind die Funktionen der verschiedenen Tubulin-Modifikationen noch nicht verstanden (Westermann and Weber, 2003). In Zellen weisen die Mikrotubuli zumeist mit ihren plus-Enden zur Außenmembran und mit den minus-Enden sind sie mit einem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) verbunden, von dem aus neue Mikrotubuli entstehen. Die bekanntesten MTOCs sind die Basalkörper an der Basis von Flagellen und die Zentrosomen, die während der Interphase an der Kernmembran verankert sind und während der Mitose zu den Spindelpolen werden (Valetti et al., 1999). In Eukaryoten haben Mikrotubuli vor allem zwei essenzielle Funktionen. Erstens sind sie die primäre strukturelle Komponente der mitotischen Spindel, die für die Koordination der Verteilung der Chromosomen während der Mitose verantwortlich sind. Zweitens organisieren sie das Zytoplasma, indem sie vor allem „Schienen“ für den Vesikeltransport bilden (Chen et al., 2005b; Dent and Gertler, 2003; Desai et al., 2003; Lee and Van Vactor, 2003; Vale and Milligan, 2000; Valetti et al., 1999). Zusammen mit Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten bilden und erhalten Mikrotubuli die Architektur des Zytoplasmas, wodurch sie unter anderem die Zellform bestimmen (Lee and Van Vactor, 2003).



**Abb.I.2. Schematische Darstellung der dynamischen Instabilität der Mikrotubuli.**

Dimere aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin sind in der Längsrichtung zu Protofilamenten an einander gefügt, 13 Protofilamente bilden die Grundform der Mikrotubuli. Nach Einbau in ein Mikrotubulum wird das GTP des  $\beta$ -Tubulins zu GDP hydrolysiert (spontan). Mikrotubuli wachsen, wenn die Konzentration von  $\alpha$ -/ $\beta$ -Dimeren oberhalb einer kritischen Konzentration liegt und  $\beta$ -Tubulin in der GTP-gebundene Form vorliegt. Bei niedrigen Konzentrationen von  $\alpha$ -/ $\beta$ -Tubulin oszillieren die Mikrotubuli zwischen Wachstum und Abbau. Das (+)-Ende wächst, wenn den Anbau von GTP-tragender  $\alpha$ -/ $\beta$ -Dimere schneller verläuft als die GTP-Hydrolyse an den  $\beta$ -Untereinheiten neu eingebauter Tubulin-Dimere. Im Neuronen wird acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin (gelbe Dreiecke) mit stabilen Mikrotubuli Strukturen assoziiert (Nach Nogales-2001).

### I.2.3 Intermediärfilamente

In der Familie der Intermediärfilamente (IF) sind über 50 Proteine zusammengefasst, die mit sich selbst oder mit anderen IF-Untereinheiten Filamente bilden können. Im Zytoplasma ziehen Intermediärfilamente von der Kernoberfläche bis zur Plasmamembran, und bilden ein dichtes Netzwerk. Im Nukleoplasma formen sie ein Geflecht, das vor allem die innere Membran der Kernhülle auskleidet. Die Intermediärfilamente sind unter anderem für die mechanische Stabilität der Zelle verantwortlich (Coulombe and Wong, 2004; Fuchs and Weber, 1994).

## I.2.4 Das neuronale Zytoskelett

Neuronen sind in vier morphologisch und funktional definierte Bereiche gegliedert: Zellkörper (Soma), Dendriten, Axon und präsynaptische Endigung (Abb.I.3). Das Soma enthält den Kern und ist Zentrum des Stoffwechsels. Am Zellkörper und an den baumartig verzweigten Dendriten werden in der Regel die chemischen Signale von anderen Nervenzellen empfangen, in elektrische umgewandelt und an den Axonhügel weitergeleitet. Hier werden die empfangenen Signale integriert und als Aktionspotential unverzerrt über das gesamte Axon bis zur Präsynapse geleitet. Dort wird das elektrische Signal wieder in ein chemisches umgewandelt, indem Transmitter sekretiert werden. Das Neuron zeigt folglich durch die Einteilung in ein somatodendritisches und ein axonales Kompartiment einen charakteristischen polaren Aufbau, der als Basis für seine Funktionen dient. Die strukturelle Polarität verlangt erstens, dass die Entwicklung von Fortsätzen exakt reguliert wird; d.h. nur einer der Fortsätzen entwickelt sich zum Axon und die anderen nehmen eine dendritische Morphologie an. Zweitens muss ein Mechanismus vorliegen, der es den Neuronen erlaubt sowohl zeitlich als auch örtlich definierte Verbindungen zu anderen Neuronen herzustellen. Als Drittes muss noch die Integrität des axonalen und dendritischen Kompartiments während der langen Lebenszeit eines Neurons sichergestellt werden. Die hauptsächlich intrazelluläre Determinante der neuronalen Morphologie stellt das Zytoskelett dar. Das Zytoskelett von Neuronen setzt sich hauptsächlich aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Neurofilamenten zusammen, wobei die Neurofilamente erst im Laufe der Differenzierung exprimiert werden. Bei der Morphogenese von Neuronen interagiert das Aktinfilamentsystem (Mikrofilamente), das unter der Plasmamembran angereichert ist, mit dem zytoplasmatischen Mikrotubuli-System, um Fortsätze zu bilden. Untersuchungen an embryonalen Neuronen aus dem Hippocampus der Ratte zeigten, dass Neuronen ihre charakteristische Morphologie durch eine stereotype Abfolge von Zwischenschritten entwickeln (Goslin and Banker, 1989; Goslin et al., 1989). Im ersten Schritt bilden frisch ausplattierte Neuronen eine Vielzahl an morphologisch nicht unterscheidbaren kurzen Fortsätzen aus. In einem zweiten Schritt wächst einer der Fortsätze schneller als die anderen und entwickelt sich zum Axon. Danach reifen alle anderen Fortsätze zu

Dendriten, die sich verzweigen und distal verjüngen. Dieser ganze Prozess wird entscheidend durch die Mikrotubuli und Mikrofilamente beeinflusst. Durch den gezielten Mikrotubuli-Aufbau und deren Stabilisierung durch MAPs werden neue Zellausläufer initiiert und vorhandene verlängert (Dent and Gertler, 2003; Drubin et al., 1985; Tanaka and Kirschner, 1991). Außerdem muss lokal das kortikale Aktinnetzwerk umorganisiert werden, damit eine Ausstülpung der Fortsätze ermöglicht wird. Bei diesem Prozess handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel der beiden Zytoskelettsysteme und vieler assoziierter Proteine. In adulten Neuronen sind die Mikrotubuli im Axon stark angereichert und ihre Orientierung unterscheidet sich von denen in den Dendriten. Während im Axon alle Mikrotubuli mit ihrem Plusende distal orientiert sind, weisen die Mikrotubuli der Dendriten gemischte Orientierungen auf (Baas et al., 1987). Nach der initialen Bildung der Fortsätze werden auch sukzessiv Neurofilamente in die Fortsätze transportiert, um ihnen vor allem mechanische Stabilität zu verleihen (Baas, 1997; Baas and Ahmad, 1993; Bray and Mills, 1991; Dent and Gertler, 2003; Tanaka and Kirschner, 1991) (Abb.I.4).

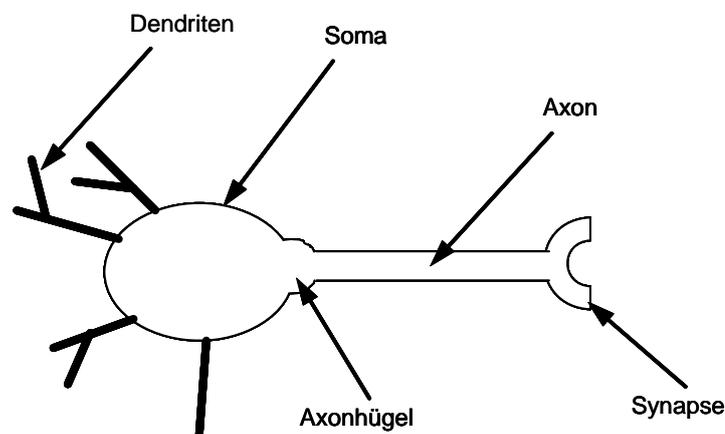
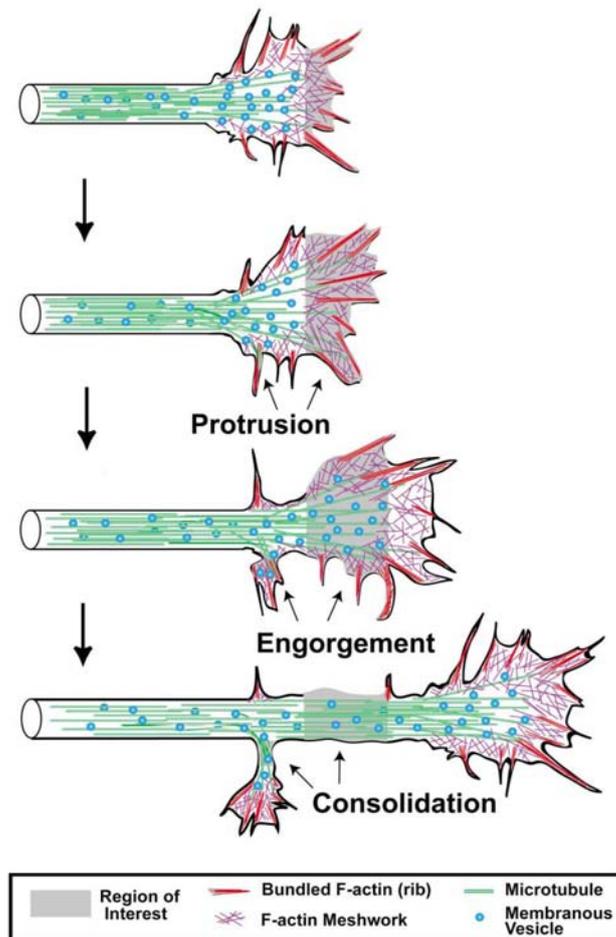


Abb.I.3. Schematische Darstellung eines Neurons



**Abb.I.4. Schematische Darstellung des Axonwachstums.** Drei Phasen des Axonwachstums werden unterschieden, *protrusion* (Vorsprung), *engorgement* (Anreicherung) und *consolidation* (Festigung) (Goldberg and Burmeister, 1986). Bei der *protrusion*-Phase kommt es zu einer schnellen Verlängerung von Filopodien und zu dünnen Lamellen Vorsprüngen, die häufig zwischen den Filopodien hervortreten. Diese Verlängerungen werden in erster Linie aus ineinander greifenden F-Actin-Netzen zusammengesetzt. Bei der *engorgement*-Phase wachsen Mikrotubuli in die *protrusion*-Region ein, in die über das Mikrotubuli vermittelte Transportsystem Membranvesikel und Organellen (wie Mitochondrien) transportieren werden. Bei der *consolidation*-Phase wird das F-Aktin-Netz im Hals des Wachstumskegels depolymerisiert und die Membran schnürt sich um die Mikrotubuli-Bündel ein, so dass ein sog. zylindrischer Axon-Schaft entsteht (Dent and Gertler, 2003).

## I.3 Posttranslationale Proteinmodifikationen

Die große Mehrzahl der in einer Zelle exprimierten Proteine sind co- oder posttranslational modifiziert. In der Literatur sind über 200 kovalente Proteinmodifikationen beschrieben (Nalivaeva and Turner, 2001). Unter ihnen bilden die reversiblen Proteinmodifikationen einen Mechanismus, der es der Zelle ermöglicht schnell, ohne eine Änderung der Genexpression und ohne zeitaufwendige Neusynthese von Proteinen, auf extra und interzelluläre Signale zu reagieren. Zu den wichtigsten dieser Modifikationen gehören die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitylierung. Im Folgenden soll auf die Acetylierung und Phosphorylierung im Besonderen eingegangen werden.

### I.3.1 Phosphorylierung

Proteinphosphorylierung ist an den Aminosäuren Serin (Ser), Threonin (Thr), Tyrosin (Tyr), Arginin (Arg), Lysin (Lys), Histidin (His), Asparaginsäure (Asp), Glutaminsäure (Glu) und Cystein (Cys) zu beobachten (Cozzone, 1993). Wobei es Unterschiede zwischen Prokaryonten und Eukaryoten gibt; bei den Prokaryoten werden häufig His und Asp phosphoryliert (Stock et al., 1989), während bei Eukaryoten vor allem die Aminosäuren Ser, Thr und Tyr phosphoryliert sind. Bei den Eukaryoten stellt sie die wichtigste posttranslationale Proteinmodifikation mit regulatorischer Funktion dar. Die Phosphorylierung an Serin-Resten findet dabei etwa zehnmal so häufig statt wie die Phosphorylierung an Threonin-Resten, die Threonin-Phosphorylierung ist wiederum etwa zehnmal häufiger als die Tyrosin-Phosphorylierung. Die Übertragung der Phosphatgruppe auf die alkoholischen bzw. phenolischen OH-Gruppen wird durch Proteinkinasen katalysiert, die ATP als Co-Substrat verwenden, wobei das  $\gamma$ -Phosphat des ATPs auf die Aminosäure transferiert wird. Die Hydrolyse der Phosphatgruppe wird durch Proteinphosphatasen katalysiert. Die meisten eukaryotischen Proteinkinasen und Proteinphosphatasen lassen sich in zwei Klassen mit Ser/Thr-Spezifität und mit Tyr-Spezifität einteilen (Hanks and Hunter, 1995). Es werden aber auch Enzyme mit dualer Spezifität, wie beispielsweise die MAP-Kinase-

Kinase, beschrieben (Seeger and Krebs, 1995). Die biologische Bedeutung der Phosphorylierung in höheren Eukaryoten lässt sich schon anhand der Vielzahl unterschiedlicher Kinasen und Phosphatasen erkennen, der Mensch besitzt zum Beispiel annähernd 600 verschiedene Proteinkinasen (Venter et al., 2001). Die Phosphorylierung spielt bei fast allen zellulären Mechanismen eine wichtige Rolle (Kouzarides, 2000). So wird beispielsweise der Zellzyklus und die DNA-Replikation durch die sog. Cyklin-abhängigen Kinasen gesteuert, die in ihrer enzymatischen Aktivität unter anderem durch verschiedene Cykline reguliert werden (Murray, 2004). Des Weiteren kommt den Proteinkinasen während der Transkription (Li et al., 2004), der DNA-Reparatur (Bartek et al., 2004; Kastan and Bartek, 2004), dem programmierten Zelltod (Apoptose) (Borgne and Golsteyn, 2003), dem Protein-Transport (Weis, 2003) und dem Auf- und Abbau des Zytoskelettes (Michaelis et al., 2002) eine Schlüsselrolle zu.

### **I.3.2 Acetylierung**

Die Proteinacetylierung reguliert ebenfalls wichtige Proteinfunktionen, einschließlich der enzymatischen Aktivität, der Stabilität, der Erkennung der DNA durch Proteine und der Protein-Protein Wechselwirkungen (Kouzarides, 2000). Sie ist die am häufigsten vorkommende kovalente Modifikation von Proteinen (Polevoda and Sherman, 2002), die sowohl in Eukaryoten als auch Prokaryoten vorkommt. Die Acetylierung von Proteinen wird durch Acetyltransferasen und deren Antagonisten, den Deacetylasen katalysiert (Taunton et al., 1996). Während der Acetylierung wird die Acetyl-Gruppe von Acetyl-Coenzym A entweder auf die  $\alpha$ -Aminogruppe des Aminoterminus (N-Terminale Acetylierung) von Proteinen (Polevoda and Sherman, 2000) oder aber auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin-Resten übertragen (Roth et al., 2001). Die Acetylierung des N-Terminus ist bei eukaryotischen Proteinen häufig zu finden, bei prokaryotischen hingegen nur selten. Sie ist im Gegensatz zu der Lysin-Acetylierung irreversibel (Polevoda and Sherman, 2002). Die Acetylierung von Lysinen wurde als erstes an Histonen beobachtet (Allfrey et al., 1964; Gershey et al., 1968; Vidali et al., 1968) und erst später, in den 90er-Jahre, konnte durch die Entdeckung der ersten

Histon-Acetyltransferase (Brownell et al., 1996) und Deacetylase (Taunton et al., 1996) das Gleichgewicht der Acetylierung erklärt werden. Aus diesem Grund heißen alle Acetyltransferasen die Lysine modifizieren Histon-Acetyltransferasen (Venter et al.) (Venter et al.), ungeachtet der Tatsache, dass mittlerweile eine Reihe von HATs gefunden wurden, die auch Nicht-Histon-Proteine, wie  $\alpha$ -Tubulin (MacRae, 1997) und p53 (Bannister and Miska, 2000; Ito et al., 2001), acetylieren (Glozak et al., 2005). Dem entsprechend nennt man ihre Gegenspieler Histon-Deacetylasen (HDAC) (Taunton et al., 1996).

## I.4 Chromatin

### I.4.1 Aufbau des Chromatins

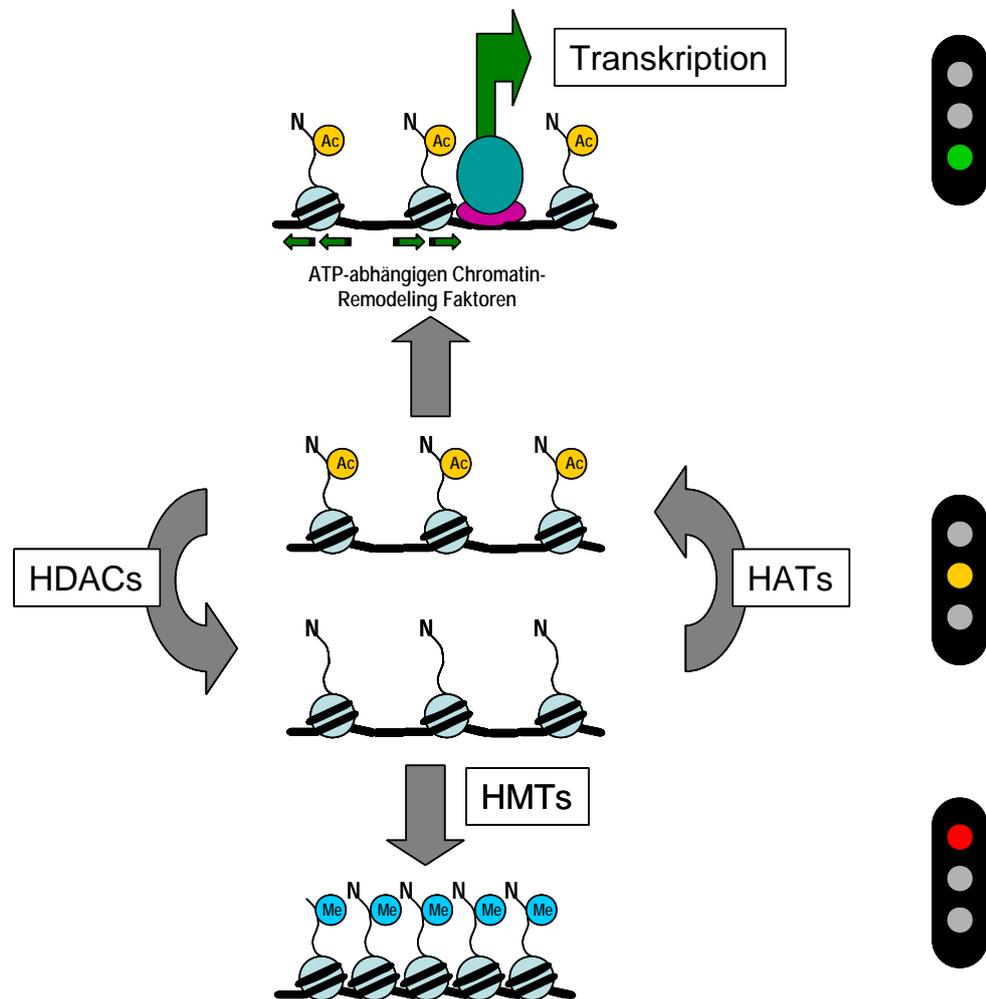
Die DNS liegt im Zellkern von eukaryotischen Zellen dicht verpackt mit Proteinen in Form von Chromatin vor. Die Grundeinheit des Chromatins ist das Nukleosom (Kornberg and Lorch, 1999b). Jedes Nukleosom besteht aus den vier Histon Proteinklassen, den argininreichen H3- und H4- sowie den lysinreichen H2A- und H2B Histonen. Die Histone H3- und H4 bilden ein Tetramer, das von beiden Seiten von einem H2A/H2B Dimeren flankiert wird. Um dieses Histonoktamer sind 146 bp DNS in 1,75 Windungen einer linksgängigen Helix gewunden (Luger et al., 1997; Luger and Richmond, 1998). Diese *core*-Nukleosomen sind durch DNS-*linker*-Einheiten von 50 bis 80 bp miteinander verbunden, wobei das Histone H1 an der Ein- und Austrittsstelle der DNS bindet. Im Gegensatz zu den *core*-Histonen ist das Histone H1 nicht essenziell zur Bildung der Nukleosomen, aber es erfüllt eine wichtige Funktion bei der Chromatinkondensierung (Guschin et al., 2000). Die Histone sind evolutionär stark konservierte Proteine. So unterscheidet sich z.B. Histon H4 aus einer tierischen Zelle von dem H4 aus einer Pflanzenzelle in nur zwei von 102 Aminosäuren (Forsberg and Bresnick, 2001; Kornberg and Lorch, 1999a). Die *core*-Histone besitzen eine Domänenstruktur bestehend aus einem basischen aminoterminalen Teil, einer hydrophoben, als *histon-fold*-Motiv bezeichneten globulären Domäne (Arents et al., 1991) und einer C-terminalen Domäne. Über das *histon-fold*-Motiv dimerisieren die

einzelnen Histone untereinander. Daneben ist das *histon-fold*-Motiv auch für die Organisation der DNA um das Histon-Oktamer des Nukleosoms verantwortlich (Chodaparambil et al., 2006; Kornberg and Lorch, 1999a; Lorch et al., 1999). Die 10 bis 40 Aminosäuren langen N-terminalen Schwänze der Histone ragen in einer wenig geordneten Struktur aus den Nukleosomen heraus, wo sie für die Wechselwirkung mit benachbarter DNS und insbesondere mit anderen Proteinen zur Verfügung stehen. Durch diese Wechselwirkungen vermitteln die N-termini Kontakte zwischen benachbarten Nukleosomen und sind für die Entstehung höher geordneter Strukturen von Bedeutung (Eberharter and Becker, 2002; Luger and Richmond, 1998). Die Kontakte zu anderen Proteinen und zur DNS werden durch reversible posttranslationale Modifikationen reguliert. So stellen besonders die evolutionär stark konservierten N-terminalen Schwänze der Histone H3 und H4 Zielstrukturen für Modifikationen, vor allem für die reversible Acetylierungen, Phosphorylierung und Methylierung dar. Diese Modifikationen haben eine entscheidende Bedeutung für die Regulation der Chromatinstruktur und sind damit eng mit Prozessen der Genexpression verknüpft (Eberharter and Becker, 2002; Forsberg and Bresnick, 2001; Kornberg and Lorch, 1999a).

## **I.4.2 Chromatin Modifikationen und ihre Auswirkungen**

Zur Regulation der Transkription über die Chromatinstruktur haben sich zwei unterschiedliche Mechanismen entwickelt. Eine Mechanismus umfasst die kovalente Modifikation der *core*-Histone an ihren N-terminalen Enden durch Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung, die zur Modulation der Chromatinstruktur führt und somit die Genexpression steuert (Nalivaeva and Turner, 2001; Narlikar et al., 2002; Orphanides and Reinberg, 2002). Diese Modulation der Chromatinstruktur wird unter dem Terminus *histone-code* zusammengefasst. Der zweite Mechanismus führt zu einem ATP-abhängigen *chromatin-remodeling*, indem die Struktur, Stabilität und Position der Nukleosomen verändert wird (Varga-Weisz, 2001; Vignali et al., 2000). Von den posttranslationalen Modifikationen ist die Acetylierung der Lysine in den N-terminalen Enden der Histone die best charakterisierte (Abb.I.5). Schon seit längerem war der Zusammenhang zwischen der Acetylierung von Histonen mit einem

transkriptionellen aktiven Zustand und die Deacetylierung mit einem transkriptionellen inaktiven Zustand bekannt (Allfrey et al., 1964). Die Acetylierungs- und Methylierungsgrade stehen in enger Abhängigkeit zu einander. So konnte man nachweisen, dass methyliertes Lys 4 und 79 zusammen mit acetyliertem Lys 9 und 14 von Histon H3 zu transkriptionell aktivem Chromatin führt, während methyliertes Lys 9 und deacetyliertes Lys 14 mit transkriptionell inaktivem Chromatin in Verbindung gebracht wird (Fischle et al., 2003; Liang et al., 2004; Schubeler et al., 2004). Die Acetylierung von Histonen führt zur Dekondensation von Chromatin, was den Zugang von Transkriptionsfaktoren und deren Bindung an ihre DNS-Bindungsstelle erleichtert. Die Deacetylierung hat den gegenteiligen Effekt und führt zur Kondensation des Chromatins (Benson et al., 2006; Berger, 2002; Bestor, 1998; Eberharter and Becker, 2002; LaVoie, 2005; Schubeler et al., 2004; Verdone et al., 2005). Die Phosphorylierung scheint eine kontextabhängig aktivierende oder reprimierende Wirkung auf die Transkription zu haben (Benson et al., 2006; Berger, 2002). Zum einen korreliert die Phosphorylierung von Serin 10 an Histon H3 mit der Chromatinkondensation während der Mitose, zum anderen ist die Phosphorylierung an Serin 10 an der Aktivierung der sehr frühen Gene *c-fos*, *c-jun* und *c-myc* beteiligt und stimuliert die nachfolgende Acetylierung von Histon H3 durch verschiedene HATs (Berger, 2002; Liang et al., 2004; Lo et al., 2000). Diese Ergebnisse führten zur Formulierung einer Hypothese, die als *histone-code* bezeichnet wird (Strahl and Allis, 2000). Sie besagt, dass die Gesamtheit aller Modifikationen, in Art, Zahl und zeitlicher Abfolge ein bestimmtes biologisches Programm vorgibt (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000). Diesen *histone-code* könnte dann von Nicht-Histonproteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren) „gelesen“ werden und somit die Genexpression begünstigen bzw. hemmen.



**Abb.I.5: Der Acetylierungs-/Deacetylierungs- Schalter von Histonen.** Die HAT und HDAC Aktivität bestimmen den Acetylierungsstatus des Chromatins. Die Acetylierung etabliert eine Struktur, die ATP-abhängige *chromatin-Remodeling* Faktoren den Umbauen des Chromatins erlauben. Dadurch werden Promotorstellen zugänglich für Transkriptionsfaktoren, die dann die Transkription einleiten. Die Histon Deacetylierung, oft gefolgt von Histon Methylierung, ist der erste Schritt zur Bildung der hoch repressiven Struktur, des Heterochromatins. Die Acetylgruppen entsprechen den gelben Kreisen, die Methylgruppen den blauen Kreisen. HAT, Histon-Acetyltransferase; HDAC, Histon-Deacetylase; HMT, Histone-Methyltransferase.

## I.5 Histon-Acetyltransferasen (HATs)

Histon-Acetyltransferasen werden in verschiedene Subfamilien eingeteilt und fungieren meist als transkriptionelle Aktivatoren (Johnstone, 2002; Kouzarides, 2000). Es werden zytosolische HATs vom Typ B und nukleäre HATs vom Typ A unterschieden (Brownell and Allis, 1996; Brownell et al., 1996; Hassig and Schreiber, 1997). Im Menschen sind bisher fünf Familien von HATs identifiziert worden, ihre prominentesten Vertreter sind PCAF/GCN5, p300/CBP, TAF250, SRC1 und MOZ, dabei sind PCAF und p300/CBP die am besten charakterisierten HATs (Kouzarides, 2000). Acetyltransferasen können die gleichen Proteine modifizieren, allerdings acetylieren sie bis auf wenige Ausnahmen unterschiedliche Lysinreste. Zum Beispiel wird der Tumorsuppressor p53 von PCAF und p300/CBP an verschiedenen Stellen acetyliert, wobei jede Modifikation unterschiedliche Effekte auf die Funktionen von p53 hat (Bode and Dong, 2004).

## I.6 Histon-Deacetylasen (HDACs)

Das Zusammenspiel von HATs und HDACs beeinflusst elementare zelluläre Prozesse, wie die Transkription (Knoepfler and Eisenman, 1999; Wolffe and Guschin, 2000), den Zellzyklus (Morris et al., 2000; Zhang et al., 2000), das *gen-silencing* (Bestor, 1998; LaVoie, 2005; Tanner et al., 2000), die Regulierung des neuronalen Phänotyps (Huang et al., 1999; Rouaux et al., 2004; Tang, 2006), die DNA-Replikation (Benson et al., 2006) und die DNA-Reparatur (Basile et al., 2006; Sakaguchi et al., 1998). Aufgrund dieser regulatorischen Funktionen der HATs und HDACs ist es nicht verwunderlich, dass es einen Zusammenhang zwischen veränderter HAT- bzw. HDAC-Aktivität und Tumorentstehung gibt. So konnte die Überexpression bestimmter HDACs mit Krebserkrankungen, wie zum Beispiel mit der Myeloischen Leukämie, in Verbindung gebracht werden (Cress and Seto, 2000; Halkidou et al., 2004). Dagegen konnte in bestimmten Hirntumoren (Gliome) eine Supprimierung der Expression bestimmter HDACs beobachtet werden (Hiratsuka et al., 2003). Die HDACs werden in drei Klassen, auf der Grundlage ihrer Homologie zu *Saccharomyces cerevisiae* Deacetylasen,

unterschieden (Tab.I.1). Die HDACs der Klasse I besitzen große Ähnlichkeit zum Hefeprotein RPD3. Zu dieser Gruppe gehören die humanen HDACs 1, 2, 3 und 8. Sie sind vorwiegend im Zellkern lokalisiert (de Ruijter et al., 2003). Die Klasse II-HDACs werden von HDACs 4, 5, 6, 7, 9 und 10 repräsentiert (de Ruijter et al., 2003). Sie sind homolog zum Hefeprotein HDA1 und sind sowohl zytoplasmatisch als auch im Zellkern lokalisiert. Während sich die Klasse I und II HDACs einige signifikante Homologien teilen, gibt es keine Ähnlichkeiten zu den Klasse III HDACs. Die Klasse III HDACs sind nach ihrem Hefehomolog Sir2 (silent information regulator 2) benannt worden (Imai et al., 2000a; Imai et al., 2000b; Landry et al., 2000; Tanner et al., 2000). In humanen Zellen wurden bisher sieben Orthologe, Sirtuin 1-7 oder SIRT1-7 genannt, gefunden (Frye, 1999; Frye, 2000). Der Unterschied zwischen den SIRTs bzw. den Klasse III HDACs zu den ersten beiden Klassen besteht darin, dass die Klasse III Enzyme NAD<sup>+</sup> (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) als Kofaktor benötigen (Abb.I.6) (Frye, 2000; Landry et al., 2000). Zusätzlich können sie nicht durch den HDAC-Klasse I und II Inhibitor Trichostatin A in ihrer Aktivität gehemmt werden (Imai et al., 2000a; Imai et al., 2000b).

**Tab.I.1 Übersicht über bereits identifizierte Histon-Deacetylasen.** Abkürzungen: HDA1 = histone deacetylase 1; HDAC = histone deacetylase; RPD3 = reduced potassium dependency; SIR = silent information regulator

HDAC Klasse	<i>S. cerevisiae</i> HDAC Proteine (Begründer der drei HDAC Klassen)	Bereits identifizierte humane HDACs
Klasse 1	Rpd3	HDAC 1, 2,3 und 8
Klasse 2	Hda1	HDAC 4, 5,6,7,9 und 10
Klasse 3	Sir2	SIRT1-7

## I.6.1 Sir2 (silent information regulator 2)

Das Sir2 Protein ist eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Histon-Deacetylase und wurde in einem Protein-Komplex zusammen mit Sir1, Sir3 und Sir4 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gefunden (Shore et al., 1984). Dieser Sir-Protein-Komplex wurde in Zusammenhang gebracht mit der transkriptionellen Inhibition dreier chromosomaler Abschnitte: dem Paarungstyp-bestimmenden Locus (*engl. mating-type locus*) (Ivy et al., 1986; Rine and Herskowitz, 1987), den telomernahen Bereichen (Palladino et al., 1993), sowie der rDNS-Loci (Smith and Boeke, 1997). Die Sir1, Sir3 und 4 Proteine haben selbst keine HDAC-Aktivität. Sir2 deacetyliert spezifisch Lysin 9 und 14 von Histon H3 sowie Lysin 16 von Histon H4 (Imai et al., 2000b; Kaeberlein et al., 1999). Die epigenetische Supprimierung (*engl. epigenetic silencing*) der Telomer nahen Bereiche hat einen direkten Einfluss auf die Chromosomenintegrität und den Zellzyklus (Brachmann et al., 1995; Gottschling et al., 1990; Shore, 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Sir2 ebenfalls bei der Reparatur von DNS-Doppelstrangbrüchen involviert ist (Martin et al., 1999; Mills et al., 1999; Shore, 2001). Außerdem hat das Sir2 vermittelte epigenetische *silencing* der rDNS-Loci einen direkten Effekt auf die Lebenserwartung der Hefezelle (Smith and Boeke, 1997). Sir2 supprimiert nicht nur die Transkription der rDNS, sondern inhibiert auch die rDNA-Rekombination. Die Rekombination der rDNS-*repeats* führt bei fast jeder Zellteilung zur Bildung von extrachromosomalen ringförmigen DNS-Elementen (ERC). Die Akkumulation dieser ERCs führt zu einer Fragmentierung des Nucleolus und zur Seneszenz, worauf der Tod der Hefezelle folgt (Bitterman et al., 2003; Reid and Rothstein, 2004; Sinclair et al., 2006).

Im Laufe weitere Untersuchungen sind sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten Sir2-verwandte Proteine gefunden worden. Diese Sir2-verwandten Proteine sind hoch konserviert und besitzen eine 200 bis 275 Aminosäuren umfassende katalytische Domäne, die auch *core*-Domäne oder Sirtuin-Homologie Domäne genannt wird. Diese Domäne ist das Markenzeichen der Sir-Proteinfamilie und wurde bisher in 60 Sir-verwandten Proteinen gefunden (Afshar and Murnane, 1999; Frye, 1999; Frye, 2000; Imai et al., 2000b).

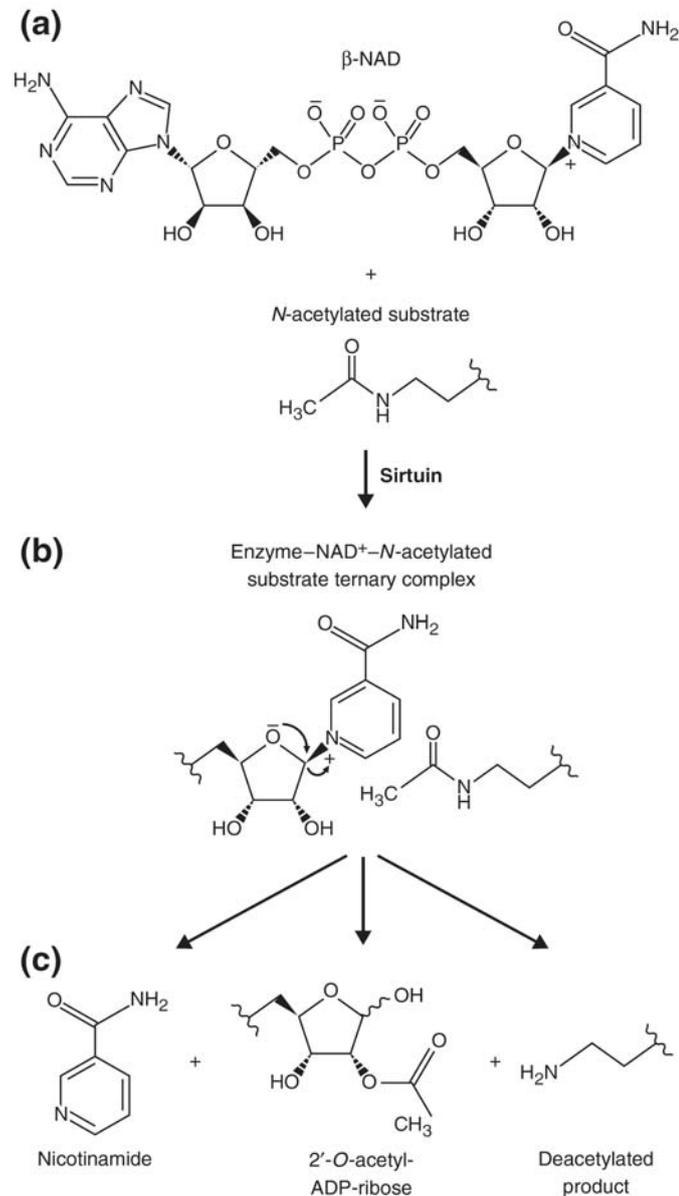
Ausführliche Strukturuntersuchungen des bakteriellen Sir2-Af1, dem humanen SIRT2 und dem Hefe Sir2 Homolog Hst2 haben gezeigt, dass die *core*-Domäne an ihren Enden durch eine große Domäne (Rossmann-Fold) und einer kleinen Domäne bestehend aus einem flexiblen Zinkbindungsmotiv und einem Substraterkennungsmotiv abgeschlossen wird. Beide Strukturelemente sind über eine Reihe von „Schleifen“, miteinander verbunden; diese bilden in der zentralen Region der *core*-Domäne eine Furche, an deren gegenüberliegenden Seite sich die Acetyllysine-Bindungsstelle und die NAD<sup>+</sup>-Bindungsstelle befinden. SIRT2 und Hst2 besitzen zusätzlich, im Gegensatz zu den beiden bakteriellen Sir-Proteinen, große amino- und carboxyterminale „Schwänze“ (Avalos et al., 2002; Finnin et al., 2001; Min et al., 2001; North and Verdin, 2004; Zhao et al., 2003). Das Zinkionen bindende Motiv (Cys-X-X-Cys) ist essenziell für die enzymatische Aktivität, eine Mutation in diesem Motiv führt zur Inhibition der Aktivität *in vitro* und *in vivo* (Min et al., 2001). Das zweite Domänen-Modul der kleinen Domäne wurde aufgrund struktureller Merkmale mit einer spezifischen Substraterkennungsfunktion in Verbindung gebracht (Avalos et al., 2002). Sequenzvergleiche zeigten, dass alle Sir-verwandten Proteine sich im wesentlichen in ihren C- und N-terminalen Enden und indem Motiv, welches für die spezifischen Substraterkennungsfunktion wichtig ist, unterscheiden (Avalos et al., 2002; North and Verdin, 2004; Zhao et al., 2003).

Aufgrund der NAD<sup>+</sup>-abhängigen enzymatischen Aktivität der Sir-Proteinfamilie, haben einige der 60 bekannten Sir-verwandten Proteine sowohl eine Deacetylierungs- als auch ADP-Ribosylierungs-Aktivität. Manche Mitglieder der Sir2-Familie haben sogar nur letztere Aktivität (Frye, 1999; Liszt et al., 2005; Tanny et al., 1999). Bei der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Deacetylierung entstehen drei Produkte, das deacetylierte Substrat, Nicotinamid und 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose (Abb.I.2) (Denu, 2003; Tanner et al., 2000). Es wird vermutet, dass die 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose in einem sog. *second messenger* System involviert ist (Tanner et al., 2000; Tanny and Moazed, 2001). Bisher ist die biologische Funktion der ADP-Ribosylierung noch nicht verstanden. Allerdings scheint die NAD<sup>+</sup>-abhängigen Deacetylase-Eigenschaft die primäre Enzymaktivität der Sir-Proteinfamilie zu sein (Imai et al., 2000a; Smith et al., 2000).

Die Sir2-Aktivität in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte in mehreren Studien mit einem verlängerten Überleben der Hefezelle in Verbindung gebracht werden. So

konnte gezeigt werden, dass eine moderate Überexpression von Sir2 das Überleben der Hefezelle um etwa 50% verlängert (Kaeberlein et al., 1999). Dabei spielt der Kofaktor NAD<sup>+</sup> die entscheidende Rolle. Dessen intrazelluläre Konzentration hängt von der Ernährungslage der Zelle ab. Bei Hefezelle mit geringem Nahrungsangebot (*engl. calorie restriction*) liegt das Gleichgewicht zwischen NAD<sup>+</sup> und NADH auf der Seite von NAD<sup>+</sup>. Diese Erhöhte NAD<sup>+</sup> Konzentration führt zu verstärkter Aktivität von Sir2, was wiederum zu einer verstärkten Inhibition der rDNA-Transkription führt und somit in einer Inhibition der gesamten Biosynthese endet. Außerdem wird durch die verstärkte Sir2-Aktivität die Fragmentierung des Nucleolus reprimiert (Sinclair et al., 2006). Sir2 ist somit möglicherweise das Schlüsselmolekül, das das Nahrungsangebot mit der Lebenserwartung verknüpft („hungernde Zellen leben länger“) (Guarente, 2001; Lin et al., 2002; Sinclair et al., 2006). Ähnliche Effekte auf die Lebenserwartung konnte ebenfalls mit dem Sir2-Ortholog in dem Fadenwurm *C. elegans* (Tissenbaum and Guarente, 2001) und durch die Überexpression von humanen SIRT1 in Rattenzellen (Cohen et al., 2004b) beobachtet werden.

Das SIRT1-Protein wurde auf Grund von phylogenetischen Studien als das Homolog zu Sir2 aus der Hefe eingestuft (Afshar and Murnane, 1999; Frye, 2000; Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001). Zudem konnten in *S. cerevisiae* vier weitere Homologe zu Sir2, Hst1-4 (homologs of Sir two) identifiziert werden. Dabei zeigte es sich, dass Hst2 eine hohe Sequenzhomologie zu SIRT2 aufweist (Afshar and Murnane, 1999; Perrod et al., 2001). Diese Sequenzhomologie zwischen Hefe Sir-Proteinen und den Sirtuinen sind Hinweise auf ähnliche Funktionen.



**Abb.I.6: Die enzymatische Aktivität der Sir-Proteine.** (a) Die notwendigen Bestandteile für die Sirtuin-vermittelte Deacetylase-Aktivität sind Sirtuin,  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, und der N-Acetyl-Lysinrest eines Substrats. (b) Die Bestandteile bilden einen tertiären Komplex. Während der enzymatischen Reaktion wird das am C1-Kohlenstoff gebundene Nicotinamid von dem ADP-Ribose-Rest des NAD abgelöst, um durch einen nukleophilen Angriff des Sauerstoffatoms der Acetyl-Gruppe auf das C1 Kohlenstoff einen oxocarbonium-artigen Übergang-Zustand zu erzeugen. Nach mehreren Intermediaten (nicht gezeigt) werden die Produkte gebildet, (c) das deacetylierte Substrat, 2-O-Acetyl-ADP-Ribose und Nicotinamid (Denu, 2003).

## I.6.2 Sirtuine (SIRTs)

Von den sieben bisher bekannten humanen SIRTs weiß man von SIRT4, SIRT5 und SIRT7 sehr wenig. Die größten strukturellen Unterschiede zwischen den Sirtuinen betreffen die Länge der amino -und carboxyterminale Regionen (N- und C-terminale). So lieferten die Sequenzanalysen der sieben SIRTs, dass nur SIRT1, 2, 3, 6 und 7 ausgeprägte N- bzw. C-terminale Schwänze aufweisen (Finnin et al., 2001; Frye, 2000). Auf Grund dieser Befunde wurde postuliert, dass die terminalen Bereiche regulatorische Aktivitäten besitzen könnten

(Min et al., 2001; North and Verdin, 2004; Zhao et al., 2003). Eine Bestätigung für diese These war die Entdeckung der Abspaltung der ersten 100 Aminosäuren von SIRT3 beim Import in das Mitochondrium. Erst durch diese Abspaltung wurde das Enzym aktiv (Onyango et al., 2002; Schwer et al., 2002). Die SIRTs werden in allen Geweben exprimiert, allerdings mit Unterschieden im Expressionsstatus (Michishita et al., 2005). *In vivo* Daten über Aktivität, Substrate und mögliche Funktionen existieren zur Zeit nur über SIRT1, SIRT2 und SIRT3.

### I.6.2.1 SIRT1

SIRT1 ist ein im Nukleus lokalisiertes Protein, mit einer Länge von 747 Aminosäuren (Dryden et al., 2003). SIRT1 deacetyliert *in vitro* und *in vivo* Histone, mit der Präferenz für Lysin 9 und 14 von Histon H3 und Lysin 16 von Histon H4 (Blander and Guarente, 2004; Frye, 1999; Vaquero et al., 2004). Dieses Deacetylierungsmuster von Histonen ist identisch mit Sir2 (Blander and Guarente, 2004; Imai et al., 2000a; Kaeberlein et al., 1999). Das erste nicht Histon Substrat von SIRT1 war der Transkriptionsfaktor TAF<sub>168</sub>. TAF<sub>168</sub> ist eine Untereinheit des RNA-Polymerase I-Komplexes, welches die rDNA transkribiert (Ranallo et al., 1999). Sir2 $\alpha$ , das murine SIRT1 ortholog Protein, kann durch die Deacetylierung von TAF<sub>168</sub> die Initiation der Transkription *in vitro* inhibieren (Muth et al., 2001). Die Tatsache, dass *S. cerevisiae* Sir2 auch die rDNA Transkription reguliert, bestärkt die Theorie, dass Sir2 und SIRT1 ähnliche Funktionen haben könnten. Weitere Transkriptionsfaktoren wurden als Substrate von SIRT1

beschrieben. So deacetyliert und reprimiert SIRT1 den MyoD/PCAF Komplex, der essenziell für die Myogenese ist (Fulco et al., 2003; McKinsey et al., 2001). Auch das Tumorsuppressorprotein p53 wird von SIRT1 *in vivo* und *in vitro* an Lysin 382 deacetyliert und so in seiner transkriptionellen Aktivität inhibiert (Chen et al., 2005a; Langley et al., 2002; Luo et al., 2001; Smith, 2002; Vaziri et al., 2001). Das Protein p53 funktioniert als ein durch DNA-Schäden und andere Noxen induzierbarer Transkriptionsfaktor, der als Tetramer an die DNA bindet und die Expression einer großen Anzahl von Genen kontrolliert, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzykluses und der Induktion der Apoptose spielen (Bode and Dong, 2004; Brooks and Gu, 2003; Lombard et al., 2005). Allerdings ist die *in vivo* Auswirkung auf die Funktion von p53 durch die SIRT1-vermittelte Deacetylierung, aufgrund widersprüchlicher Daten, noch nicht eindeutig geklärt (Bode and Dong, 2004; Li et al., 2002; Prives and Manley, 2001; Solomon et al., 2006). Darüber hinaus sind p53 und SIRT1 in Promyelocyten Leukemie Körpern (PML-Körper), die subnukleäre Strukturen darstellen, kolokalisiert. Über die Interaktion mit Proteinen der PML-Körper scheint SIRT1 auf die Zellproliferation Einfluss zu nehmen (Langley et al., 2002). Des Weiteren wurden die sog. *forkhead*-Transkriptionsfaktoren FOXO 1 (Yang et al., 2005), FOXO 3 (Brunet et al., 2004; Nemoto et al., 2004) und FOXO 4a (Kobayashi et al., 2005; van der Horst et al., 2004) als Substrate von SIRT1 beschrieben. Diese Faktoren werden *in vivo* und *in vitro* von SIRT1 deacetyliert. Die FOXO regulierten Gene kontrollieren unter anderem den Zellzyklus, den Zelltod, den Zellmetabolismus und die Zellantwort auf oxidativen Stress (Burgering and Kops, 2002; Greer and Brunet, 2005). Die letzten beiden Zellfunktionen haben einen direkten Einfluss auf die Lebensspanne der Zelle, wie Experimente im Fadenwurm *C. elegans* gezeigt haben. Das *C. elegans* homolog von SIRT1 deacetyliert das *C. elegans* FOXO-Protein Daf16 und induziert eine „Dauer“ genannte Seneszenz, die die Lebensspanne des Fadenwurms signifikant steigert. (Morris, 2005; Tissenbaum and Guarente, 2001). Die FOXO-Proteine werden über den Insulin-Phosphatidylinosit-3-kinase Signalweg negativ reguliert, der wiederum durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen aktiviert wird (Nemoto et al., 2004; Puig and Tjian, 2005). Diesen Zusammenhang zwischen geringem Nahrungsangebot (*calorie-restriction*) und Seneszenz entspricht den Beobachtungen, die bereits in der Hefe *S.cerevisiae* mit Sir2 gemacht wurden (Guarente, 2001; Sinclair et al., 2006). SIRT1

deacetyliert *in vitro* und *in vivo* auch die Proteine Ku70 und NF- $\kappa$ B, die wiederum in der Regulation der Apoptose involviert sind. So hat Ku70 sowohl eine essenzielle Funktion bei der Reparatur von DNS-Doppelstrangbrüchen, als auch bei der Bax-vermittelten Apoptose. Deacetyliertes Ku70 bindet den pro-apoptotischen Faktor Bax und verhindert so den Bax-vermittelten Zelltod (Cohen et al., 2004a; Cohen et al., 2004b). Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B kontrolliert die Expression von Genen, die zelluläre Prozesse wie die Zelladhäsion, die Immunantwort, den Zellzyklus, die Angiogenese und die Apoptose steuern (Ghosh and Karin, 2002; Karin and Lin, 2002; Mayo et al., 2001; Yamamoto and Gaynor, 2004). Durch die Deacetylierung von NF- $\kappa$ B wird die transkriptionelle Aktivität inhibiert. Allerdings führt die Deacetylierung von NF- $\kappa$ B im Gegensatz zu den anderen SIRT1-Substraten, die in der Regulation der Apoptose involviert sind, scheinbar zu einem pro-apoptotischen Effekt (Yeung et al., 2004). Es existieren zudem Hinweise, die vermutet lassen, dass SIRT1 nicht nur durch die Deacetylierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression inhibiert sondern auch durch die Deacetylierung von Histonen. Dies trägt dann zur Kondensation des Chromatins bei und somit zur Supprimierung der Genexpression (Fulco et al., 2003). Ein weiteres Indiz für diese Vermutung war der Nachweis, dass SIRT1 mit den beiden DNS-bindenden Repressorproteine hHES1 und hHEY2 *in vitro* und *in vivo* assoziiert. Die hHES1- und hHEY2-Proteine spielen eine wichtige Rolle während der Entwicklung des zentralen Nervensystems (Nakatani et al., 2004; Takata and Ishikawa, 2003). Weitere Experimente mit *knockout*-Mäusen zeigten, dass der Verlust von SIRT1 zu einer gestörten Muskeldifferenzierung führt (Sartorelli and Puri, 2001). Außerdem beeinflusst der komplette oder teilweise Verlust von SIRT1 die Embryo- und Gametogenese. Zum einen scheint der *knockout* von SIRT1 teilweise letal zu sein, denn es wurde nur etwa die Hälfte der zu erwarteten Nachkommen beobachtet. Zum anderen ist die gesamte Nachkommenschaft steril. Zusätzlich zeigten diese *knockout*-Mäuse erhebliche Entwicklungsstörungen, die insbesondere im Sehapparat, im Herz-Kreislauf-System und während der Muskelentwicklung zu beobachten sind. Dagegen konnte bei keinem der Mäuse ein Defekt im *gene-silencing* beobachtet werden (Cheng et al., 2003; McBurney et al., 2003). Die bisher bekannten Daten lassen die Annahme zu, dass SIRT1, wie sein Hefe Homolog Sir2, als transkriptioneller Repressor fungiert.

### I.6.2.2 SIRT2

SIRT2 ist ein überwiegend zytoplasmatisches Protein mit einer Länge von 352 Aminosäuren (Dryden et al., 2003). SIRT2 kolokalisiert mit dem Mikrotubuli-Netzwerk und deacetyliert  $\alpha$ -Tubulin an Lysin 40 *in vitro* und *in vivo*. Des Weiteren bindet SIRT2 *in vitro* und *in vivo* an HDAC6, einem Klasse II HDAC (North et al., 2003), das ebenfalls Lysin 40 von  $\alpha$ -Tubulin deacetyliert (Hubbert et al., 2002; Kovacs et al., 2004; Matsuyama et al., 2002). Eine Überexpression von HDAC6 führt zu hypoacetyliertem  $\alpha$ -Tubulin im Mikrotubuli-Netzwerk von NIH-3T3-Zellen und steigert deren Zellmigration (Hubbert et al., 2002). Deshalb wird vermutet das SIRT2, wie HDAC6, durch die Regulation des Acetylierungsstatus von  $\alpha$ -Tubulin die Zellmotilität beeinflussen könnte. Möglicherweise geschieht dies in Kooperation mit HDAC6 (North et al., 2003; North and Verdin, 2004).

Weitere Publikationen deuten auf einen Einfluss von SIRT2 im Zellzyklus hin. So ist SIRT2 während des Überganges von der G2-Phase in die Mitose-Phase nuklear lokalisiert und ist mit dem Chromatin assoziiert und bleibt dies die gesamte Mitose über. Dabei deacetyliert SIRT2 Histon H4 an Lysin 16 (Vaquero et al., 2006). Zudem wird SIRT2 in der späten G2-Phase hochreguliert und nach der Mitose sehr schnell wieder abgebaut und eine moderate Überexpression führt in Saos2-Zellen zu einer verlängerten M-Phase des Zellzyklus (Dryden et al., 2003), allerdings ist dieser Befund kontrovers zu neueren Ergebnissen, die ausschließlich Zellzykluseffekte während des G1-S-Phasen und G2-M-Phasen Übergangs beschreiben (Bae et al., 2004; Vaquero et al., 2006). Demnach führt der Verlust von SIRT2 zu einem Arrest in der G1-Phase. Dieser Arrest oder verspätete Übergang in die S-Phase korreliert mit der Zunahme der Histon H4 Lysin 16 Acetylierung in der M-Phase und einem abnormalen Acetylierungsstatus von H4 Lysin 16 in den heterochromatischen Foci in der S-Phase (Vaquero et al., 2006). Des Weiteren deuten die bisher gewonnenen Resultate auf eine Phosphorylierung von SIRT2 während der G2/M Übergang und der M-Phase hin (Dryden et al., 2003; Vaquero et al., 2006). Eine Regulation der SIRT2 Effektes durch eine Phosphorylierung in der Mitose könnte zum Beispiel über die CDKs erfolgen. Einen Zusammenhang zwischen SIRT2-abhängiger Deacetylierung von  $\alpha$ -Tubulin und

einem Zellzykluseffekt, z.B. während der Spindelbildung, konnte bisher nicht beobachtet werden. Dennoch deuten die in der Literatur beschriebenen Hinweise auf einen Einfluss von SIRT2 im Zellzyklus hin.

In weiteren Untersuchungen konnte in zahlreichen Glioma Zelllinien (Hirntumoren) festgestellt werden, dass die SIRT2 Expression stark reduziert war. Es stellte sich heraus, dass eine Überexpression von SIRT2 in diesen Zelllinien das *colony-formation* unterdrücken konnte und auch zu einer Modifizierung des Mikrotubuli-Netzwerk führte (Hiratsuka et al., 2003; North and Verdin, 2004). Diese Ergebnisse deuten auf eine Tumorsuppressor Eigenschaft von SIRT2 hin, die in Zusammenhang stehen könnte mit der Regulation von Zellzyklusfunktionen und des Mikrotubuli-Netzwerkes.

### **I.6.2.3 SIRT3**

SIRT3 zeigt *in vitro* HDAC-Aktivität auf Histon H4 (Onyango et al., 2002; Schwer et al., 2002) und ist in Mitochondrien lokalisiert. Die ersten 100 Aminosäuren von SIRT3 werden während des mitochondriellen Imports durch die Matrix-Prozessierende-Peptidase protolytisch abgespalten. Erst diese modifizierte Form besitzt Deacetylase-Aktivität (Onyango et al., 2002; Schwer et al., 2002). Damit ist SIRT3 das bisher einzig bekannte Protein der Sir-Proteinfamilie das durch eine Modifikation in seiner Aktivität reguliert wird. *In vivo* Substrate sind bisher noch nicht bekannt.

### **I.6.2.4 SIRT6**

SIRT6 zeigt *in vitro* ausschließlich eine auto-ADP-Ribosyltransferase-Aktivität (Liszt et al., 2005). SIRT6 ist im Nucleus lokalisiert (Liszt et al., 2005; Michishita et al., 2005) und es sind bisher keine Substrate bekannt, allerdings scheint der Verlust von SIRT6 die Genom-Stabilität zu beeinflussen (Mostoslavsky et al., 2006).

### **I.6.2.5 Inhibitoren der SIR-Proteine**

Die enzymatische Aktivität kann durch verschiedene Substanzen moduliert werden. So konnte man aufgrund von Aktivitäts-Assays unter Anwendung von Lineweaver-Burk-Diagrammen Nicotinamid (Na) als kompetitiven Inhibitor identifizieren. Die Hemmung durch Na wird durch den NAD<sup>+</sup>-abhängigen enzymatischen Mechanismus der Sir-Proteinen (Abbl.2) erklärbar (Howitz et al., 2003). Im Gegensatz zu den HDACs der Klasse I und II sind die Sir-Proteine (Klasse III) nicht durch Trichostatin A (TSA) hemmbar (Futamura et al., 1995; Imai et al., 2000a; Imai et al., 2000b).

## I.7 Zielsetzung

Es ist von Bedeutung die weitgehend unbekannt Rolle von Sirtuinen in Bezug auf Funktion und Regulation aufzuklären. Sirtuine beeinflussen verschiedene Prozesse wie die Apoptose, die Seneszenz (SIRT1), und das Migrationsverhalten (SIRT2) von Zellen. Diese Zellprozesse werden bei vielen Krankheitszuständen, wie der Tumorgenese und neurodegenerativen Erkrankungen, beeinflusst. Bisher sind sehr wenige Daten über Signalwege bekannt, die Sirtuine kontrollieren. Die ersten konkreten Hinweise konnte erst durch einen Festphasenphosphorylierungs-Screen zur Identifizierung von neuen Substraten für Cyclin E/CDK2 (Lilischkis et al., unveröffentl. Ergebnisse) in diesem Institut beschrieben werden.

Ziel dieses Forschungsprojektes war es, den Einfluss der Phosphorylierung durch Cyclin/CDK-Komplexe auf SIRT1 und SIRT2 aufzuklären. Dabei sollte das Schwergewicht der Untersuchungen auf SIRT2 liegen, weil SIRT2 zum einen in dem Festphasen-phosphorylierungs-Screen als mögliches Substrat für Cyclin E/CDK2 identifiziert wurde, zum anderen wurde in der Literatur eine Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung von SIRT2 postuliert.

Hierfür sollte zunächst die Charakterisierung der Zielaminosäuren von SIRT2 erfolgen, um Einblicke in das Phosphorylierungsmuster zu erhalten.

Des weiteren sollte die Spezifität einzelner Cyclin/CDK-Kinasekomplexe gegenüber SIRT1 und SIRT2 bestimmt werden, um unter anderem den Wirkungsbereich der Cyclin/CDK-vermittelten SIRT1- und SIRT2-Phosphorylierung in der Zelle einzugrenzen.

In weiteren Untersuchungen sollte der Einfluss der Phosphorylierung von SIRT2 auf Aktivität, Lokalisation und Stabilität untersucht werden. Um so einen Hinweis auf die Funktion dieser Modifikation zu erhalten.

Schließlich sollte die Zellbiologische Auswirkung der SIRT2-Phosphorylierung analysiert werden. Dabei wurde das Haupt-Augenmerk auf Effekte während des Zellzyklus und der Zellmigration gelegt.

## II Material und Methoden

### II.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham, Amicon, AppliChem, Baker, Biomol, BioRad, Boehringer, Difco, Du Pont, Eurogentech, Falcon, Fermentas, Fluka, Gibco BRL, ICN, Invitrogene, Merck, New England Biolabs, Promega, Riedel-deHaen, Roth, Santa Cruz, Seromed, Serva, Sigma, Stratagene.

Das Verbrauchsmaterial stammte von folgenden Firmen:

Amersham, Beckman, Biozym, Costar, Eppendorf, Falcon, Fuji, Gilson, Greiner, Kodak, Macherey-Nagel, Pharmacia, Qiagen, Sarstedt, Schleicher & Schuell, Whatman.

### II.2 Enzyme und Reaktionskits

Die verwendeten Enzyme zur Restriktion, Ligation und Amplifikation von DNS wurden von der Firma Fermentas bezogen. Die Enzyme wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben eingesetzt. Des weiteren wurden folgende Reaktionskits verwendet:

- Gateway cloning Kit (Invitrogene)
- Flp-In T-REx-Systems (Invitrogen)
- QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)
- QIAprep Spin Midi, Maxi prep Kit (Qiagen)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
- QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
- TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)

## II.3 Vektoren

### II.3.1 Klonierungsvektoren

**GWpD-CDK5:** Mittels Gateway-PCR und anschließender BP-Reaktion (II.8.2.7) wurde die hCDK5 ORF in den pDONR™201 rekombiniert. Als Matrize wurde die cDNA aus S5Y5-Neuroblastomazellen verwendet.

**GWpD-SIRT1:** Ein hSIRT1-Bsp1470I Fragment wurde in die Bsp1470I Schnittstelle von pDONR™221 kloniert. (II.8.2.1-2).

**GWpD-SIRT1-H363Y:** Siehe GWpD-SIRT1

**GWpD-SIRT1-S540A:** Das EcoRI/HindIII Fragment von pBS-SIRT1-(EcoRI/HindIII)-S540A wurde in die EcoRI/HindIII Schnittstelle von GWpD-SIRT1 rekloniert (II.8.2.1).

**GWpD-SIRT2:** Mittels Gateway-PCR und anschließender BP-Reaktion (II.8.2.7) wurde die hSIRT2 ORF in den pDONR™201-Vektor rekombiniert. Als Matrize wurde das pLafmid BA-SIRT2-Plasmid verwendet.

**GWpD-SIRT2-S331A:** Serin (S) 331 wurde zu Alanin (A) mittels QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) mutiert (II.8.2.6) Als Matrize diente GWpD-SIRT2.

**GWpD-SIRT2-S331D:** Serin (S) 331 wurde zu Asparaginsäure (D) mittels QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) mutiert (II.8.2.6). Als Matrize diente GWpD-SIRT2 .

**GWpD-SIRT2-S331E:** Serin 331 wurde zu Glutaminsäure (E) mittels QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) mutiert (II.8.2.6). Als Matrize diente GWpD-SIRT2.

**GWpD-SIRT2-H150Y:** Histidin (H) 150 wurde zu Tyrosin (Y) mittels QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) mutiert (II.8.2.6). Als Matrize diente GWpD-SIRT2.

**GWpD-SIRT2-H150Y-S331A:** Histidin (H) 150 wurde zu Tyrosin (Y) mittels QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) mutiert (II.8.2.6). Als Matrize diente GWpD-SIRT2-S331A.

**GWpE-SIRT1:** Das hSIRT1 wurde mittels BamHI/SnaBI aus dem pBabe-YESir2-wt geschnitten und in die BamHI/EcoRV Schnittstellen von pENTR<sup>TM</sup>3C kloniert (II.8.2.1-2). Eine Rekombination durch Gateway Klonierung war aufgrund des extrem hohen GC-Anteils in Anfangsbereich des SIRT1-ORFs nicht möglich.

**GWpE-SIRT1-H363Y:** Das hSIRT1 wurde mittels BamHI/SnaBI aus dem pBabe-YESir2-wt geschnitten und in die BamHI/EcoRV Schnittstellen von pENTR<sup>TM</sup>3C kloniert (II.8.2.1-2). Siehe auch GWpE-SIRT1.

**pBabe-YESir2-H363Y:** Das Plasmid wurde von dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie von Dr. Weinberg, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA zur Verfügung gestellt. Es beinhaltet das ORF von hSIRT1. Bei diesem Klon wurde das Histidin (H) 363 zu Tyrosin (Y) mutiert.

**pBabe-YESir2-wt:** Das Plasmid wurde von dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie von Dr. Weinberg, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA zur Verfügung gestellt. Es beinhaltet das ORF von hSIRT1.

**pBluescript II KS+:** Der Plasmidvektor pBluescript II KS+ (Stratagene) wurde zum Subklonieren und zur Standardisierung der transienten Transfektion verwendet.

**pBS-SIRT1-(EcoRI-HindIII):** Das EcoRI/HindIII Fragment von hSIRT1 wurde in die EcoRI/HindIII Schnittstelle von pBluescript II KS+ subkloniert (II.8.2.1-2).

**pBS-SIRT1-(EcoRI-HindIII)-S540A:** Serin (S) 540 wurde zu Alanin (A) mittels QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) mutiert . (II.8.2.6). Als Matrize diente pBS-SIRT1-(EcoRI-HindIII).

**pDONR™201, pDONR™221 und pENTR™3C:** Diese Vektoren wurde bei Invitrogen bestellt und sind Bestandteil des Gateway Cloning Kits von Invitrogen. Diese Vektoren beinhaltet zwei Rekombinationssequenzen, die auf der Lamda-Phagen Erkennungssequenzen der sog. *attachment sites* (*att-sites*) basieren Mit Hilfe dieser *att-sites* kann eine Ziel-DNS die über die passende Erkennungssequenz verfügt in diese Vektor kloniert bzw. rekombiniert werden.

**pLafmid-BA-SIRT2:** Der Vektor wurde beim RZPD in Berlin bestellt und beinhaltet den Klon IMAGp998N11146q2 , der die gesamte cDNA von hSIRT2 umfasst. Die zur Überprüfung durchgeführte Sequenzierung zeigte, dass die cDNA Sequenz mit der Sequenz von (Afshar and Murnane, 1999) übereinstimmt.

**pSuper:** Der Vektor wurde beim OligoEngine (<http://www.oligoengine.com>) bestellt.

### II.3.2 Eukaryotische Expressionsvektoren

**pCMV-CDK2:** Das Plasmid wurde von Dr. Bernards, Division of Molecular Carcinogenesis and Centre for Biomedical Genetics, Netherlands Cancer Institute zur Verfügung gestellt. Das pCMV Plasmid ist ein auf dem CMV-Promotor basierendes Expressionsplasmid.

**pCMV-Cyklin E:** Das Plasmid wurde von Dr. Bernards, Division of Molecular Carcinogenesis and Centre for Biomedical Genetics, Netherlands Cancer Institute zur Verfügung gestellt. Das pCMV Plasmid ist ein auf dem CMV-Promotor basierendes Expressionsplasmid.

**pCGN-c-Myc (Salghetti et al., 1999):** Die Aminosäuren 2 bis 439 der humane c-Myc cDNA wurde PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen XbaI und

BamHI in pCGN kloniert. pCGN ist ein auf dem CMV-Promotor basierendes Expressionsplasmid, das HA-Epitop getaggte Fusionsproteine erzeugt. Das Plasmid wurde von W. P. Tansey zur Verfügung gestellt.

**pEGFP- $\alpha$ -Tubulin:** In den pEGFP-C3-Vektor wurde  $\alpha$ -Tubulin kloniert (Richard Lilischkis)

**pEGFP-C3:** Dieser Vektor wurde bei Clontech erworben und kodiert für eine rot verschoben Variante des wild Typ GFP, der für die hellere Fluoreszenz und höheren Expression in Säugetierzellen optimiert worden ist. (Erregungsmaximum = 488 nm; Emissionsmaximum = 507 nm.). pEGFP-C3 kodiert die GFPmut1 Variante, bei der Phenylalanin (Phe)-64 zu Leucin (Leu) und Ser-65 zu Threonin (Thr) mutiert worden ist. Die MCS befindet sich zwischen der EGFP-kodierenden Sequenz und dem SV40 poly A. Dieser Vektor wurde als Transfektionskontrolle verwendet.

**GWp-HA:** pEV-HA-RF0, [Mattias, 1989] Mit den pEV-HA Vektoren können HA-Epitop getaggte cDNAs in eukaryotischen Zellen unter der Kontrolle des CMV-Promoters exprimiert werden. Das HA-Epitop ist in den drei möglichen Leserastern zu den Restriktionsschnittstellen KpnI, SmaI und XbaI angeordnet. Ansonsten besitzen die drei Vektoren einen SV40 *origin of replication* und beruhen auf dem bakteriellen Plasmidsequenz von pSP65. In die SmaI Schnittstelle wurde Gateway Kasette C.1 kloniert (II.8.2.1-2).

**GWp-HA-SIRT1:** Das hSIRT1 aus GWpD-SIRT1 wurde in einer LR-Reaktion in den GWp-HA-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWp-HA-SIRT1-S540A:** Das hSIRT1 aus GWpD-SIRT1-S540A wurde in einer LR-Reaktion in den GWp-HA-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWp-HA-SIRT2:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2 wurde in einer LR-Reaktion in den GWp-HA-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWp-HA-SIRT2-S331A:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2-S331A wurde in einer LR-Reaktion in den GWp-HA-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWp-HA-SIRT2-S331D:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2-S331D wurde in einer LR-Reaktion in den GWp-HA-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWp-HA-SIRT2-S331E:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2-S331E wurde in einer LR-Reaktion in den GWp-HA-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWp-HA-SIRT2-H150Y-S331A:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2-H150Y-S331A wurde in einer LR-Reaktion in den GWp-HA-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWp-HA-SIRT2-H150Y:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2-H150Y wurde in einer LR-Reaktion in den GWp-HA-Vektor rekombiniert (II.8.2.7)

**GWp-HA-CDK5:** Das hCDK5 aus GWpD-CDK5 wurde in einer LR-Reaktion in den GWp-HA-Vektor rekombiniert (II.8.2.7)

**GW-N-TAP:** In den pcDNA5/FRT/ TO/N-TAP-Vektor (Invitrogen) wurde in die EcoRV Schnittstelle die Gateway Kasette A kloniert. (II.8.2.1-2). Mit diesem Vektor und unter Verwendung des Flp-In T-REx-Systems (Invitrogen) ist es möglich Zielgene stabil in Zell zu integrieren (II.6.7).

**GWpNTAP-SIRT1:** Das hSIRT1 aus GWpD-SIRT1 wurde in einer LR-Reaktion in den GWpNTAP-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWpNTAP-SIRT2:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2 wurde in einer LR-Reaktion in den GWpNTAP-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWpNTAP-SIRT2-S331A:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2-S331A wurde in einer LR-Reaktion in den GWpNTAP-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**pCMV-p27:** Das Plasmid wurde von DR. Bernards, Division of Molecular Carcinogenesis and Centre for Biomedical Genetics, Netherlands Cancer Institute zur Verfügung gestellt. Das pCMV Plasmid ist ein auf dem CMV-Promotor basierendes Expressionsplasmid.

### II.3.3 Bakterielle Expressionsvektoren

**GWpGST:** In den pGEX-4T2 Vektor (Amersham Biosciences) wurde in die SmaI Schnittstelle die Gateway Kasette A kloniert. (II.8.2.1-2). Der Vektor kodiert für Glutathion-S-Transferase (GST) gefolgt von Gateway Rekombinationssequenzen (Hartley et al., 2000) zum Einfügen von cDNAs. Die Expression der Fusionsproteine kann mittels des synthetischen *lac*-Promotors mit IPTG induziert werden.

**GWpGST-SIRT1:** Das hSIRT1 aus GWpD-SIRT1 wurde in einer LR-Reaktion in den GWpGST-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWpGST-SIRT2:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2 wurde in einer LR-Reaktion in den GWpGST-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWpGST-SIRT2-H150Y:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2-H150Y wurde in einer LR-Reaktion in den GWpGST-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWpGST-SIRT2-H150Y-S331A:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2-H150Y-S331A wurde in einer LR-Reaktion in den GWpGST-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWpGST-SIRT2-S331A:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2-S331A wurde in einer LR-Reaktion in den GWpGST-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWpGST-SIRT2-S331D:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2-S331D wurde in einer LR-Reaktion in den GWpGST-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

**GWpGST-SIRT2-S331E:** Das hSIRT2 aus GWpD-SIRT2-S331E wurde in einer LR-Reaktion in den GWpGST-Vektor rekombiniert (II.8.2.7).

## II.4 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von MWG-Biotech bezogen. Die Primer kamen, nach Verdünnung mit H<sub>2</sub>O auf 10 pmol/μl, in PCR-Reaktionen zum Einsatz (II.8.1).

**Tab. II-1:** Übersicht über die verwendeten Primer.

	Name	Sequenz
1	AttB1-SIRT2	5'- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT AC ATG GAC TTC CTG CGG AAC TTA TTC-3'
2	AttB2-SIRT2	5'- GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT C TCA CTG GGG TTT CTC CCT CTC TGT TG -3'
3	SIRT2-361F	5'-CCG CGG AGG CAT GGA GTG GAG CTG GAT CTT CTT G-3'
4	SIRT2-S331A-PstI F	5'- CCC AGC ACT TCT GCA GCC CCC AAG AAG TCC CC -3'
5	SIRT2-S331A-PstI R	5'- GGG GAC TTC TTG GGG GCT GCA GAA GTG CTG GG -3'
6	SIRT2-S331D-BamHI F	5'- CCC AGC ACT TCA GCG GAT CCC AAG AAG TCC CC -3'
7	SIRT2-S331D-BamHI R	5'- GGG GAC TTC TTG GGA TCC GCT GAA GTG CTG GG -3'
8	SIRT2-S331E-PvuII F	5'- GCA CTT CAG CTG AGC CCA AGA AGT CCC C -3'
9	SIRT2-S331E-PvuII R	5'- GGC GGG GAC TTC TTG GGC TCA GCT GAA GTG -3'

10	SIRT2-H150Y-StuI F	5'- GGA GGC CTA CGG CAC CTT CTA CAC ATC ACA C -3'
11	SIRT2-H150Y-StuI R	5'- GTG TGAT GTG TAG AAG GTG CCG TAG GCC TCC -3'
12	SIRT1-S540A-E47III F	5'- GTT TCA GAA GAC TCA AGC GCT CCA GAA AGA ACT TCA CCA CC -3'
13	DONR201-F	5'- TCG CGT TAA CGC TAG CAT GGA TCT C -3'
14	DONR201-R	5'- GTG CAA TGT AAC ATC AGA GAT TTT GAG ACA -3'
15	siRNA-hSIRT2-Nr.1.1	5'- GAT CCC CAT CCA CCG GCC TCT ATG ATT CAA GAG A TC ATA GAGG CCG GTG GAT GTT TTT GGA AA -3'
16	siRNA-hSIRT2-Nr.1.2	5'- AGC TTT TCC AAA AAC ATC CAC CGG CCT CTA TGA TCT CIT GAA TCA TAG AGG CCG GTG GAT GGG G -3'
17	siRNA-mSIRT2-Nr.2.1	5'- GAT CCC CCT TCC ACC GCG CTT CTT CTT TCA AGA GAA GAA GAA GCG CGG TGG AAG TTT TTG GAA A -3'
18	siRNA-mSIRT2-Nr.2.2	5'- AGC TTT TCC AAA AA C TTC CAC CGC GCT TCT TCT TCT CIT GAA AGA AGA AGC GCG GTG GAA GGG G-3'
19	siRNA-hmSIRT2-Nr.1.1	5'- GAT CCC CGT TCA CAG CCT AGA ATA TAT TCA AGA GAT ATA TTC TAG GCT GTG AAC TTT TTG GAA A -3'
20	siRNA-hmSIRT2-Nr.1.2	5'- AGC TTT TCC AAA AAG TTC ACA GCC TAG AAT ATA TCT CIT GAA TAT ATT CTA GGC TGT GAA CGG G -3'

## II.5 Antikörper

**$\alpha$ -alpha-Tubulin (B-5-1-2):** Monoklonaler Maus Antikörper gegen alpha-Tubulin (Sigma)

**$\alpha$ -acetyl-alpha-Tubulin (6-11-B-1):** Monoklonaler Maus Antikörper gegen acetyliertes alpha-Tubulin (Sigma)

**$\alpha$ -CDK2 (H-298):** Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen CDK2 (St. Cruz, sc 748 )

**$\alpha$ -CDK5 (C-8):** Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen CDK5 (St. Cruz, sc 173 )

**$\alpha$ -Cyclin E (M-20):** Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen Cyclin E (St. Cruz, sc 481)

**$\alpha$ -GFP (FL):** : Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen GFP (St. Cruz, sc 8334)

**$\alpha$ -HA (3F10):** Monoklonaler Ratten Antikörper, erkennt die Aminosäuren 98-108 in Hämagglutinin des Influenzavirus (E. Kremmer).

**$\alpha$ -p27 (C-19):** Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen p27 (St. Cruz, sc 528)

**$\alpha$ -SIRT2 (A-5):** Monoklonaler Maus Antikörper gegen SIRT2 (St. Cruz, sc 28298)

**$\alpha$ -SIRT2 (T749):** polyklonales Kaninchenserum gegen SIRT2 (E. Kremmer).

## II.6 Zellkultur

### II.6.1 Allgemeine Materialien für Zellkultur

DMEM (Gibco)	mit 4,5 g/l Glucose
MEM (Gibco)	mit 4,5 g/l Glucose
PBS	140 mM NaCl 2,6 mM KCl 2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,45 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Penicillin/Streptomycin (Seromed)	10.000 Einheiten/10.000 µg/ml
Trypsin/EDTA (Seromed)	0,5/0,02% (w/v) in PBS
FCS (Gibco)	fötale Kälberserum
Pyruvat	
Gewebekulturschalen (Falcon)	Durchmesser 6, 10, 25 cm
Gewebekulturflaschen (Falcon)	Volumen 100, 250, 1000 ml
1 ml Einfriergefäße (Nalgene)	

### II.6.2 Eukaryontische Zellen

**HEK 293:** Adhärenente epitheliale Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen (HEK), die mit Ad5-DNA transformiert wurden. Das Ad5-Insert liegt auf 19q13.2. 293 ist eine hypotriploide Zelllinie mit der modalen Chromosomenzahl  $n = 64$ , die man in 30% der Zellen findet (ATCC CRL-1573).

**HEK 293T:** Ist ein Derivat der 293 Zellenlinie, in die das SV40 T-Antigen eingefügt wurde. Somit können diese Zellen auch Expressionsplasmide mit einem SV40-Replikationsstartpunkt amplifizieren (DuBridge et al., 1987).

**HEK293-GW- N-TAP, N-TAP-SIRT2, N-TAP-SIRT2-S331A, N-TAP-SIRT1:** HEK 293-Zelllinie mit stabil integriertem Expressionsvektor GW-N-TAP, N-TAP-SIRT2, N-TAP-SIRT2-S331A, N-TAP-SIRT1. Die Zelllinien wurde generiert unter Verwendung des Flp-In T-REx-Systems (Invitrogen), das auf Rekombination des Expressionsvektors in einen transkriptionell aktiven Locus der Flp-In T-REx 293-Zellen beruht. Die Expression steht unter Kontrolle eines Tet-induzierbaren Promotors.

**HeLa:** Die HeLa-Zellen leiten sich von einem menschlichen Cervixkarzinom ab und werden seit 1951 in permanenter Kultur gehalten

**Saos-2:** Osteosarkom Zelllinie (ATCC HTB-85)

### II.6.3 Kulturbedingungen

Alle Zellkulturmedien enthalten 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin.

293,HeLa,Saos-2 MEF:	DMEM mit 10% (v/v) FCS
	Pyruvat, 10% (v/v) FCS

### II.6.4 Krykonservierung

Zum Einfrieren wurden Zellen in 1 ml FCS mit 10% DMSO aufgenommen, in ein Einfriergefäß überführt und in Zellstoff eingewickelt bei -80°C über Nacht langsam abgekühlt. Anschließend wurden die gefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen für 10 min in einem 37°C-Wasserbad inkubiert, mit 10 ml Medium gewaschen und in die entsprechenden Gefäße mit frischen Medium überführt.

## II.6.5 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde vorsichtig unter das Deckgläschen einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zellen in jeweils 4 x 4 Quadraten der Zählkammer wurden gezählt. Aus vier Werten wurde ein Mittelwert gebildet und die Zellzahl/ml nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen/ml} = m' \cdot v \cdot K$$

wobei:  $m'$  = Mittelwert

$v$  = Verdünnungsfaktor

$K = 1 \times 10^4$  = Konstante der Zählkammer

## II.6.6 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion adhärenter Zellen erfolgte nach der Calcium-Phosphat-Methode (Chen and Okayama, 1988). Dabei kopräzipitiert die DNA in einem Komplex mit Calciumphosphat und wird von den Zellen vermutlich über Endozytose aufgenommen und im Zellkern extrachromosomal transkribiert. Die Effizienz der hier durchgeführten Transfektion ist abhängig vom Zelltyp mit etwa 5-10% einzuschätzen.

2 x Hebs-Puffer	274 mM NaCl
	42 mM HEPES
	9,6 mM KCl
	1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	pH 7,1
HEPES-Puffer	142 mM NaCl
	10 mM HEPES
	6,7 mM KCl
	pH 7,3

250 mM CaCl<sub>2</sub>

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  pro 6 cm bzw.  $8 \times 10^5$  pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gegen MEM mit 10% HS und 1% (w/v) Penicillin/Steptomycin gewechselt. Zur Transfektion der REFs wurde DMEM statt MEM verwendet. Die DNS für 6 cm Schalen wurde in 200  $\mu$ l (500  $\mu$ l für 10 cm Schalen) 2x Hebs-Puffer aufgenommen. Unmittelbar vor der Transfektion wurde 200  $\mu$ l (500  $\mu$ l) CaCl<sub>2</sub> tropfenweise innerhalb 10-15 sec zugegeben, durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und direkt tröpfchenweise in das Kulturmedium gegeben. Die Schalen wurden kurz geschwenkt und sofort in den Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt. Nach 4-6 Stunden wurden die Zellen zweimal mit 4 ml (10 ml) HEPES-Puffer gewaschen. Anschliessend wurden 4 ml (10 ml) frisches Kulturmedium zugesetzt. REFs wurden über Nacht transfektiert.

### **II.6.7 Herstellung von stabil exprimierenden Zelllinien**

Die Herstellung von stabil exprimierenden Zellen erfolgte nach dem Flp-IN™ Protokoll Version C von Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>). Hier für wurden die Gateway kompatiblen Integrations Vektoren verwendet (II.1.3.2).

### **II.6.8 Adhäsions- Assay**

In dem Adhäsions-Assay sollte die Anzahl der adhärenenten und abgelösten transfizierten Zellen bestimmt werden. Hierfür wurden HEK293 oder HeLa Zellen in 10 cm Zellkulturschale mit max 20,5  $\mu$ g DNS transient transfiziert (II.6.6). Dabei diente die Transfektion von 0,5  $\mu$ g pEGFP- $\alpha$ -Tubulin (II.3.2) als Transfektions-Kontrolle. 36h nach der Transfektion wurde der Mediumüberstand in ein 12 ml Falcon-Tube überführt und die Zellen bei 2000 rpm für 2 min sedimentiert. Die sedimentiertem Zellen wurden in 1 ml- 2 ml PBS aufgenommen. Die adhärenenten Zellen auf der

Zellkulturschale wurden mit 5 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C behandelt. Die trypsinisierten Zellen wurden mit PBS auf in einem Gesamtvolumen von 5 ml PBS aufgenommen. Daraufhin wurde die Zellzahl der transfizierten abgelösten und adhärenen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (II.6.5) unter Verwendung eines Olympus IX50 Fluoreszenzmikroskops bestimmt. Dabei wurden die Zellen in allen neun Quadraten der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

### II.6.9 Durchflusszytometer (FACS)

80% Ethanol (-20°C)

RNAse (20µg/ml)

PI (50µg/ml)

Die Methode der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated-cell-sorter* = FACS) beruht auf dem Prinzip, dass verschiedene mikroskopisch kleine Partikel anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und auch ihrer intrazellulären Zusammensetzung unterschieden werden können. Dabei handelt es sich in der Regel um Zellen. Jedoch reicht das Anwendungsspektrum der Durchflusszytometrie über das reine *cell-sorting* weit hinaus, so spielt diese Methode unter anderem bei der Zellzyklusanalyse von Zellpopulationen eine wichtige Rolle. Viel Anwendungen setzen für die Messung die Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörpern, die gegen bestimmte zelluläre Strukturen gerichtet sind, voraus. Die so markierten Zellen werden in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet und charakterisiert. Das Entscheidende Merkmal dieser Messmethode ist, dass innerhalb kürzester Zeit eine große Anzahl von Zellen charakterisiert werden können.

Der Nachweis der Zellzyklusverteilung von Zellpopulationen in dieser Doktorarbeit erfolgte durch die Fluoreszenzmarkierung der DNS mit Propidium-Iodid (PI) und anschließender Detektion am Durchflusszytometer. Hierzu wurden die Zellen einer 10 cm Gewebekulturschalen zunächst mit Hilfe von 2 ml Trypsin/EDTA vom Boden ihres Kulturgefäßes abgelöst. Der Mediumüberstand (ca. 10 ml) wurde zuvor in 14 ml *Falcon*

*Round Bottom Tubes* verwahrt. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden darauf in dem verwahrten Mediumüberstand aufgenommen und die Zellen durch hoch und runter pipettieren weiter vereinzelt. Die Vereinzlung der Zellen ist für diese Messmethode essenziell, da an sonsten durch Zellaggregate die Messküvette verstopft werden könnte außerdem würde auch das Ergebnis verfälscht werden. Der Mediumüberstand wurde verwahrt um die abgelösten Zellen im Medium, die vor der Trypsin-Behandlung z.B. durch Zytostatikabehandlung sich ablösten hatten, ebenfalls der Messung zuzuführen. Die Zellen wurden dann in 14 ml *Falcon Round Bottom Tubes* bei 2000 rpm für 2 min abzentrifugiert und zwei mal in 5 ml PBS gewaschen. Darauf wurden die Zellen in 0,5 ml PBS homogenisiert und unter *vortexen* in 7,5 ml 80% Ethanol (-20°C) aufgenommen. Dies dient der Fixierung der Zellen. Dabei wird das Ethanol tropfenweise zu der Zellsuspension hinzugefügt. Die Zellen wurden dann für mindestens 24 h bei -20°C gelagert. Die fixierten Zellen wurden dann abzentrifugiert, zweimal in 5ml PBS gewaschen und in 0,4 ml PBS aufgenommen. Zu dieser Zellsuspension wurde 200 µl RNase (20µg/ml) hinzugefügt und die Zellen für 5 min bei RT inkubiert. Darauf wurde 400µl PI (50µg/ml) dazugegeben und die Zellen für mindestens 30 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Zellzyklusverteilung der Zellen in einem Durchflusszytometer der Marke „FACSCALIBUR“ der Firma BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) analysiert.

## II.6.10 Präparation von Zell-Lysaten

Frackelton-Puffer (F-Puffer):	10 mM Hepes pH 7,5
	50 mM NaCl
	30 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
	50 mM NaF
	5 µM ZnCl <sub>2</sub>
	pH 7,05
	0,2 % (v/v) Triton X-100
	10% (v/v) Glycerin

RIPA-Puffer:	10 mM Hepes pH 7,5 150 mM NaCl 1% NP40 1 % DOC 0,1 % SDS
Protease Inhibitoren:	2,5 µg/ml Leupeptin 0,025 U/ml $\alpha_2$ -Macroglobulin (Roche) 2,5 µg/ml Pepstatin A 500 µM Pefa-Bloc (Roche) 14 µg/ml Aprotinin
Phosphatase Inhibitoren:	100 µM $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 10 mM Natrium- $\beta$ -glycerophosphat 1 mM NaF

Je Ø10 cm- / Ø6 cm-ZK-Schale wurden die Zellen bei 4°C mit 500 µl / 200 µl F-Puffer für 10-15 Minuten lysiert, dann abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und weitere 20-30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden bei 13.200 rpm (16.100xg) in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das Gesamtzelllysate im Überstand wurde sofort weiter verwendet oder bei (-20)°C gelagert.

### II.6.11 Immunopräzipitation

Protein A-Sepharose CL4B (Pharmacia) oder Protein G-Sepharose (E. Kremmer), in PBS gequollen, mehrfach mit PBS gewaschen und in PBS mit 0,1% (w/v) Natriumazid bei 4°C gelagert. Für Immunpräzipitationen wurden F-Puffer (niedrig stringent) oder RIPA-Puffer (hoch stringent) für die Zelllyse und eingesetzt (II.6.1.2). Die spezifischen Antikörper und 10-20 µl Protein A-Sepharose bei polyklonalen Antikörpern oder Protein G-Sepharose bei monoklonalen Antikörpern wurden mindestens 1 h mit den Zelllysaten bei 4°C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf einem Überkopfschüttler

inkubiert. Nach die Inkubation wurden die Immunokomplexe viermal mit F-Puffer bzw. RIPA-Puffer gewaschen und in einem SDS-Page (II.9.1) aufgetrennt. Das gel wurde anschließend in einem Immunoblot analysiert (II.9.2)

### II.6.12 *In vivo* Markierung von Proteinen mit [<sup>35</sup>S]-Methionin

Labelling-Medium:

DMEM (Sigma D0422) incl. 4.5 g/l glucose and NaHCO<sub>3</sub>  
w/o methionine, cysteine and glutamine  
1% glutamax  
10% dialysed FCS  
1% PenStrept  
25 mM Hepes pH 7.5

Chase-Medium:

DMEM (Gibco 61965-026) incl. Glutamax, 4.5 g/l glucose  
and pyridoxine, no pyruvate.  
10% FCS  
1% PenStrept  
25 mM Hepes pH 7.5  
15 mg/l L-methionine

[<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein (Translabel, Amersham)

Die 24 h zuvor transfizierten 10 cm Zell (10 cm Zellkulturkulturplatten) (II.6.6) wurden mittels Trypsin/EDTA (II.6.3) abgelöst, gegebenen falls gepoolt, und auf 6 cm Zellkulturplatten ausgesät. Die Anzahl der 6cm Platten richtete sich nach den Zeitpunkten der Probenentnahme. Nach einem weiteren Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 30 min in Methionin-freiem Labelling-Medium vorinkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), das Medium wurde entfernt und durch 2 ml Methionin-freiem Medium mit [<sup>35</sup>S]- Methionin/Cystein ersetzt. Die Zellen wurden mit 150 µCi [<sup>35</sup>S]- Methionin pro Platte für 20-45 min markiert. Anschließend wurden die Zellen

einmal mit PBS gewaschen und 2 ml Chase medium hinzugefügt. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde das Chase medium abgesaugt und die Zellen mit 300 µl RIPA-Puffer aufgeschlossen (II.6.12). Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und Zelltrümmer, ggf. nach Sonifizieren, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 15000 upm, 4°C, 20 min in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde in einer Immunopräzipitation eingesetzt (II.6.1.3), anschließend die Immunokomplexe in SDS-Pages aufgetrennt (II.9.1). Das Gel wurde vakuumgetrocknet und die Radioaktivität über einen sensitiven Film detektiert. Exponiert wurde entweder bei Raumtemperatur oder bei (-80)°C unter Verwendung eines Verstärker-Screens für einen Zeitraum von 6-72h Stunden. Alternativ wurde das radioaktive Signal über einen Phosphor-Imager (Typhoon 9400, Amersham Biosciences) erfasst. (J.S. Bonifacino in Current protocols in protein science (1999) Unit 3.7.1-10).

### II.6.13 *In vivo* Markierung von Proteinen mit [<sup>32</sup>P]

Labelling-Medium:

DMEM w Glutamin w/o Na-PO<sub>4</sub> und NaHCO<sub>3</sub> (SIGMA D-3656)  
10% dialysed FCS  
20 mM NaHCO<sub>3</sub>  
1% PenStrept  
25 mM Hepes pH 7.5

Chase-Medium:

DMEM (Gibco 61965-026) incl. Glutamax, 4.5 g/l glucose  
and pyridoxine, no pyruvate.  
10% FCS  
1% PenStrept

H<sub>3</sub>[<sup>32</sup>P]O<sub>4</sub> Hartmann Analytic P-RB-1 (<http://www.hartmann-analytic.de>)

Die zuvor transfizierten Zellen (II.6.6) wurden zweimal mit HEPES-Puffer (pH 7,5) gewaschen und 30 min in Phosphat-freiem Labelling-Medium vorinkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Darauf wurde das Medium wieder entfernt und durch 2 ml Labelling-Medium mit [<sup>32</sup>P]- Phosphorsäure (H<sub>3</sub>[<sup>32</sup>P]O<sub>4</sub>) ersetzt. Die Zellen wurden mit 500 µCi [<sup>32</sup>P]- Phosphorsäure pro 10 cm Zellkulturplatte für 2-3 h markiert. Anschließend wurde das Labelling-Medium abgesaugt und die Zellen mit 500 µl RIPA-Puffer aufgeschlossen (II.6.12). Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und Zelltrümmer, nach Sonifizieren, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 15000 upm, 4°C, 20 min in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde in einer Immunopräzipitation eingesetzt (II.6.1.3), anschließend die Immunokomplexe in SDS-Pages aufgetrennt (II.9.1). Ein Gel wurde vakuumgetrocknet und die Radioaktivität über einen sensitiven Film detektiert. Exponiert wurde entweder bei Raumtemperatur oder bei (-80)°C unter Verwendung eines Verstärker-Screens für einen Zeitraum von 6-72h Stunden. Alternativ wurde das radioaktive Signal über einen Phosphor-Imager (Typhoon 9400, Amersham Biosciences) erfasst. Ein weiteres Gel wurde in einer Immunoblot-Analyse (II.9.2) eingesetzt.

## II.7 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

### II.7.1 Kulturmedien

Agar-Platten:	LB-Medium 1,5% (w/v) Bacto-Agar (Difco) 100 µg/ml Ampicillin 30 µg/ml Kanamycin
LB-Medium:	1% (w/v) Trypton (AppliChem) 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl pH 7,0 100 µg/ml Ampicillin

	30 µg/ml Kanamycin
TB-Medium:	1,2% (w/v) Trypton (AppliChem)
	2,4% (w/v) Hefeextrakt
	0,4% (w/v) Glycerin
	17 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
SOC-Flüssigmedium:	1 %(w/v) Hefeextrakt
	2 %(w/v) Pepton
	10 mM NaClKCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM MgSO <sub>4</sub>
	20 mM Glucose

## II.7.2 Bakterienstämme

### BL21(DE)pLysS:

F<sup>-</sup>, ompT, hsdS<sub>B</sub>, (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), dcm, galλ(DE3), pLysS(Cm<sup>r</sup>)

### DH5α:

F<sup>-</sup>, deoR, endA1, hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, Δ(argFV169-LacZYA), U169, φ80lacZΔM15, F<sup>-</sup>, λ-

### II.7.3 Transformation

In einem 10 ml *snap cap* wurden 50 µl frisch aufgetaute transformationskompetente Bakterien mit 1µl DNA für 20 min auf Eis inkubiert, diese anschließend für 45 sec bei 42°C hitzebehandelt und für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 600 µl SOC-Medium und Inkubation von 1 h bei 37°C auf einem Rotationsgerät, wurden 50 - 100 µl der Bakteriensuspension auf Amp-LB-Agar-Platten (bzw. Kan-LB-Agar-Platten) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### II.7.4 Isolation von Plasmid-DNS

#### **In kleinem Maßstab (für Klonierungen):**

Die Bakterienkultur wurde in LB-Ampicillin-Medium (5 ml) sedimentiert. Die Präparation der Plasmid-DNS erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, <http://www1.qiagen.com>) gemäß der Herstellerangaben. Zur Verifizierung wurde die isolierte Plasmid-DNS verdaut (II.8.2.1-2). und mittels analytischer Agarosegelelektrophorese analysiert (II.8.2.5.1). Die Konzentration und der DNA wurde photometrisch bestimmt (II.8.2.4).

#### **In großem Maßstab (für Transfektionen):**

Es wurden 200 ml TB-Medium (100 µl/ml Ampicillin) mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C für 12 - 18 h inkubiert. Nach Sedimentation der Bakterienkultur bei 6000 x g und 4°C für 10 min wurde die Plasmid-DNS mit dem QIAprep Spin Midi, Maxi prep Kit (Qiagen, <http://www1.qiagen.com>) gemäß der Herstellerangaben isoliert.

Zur Verifizierung wurde die isolierte Plasmid-DNS verdaut (II.8.2.1-2) und mittels analytischer Agarosegelelektrophorese analysiert (II.8.2.5.1). Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bestimmt (II.8.2.4).

## II.7.5 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

### NETN-Puffer:

20 mM Tris-clpH8  
100 mM NaCl  
0,5 % NP-40  
1 mM EDTA  
10 mM DTT  
1 µg/ml Papatatin A  
1 mM PefaBloc  
14 µg/ml Aprotinin

### Waschpuffer:

100 mM Tris-Cl pH 8,0  
120 mM NaCl  
1 mM PefaBloc

### Glutathion-Lösung:

200 mM Glutathion  
20 mM Hepes pH 8,0

### Elutionspuffer:

10 ml Waschpuffer  
20 mM Glutathion  
1 µg/ml Papatatin A  
1 mM PefaBloc  
14 µg/ml Aprotinin

Glutathion-Agarose-Beads (Sigma G4510)

Lysozym:

10 mg/ml Lysozym in TE

Zinkchlorid-Lösung:

1 M ZnCl<sub>2</sub>

BL21- oder DH5 $\alpha$ -Bakterien wurden zunächst mit dem gewünschtem GWpGST-Konstrukt transformiert. Am nächsten Tag wurde eine 5 ml LB/Amicillin-Kultur mit 1 Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit der Übernachtskultur wurden 500 ml Volumen LB/Ampicillin/1mM ZnCl<sub>2</sub> angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,7 inkubiert. Schließlich wurde die Kultur für 3 bei 37 C° oder 16 h bei 25 C° mit 0,4 mM IPTG induziert. Darauf wurde die Bakteriensuspension sedimentiert und in 30 ml NETN-Puffer bei 4 C° resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zugabe von 250  $\mu$ l Lysozym (10 mg/ml) und durch Ultraschallbehandlung [3 x (1 sec Puls, 1 sec Pause für 30 sec)] lysiert. Die Zelltrümmer werden sedimentiert (30 min bei 4°C/15000 rpm/JA 20 -Rotor) und der Überstand üN bei 4°C mit Glutathion-Agarose-Beads, die zuvor durch dreimaliges Waschen mit NETN-Puffer äquilibriert worden waren, inkubiert. Die Glutathion-Agarose-Beads mit dem gebundenen Protein wurde zunächst dreimal mit NETN-Puffer und zweimal mit dem Waschpuffer gewaschen und dann in eine neues 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt und sedimentiert (1 min bei 4°C/4000 rpm). Die gebundenen Proteine wurden in 500  $\mu$ l Elutionspuffer aufgenommen und in einem Überkopfschüttler (für 1h) eluiert. Nach der Sedimentation der Glutathion-Agarose-Beads wurde die Elutionsfraktion in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Standard mäßig wurde der Elutionsschritt drei mal wiederholt. Zur Konzentrationsabschätzung wurden Aliquots der Fraktionen zusammen mit einer BSA Verdünnungsreihe auf einem SDS-Polyacrylamidgel (II.9.1) aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt (II.9.4) oder in einem Bradford-Asay (II.9.5) bestimmt.

Die GST-Fusionsproteine wurden in Centricon-Centrifugal-Filter Gefäßen (millipore, <http://www.millipore.com>) gemäß der Herstellerangaben umgepuffert und konzentriert.

## II.8 Arbeiten mit DNS

### II.8.1. PCR-Amplifikation von DNS-Fragmenten

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach (Saiki et al., 1986) ist eine enzymatische *in vitro* Reaktion. Sie dient neben der Amplifikation und Modifikation von DNS auch zur Integration von Restriktionsschnittstellen oder anderen gewünschten kurzen Nukleotidsequenzen in das DNS-Fragment. Zur Vervielfältigung von DNS benötigt man zwei Oligonukleotide, die an die flankierenden 5' und 3' Sequenzen des zu amplifizierenden DNS-Fragments hybridisieren. In Gegenwart von hitzestabiler DNS-Polymerase und den vier desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dNTP) werden die Primer entlang der Matrizen-DNS verlängert. Die Polymerase ermöglicht, bedingt durch unterschiedliche Temperaturen, die mehrfache Wiederholung der drei Teilschritte der PCR-Reaktion: Denaturierung, Primeranlagerung und Primerverlängerung. Die PCR-Reaktion wurde im 50 µl Maßstab in 200 µl Reaktionsgefäßen wie folgt angesetzt:

**Tab. II-2:** Konzentrationen und Volumina der verwendeten PCR-Komponenten.

Komponente	Endkonzentration/Volumen
Matrizen-DNS	1-20 ng
5'-Primer	10 pmol
3'-Primer	10 pmol
dNTP-Mix (10 mM/dNTP)	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2- 4 mM
10x Taq DNS Polymerase Puffer	1 x
Taq-und/oder Pfu-DNS Polymerase (Fermentas)	2 U
bidestilliertes und sterilfiltriertes Wasser	ad 50 µl

Um Verdunstungsverluste zu vermeiden, wurden der Heizdeckel des Thermocyclers wurde auf 110 °C programmiert. Für die Amplifikation der DNS folgendes Programm verwendet:

Tab. II-3: PCR-Reaktionsschema.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1 x
Denaturierung	94 °C	1 min	} x 30
Primeranlagerung	T <sub>P</sub>	1 min	
Elongation	72 °C	1-2 min	
abschließende Elongation	72 °C	5 min	1 x

Die Anlagerungstemperatur (T<sub>P</sub>) richtete sich hauptsächlich nach der Art der verwendeten Primer. Bei Primern, die vollständig mit der Matrizen-DNS hybridisieren, ergab sich die T<sub>P</sub> durch Subtraktion von 5°C von der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur T<sub>m</sub>. Bei Primern mit Überhängen, die nicht vollständig mit der Matrizen-DNS hybridisieren, wurde die T<sub>P</sub> folgendermaßen bestimmt (Wu et al., 1991), wobei nur die Basenpaare berücksichtigt wurden, die mit der Matrizen-DNS hybridisieren:

$$[T_P = 22 + 1,46 \times [2 \times \text{Anzahl (G + C)} + \text{Anzahl A} + \text{Anzahl T}]]$$

Am Ende der PCR-Reaktion wurden die amplifizierte Produkte mittels analytischer (II.8.2.5.1) auf Größe, Reinheit und Ausbeute hin untersucht und gegebenenfalls das gewünschte DNS-Produkt aus der Gelmatrix isoliert (II.8.2.5.2). Amplifizierte DNS-Fragmente, die in einer Gateway Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden mittels PEG-Fällung isoliert (II.8.2.7).

## II.8.2 DNS-Klonierungstechniken

### II.8.2.1 Restriktionsverdau DNS

Die Spaltung von DNA mit spezifischen Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung mit Kalbsdünndarm-Phosphatase und Ligationen wurde mit Enzymen der Firma Fermentas (<http://www.fermentas.de>) in den mitgelieferten In

der Regel wurden Enzymmengen von 2-10 U pro  $\mu\text{g}$  DNS eingesetzt. Puffer nach Herstellerangaben oder nach (Sambrook and Gething, 1989) durchgeführt. Bei einem Restriktionsverdau von DNS mit zwei verschiedenen Endonukleasen wurde ein Doppelverdau entsprechend der Herstellerangaben mit dem günstigsten Puffer angesetzt.

### **II.8.2.2 Ligation von DNS**

Die verdaute DNS (II.8.2.1) wurde mit 0,5  $\mu\text{l}$  T4-DNS-Ligase pro Ansatz in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem und einem Gesamtvolumen von 10-25  $\mu\text{l}$  ligiert. Bei Ligationen von DNS-Fragmenten mit überhängenden Enden („sticky-end“) wurde das Insert in dreifach molarem Überschuss zum Vektor eingesetzt. Die Ligation erfolgte entweder für drei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 15 °C. Der gesamte Ligationsansatz wurde für die nachfolgende Transformation (II.7.3) verwendet.

### **II.8.2.3 Präzipitation von DNS**

Zur Reinigung oder Konzentrierung von DNS wurden die folgende beiden DNS-Präzipitationen durchgeführt:

#### **Ethanol-fällung:**

Bei der Ethanol-fällung wurden die DNS-Proben mit dem zweifach fachen Volumen eiskaltem 96%igem Ethanol versetzt und anschließend für 30 min bei -20 °C gelagert.

#### **Isopropanol-fällung:**

Bei der Isopropanol-fällung wurden die DNS-Proben mit dem 0,7 fachen Volumen Isopropanol versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gelagert.

Die präzipitierte DNS wurde bei beiden Methoden durch Zentrifugation (13.000g/20min/4°C) pelletiert, mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut

zentrifugiert (13.000 g/5 min/4 °C). Die DNS wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in sterilem Wasser oder TE-Puffer (pH 8) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### **II.8.2.4 Konzentrationsabschätzung von DNS**

Zur Konzentrationsabschätzung wurde sowohl in einer analytischen Agarosegelelektrophorese (II.8.2.5.1) als auch photometrisch bestimmt. Die Abschätzung der DNS-Konzentration in einer analytischen Agarosegel-elektrophorese erfolgte im Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität der DNS-Banden mit den Banden der Marker-DNS (Fermentas ) bekannter Konzentration. Die photometrische Bestimmung der DNS Konzentration und Reinheit erfolgte bei OD<sub>260</sub>. Dabei entspricht OD<sub>260</sub> von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Der Quotient aus OD<sub>260</sub> nm und OD<sub>280</sub> sollte bei 1,8 liegen.

### **II.8.2.5 Agarosegelelektrophorese von DNS**

#### **II.8.2.5.1 Analytische Agarosegelelektrophorese von DNS**

DNA-Ladepuffer:

50 mM Tris-HCl, pH 8,0  
50 mM EDTA  
50% (v/v) Glycerin  
0,25% (w/v) BPB  
0,25% (w/v) XC

TBE:

89 mM Tris-HCl pH 8,0  
89 mM Borsäure  
2 mM EDTA

Isolierte Plasmide (II.7.2), Restriktionsfragmente (II.8.2.1) und PCR-Produkte (II.8.1) wurden zur Bestimmung ihrer Größe und Konzentration mittels analytischer Agarosegelelektrophorese separiert. Hier für wurde Plasmid-DNS oder DNS-Fragmente mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgte entsprechend ihrer Größe in einem 0,8-1,2 %igem (w/v) Agarosegel bei einer Feldstärke von 4-5 V/cm. Die Elektrophoresen wurden nach (Sambrook and Gething, 1989) in 1x TBE-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte mit dem UV-Transilluminator und Fotodokumentationssystem 299 (Herolab, Wiesloch) bei einer Wellenlänge von 302 nm.

#### **II.8.2.5.2 Präparative Agarosegelelektrophorese von DNS**

Zur Isolierung von PCR-Produkten (II.8.1.3) oder verdauter DNS (II.8.2.1) wurde eine präparative Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte wie in (II.8.2.5.1) beschrieben. Nach der Separation der DNS-Fragmente wurde die gewünschte DNS-Bande unter einem UV-Transilluminator lokalisiert und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die DNS wurde mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, <http://www1.qiagen.com>) entsprechend der Herstellerangaben aus dem Gel isoliert und die Konzentration der gereinigten DNS mittels analytischer Agarosegelelektrophorese verifiziert (II.8.6.1.1, II.8.5)

#### **II.8.2.6. In vitro Mutagenese**

Zur Erstellung von Punktmutationen in Plasmiden wurde das Protokoll von QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, <http://www.stratagene.com>) verwendet. Die *sense* und *antisense* Primer zur Einführung der Mutation wurden so entworfen, daß etwa jeweils 13-15 Nukleotide zu beiden Seiten der/des zu mutierenden Nukleotide(s) liegen. Die Mutation sollte neben der Punktmutation auch zur Einführung einer neuen Restriktionsstelle oder dem Wegfall einer alten führen, um hinterher direkt durch einen Restriktionsverdau auf eine erfolgreiche Mutagenese testen zu können. Die Primer sollten weiterhin so

konstruiert sein, dass keine endogenen Schleifen oder Doppelstränge gebildet werden und die Anwendung folgender Formel zu einer  $T_m$  von über 78°C führt:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times \%GC \text{ Gehalt} - 675/N \text{ (Länge des Oligos)} - \% \text{ Fehlpaarung}$$

**Tab. II-4:** Konzentrationen und Volumina der verwendeten Komponenten. für die Mutagenese-PCR

Komponente	Endkonzentration/ Volumen
Matrizen-DNS	20 ng
<i>sense</i> Primer	125 ng
<i>antisense</i> Primer	125 ng
dNTP-Mix (25 mM/dNTP)	2,5 mM
10x Pfu-Polymerase Puffer (Stratagen)	1 x
PfuTurbo-DNS Polymerase (Stratagen)	2,5 U
bidestilliertes und sterilfiltriertes Wasser	ad 50 µl

Um Verdunstungsverluste zu vermeiden, wurden der Heizdeckel des Thermocyclers wurde auf 110 °C programmiert. Für die Amplifikation der DNS folgendes Programm verwendet:

**Tab. II-5:** PCR-Reaktionsschema.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1 x
Denaturierung	95 °C	30 sec	} x18
Primeranlagerung	55 °C	1 min	
Elongation	68 °C	1 min	
abschließende Elongation	68 °C	2 min pro kb (bezogen auf das Palsmid)	1 x

**Verdau und Transformation:**

Nach der PCR wurde 1/10 des Ansatzes in einer analytischen Agarosegelelektrophorese (II.8.2.5.1) eingesetzt, um zu prüfen, ob ein entsprechend großes Produkt amplifiziert wurde. Parallel wurde der restliche Ansatz mit 1 µl DpnI für 1 h bei 37°C verdaut. Dieses Enzym erkennt nur die methylierte Restriktionsstelle, so dass spezifisch das Wildtyp-Plasmid verdaut, das mutierte Plasmid aber erhalten bleibt. Hiermit wurden dann DH5α-Bakterien transformiert (II.7.3). Aus den erhaltenen Klonen wurde mittels Minipräparation (II.7.4) die Plasmid-DNA gewonnen und im Restriktionsverdau geprüft (II.8.2.1), ob das mutierte Plasmid vorlag. Zudem wurde das Plasmid sequenziert (II.8.3).

**II.8.2.7. Gateway Klonierung**

In dieser Arbeit wurde vorwiegend das Gateway<sup>®</sup> System von Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>) gemäß der Herstellerangaben zur Erzeugung von Klonierungs- und Expressionsplasmiden verwendet. Das Gateway<sup>®</sup> System nutzt die sequenzspezifischen Rekombinationsreaktionen des Lambda-Phagen zur Einführung von Genen in die entsprechenden Plasmide anstelle der klassischen Klonierung mit Restriktionsenzymen und Ligasen. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass es unter Beibehaltung der Orientierung eine direkte Klonierung von Genen aus dem Entry-Vektor (Klonierungsvektor) in verschiedene Expressionsvektoren (Destination-Vektoren) ermöglicht (Bushman et al., 1985; Hartley et al., 2000). Diese rekombinante Klonierungsstrategie basiert auf der BP- und LR-Reaktion (Gateway Nomenklatur). Dabei wird mit Hilfe des Enzymgemisches Clonase bestehend aus Int (Integrase) und Xis (Excisionase) des Lambda-Phagen (Hartley et al., 2000; Van Duyne, 2005) und dem *E.coli* Protein IHF (Integration Host Factor) die in vitro Rekombination vollzogen. Zunächst wurde mittels PCR die gewünschten Ziel-DNS mit den spezifischen Überlappungsenden attB1 und attB2 amplifiziert. Ein 1/10 des PCR Ansatzes wurden in einer analytischen Agarosegelelektrophorese (II.8.2.5.1) auf Größe, Reinheit und Ausbeute überprüft. und mittels PEG-Fällung isoliert und mit einem der Donor-

Vektoren pDONR™201 oder pDONR™221 in der BP-Reaktion rekombiniert. Anschließend wurden der Entry-Vektor (pDONR Vektor mit Ziel-DNS) in kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert (II.7.3) und auf LB/Kanamycin-Platten ausplattiert (II.7.1). Mit den positiven Klonen wurden 5 ml LB/Kanamycin übernacht Kultur (II.7.1) angeimpft und anschließend die Plasmid-DNS mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) isoliert (II.7.4). Anschließend wurden die isolierte Plasmid-DNS mittels eines Restriktionsverdau (II.8.2.1) mit dem Bsp1407I Restriktionsenzym (Schnittstellen befinden sich in den beiden das Zielgen flankierenden Rekombinationssequenzen) und einer analytischen Agarosegelelektrophorese (II.8.2.5.1) verifiziert. Das so gewonnenen Entry-Klon-Plasmid wurden in einer zweiten Rekombinationsreaktion, der LR-Reaktion, in Destinationsvektoren (Expressionvektoren ohne die Ziel-DNS), wie GWpGST (II.3.2), GWp-HA, GW-N-TAP und Gwp-Retro-Puro (II.3.2) übergeführt. Die erhaltenen Expressionsplasmide wurden dann in kompetente Bakterien transformiert (II.7.3) und auf LB/Ampicilin-Platten ausplattiert (II.7.1). Mit den positiven Klonen wurden wiederum 5 ml LB/Ampicilin übernacht Kultur angeimpft (II.7.1) und anschließend die Plasmid-DNS isoliert (II.7.4). Daraufhin wurden diese Expressionskonstrukte, wie bereits die Entry-Klon-Plasmide, mittels Restriktionsverdau mit Bsp1407I (II.8.2.1) und anschließender analytischen Agarosegelelektrophorese (II.8.2.5.1).

### II.8.3 Sequenzierung von DNS

PCR-Fragmente wurden nach der Klonierung in Vektoren mittels DNS-Sequenzierung auf Amplifikationsfehler hin untersucht. Die Sequenzierung von Plasmid-DNS erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) Diese Methode beruht auf der zufälligen Inkorporation von 2',3'-dideoxy-Nukleosidtriphosphaten (ddNTPs) anstelle von 2'-desoxy-Nukleosid-triphosphaten und dem durch die fehlende 3'-OH-Gruppe verursachten statistischen Kettenabbruch. Die ddNTPs waren jeweils mit einem anderen Farbstoff-Fluoreszenz markiert. Es wurden für die Gateway-Klone vorwiegend die Primer DONR201-F und R verwendeten (II.4). Die Sequenzierungen wurden von der Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH (SeqLab.) durchgeführt. Die Aufbereitung der DNS für die Sequenzierung erfolgt nach dem

SeqLab.Protokoll.(<http://www.seqlab.de>) Die Sequenzdaten wurden mit dem Programm Chromas und DNAMAN Version 4 (Lynnon Biosoft) aufgezeichnet und ausgewertet.

## II.8.4 Herstellung von shRNA-Konstrukten

Die siRNA Oligonukleotidsequenz (19 Nt) wurde mit dem siRNA On-Line-Design Internetseite (<http://design.rnai.jp>) bestimmt. Zu diesen Sequenzen wurden noch eine *hairpin* Sequenzen und Restriktionsschnittstellen eingefügt und zusammen mit den komplementären Sequenzen bei MWG bestellt.

Bsp: shRNA

**GATCCC CACCGGCCAAGATTCTTCT **TTCAAGAGA** AGAAGAATCTTGCCGGTG **TTTTGGAAA**  
**GGG** GTGGCCGGTTCTAAGAAGA **AAGTTCTCT** TCTTCTTAGAACCGCCAC **AAAAACCTTTCGA****

A/GATCT = BglIII

A/AGCTT = HindIII

Die rot markierten Basen entsprechen der *hairpin*-Sequenz die unterstrichenen Sequenzen der BglIII und HindIII Restriktionsschnittstellen. Die komplementären Oligonukleotide wurden in TE-Puffer aufgenommen (100pmol/μl) und gelöst. Darauf wurden jeweils 10 μl von den komplementären Oligonukleotiden in 1,5 ml Reaktionsgefäße gemischt, 5 min bei 95°C inkubiert und zum hybridisieren für 2h bei 25°C inkubiert. Nach der Hybridisierung der komplementären Stränge wurden die Fragmente in den HindIII/BglIII linearisierten pSuperDuper (II.3.1) Vektor kloniert (II.8.2), in DH5α-Bakterien transformiert (II.7.3) und mit einem Klon eine 3ml LB/Ampicillin Kultur angeimpft. Nach der Plasmidisolierung (II.7.4) wurde 20 ng der shRNA-Konstrukte in einer PCR (II.8.1) zu Verifizierung der Klonierung eingesetzt.

## II.9 Proteinchemische und immunologische Methoden

### II.9.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3x Probenpuffer:

150 mM Tris-HCl pH 6,8

300 mM DTT

6% SDS (w/v) SDS

0,3 % (w/v) Bromphenolblau

30% (w/v) Glycerol

Protein-Marker:

PageRuler Prestained Protein Ladder, 15 -  
180 kDa (MBI Fermentas)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe. Hierzu werden die aufzutrennenden Proben mit Probenpuffer versetzt und durch Hitze denaturiert. SDS bindet quantitativ zum Molekulargewicht an die Proteine und erzeugt aufgrund seiner anionischen Eigenschaften eine negative Nettoladung der Proteine. Diese wandern nun im elektrischen Feld unabhängig von ihrer Eigenladung in Richtung der Anode (Plus-Pol). Zudem unterbindet SDS als Detergens die erneute Ausbildung nichtkovalenter Bindungen, so dass eine Renaturierung des Proteins verhindert wird. Dieser Prozess wird unterstützt durch das Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol, welches der Ausbildung kovalenter Disulfidbrücken entgegenwirkt. Kleine Proteine wandern schneller durch das Netzwerk der Polyacrylamid-Matrix im Gel als große Proteine. Es wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) mit 5%-igem Sammelgel und je nach Probe 10-20%-igem Trenngel angewendet.

## II.9.2 Immunoblot-Analyse

Immunoblot-Analysen (Naaby-Hansen and Bjerrum, 1985) wurden zum Nachweis von rekombinanten Proteinen

### II.9.2.1 Western Blot

Semidry-Transfer-Puffer:

25 mM Tris-Base

192 mM Glycin

20% (v/v) Methanol

0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (v/v) TCA

Die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden im Western Blot elektrophoretisch auf eine Protein-bindende Membran übertragen. Dabei kann es sich um Nitrocellulose-, PVDF- oder Nylon-Membranen handeln. Im Verlauf des Transfers geht das an die Proteine gebundene SDS verloren. Die Proteine liegen daher nach dem Blot größtenteils renaturiert vor, Quartärstrukturen werden allerdings nicht ausgebildet. Die Renaturierung erlaubt eine nachfolgende Immunodetektion der Proteine.

Im Semidry-Verfahren werden Gel und Membran in einem „Sandwich“ von puffergetränktem Whatman-Papier umschlossen und zwischen zwei Elektrodenplatten eingebracht. Beim Tank Blot dagegen wird das „Sandwich“ vertikal in eine puffergefüllte Elektrophorese-Kammer eingebracht.

In dieser Arbeit wurde im Wesentlichen ein Western Blot nach Towbin (Towbin et al., 1989) durchgeführt. Transferiert wurde im Semidry-Verfahren bei 2 A pro cm<sup>2</sup> Gelgröße für 1,5 Stunde. Im Semidry-Verfahren wurden stets Nitrocellulose-Membranen genutzt.

### II.9.2.2 Immunodetektion von Proteinen nach Western Blot

PBS-T:

PBS

0,05% (v/v) Tween-20

Blockpuffer:

PBS-T

5% (w/v) Magermilchpulver

ECL-Lösungen (Pierce)

Die auf eine Membran geblotteten Proteine können mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Man spricht hierbei von Immunoblot. Dazu werden zunächst die überschüssigen freien Proteinbindungsstellen der Membran blockiert. Dies geschieht entweder über eine nicht fest definierte Mischung an Proteinen wie z.B. Milch oder aber über ein spezifisches Protein, zumeist BSA. Anschließend inkubiert man mit einem spezifischen Erst-Antikörper gegen das zu detektierende Protein. einem Waschschrift, der ungebundene Antikörper entfernt, wird ein HRP-konjugierter Zweit-Antikörper zugegeben, der gegen den konstanten Teil des Erst-Antikörpers gerichtet ist. Nach einem erneuten Waschschrift wird eine ECL-Lösung zugeben, die ein Substrat enthält, welches die Peroxidase via Chemolumineszenz, also unter Freisetzung eines Lichtquants, umsetzt. Dieses Signal wird über einen sensitiven Film oder ein computergestütztes Kamerasystem nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach dem Western Blot die Membran für 1 Stunde bei RT geblockt, dann für 2 Stunden bei RT oder üN bei 4°C mit Erst-Antikörper in Blockpuffer inkubiert. Nach 30-minütigem Waschen in PBS-T wurde für 45-60 Minuten bei RT mit in Blockpuffer oder PBS-T verdünntem Zweit-Antikörper inkubiert. Es folgte ein 15-minütiger PBS-T-Waschschrift, die Zugabe der ECL-Lösungen und die direkte Detektion über ein computergestütztes Kamerasystem (LAS-3000, Fuji).

### II.9.3. Immunofluoreszenz

Waschpuffer 1:

1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 mM CaCl<sub>2</sub>  
in PBS

Waschpuffer 2:

0,2 % Triton  
02 % BSA  
in Waschpuffer 1

Fixierlösung:

3,7% Paraformaldehyd in Waschpuffer 1

Permeabilisierungs-Puffer:

0,2% Triton X-100  
50 mM NH<sub>4</sub>Cl  
in Waschpuffer 1

Block-Puffer :

0,2 % Triton  
1 % BSA  
Waschpuffer 1

Hechst 33258 (1 mg/ml Stammlösung in PBS)

Moviol 4-88 (Hoechst) mit Isopropylgallat

Um überexprimierte Proteine über Immunfluoreszenz nachzuweisen, wurden am Boden von 12 Well Zellkulturschalen runde Deckgläschen mit 18 mm Durchmesser

platziert. Diese waren vorher durch Einlegen in Ethanol entfettet und anschließend hitzesterilisiert worden. Dann wurden ca. 20000 HeLa Zellen für die Transfektion (II.6.6) ausgesät. 24 - 35 h nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die Platten zweimal mit 1 ml Waschpuffer 1 gewaschen und für 20 min bei RT mit 900 µl 3,7% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Platten zweimal mit Waschpuffer 1 gewaschen und dann für 10 min bei RT mit dem Permeabilisierungspuffer inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit Waschpuffer 1 wurden die Deckgläschen mit den fixierten Zellen für 30 min bei RT mit Block-Puffer behandelt. Zur Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde dieser zunächst in Waschpuffer 2 verdünnt und dann in 30 µl Tropfen auf Parafilm platziert. Die Deckgläschen wurden dann mit der Zell-Seite auf diese Tropfen gelegt und in einem Inkubator für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Deckgläschen dreimal mit Waschpuffer 2 gewaschen und anschließend wie bei der Behandlung mit dem ersten Antikörper mit dem in Waschpuffer 2 verdünntem zweiten Antikörper inkubiert. Darauf wurden die fixierten und so markierten Zellen zweimal mit Waschpuffer 2 und einmal mit Waschpuffer 1 gewaschen. Zuletzt wurde die DNA mit 1:5000 verdünnter Hoechst-Lösung für 3 min bei RT gefärbt und dreimal mit Waschpuffer 1 gewaschen. Schließlich wurden PBS Kristalle mit destilliertem Wasser von den Deckgläschen gewaschen und die Deckgläschen mit einem Tropfen Moviol (mit Isopropylgallat als Bleichschutz) auf Objektträger fixiert. Die Detektion und Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Zeiss Mikroskop Axiovert 100 M.

## **II.9.4 Anfärben von Proteinen**

### **II.9.4.1 Coomassie-Blau Färbung**

Fixierlösung:

25 % (v/v) Isopropanol

10% (v/v) Essigsäure

Färbelösung:

0.006 % (w/v) CBB G250

10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

5% (v/v) Glycerol

Zur Detektion von Proteinen nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G250) gefärbt. Dazu wurden die Gele 20 min in Färbelösung geschwenkt, mit destilliertem Wasser gespült und für 20 min in Entfärbelösung 1 inkubiert. Danach wurden die Gele mehrmals mit frischer Entfärbelösung 2 gewaschen, bis die Hintergrundfärbung der Gele entfernt war. Zur Aufbewahrung wurden die Gele auf ein Whatman Papier überführt und für 1 h bei 80°C getrocknet. Um die Proteinkonzentration von gereinigten bakteriellen Proteinen abzuschätzen, wurde parallel eine BSA Verdünnungsreihe im Gel aufgetrennt und die Färbungsintensitäten miteinander verglichen.

#### II.9.4.2 Colloidal Coomassie-Färbung

Fixierer:

10% (v/v) Essigsäure

50% (v/v) Methanol

Färbelösung:

0,08% (w/v) CBB G-250 (Bio-Rad)

1,6% (v/v) o-Phosphorsäure

8% (w/v) Ammoniumsulfat

20% (v/v) Methanol

Entfärbelösung:

25% (v/v) Methanol

Die Färbung wurde im Wesentlichen nach Neuhoff (Neuhoff et al., 1988) durchgeführt. Fixiert wurde für 30 Minuten, gefärbt üN und entfärbt für 10-30 Minuten.

## II.9.5 Proteinbestimmung nach Bradford

5x Bradford-Reagenz:

0,05% (w/v) CBB G-250 (Bio-Rad)

25% (v/v) Ethanol

50% (v/v) o-Phosphorsäure 85%

BSA 1 µg/µl (NEB)

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Reagenz von 465 nm zu 595 nm. Diese Verschiebung der Absorption wird photometrisch gemessen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proteinbestimmung nach Bradford in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Das f.a.v. betrug 200 µl. Sowohl BSA-Standard als auch zu messende Proben wurden als Dreifach-Ansatz gemessen. Als Eichreihe dienten Verdünnungen von BSA in A.dest. mit Konzentrationen zwischen 10 µg/ml und 160 µg/ml. Proben wurden 1:200, 1:100 oder 1:50 in A.dest. verdünnt. Proben bzw. Standard wurden 1:1 mit 2x Bradford-Reagenz versetzt und für etwa 10-20 Minuten bis zum Eintreten einer Farbreaktion inkubiert. Mit Hilfe eines Computer-gestützten ELISA-Readers wurde die Proteinkonzentration der Proben unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt, indem die Extinktion bei  $\lambda = 595$  nm bestimmt, aus den Extinktionswerten der Eichreihe eine Eichgerade berechnet und anhand dieser die Proteinkonzentration in den Messproben abgeleitet wurde.

## II.9.6 Massenspektrometrische Analyse

0,5 M Iodacetamid

Gel-Code Blue Stain Reagent (Pierce)

MS-Waschpuffer A:

50 mM Ammoniumbicarbonat

MS-Waschpuffer B:

50% (v/v) Ammoniumbicarbonat

50% (v/v) Acetonitril

Um mögliche Keratinkontaminationen zu vermeiden, die in nachfolgender MS-Analyse einen hohen Hintergrund erzeugen würden, wurden alle benutzten Lösungen mit Milli-Q-Wasser angesetzt und vor Gebrauch durch 0,22 µm-Filter sterilfiltriert. Soweit möglich wurden alle Schritte unter Sterilbank-Bedingungen durchgeführt. Nicht radioaktiv phosphorylierte GST-Fusionsproteine (5-20 µg) sowie N-TAP-Fusionsproteine, je 30 µl pro Ansatz, wurden mit 15 µl 3x Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und auf 55°C abgekühlt. Nach Zugabe von 5 µl 0,5 M Iodacetamid wurde 2 Minuten bei 95°C inkubiert, im Anschluss wurden die Proben auf ein SDS-Gel geladen. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel in eine Zellkultur-Schalen geeigneter Größe überführt und in dieser eine Coomassie-Färbung mit Gel-Code Blue Stain Reagent (Pierce) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (II.9.4.2). Zur Erhöhung der Sensitivität wurde ein optionaler Waschschrift in Milli-Q-Wasser durchgeführt. Mit Hilfe eines Einmalskalpells wurden sichtbare Proteinbanden ausgeschnitten, in kleine Stücke fragmentiert und in ein 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäß überführt. Die Banden wurden für 15 Minuten mit 100 µl MS-Waschpuffer A gewaschen, dann dreimal für je 15 Minuten mit 50 µl MS-Waschpuffer B. Im Anschluss wurden die Banden geschrumpft unter Zugabe von 50 µl 100% (v/v) Acetonitril. Nach Absaugen überschüssigen Acetonitrils wurde das verbliebene Acetonitril entfernt, indem die Reaktionsgefäße mit offenem Deckel für eine Stunde in einer Sterilbank stehen gelassen wurden. Die so vorbereiteten Proben wurden bei 4°C bis zum

Postversand zur MS-Analyse gelagert. MS-Analyse wurde in Kooperation mit Edwin Lasonder (Proteomics Facility, Nijmegen) durchgeführt.

## II.10 Enzymatische Assays

### II.10.1 *In vitro* Kinase-Assay

3 x Kinase-Puffer

150mM HEPES pH 7,5  
30mM MgCl<sub>2</sub>  
75 μM M ATP  
3mM M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
30mM NaF  
30mM β-Glycerophosphat

Kinase-Inhibitoren:

Roscovitin 25mM Stock-Lösung in DMSO  
(1:1000) (Calbiochem; Kat.Nr.=557360)

Phosphatase-Inhibitoren:

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, NaF, β-Glycerophosphat im 3 x  
Kinase-Puffer (siehe 3 x Kinase-Puffer)

Protease-Inhibitoren:

2,5 μg/ml Pepstatin A  
500 μM Pefa-Bloc (Roche)

[γ-P<sup>32</sup>]ATP, Hartmann Analytic (<http://www.hartmann-analytic.de>)

Sf E/2 Baculovirus-aufgereinigtes Cyklin A/ Cdk2, Cyklin B/ Cdk1, Cyklin D1/ Cdk4,  
Cyklin E/ Cdk2, (R. Lilischkis)

CDK5/p35 (Upstate, <http://www.upstate.com>)

(Alle Cyclin-CDK Komplexe sind in Glycerol 1: 1 verdünnt)

Pipettierschema:

3 x Kinasepuffer	10 µl
Substrat	x µl (1 -2 µg)
Enzym	x µl (abhängig von Aktivität)
Pepstatin A	1µl
Pefabloc	1µl
Hot Mix	8 µl
H <sub>2</sub> O	ad 30 µl

Hot Mix: 0,2 µCi [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>] ATP, ad 8 µl mit H<sub>2</sub>O

Der Kinase-Assay wurde entweder mit GST-Fusionsproteinen (II.7.5) oder mit immunopräzipitierten Proteinen durchgeführt (II.6.1.3). Die GST-Fusionproteine wurden zuvor in den 1x Kinase-Puffer umgepuffert (II.7.5). Bei der Verwendung von Immunpräzipitaten als Substrat wurden die Immunokomplexe zuvor zweimal mit 3 x Kinase-Puffer gewaschen. Eine Standardisierung der eingesetzten Proteinmengen erfolgte über eine Coomassie-Blau Färbung des Gels (II.9.4.1). Als Negativkontrollen wurde das GST-Protein (1µg) allein oder im Falle von Immunpräzipitaten die nur an den *tag* gebundenen Beads (II.6.13) verwendet. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden alle Bestandteile der Kinase-Reaktion, abgesehen vom Hot-Mix mit dem [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>] ATP, in verschraubbaren 1,5 ml Reaktionsgefäßen gemischt. Die Kinase-Reaktion wurde mit der Zugabe des Hot-Mixes gestartet. Die Inkubation erfolgt bei 30°C unter leichtem schütteln. Nach 30- 60 min wurde die Kinase-Reaktion auf Eis durch die Hinzufügung von 15 µl 3x Probenpuffer (II.9.1) angehalten. Der Ansatz wurde in einen SDS-PAGE eingesetzt. Das Gel wurde vakuumgetrocknet, Coomassie-Blau gefärbt (II.9.4.1) und die Radioaktivität über einen sensitiven Film detektiert. Exponiert wurde bei (-80)°C unter Verwendung eines Verstärker-Screens für

einen Zeitraum von 6-72h Stunden. Alternativ wurde das radioaktive Signal über einen Phosphor-Imager (Typhoon 9400, Amersham Biosciences) erfasst.

## II.10.2 Histon-Deacetylase Assay (HDAC-Assay)

HDAC-Reaktionspuffer: Entspricht dem 3x Kinase-Puffer (II.10.1)

Co-Enzym:  $\beta$ -NAD (100mM)

Protease-Inhibitoren:

2,5  $\mu$ g/ml Pepstatin A  
500  $\mu$ M Pefa-Bloc (Roche)

Stop-Puffer:

HCl 100 mM  
Essigsäure 160 mM

1 N NaOH

Ethylacetat

[ $^3$ H]-acetylierte Hühnchen-Retikulozyten-*core*-Histone (Loidl and Grobner, 1987)

Pipettierschema:

3 x Kinasepuffer	17 $\mu$ l
Enzym	x $\mu$ l (0,5-2 $\mu$ g))
$\beta$ -NAD(100 mM)	0,5 $\mu$ l (1 mM)
DTT (100 mM)	0,5 $\mu$ l (1 mM)
Pepstatin A	1 $\mu$ l
Pefabloc	1 $\mu$ l
[ $^3$ H]- <i>core</i> -Histone	2 $\mu$ l (~14000 cpm)
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

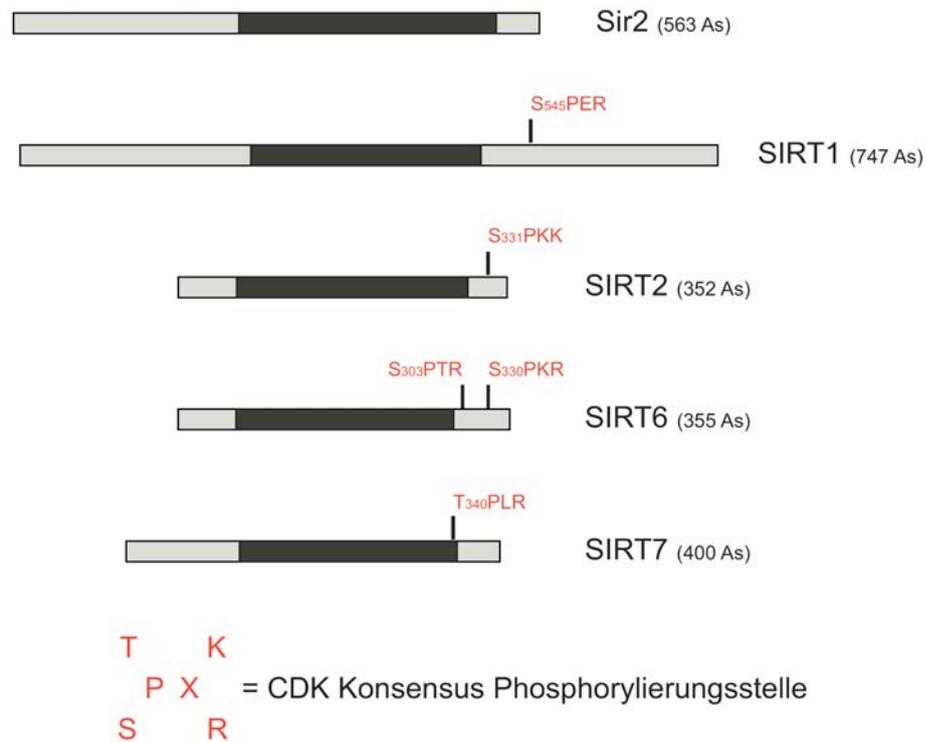
Der HDAC-Assay (Borra and Denu, 2004) wurde entweder mit GST-Fusionsproteinen (II.7.5) oder mit immunpräzipitierten Proteinen durchgeführt (II.6.1.3). Die GST-Fusionproteine wurden zuvor in den 1x Kinase-Puffer umgepuffert (II.7.5). Bei der Verwendung von Immunpräzipitaten als Substrat wurden die Immunokomplexe zuvor zweimal mit 3 x Kinase-Puffer gewaschen. Eine Standardisierung der eingesetzten Proteinmengen erfolgte über eine Coomassie-Blau Färbung des Gels (II.9.4.1). Als Negativkontrollen wurde das GST-Protein (1µg) allein oder im Falle von Immunpräzipitaten die nur an den *tag* gebundenen Beads (II.6.13) verwendet. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden alle Bestandteile der HDAC-Reaktion, abgesehen von den [<sup>3</sup>H]-acetylierten *core*-Histonen, in verschraubbaren 1,5 ml Reaktionsgefäßen gemischt. Die HDAC-Reaktion wurde mit der Zugabe des radioaktiven *core*-Histonen gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C unter schütteln. Nach einer Inkubation von 45 min - 2h wurde 12 µl 1 N NaOH zu den Ansätzen hinzugefügt, gemischt und die Probe 20 min bei 25°C inkubiert. Dies ist nötig, da die Acetyl-Gruppe, die auf den ADP-Ribose Anteil des NAD transferiert wird, bei einem pH unter 9,5 nicht mit Ethylacetat extrahiert werden kann. Bei pH von über 9,5 wird die Acetyl-Gruppe der ADP-Ribose hydrolysiert und kann bei anschließender Absenkung des pH auf 1-2 (Stop-Puffer) mit Ethylacetat extrahiert werden (Borra and Denu, 2004). Anschließend wurde je 250 µl Stop-Puffer und 700 µl Ethylacetat zu den Ansätzen hinzupipettiert. Die Proben wurden darauf bei 25°C für 30 min und unter starkem Schütteln (1400rpm) inkubiert, so dass die Acetyl-Gruppen in die lipophile Phase überführt werden können. Die Phasentrennung erfolgte in einer Tischzentrifuge (25°C/5 min/14.000 upm). Von der oberen Phase wurde ein Aliquot von 600 µl abgenommen und in 3 ml Szintillationsflüssigkeit gemessen.

## III Ergebnisse

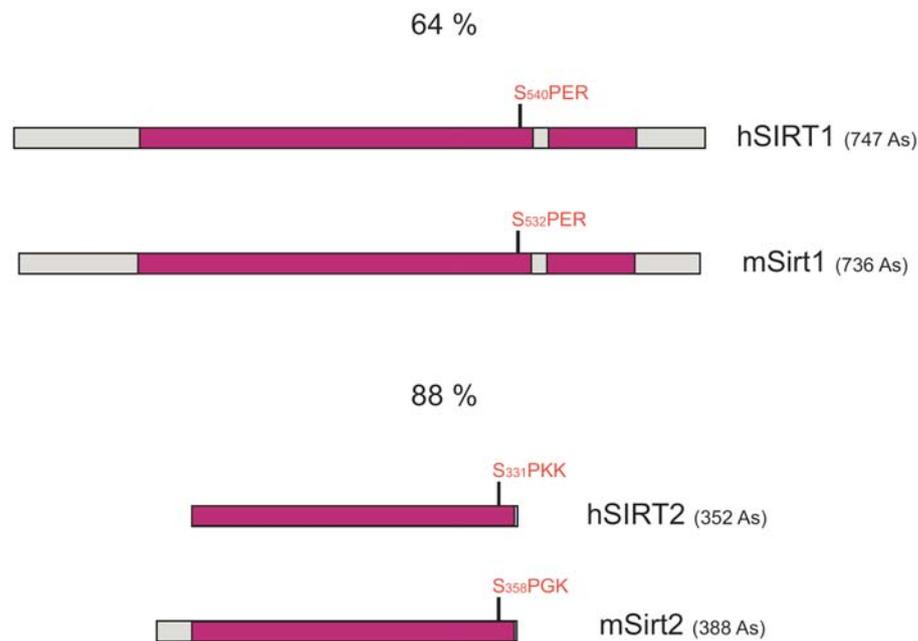
### III.1 Aminosäuresequenzvergleiche zur Ermittlung von potenziellen CDK-Phosphorylierungsstellen von SIRT1 und SIRT2

Das SIRT2 Protein wurde auf der Suche nach neuen Substraten für Cyklin E/CDK2 in einem Festphasenphosphorylierungs-Screen (Sarcevic et al., 1997) als potenzielles Substrat identifiziert. Unter den isolierten und sequenzierten positiven Klonen des Screenings wurden auch bereits bekannte Cyklin E/CDK2-Substrate, wie z.B. Histon H1, identifiziert. Ein Klon enthielt eine cDNA, die für ein C-terminales Fragment des humanen Sir2-Orthologs SIRT2 kodierte. In diesem Fragment konnten wir ein Sequenzmotiv (S<sub>331</sub>PKK) lokalisieren, das optimal mit der Konsensus-Sequenz für Phosphorylierungsstellen von CDKs (S/T PX K/R) übereinstimmte (Abb.III.1). Daraufhin führte ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von SIRT2 mit Sir2, den weiteren 6 Sirtuinen und mit dem Maus-Ortholog von SIRT1 und SIRT2 zu dem Ergebnis, dass diese potenzielle Phosphorylierungsstelle konserviert sein könnte. Es zeigte sich zum einen, dass außer SIRT2 SIRT1, 6 und 7 sehr gut passende CDK-Konsensus-Sequenzen am C-terminalen Ende hinter der für die Sirtuine spezifischen Homologie-Domäne aufwiesen (Abb.III.1). Zum anderen besitzen sowohl humanes SIRT1 als auch sein Maus-Ortholog eine identische Phosphorylierungssequenz an fast der selben Stelle am C-Terminus (Abb.III.2). Die Konsensus-Phosphorylierungsstelle von humanem und Maus-SIRT2 sind sich ebenfalls sehr ähnlich, sie unterscheiden sich nur in der nicht essenziellen Aminosäure (SPXK) und befinden sich ebenfalls fast an der selben Position am C-Terminus (Abb.III.2). Zusätzlich zu den CDK-Konsensus-Sequenzen konnten für SIRT1 sieben und für SIRT2 vier weitere potenzielle Phosphorylierungsstellen (nur SP- oder TP- Stellen) ermittelt werden. Aufgrund der Resultate des Festphasenphosphorylierungs-Screens und der Aminosäuresequenz-Vergleiche der Phosphorylierungsstellen von SIRT1 und SIRT2 konnte vermutet

werden, dass es sich bei der CDK-Phosphorylierung um eine konservierte Modifikation handeln könnte, die eine zellbiologische Funktion besitzen.



**Abb.III.1: Vergleich der Struktur von Sir2, SIRT1, SIRT2, SIRT6 und SIRT7 in Bezug auf die Sirtuin-Homologie Domäne und die potenziellen CDK-Konsensus-Phosphorylierungsstellen.** Die Sirtuin-Homologie-Domäne (katalytische Domäne) ist in schwarz dargestellt und umfasst einen Bereich von 260-275 As. Die CDK-Konsensus-Phosphorylierungsstellen sind mit vollständiger Aminosäuresequenz und mit der Position der zu phosphorylierenden Zielaminosäure in rot dargestellt.



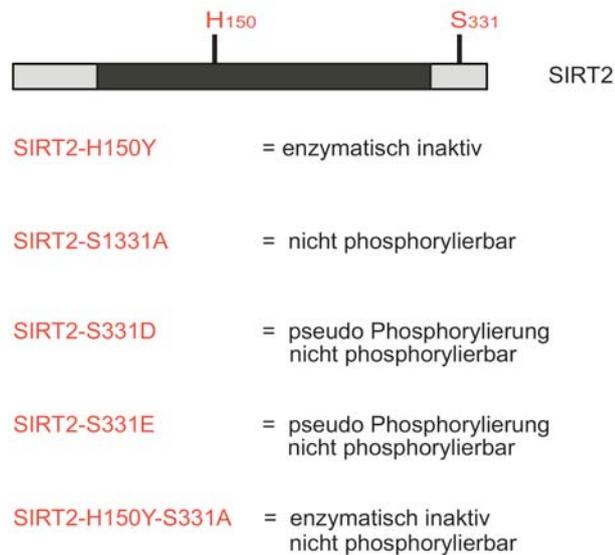
**Abb.III.2: Vergleich der Struktur von humanen und Maus-SIRT1 und -SIRT2.** Die Homologen Abschnitte sind lila gefärbt. Das humane und Maus-SIRT1 ist zu 64 % identisch. Während das humane und Maus-SIRT2 zu 88 % identisch ist. Die potenziellen CDK-Konsensus-Phosphorylierungsstellen sind mit vollständiger Aminosäuresequenz in rot dargestellt. Sowohl bei dem Maus-SIRT1 als auch bei dem Maus-SIRT2 sind die CDK-Konsensus-Sequenzen am C-terminalen Ende vorhanden.

## III.2 Charakterisierung der SIRT2-Phosphorylierung

Bisher ist über die Funktion von SIRT2 nur sehr wenig bekannt. Die bisher einzig bekannten Substrate  $\alpha$ -Tubulin (Dryden et al., 2003) und Histon H4 (Vaquero et al., 2006) lassen mögliche Effekte auf das Zytoskelett, wie die Beeinflussung der Mikrotubuli-Dynamik, und Effekte auf das Chromatin, wie die Regulation der Chromatinkondensation, vermuten. Die Hypothese, dass SIRT2 möglicherweise über Cyclin/CDK-Modifikationen reguliert wird, eröffnete neue Ansatzpunkte, um die Rolle von SIRT2 in der Zelle aufzuklären. Dazu diente zunächst die Bestimmung der Zielaminosäuren der CDK-vermittelten Phosphorylierung (III.1 sowie III.2.1-3). Danach wurden Experimente zur Ermittlung der Funktion der SIRT2-Phosphorylierung durchgeführt (III.2.4-7) und schließlich sollte die biologische Funktion von SIRT2 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung untersucht werden (III.2.8-9).

### III.2.1 Herstellung von SIRT2-Mutanten

Zu Beginn des Projekts wurde zunächst die cDNS von SIRT2 (II.3.1) mittels Gateway-PCR amplifiziert und darauf mit dem Gateway-Cloning Kit in den Klonierungsvektor pDONR™201 (II.3.1) rekombiniert (II.8.2.7) und anschließend weiter in die Expressionsvektoren GWpGST- (II.3.3), GWpHA- (II.3.2), und GWpN-TAP- (II.3.2) integriert (II.8.2.7). Die daraus resultierenden SIRT2-Fusionproteine wurden in den Analysen zur Aufklärung der Funktion der SIRT2 Phosphorylierung verwendet. Aufgrund der Hypothese, dass SIRT2 an Serin 331 phosphoryliert sein könnte (III.1), wurde als erstes die SIRT2-S331A Mutante hergestellt. Nachdem gezeigt werden konnte, dass GST-SIRT2 *in vitro* nur an Serin 331 durch Cyklin E/CDK2 modifiziert werden konnte (III.2.2.1), wurden weitere SIRT2 Phosphorylierungs-Mutanten und enzymatisch inaktive Mutanten generiert um die Funktion der CDK-vermittelten Phosphorylierung zu ermitteln. Die Mutagenese (II.8.2.6) zur Herstellung der Mutanten wurde mit dem GWpD-SIRT2 Klonierungsvektor als Matrize durchgeführt (II.3.1). Die SIRT2 Mutanten wurden in die Expressionsvektoren GWpGST (siehe II.3.3), GWpHA (II.3.2) und GWpN-TAP mittels Gateway-Klonierung rekombiniert (II.8.2.7). Bei der Herstellung der SIRT2-S331A Mutante wurde das Serin 331 durch ein Alanin ersetzt und somit die Phosphorylierungsstelle entfernt. Diese Mutante diente als Kontrolle zur Überprüfung, ob das Serin 331 der CDK-Konsensussequenz phosphoryliert wird (Abb.III.3). Zusätzlich wurden jeweils einmal Serin 331 durch Asparaginsäure und Glutaminsäure ersetzt, um so zwei Mutanten mit einer vorgetäuschten Phosphorylierung zu erhalten. Die elektrische Ladung von Aspartat und Glutamat imitiert die Ladung der Phosphatgruppe. Diese Konstrukte fungierten als Kontrolle, um die mögliche Auswirkung der Phosphorylierung zu analysieren. Als nächstes wurde eine enzymatisch inaktive SIRT2-Mutante hergestellt, dabei wurde das Histidin 150 durch ein Tyrosin ersetzt. Dieses Histidin wurde in einer Strukturanalyse und in anschließenden Experimenten als essenziell für die Aktivität identifiziert (Finnin et al., 2001). Diese Mutante diente als Negativ-Kontrolle in den Analysen zur Bestimmung der SIRT2 Aktivität (III.2.6). Anschließend wurde eine SIRT2-H150Y-S331A Doppelmutante als Negativ-Kontrolle generiert.



**Abb.III.3: Übersicht der hergestellten SIRT2-Mutanten.** Die Sirtuin-Homologie-Domäne ist schwarz dargestellt. Bei SIRT2-H150Y Mutante ist das Histidin (H) durch ein Tyrosin (Y) ersetzt worden. Bei SIRT2-S331A, SIRT2-S331D und SIRT2-S331E ist das Serin (S) durch ein Alanin (A), eine Asparaginsäure (D) oder durch eine Glutaminsäure (E) ersetzt worden. Bei der SIRT2-H150Y-S331A ist sowohl das Histidin 150 durch ein Tyrosin als auch das Serin 331 durch ein Alanin ersetzt worden.

### III.2.2 Charakterisierung der Spezifität einzelner Cyklin-CDK-Kinasekomplexe gegenüber SIRT2 in *in vitro* Kinase-Assays

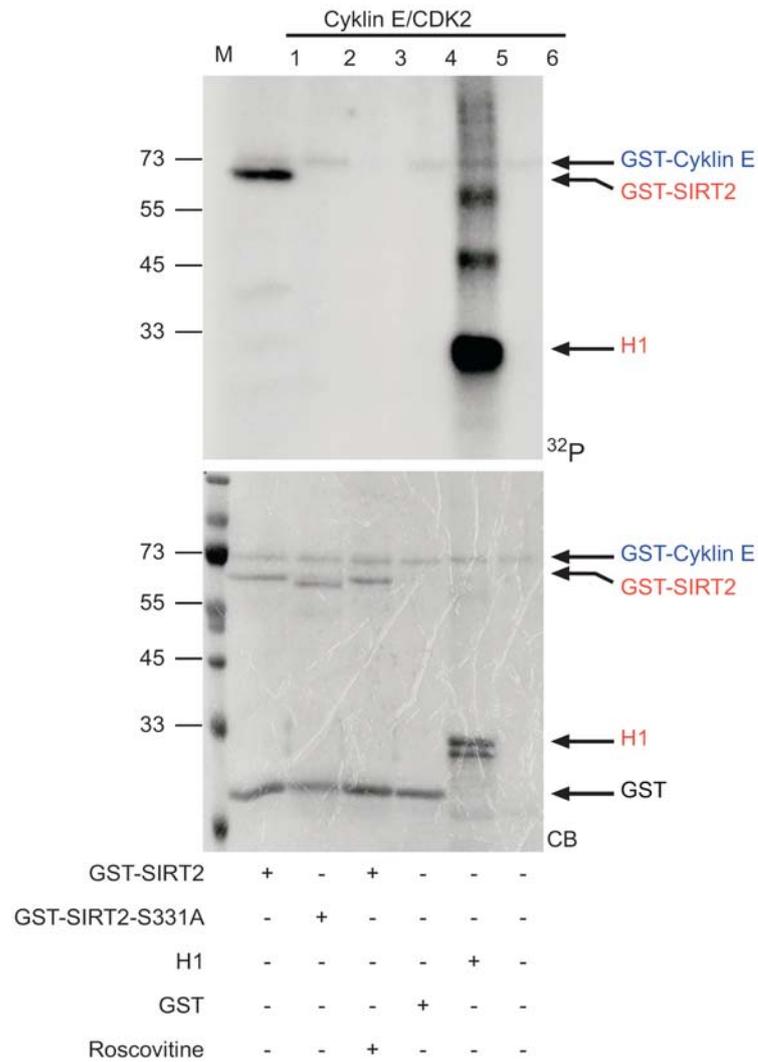
Aufgrund der Arbeitshypothese, dass die potenzielle CDK-Konsensus-Phosphorylierungsstelle von SIRT2 modifiziert sein könnte (siehe III.1), wurde die SIRT2-S331A Mutanten zusammen mit dem Wildtyp als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und anschließend aufgereinigt (II.7.5) und in einem Bradford-Assay die Proteinkonzentration bestimmt (II.9.5). Diese GST-Fusionsproteine wurden darauf in einem radioaktiven *in vitro* Kinase-Assay zusammen mit [<sup>32</sup>P]-ATP und Cyklin/CDK-Komplexen eingesetzt (II.10.1). Die übrigen GST-SIRT2 Mutanten wie S331D, S331E, H150Y und H150Y-S331A wurden ebenfalls analysiert, um so ihre Funktion in Bezug auf die Phosphorylierbarkeit zu testen. Die Cyklin/CDK Komplexe D3/CDK4, E/CDK2, A/CDK2 und B/CDK1 wurden in unserem Labor aus SF9-Insektenzellen aufgereinigt (R. Lilischkis und B. Jedamzik, unveröffentlichte Daten). In allen *in vitro* Kinase-Assays wurde je Probe eine Kinaseaktivität von 25 fktal

eingesetzt. Einzig in dem Kinase-Assay mit dem Kinasekomplex p35/CDK5 wurde eine Kinaseaktivität von 6 fktal eingesetzt.

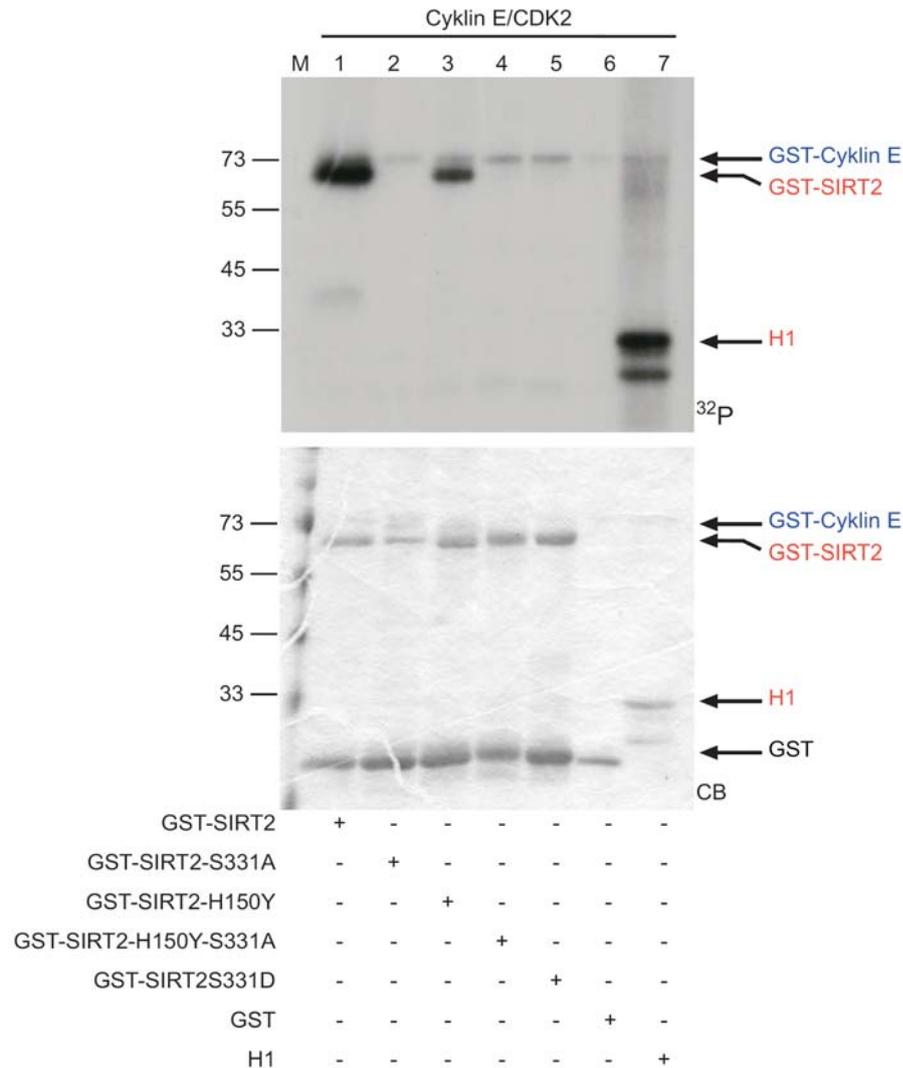
### III.2.2.1 In vitro Kinase-Assay mit GST-SIRT2 und Cyklin E/CDK2

In diesem Experiment konnte die Cyklin E/CDK2 vermittelte Phosphorylierung von SIRT2, die bereits in dem Festphasenphosphorylierungs-Screen (Lilischkis et al., unveröffentl. Ergebnisse) zur Identifizierung von Cyklin E/CDK2-Substraten beobachtet worden war, bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass GST-SIRT2 von der Kinase phosphoryliert wird (Abb.III.4), aber nicht die Mutante GST-SIRT2-S331A. Außerdem konnte durch die Verwendung von Roscovitine, einem spezifischen CDK1, CDK2 und CDK5 Inhibitor (Castedo et al., 2002; Kesavapany et al., 2001) gezeigt werden, dass der verwendete Kinasekomplex keine Verunreinigungen durch andere Kinasen beinhaltet, die möglicherweise auch für die GST-SIRT2-Modifizierung verantwortlich sein könnten. Die GST-SIRT2 Phosphorylierung erfolgte dem entsprechend ausschließlich durch Cyklin E/CDK2. Als weitere Kontrollen für die Spezifität und Aktivität des Cyklin E/CDK2-Komplexes diente GST als Negativ-Kontrolle und Histon H1, welches ein bekanntes Cyklin E/CDK2-Substrat ist (Matsumoto and Maller, 2004), als Positiv-Kontrolle. Die Proteinbande bei ~73 kDa ist das GST-Cyklin E des Kinasekomplexes, das autophosphoryliert wurde (<sup>32</sup>P-Bild Abb.III.4). In einem weiteren Kinase-Assay mit Cyklin E/CDK2 (Abb.III.5) wurden Wildtyp GST-SIRT2, GST-SIRT2-S331A, GST-SIRT2-S331D, GST-SIRT2-S331E, GST-SIRT2-H150Y und GST-SIRT2-H150Y-S331A eingesetzt. Dieses Experiment diente zur Überprüfung der Funktionalität der SIRT2 Mutanten in Hinblick auf ihre Phosphorylierbarkeit. Wie erwartet wurde außer Wildtyp GST-SIRT2 auch GST-SIRT2-H150Y modifiziert, da das Serin 331 der CDK-Konsensus-Phosphorylierungsstelle nicht ersetzt worden war. Die GST-SIRT2 Mutanten, bei denen das Serin 331 ausgetauscht worden war, GST-SIRT2-S331A, GST-SIRT2-S331D und GST-SIRT2-S331E wurden nicht phosphoryliert. Dieses Resultat bestätigte weiter die in Abb.III.4 beschriebenen Ergebnisse. Außerdem konnte die Funktionalität der Mutanten in Bezug auf ihre Phosphorylierbarkeit verifiziert werden. Die Daten festigten die Hypothese, dass die Cyklin E/CDK2-vermittelte GST-SIRT2-Phosphorylierung an Serin 331 erfolgt.

Außerdem sind diese Resultate ein erster Hinweis auf eine mögliche Funktion von SIRT2 im bzw. während des Zellzykluses. Ein Effekt von SIRT2 auf den Zellzyklus wurde bereits in der Literatur beschrieben. So führte eine stabile Überexpression von SIRT2 in Saos2 Zellen zu einem verzögerten Übergang von der M-Phase in die G1-Phase (Dryden et al., 2003). Obwohl SIRT2 ein zytoplasmatisches Protein ist (Dryden et al., 2003; North et al., 2003) könnte es dennoch mit Cyklin E/CDK2 assoziieren, da Cyklin E/CDK2 zwischen Nucleus und Zytoplasma *shuttelt* und so auch mit zytoplasmatischen Substraten interagieren könnte (Jackman et al., 2002). Resultierend aus diesen Daten konnte unter anderem die Frage nach der Spezifität weiterer CDK-Komplexe gegenüber SIRT2 gestellt werden und ob diese ebenfalls Serin 331 modifizieren. Mit der Klärung dieser offenen Fragen könnte der mögliche Wirkungsbereich der Cyklin/CDK-vermittelten SIRT2-Phosphorylierung im Zellzyklus oder in anderen Zellprozessen eingrenzt werden.



**Abb.III.4: Cyclin E/CDK2 Phosphorylierung von GST-SIRT2 in einem *in vitro* Kinase-Assay.** Bakteriell exprimierte GST-SIRT2-Proteine wurde zusammen mit [<sup>32</sup>P]-ATP und Cyclin E/CDK2 in einem Kinase-Assay eingesetzt. Nach der Auftrennung der Proteine in einem 12% SDS-Page wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und vakuumgetrocknet (CB). Die Radioaktivität wurde über einen Röntgenfilm detektiert (<sup>32</sup>P). Spur 1: Wildtyp GST-SIRT2; Spur 2: GST-SIRT2-S331A; Spur 3: GST-SIRT2 mit Roscovitine; Spur 4: GST; Spur 5: Histon H1; Spur 6: Kinasekomplex ohne Substrat.



**Abb.III.5: Überprüfung der Phosphorylierbarkeit der GST-SIRT2 Mutanten durch Cyklin E/CDK2 in einem *in vitro* Kinase-Assay.** Bakteriell exprimierte GST-SIRT2-Proteine wurde zusammen mit [<sup>32</sup>P]-ATP und Cyklin E/CDK2 in einem Kinase-Assay eingesetzt. Nach der Auftrennung der Proteine in einem 12% SDS-Page wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und vakuumgetrocknet (CB). Die Radioaktivität wurde über einen Röntgenfilm detektiert (<sup>32</sup>P). Spur 1: Wildtyp GST-SIRT2; Spur 2: GST-SIRT2-S331A; Spur 3: GST-SIRT2-H150Y; Spur 4: GST-SIRT2-H150Y-S331A; Spur 5: GST-SIRT2-S331D; Spur 6: GST; Spur 7: Histon H1.

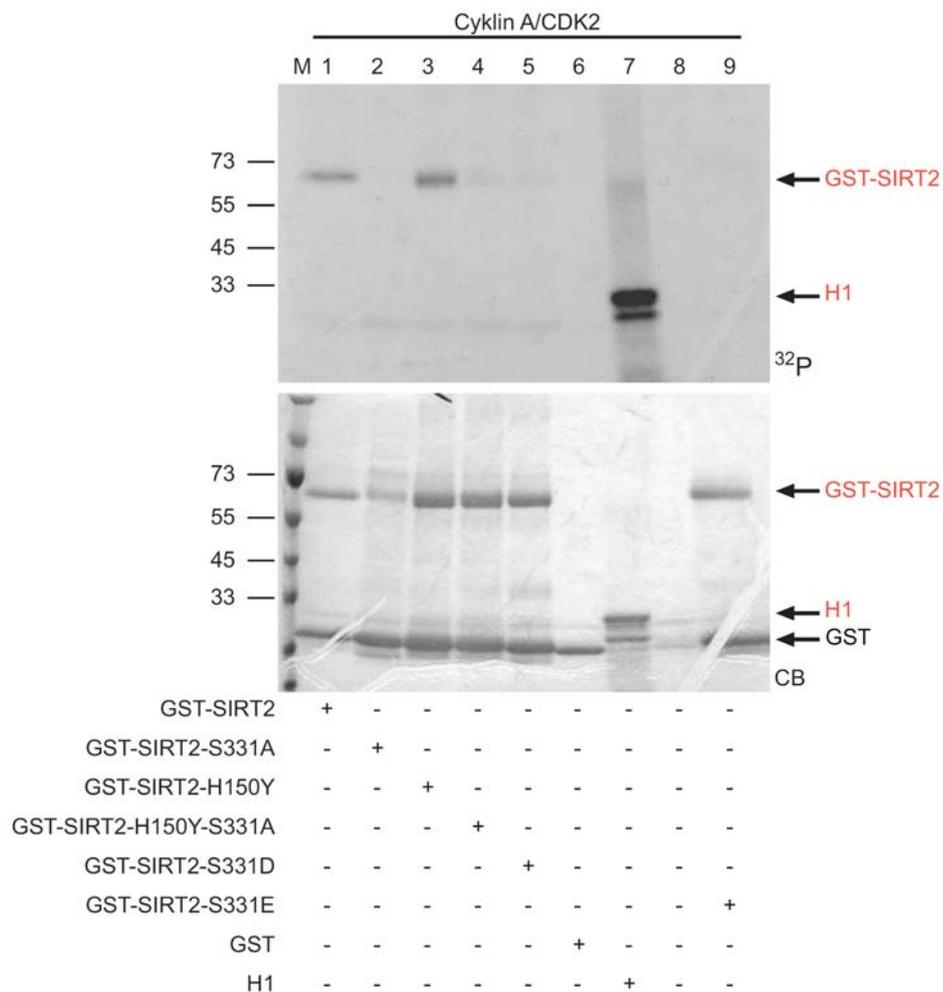
### III.2.2.2 *In vitro* Kinase-Assay mit GST-SIRT2 und Cyklin D3/CDK4

Die Cyklin D/CDK-Komplexe sind essenziell für den G1-S Phase Übergang. Dieser Prozess wird durch die Phosphorylierung des Rb-Proteins aktiviert (Sherr, 1993). In diesem Experiment sollte Phosphorylierbarkeit von GST-SIRT2 durch Cyklin D3/CDK4 untersucht (Abb.III.6). Dabei konnte gezeigt werden, dass GST-SIRT2 nicht von Cyklin D3/CDK4 phosphoryliert wird. In Spur 1 wurde nur der GST-Cyklin

D3/CDK4-Komplex ohne Substrat untersucht. Es zeigte sich, dass das an GST fusionierte Cyklin D3 scheinbar autophosphoryliert wird. Da es keine eindeutige Referenz für die Autophosphorylierung von Cyklin D3 gab, wurde der bekannte CDK4- und CDK6-Inhibitor p16 (Sherr and Roberts, 1999) als GST-Fusionsprotein in diesem Assay eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass GST-p16 die Phosphorylierung von GST-Cyklin D3 unterdrückte, was die Vermutung der Autophosphorylierung bestätigte. Als zusätzliche Kontrolle wurde Cyklin E/CDK2 und Cyklin D3/CDK4 zusammen mit GST-p16 und GST-SIRT2 im Kinase-Assay eingesetzt. Dabei inhibierte das GST-p16 spezifisch den Cyklin D3/CDK4-Komplex, zu erkennen an der fehlenden Autophosphorylierung von Cyklin D3. Gleichzeitig wurde GST-SIRT2 durch Cyklin E/CDK2 phosphoryliert, das bereits unter III.2.2.1 beschrieben wurde. Dies diente zur weiteren Verifizierung, dass die GST-SIRT2 Phosphorylierung scheinbar spezifisch erfolgt, denn es konnte durch Cyklin E/CDK2 phosphoryliert werden, aber nicht durch Cyklin D3/CDK4. Zudem bestätigte dieser Versuchsteil, dass das eingesetzte bakteriell exprimierte GST-p16 spezifisch CDK4 inhibiert. Als weitere Kontrollen für die Spezifität und Aktivität des Cyklin D3/CDK4 Komplexes fungierte das Rb-Protein als Positiv-Kontrolle (~48 kDa). Außerdem diente die Verwendung von GST-p16 und GST-Rb zur Verifizierung der Spezifität und Reinheit des Kinasekomplexes. Hierbei konnte gezeigt werden, dass GST-Rb nicht mehr durch Cyklin D3/CDK4 phosphoryliert werden konnte. Dieses Ergebnis deutet auf eine differenzierte SIRT2 Phosphorylierung durch Cyklin/CDK-Komplexe hin.



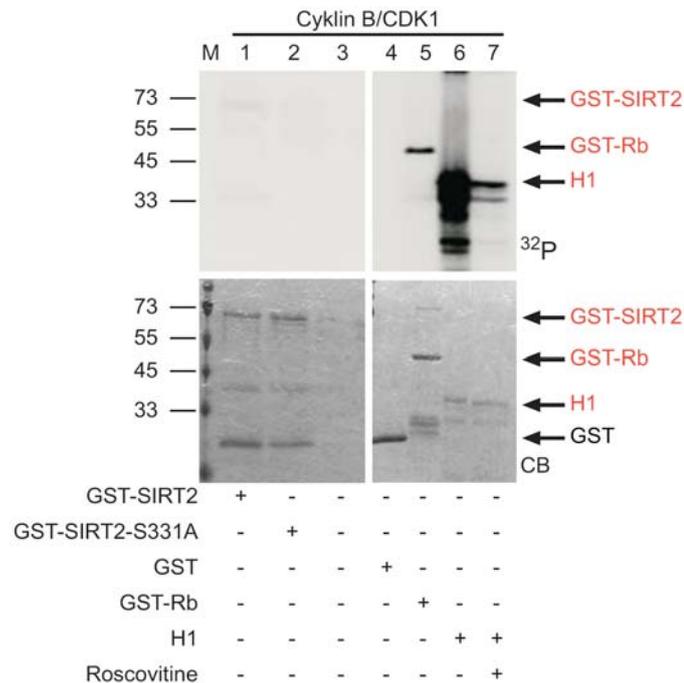
GST-SIRT2-Mutanten, bei denen das Serin 331 ausgetauscht worden ist, GST-SIRT2-S331A, GST-SIRT2-S331D und GST-SIRT2-S331E wurden nicht phosphoryliert. Als weitere Kontrollen für die Spezifität und Aktivität des Cyclin A/CDK2-Komplexes diente GST als Negativ-Kontrolle und Histon H1 als Positiv-Kontrolle. Dieses Resultat festigte erneut die Vermutung, dass SIRT2 nur an Serin 331 durch Cyclin/CDKs modifiziert wird und so möglicherweise eine Funktion während des Zellzykluses haben könnte. Wie im Falle von Cyclin E/CDK2 könnte auch Cyclin A/CDK2 mit SIRT2 im Zytoplasma interagieren, da Cyclin A/CDK2 ebenfalls zwischen Nucleus und Zytoplasma *shuttelt* (Jackman et al., 2002).



**Abb.III.7: Cyclin A/CDK2-Phosphorylierung von GST-SIRT2 in einem *in vitro* Kinase-Assay.** Bakteriell exprimierte GST-SIRT2-Proteine wurde zusammen mit [<sup>32</sup>P]-ATP und Cyclin A/CDK2 in einem Kinase-Assay eingesetzt. Nach der Auftrennung der Proteine in einem 12% SDS-PAGE wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und vakuumgetrocknet (CB). Die Radioaktivität wurde über einen Röntgenfilm detektiert (<sup>32</sup>P). Spur 1: Wildtyp GST-SIRT2; Spur 2: GST-SIRT2-S331A; Spur 3: GST-SIRT2-H150Y; Spur 4: GST-SIRT2-H150Y-S331A; Spur 5: GST-SIRT2-S331D; Spur 6: GST; Spur 7: Histon H1; Spur 8: Kinasekomplex ohne Substrat; Spur 9: GST-SIRT2-S331E

### III.2.2.4 *In vitro* Kinase-Assay mit GST-SIRT2 und Cyklin B/CDK1

Cyklin B akkumuliert am Ende der G2-Phase und bildet zusammen mit CDK1 einen Komplex, dessen Aktivierung für den irreversiblen Übergang in die Mitose notwendig ist. Die Cyklin B/CDK1-Substrate sind unter anderem involviert in der Auflösung der Kernhülle und beim Aufbau des Spindelapparats (McGowan, 2003; Pines and Rieder, 2001). In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass GST-SIRT2 von Cyklin B/CDK1 sehr schwach phosphoryliert wird (Abb.III.8), aber in Anbetracht der Intensität der Phosphorylierung der Kontrollen konnte es sich bei dieser Phosphorylierung nur um eine unspezifisch Modifikation handeln. In Spur 2 wurde GST-SIRT2-S331A untersucht, welches keine Phosphorylierung aufwies. Daher ist anzunehmen, dass diese schwache Modifikation ebenfalls an Serin 331 erfolgt. In Spur 3 wurde der Kinasekomplex ohne Substrat aufgetragen. Als weitere Kontrollen für die Spezifität und Aktivität des Cyklin B/CDK1-Komplexes diente wiederum GST als Negativ-Kontrolle sowie GST-Rb und Histon H1 als Positiv Kontrollen. Außerdem konnte durch die Verwendung von Roscovitine gezeigt werden, dass der verwendete Kinasekomplex keine Verunreinigungen durch andere Kinasen aufwies, die möglicherweise für die GST-Rb und Histon H1 Modifizierung verantwortlich sein könnten .



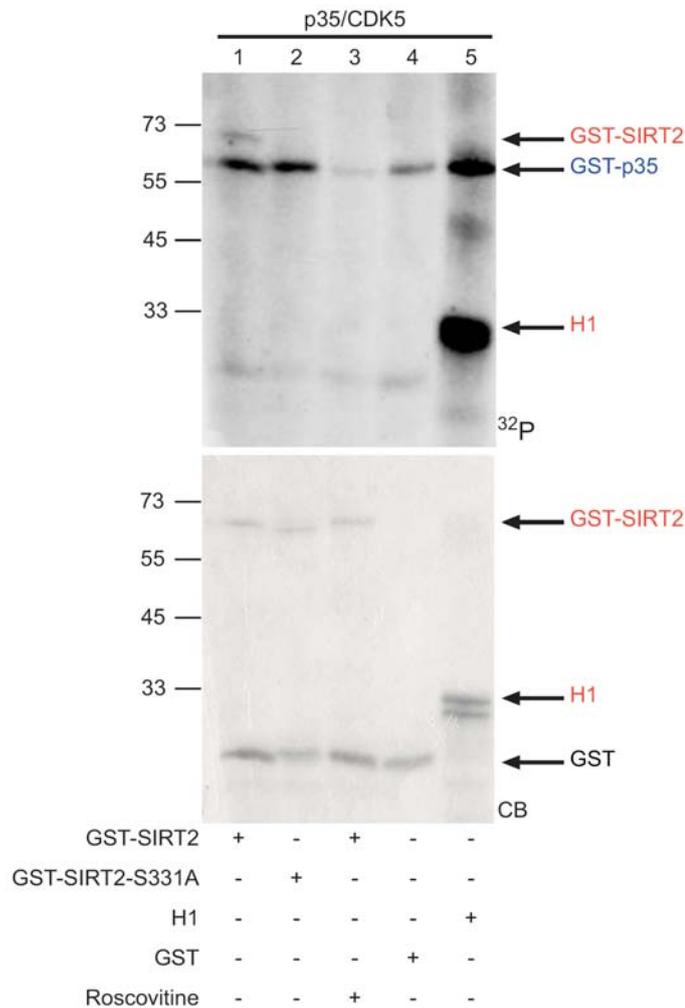
**Abb.III.8: Cyklin B/CDK1-Phosphorylierung von GST-SIRT2 in einem in vitro Kinase-Assay.** Bakteriell exprimierte GST-SIRT2-Proteine wurde zusammen mit [<sup>32</sup>P]-ATP und Cyklin B/CDK1 in einem Kinase-Assay eingesetzt. Nach der Auftrennung der Proteine in einem 12% SDS-Page wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und vakuumgetrocknet (CB). Die Radioaktivität wurde über einen Röntgenfilm detektiert (<sup>32</sup>P). Spur 1: Wildtyp GST-SIRT2; Spur 2: GST-SIRT2-S331A; Spur 3: Kinasekomplex ohne Substrat; Spur 4: GST; Spur 5: GST-Rb; Spur 6: Histon H1; Spur 7: GST-SIRT2 mit Roscovitine

### III.2.2.5 In vitro Kinase-Assay mit GST-SIRT2 und p35/CDK5

Da in der Literatur neben einem möglichen Einfluss von SIRT2 auf den Zellzyklus auch ein möglicher Effekt auf die Zellmigration über die Deacetylierung von  $\alpha$ -Tubulin postuliert wurde, sollte die Phosphorylierbarkeit von GST-SIRT2 durch p35/CDK5 untersucht werden. Der Kinasekomplex p35/CDK5 spielt eine wichtige Rolle in der Zellmigration. Dabei kommt es durch p35/CDK5 vermittelt zu Stabilitätsänderungen im Tubulin-Netzwerk der Zelle, die die Zellmigration ermöglichen (Hahn et al., 2005; Tanaka et al., 2004). In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass GST-SIRT2 von der Kinase phosphoryliert wird (Abb.III.9), aber nicht die Mutante GST-SIRT2-S331A. Außerdem konnte durch die Verwendung von Roscovitine bestätigt werden, dass der verwendete Kinasekomplex keine Verunreinigungen durch andere Kinasen hatte, die möglicherweise auch für die GST-SIRT2 Modifizierung verantwortlich sein könnten. Die GST-SIRT2 Phosphorylierung erfolgte ausschließlich durch p35/CDK5. Als weitere

Kontrollen für die Spezifität und Aktivität des p35/CDK5-Komplexes diente wiederum GST als Negativ-Kontrolle und Histon H1 welches ein p35/CDK5-Substrat ist (Tang et al., 2005), als Positiv-Kontrolle. Die Proteinbande bei ~60 kDa entspricht dem autophosphorylierten GST-p35 des Kinasekomplexes (<sup>32</sup>P-Bild Abb.III.9). Dieses Ergebnis bestätigt weiter die Vermutung, dass die SIRT2 Phosphorylierung spezifisch an Serin 331 erfolgen könnte.

Zusammenfassend lieferten diese Untersuchungen das Resultat, dass GST-SIRT2 von p35/CDK5 (III.2.2.5), Cyklin E/CDK2 (III.2.2.1) und Cyklin A/CDK2 (III.2.2.3) phosphoryliert wird, aber nicht von den Cyklin D3/CDK4 (III.2.2.2) und Cyklin B/CDK1 (III.2.2.4) und dass die Phosphorylierung durch diese CDK-Komplexe ausschließlich an Serin 331 erfolgt. Diese Ergebnisse deuteten auf eine differenzierte SIRT2-Phosphorylierung durch Cyklin/CDK-Komplexe hin. Allerdings handelt es sich hierbei um *in vitro* Daten, die durch zusätzliche *in vivo* Phosphorylierungsexperimente bestätigt werden mussten (III.2.3).



**Abb.III.9: p35/CDK5-Phosphorylierung von GST-SIRT2 in einem *in vitro* Kinase-Assay.** Bakteriell exprimierte GST-SIRT2-Proteine wurde zusammen mit [ $^{32}$ P]-ATP und p35/CDK5 in einem Kinase-Assay eingesetzt. Nach der Auftrennung der Proteine in einem 12% SDS-Page wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und vakuumgetrocknet (CB). Die Radioaktivität wurde über einen Röntgenfilm detektiert ( $^{32}$ P). Spur 1: Wildtyp GST-SIRT2; Spur 2: GST-SIRT2-S331A; Spur 3: GST-SIRT2 mit Roscovitine; Spur 4: GST; Spur 5: Histon H1.

### III.2.3 *In vivo* Phosphorylierung von SIRT2

Die aus den *in vitro* Kinase-Assays gewonnenen Daten zeigten auf, dass SIRT2 differenziert durch Cyklin/CDK-Komplexe phosphoryliert wird und dass diese Modifikation exklusiv an Serin 331 erfolgt (III.2.2). Es stellte sich die Frage, ob Serin 331 auch in Zellen phosphoryliert wird. Diese Fragestellung sollte durch radioaktive *in vivo* Markierungsexperimente beantwortet werden (II.6.15). Hierfür wurde Wildtyp HA-SIRT2 und die Mutante HA-SIRT2-S331A in HEK293-Zellen transfiziert (II.6.6) Anschließend metabolisch mit [ $^{32}$ P] markiert. Die transfizierten Zellen wurden darauf

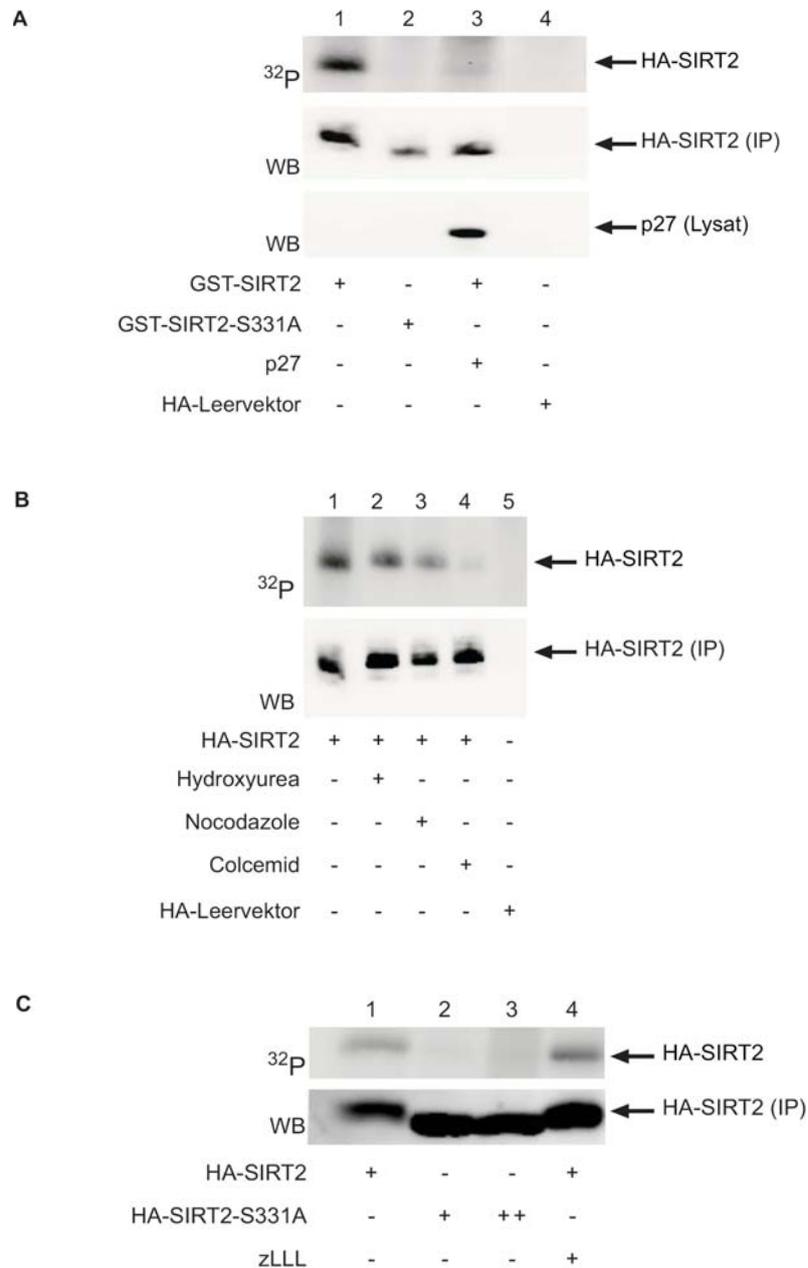
lysiert (II.6.12) und die HA-SIRT2-Fusionsproteine mittels eines spezifischen anti-HA Antikörpers immunpräzipitiert (II.6.13). Die präzipitierten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt (II.9.1) anschließend die Radioaktivität über einen Röntgenfilm detektiert. Die Resultate aus diesen Experimenten bestätigten die Vermutung, dass SIRT2 *in vivo* an Serin 331 phosphoryliert wird. (Abb.III.10 A und C). Zudem konnte die *in vivo* Phosphorylierung von HA-SIRT2 durch die Kotransfektion von p27, einem spezifischen CDK1- und CDK2-Inhibitor (Ruas and Peters, 1998; Sherr, 1995), unterbunden werden (Abb.III.10 A). Dies war ein erster Beweis für eine spezifische *in vivo* Phosphorylierung von SIRT2 durch Cyklin/CDK-Komplexe. Um die Cyklin/CDK-spezifische Phosphorylierung weiter zu untersuchen, sollte die SIRT2-Phosphorylierung in Zellen mit der endogen CDK-Aktivitäten korreliert werden. Hier für wurden mit HA-SIRT2 und HA-SIRT2-S331A transfizierte HEK293-Zellen für 20h mit Zytostatika behandelt, um die Zellen in der S-Phase (Hydroxyurea), G2-M-Phase (Nocodazol) und M-Phase (Colcemid) des Zellzykluses zu arretieren (Abb.III.10 B). In der S-Phase sind die Kinasen CyklinE/CDK2 und Cyklin A/CDK2, in der G2-Phase Cyklin A/CDK2 und in der M-Phase Cyklin B/CDK1 aktiv (Sherr, 2000). Die immunpräzipitierten HA-SIRT2-Proteine aus den S-Phase und G2-M-Phase arretierten Zellen zeigten eine relativ starke *in vivo* Phosphorylierung, während die M-Phase SIRT2-Proteine nur ein schwaches Phosphorylierungs-Signal aufwiesen. Der Unterschied der Intensität der Phosphorylierung zwischen S-Phase und G2-M-Phase HA-SIRT2-Proteinen ist durch die geringeren Menge an SIRT2 in den G2-M-Phase-Proben zu erklären. Dieses Phosphorylierungsmuster entspricht den *in vitro* Daten (III.2.2). Demnach wird SIRT2 *in vivo* und *in vitro* von Cyklin E/CDK2 und CyklinA/CDK2 phosphoryliert.

In einem weiteren Experiment sollte überprüft werden, ob die Phosphorylierung einen Einfluss auf den Abbau von SIRT2 hat. Dafür wurden HA-SIRT2 transfizierte HEK293-Zellen 2h mit dem Proteasom-Inhibitor zLLL behandelt (Abb.III.10 C). Es zeigte sich, dass die Menge an HA-SIRT2-Proteinen in den zLLL behandelten Zellen zunahm, was auf einen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Hershko and Ciechanover, 1998) schließen lässt. Allerdings konnte in diesem Experiment keine belastbare Schlussfolgerung getroffen werden, da das Phosphorylierungs-Signal der zLLL-Probe nicht signifikant stärker war als das Phosphorylierungs-Signals des unbehandelten

SIRT2-Probe. Dies ist jedoch ein relativ ungenaue Methode, um einen möglichen Einfluss der Phosphorylierung auf die Stabilität von SIRT2 zu untersuchen. Deshalb wurden [<sup>35</sup>S]-Markierungsexperimente durchgeführt (III.2.5).

Des Weiteren wurde in Kooperation mit Dr. Edwin Lasonder (Proteomics Facility Nijmegen) die *in vitro* und *in vivo* Phosphorylierung von SIRT2 massenspektrometrisch analysiert. Dafür wurde zum einen bakteriell exprimiertes GST-SIRT2 in einem Kinase-Assay zusammen mit Cyklin A/CDK2 und ATP eingesetzt (II.10.1) und danach für die Massenspektrometrie aufbereitet (II.9.6). Der Cyklin A/CDK2-Komplex erwies sich von den in unserem Labor hergestellten Cyklin/CDK-Komplexen als der stabilste der SIRT2-phosphorylierenden Kinasen. Dies war wichtig, da die SIRT2-Proteine in diesem „kalten“ Kinase-Assay für 2h mit dem Cyklin/CDK-Komplex inkubiert wurden. Parallel dazu wurden Doxycyclin-induzierte HEK293-N-TAP-SIRT2-Zellen mit Hydroxyurea und Nocodazol arretiert und darauf die N-TAP-SIRT2-Proteine präzipitiert (II.6.11) und für die Massenspektrometrie vorbereitet. Dabei konnte sowohl bei den *in vitro* phosphorylierten GST-SIRT2-Proteinen als auch bei den *in vivo* phosphorylierten N-TAP-SIRT2-Proteinen eindeutig das Serin 331 als Zielaminosäure identifiziert werden.

Zusammenfassend bewiesen diese Resultate die Arbeitshypothese, dass SIRT2 von Cyklin/CDKs an Serin 331 phosphoryliert wird. Es galt nun aufzuklären, welche Funktion die Phosphorylierung auf SIRT2 haben könnte und welche Zellprozesse dadurch beeinflusst werden.



**Abb.III.10: *In vivo* Phosphorylierung von HA-SIRT2.** HA-SIRT2-Konstrukte (10 µg) wurden in HEK293-Zellen transfiziert und metabolisch mit [<sup>32</sup>P] markiert. Nach der Auftrennung der Proteine in einem 12% SDS-Page wurde die Radioaktivität über einen sensitiven Film detektiert. **(A)** Spur 1: Wildtyp HA-SIRT2; Spur 2: HA-SIRT2-S331A; Spur 3: HA-SIRT2 kotransfiziert mit p27 (5 µg); Spur 4: HA-Leervektor (10 µg). **(B)** HA-SIRT2 transfizierte HEK293-Zellen wurden jeweils 20 h mit Hydroxyurea (200 µM), Nocodazol (400 ng/ml) oder Colcemid (200 ng/ml) behandelt. Spur 1: Wildtyp HA-SIRT2; Spur 2: HA-SIRT2-S331A; Spur 3: HA-SIRT2 kotransfiziert mit p27 (5 µg); Spur 4: Wildtyp HA-SIRT2 mit Hydroxyurea; Spur 5: Wildtyp HA-SIRT2 mit Nocodazol; Spur 6: Wildtyp HA-SIRT2 mit Colcemid; Spur 7: HA-Leervektor. **(C)** HA-SIRT2 transfizierte HEK293-Zellen wurden 2 h mit dem Proteasom-Inhibitor zLLL (30µM) behandelt. Spur 1: Wildtyp HA-SIRT2; Spur 2: HA-SIRT2-S331A (10 µg); Spur 3: HA-SIRT2-S331A (20 µg); Spur 4: Wildtyp HA-SIRT2.

## III.2.4 Die Aktivität von SIRT2 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung

Um die Funktion der SIRT2-Phosphorylierung zu bestimmen, sollte zum einen die Wirkung der Modifikation auf die SIRT2-Deacetylaseaktivität bestimmt werden. Zunächst wurden die bakteriell exprimierte GST-SIRT2-Fusionsproteine und die immunpräzipitierten HA-SIRT2 Proteine in HDAC-Assays (II.10.2) auf ihre Aktivität hin untersucht (III.2.4.1). Anschließend wurde die Abhängigkeit der Aktivität von GST-SIRT2 von der Cyclin/CDK-Phosphorylierung in einem HDAC-Assay analysiert (III.2.4.2). Zudem wurde die *in vivo* Deacetylaseaktivität von HA-SIRT2 und der SIRT2-Mutanten auf  $\alpha$ -Tubulin bestimmt (III.2.4.3). Durch diese Experimente konnte geklärt werden, dass die Phosphorylierung von SIRT2 an Serin 331 die Deacetylaseaktivität *in vivo* und *in vitro* inhibiert. So konnte gezeigt werden, dass zum einen die Aktivität von GST-SIRT2 durch die Phosphorylierung durch CyclinA/CDK2 inhibiert, aber zum anderen die Aktivität von GST-SIRT2-S331A durch CyclinA/CDK2 nicht beeinflusst wird (III.2.4.2). Dementsprechend zeigte die SIRT2-S331D Mutante *in vitro* und *in vivo* eine stark verringerte Aktivität (III.2.4.1 und III.2.4.3).

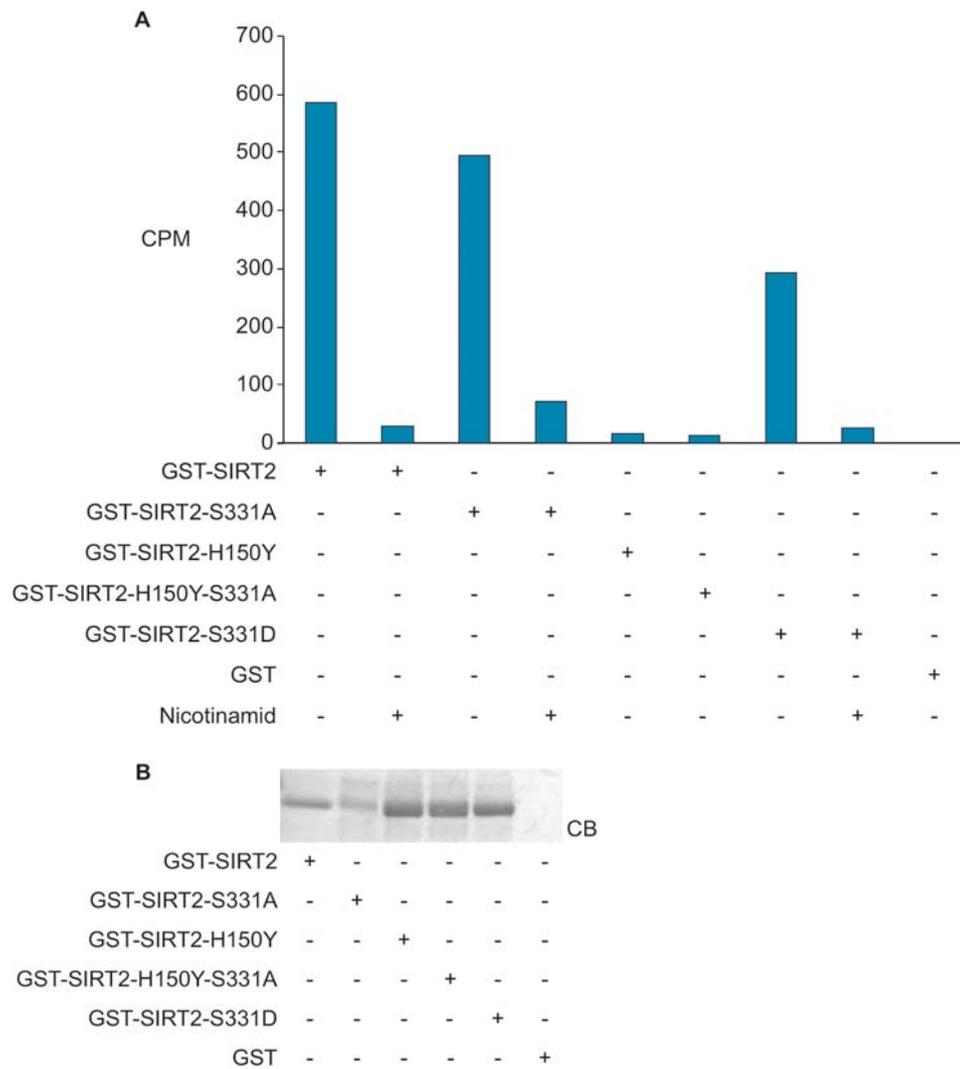
### III.2.4.1 *In vitro* HDAC-Assay mit bakteriell und in humanen Zellen exprimierte SIRT2 Proteinen

Bakteriell exprimiertes GST-SIRT2 und die GST-SIRT2-Mutanten wurden zusammen mit [<sup>3</sup>H]-acetylierten Hühner-Retikulozyten-*core*-Histonen als Substrat in einem *in vitro* HDAC-Assay (II.10) eingesetzt und die freigesetzten [<sup>3</sup>H]-Acetylgruppen in einem Szintillationsgerät gemessen. Die Aktivität der Enzyme wurde in CPM (*counts per minute*) wiedergegeben (Abb.III.11 A). Die eingesetzte Menge an Protein in den HDAC-Assay wurden zum einen durch Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue nach einer SDS-Page (Abb.III.11. B) zum anderen durch Immunoblot-Analysen (Abb.III.12. B) kontrolliert. Dabei konnte verifiziert werden, dass der bakteriell exprimierte GST-SIRT2 und die GST-SIRT2-S331A-Mutante aktiv sind und dass sie durch Zugabe von Nicotinamid (10 mM) in ihrer Aktivität inhibiert werden können (Imai et al., 2000).

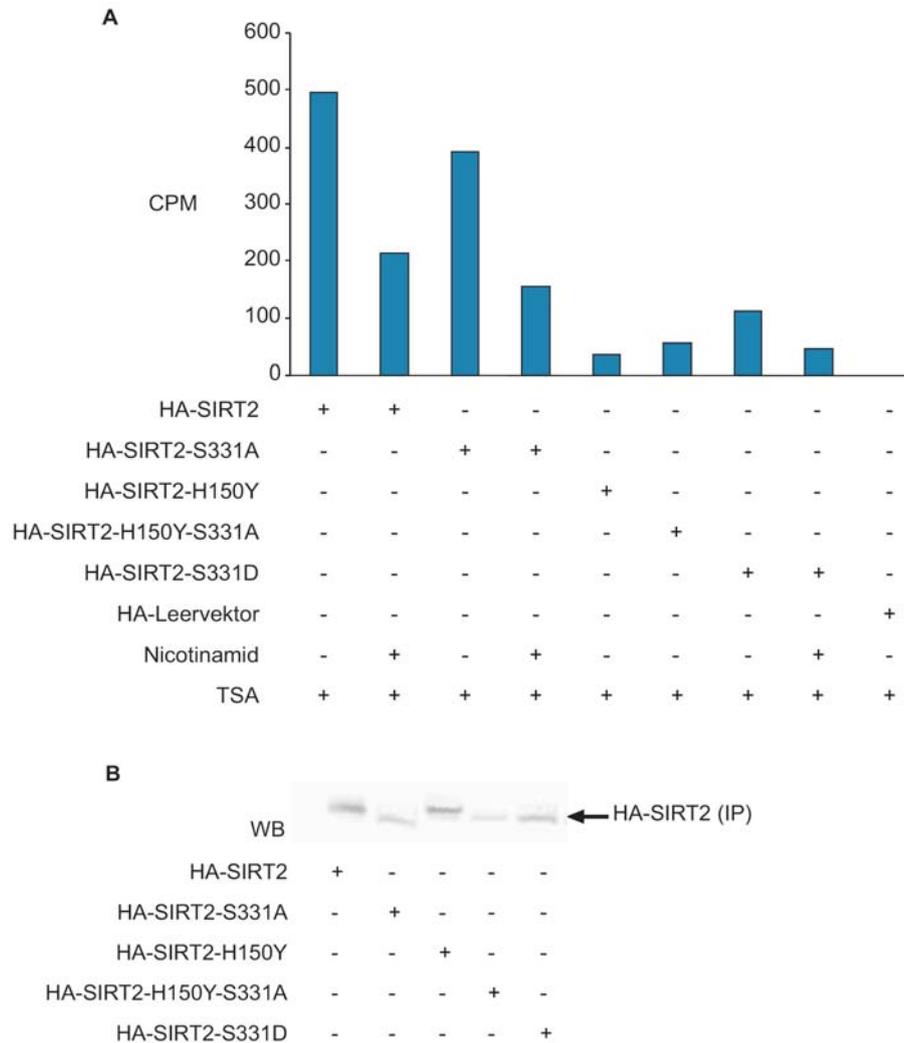
Zudem konnten die enzymatisch inaktiven Mutanten GST-SIRT2-H150Y und -H150Y-S331A als solche bestätigt werden. Die GST-SIRT2-S331D-Mutante zeigte eine signifikant erniedrigte Aktivität gegenüber dem Wildtyp SIRT2, obwohl die Proteinmenge in der Probe mindestens doppelt so hoch war als die des Wildtyps (Abb.III.11 B). Außerdem war die Aktivität von GST-SIRT2-S331A, trotz der um die Hälfte geringeren Proteinmenge, fast äquivalent zur Wildtyp-Aktivität (Abb.III.11 B). Zusammengefasst waren diese Daten der erste Hinweis, dass die negative Ladung der Phosphatgruppe an Serin 331 inhibierend auf die enzymatische Aktivität von SIRT2 wirkt.

Um dieses Resultat weiter zu bestätigen, wurden HEK293-Zellen mit HA-SIRT2 und den übrigen HA-SIRT2-Mutanten transfiziert und nach der Lyse der Zellen immunpräzipitiert. Die Protein Präzipitate wurden dann in einem HDAC-Assay mit [<sup>3</sup>H]-acetylierten-*core*-Histonen eingesetzt (Abb.III.12 A). In allen Proben wurde der HDAC-Klasse I und II Inhibitor Trichostatin A (TSA) eingesetzt, um die Aktivität von koimmunpräzipitierten HDAC-Proteinen zu inhibieren und somit zu gewährleisten, dass einzig die SIRT2-Aktivität gemessen wird. Dabei konnte die Vermutung weiter erhärtet werden, dass die Phosphorylierung SIRT2 in seiner Aktivität inhibiert. Es konnte verifiziert werden, dass sowohl HA-SIRT2 als auch HA-SIRT2-S331A aktiv sind und dass sie durch Nicotinamid inhibiert werden können. Des weiteren konnte, wie bereits bei den GST-SIRT2 HDAC-Experimenten gezeigt, eine höhere Aktivität der HA-SIRT2-S331A-Mutante gegenüber dem Wildtyp vermutet werden, da die eingesetzte Proteinmenge der Mutante um die Hälfte geringer war als die des Wildtyps (Abb.III.12 B). Die schwächere Aktivität von SIRT2 könnte durch die Phosphorylierung eines Teils der HA-SIRT2-Proteine erklärt werden. Diese Vermutung konnte durch die stark verringerte Aktivität der HA-SIRT2-S331D-Mutante weiter erhärtet werden. Die Phosphorylierung imitierende S331D-Mutante zeigte bei fast gleicher Proteinmenge nur ein fünftel der Aktivität des Wildtyps (Abb.III.12 B)

Zusammenfassend deuteten diese beiden HDAC-Experimente auf einen inhibierenden Effekt der Serin 331-Phosphorylierung auf die enzymatischen Aktivität von SIRT2 hin. Um diese Hypothese weiter zu untermauern sollte der direkte Einfluss der CDK-Phosphorylierung von SIRT2 in einem *in vitro* HDAC-Assay untersucht werden (III.2.4.2).



**Abb.III.11: *In vitro* HDAC-Assay mit GST-SIRT2-Proteinen.** Die bakteriell exprimierten GST-SIRT2-Proteine wurden zusammen mit [ $^3\text{H}$ ]-acetylierten-*core*-Histonen als Substrat in einem HDAC-Assay eingesetzt. Die freigesetzten [ $^3\text{H}$ ]-Acetylgruppen wurden in einem Szintillationsgerät gemessen. Die Aktivität wurde in CPM (counts per minute) in Abb. A wiedergegeben. In Abb. B wurde die im HDAC-Assay eingesetzte Mengen an GST-SIRT2-Protein durch eine Coomassie- Proteinfärbung verglichen.



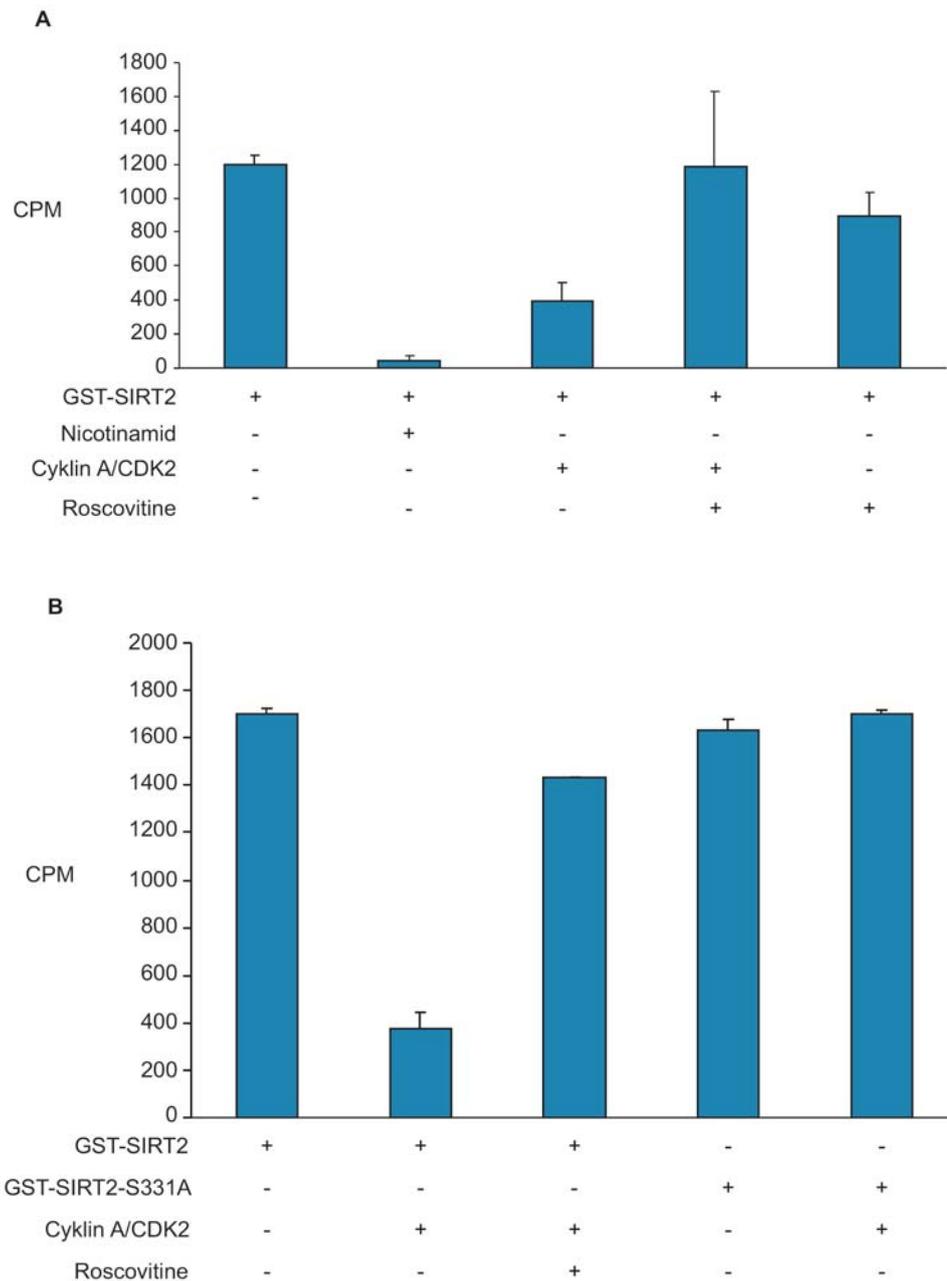
**Abb.III.12: *In vitro* HDAC-Assay mit HA-SIRT2-Proteinen.** HEK293-Zellen wurden mit HA-SIRT2 Expressionsvektoren (10 µg) transfiziert und darauf immunpräzipitiert. Die präzipitierten HA-SIRT2 Proteine wurden zusammen mit [<sup>3</sup>H]-acetylierten-*core*-Histonen als Substrat in einem HDAC-Assay eingesetzt. Die freigesetzten [<sup>3</sup>H]-Acetylgruppen wurden in einem Szintillationsgerät gemessen. Die Aktivität wurde in CPM (counts per minute) in Abb. A wiedergegeben. In Abb. B wurde die im HDAC-Assay eingesetzte Mengen an HA-SIRT2-Protein in einer Immunoblot Analyse verglichen.

### III.2.4.2 *In vitro* HDAC-Assay mit Cyklin A/CDK2-phosphoryliertem GST-SIRT2 und GST-SIRT2-S331A

Bakteriell exprimiertes GST-SIRT2 und GST-SIRT2-S331A wurden zunächst in einem Kinase-Assay zusammen mit oder ohne Cyklin A/CDK2 eingesetzt (II.10.1). Da der Kinasereaktionspuffer gleichzeitig auch der HDAC-Reaktionspuffer ist, wurde nach der „kalten“ Phosphorylierung der GST-SIRT2-Proteine [<sup>3</sup>H]-acetylierte Hühner-

Retikulozyten-*core*-Histone als Substrat zusammen mit NAD<sup>+</sup>, als Kofaktor in die Kinaseansätze gegeben und der *in vitro* Kinase-Assay somit zu einem *in vitro* HDAC-Assay (II.10.2) weiterentwickelt (Abb.III.13 A und B). Von den in unserem Labor hergestellten Cyklin/CDK-Komplexen erwies sich der Cyklin A/CDK2-Komplex von den SIRT2-phosphorylierenden Kinasen als der stabilste. Deshalb wurden diese Experimente mit Cyklin A/CDK2 durchgeführt. Der GST-Messwert wurde in den Abbildungen als Hintergrund bereits abgezogen. In diesen *in vitro* HDAC-Experimenten konnte eindeutig festgestellt werden, dass die Phosphorylierung von Serin 331 die Aktivität von GST-SIRT2 inhibiert. Die Aktivität von GST-SIRT2 konnte durch die Cyklin A/CDK2-Phosphorylierung um bis zu  $\frac{3}{4}$  der Aktivität inhibiert werden (Abb.III.13. A und B). Diese Inhibition konnte durch die Zugabe des spezifischen CDK2-Inhibitors Roscovitine verhindert werden (Abb.III.13 A und B). Dagegen zeigte die nichtphosphorylierbare GST-SIRT2-S331A-Mutante keine verringerte enzymatische Aktivität nach der Inkubation mit Cyklin A/CDK2 (Abb.III.13 B). Als Kontrolle für die Spezifität des HDAC-Assays wurde die GST-SIRT2-Aktivität mit Nicotinamid inhibiert (Abb.III.13 A), zusätzlich wurde sowohl GST-SIRT2 als auch GST-SIRT2-S331A mit Roscovitine ohne Kinase behandelt, um sicher zu gehen, dass Roscovitine keinen Effekt auf die Aktivität besitzt. Es zeigte sich dabei, dass Roscovitine bei GST-SIRT2 einen leicht inhibitorischen Effekt hatte (Abb.III.13. A, Spur 5). In der Literatur wurde dieses Phänomen bisher nicht erwähnt, da Experimente dieser Art bisher noch nicht beschrieben wurden.

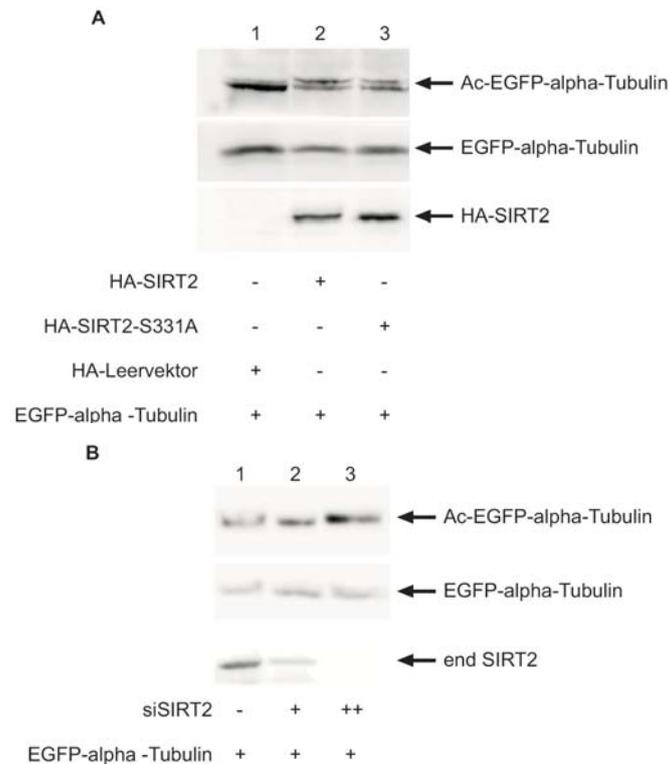
Die Daten aus den HDAC-Experimenten mit den SIRT2 Mutanten (III.2.4.1) und die Ergebnisse aus der direkten Phosphorylierung von GST-SIRT2 (III.2.4.2) deuten daraufhin, dass SIRT2 durch die Phosphorylierung an Serin 331 in seiner Aktivität inhibiert wird. Allerdings waren dies *in vitro* Daten, die noch *in vivo* verifiziert werden mussten.



**Abb.III.13: *In vitro* HDAC-Assay mit Cyklin A/CDK2-phosphoryliertem GST-SIRT2 und GST-SIRT2-S331A.** Die bakteriell exprimierte GST-SIRT2 Proteine wurden zunächst in einem *in vitro* Kinase-Assay phosphoryliert und darauf zusammen mit [<sup>3</sup>H]-Acetylierten-core-Histonen als Substrat in einem HDAC-Assay eingesetzt. Die freigesetzten [<sup>3</sup>H]-Acetylgruppen wurden in einem Szintillationsgerät gemessen. Die Aktivität wurde in CPM (counts per minute) dargestellt. In Abb. A wurde die Auswirkung der Phosphorylierung auf GST-SIRT2 dargestellt (Stabw: 5 Experimente). In Abb. B wurde die Auswirkung der Cyklin A/CDK2 Inkubation mit GST-SIRT2-S331A auf dessen Aktivität untersucht (Stabw: 3 Experimente).

### III.2.4.2 *In vivo* Deacetylierung von $\alpha$ -Tubulin durch HA-SIRT2 Proteine

Um die Inhibition der enzymatischen Aktivität durch die Serin 331 Phosphorylierung von SIRT2 auch *in vivo* zu verifizieren, sollte die Deacetylierung von EGFP- $\alpha$ -Tubulin durch HA-SIRT2 Proteine dokumentiert werden. Die Kotransfektion von HA-SIRT2 und EGFP- $\alpha$ -Tubulin und die darauffolgende Untersuchung des Acetylierungsstatus des EGFP- $\alpha$ -Tubulins erlaubte die spezifische Analyse der HA-SIRT2-Aktivität in Zellen. Da die Transfektionseffizienz von HEK293-Zellen bei ca 50- 70% lag, würde man durch Detektion der Acetylierung von endogenem  $\alpha$ -Tubulin auch die Acetylierung der untransfizierten Zellen, die kein HA-SIRT2 exprimieren, dokumentieren und somit das Resultat verfälschen. Die Ergebnisse zeigten eine Deacetylierung von EGFP- $\alpha$ -Tubulin durch HA-SIRT2 und HA-SIRT2-S331 (Abb.III.14 A). Diese Beobachtung sollte durch die Deacetylierung von EGFP- $\alpha$ -Tubulin durch endogenes SIRT2 verifiziert werden. Hierfür wurde eine siRNA gegen SIRT2 (II.3.1) in zwei verschiedenen Konzentrationen zusammen mit EGFP- $\alpha$ -Tubulin in HEK293-Zellen kotransfiziert und nach dem Aufschluss den Acetylierungsstatus von EGFP- $\alpha$ -Tubulin bestimmt (Abb.14.B). Die siRNA inhibierte proportional zu ihrer Konzentration die Expression von endogenem SIRT2 und dementsprechend verstärkte sich das Acetylierungssignal von EGFP- $\alpha$ -Tubulin. Diese Experimente beweisen, dass die aktiven HA-SIRT2 Proteine *in vivo*  $\alpha$ -Tubulin deacetylieren können. Außerdem wurde in Abb.III.14 B die Funktionalität der SIRT2 siRNA überprüft. Diese siRNA wurde in den weiteren Experimenten eingesetzt.

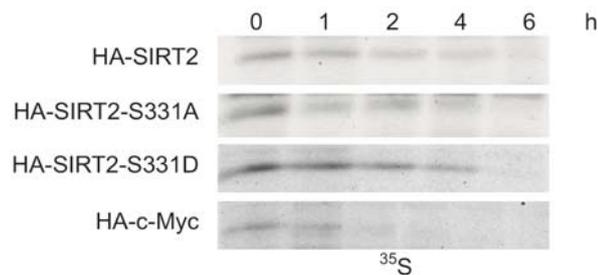


**Abb.III.14: *In vivo* Deacetylierung von EGFP- $\alpha$ -Tubulin durch SIRT2 Proteine.** In Abb. A wurden HEK293-Zellen mit HA-SIRT2 (10  $\mu$ g), HA-SIRT2-S331A (10  $\mu$ g), HA-Leervektor (10  $\mu$ g) zusammen mit EGFP- $\alpha$ -Tubulin (0,5  $\mu$ g) kotransfiziert und anschließend der Acetylierungsstatus von EGFP- $\alpha$ -Tubulin im Immunoblot gemessen. In Abb. B wurden HEK293-Zellen mit siSIRT2 (20  $\mu$ g) und EGFP- $\alpha$ -Tubulin (0,5  $\mu$ g) kotransfiziert. Hierbei wurde die Funktionalität der siRNA bestätigt und gleichzeitig die Deacetylierung von EGFP- $\alpha$ -Tubulin durch endogenes SIRT2 analysiert.

### III.2.5 Bestimmung der SIRT2 Halbwertszeit in Abhängigkeit von der Phosphorylierung

Die Halbwertszeit Bestimmung (II.6.14) von HA-SIRT2, HA-SIRT2-S331A und -S331D diente der Überprüfung, ob die Serin 331 Phosphorylierung neben der Inaktivierung von SIRT2 auch einen Effekt auf die Stabilität von SIRT2 besitzt. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit den HA-SIRT2-Konstrukten transfiziert (II.6.6) und anschließend die HA-SIRT2-Proteine metabolisch mit [<sup>35</sup>S]-Methionin und -Cystein markiert. Die transfizierten Zellen wurden darauf lysiert (II.6.12) und die HA-SIRT2-Proteine immunpräzipitiert (II.6.13). Die präzipitierten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt (II.9.1), vakuumgetrocknet und die Radioaktivität über einen sensitiven Film detektiert. Bei dieser Untersuchung zeigte es sich, dass die S331-Phosphorylierung keinen Effekt auf die Stabilität von SIRT2 besitzt. HA-SIRT2, HA-

SIRT2-S331A und -S331D haben eine Halbwertszeit von ca. 4 h. Die Stabilitätsanalyse von c-Myc diente als Kontrolle für dieses Experiment. In der Literatur ist eine c-Myc-Halbwertszeit von 30 min beschrieben worden (Vervoorts et al., 2003). Dies entspricht der in diesem Experiment bestimmten Halbwertszeit.

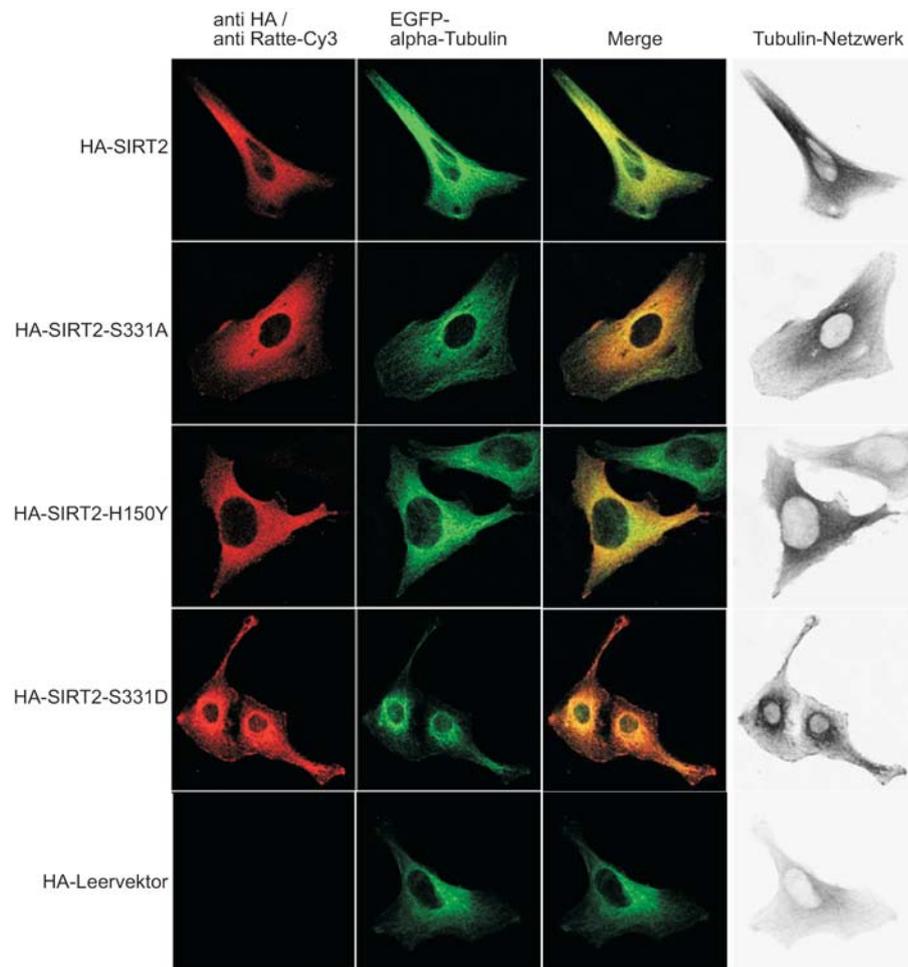


**Abb.III.15: Halbwertszeit Bestimmung von HA-SIRT2-Proteinen in einem [<sup>35</sup>S]-Markierungsexperiment.** HEK293-Zellen wurden mit HA-SIRT2 (4 µg), HA-SIRT2-S331A (4 µg), HA-SIRT2-S331D (4 µg) Konstrukten transfiziert und anschließend die HA-SIRT2 Proteine metabolisch mit [<sup>35</sup>S] markiert. Die transfizierten Zellen wurden darauf lysiert und die HA-SIRT2 Proteine immunpräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt (II.9.1), vakuumgetrocknet und die Radioaktivität über einen sensitiven Röntgenfilm detektiert. Die Bestimmung der Halbwertszeit von c-Myc (1 µg) diente als Kontrolle.

### III.2.6 Subzelluläre Lokalisation von SIRT2 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung

Die Bestimmung der subzellulären Lokalisation von SIRT2 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung diente zum einen dazu mögliche Veränderungen in der zytoplasmatischen Lokalisation von SIRT2 aufzuklären und zum anderen sollte die Auswirkung auf die Integrität des Tubulinnetzwerk untersucht werden. Hierfür wurden die Expressionsvektoren, die für HA-SIRT2, HA-SIRT2-S331A, -H150Y, -S331D kodieren, und der HA-Leervektor als Negativ-Kontrolle zusammen mit EGFP- $\alpha$ -Tubulin in HeLa Zellen transfiziert (II.6.6). Mit der EGFP- $\alpha$ -Tubulin Koftransfektion sollte zum einen das Tubulinnetzwerk visualisiert werden als auch das Zytoplasma vom Zellkern visuell unterscheidbar gemacht werden. Nach 36h wurden die transfizierten Zellen fixiert und mit dem primären anti-HA-Antikörper inkubiert. Für die Detektion der HA-SIRT2-Proteine wurde ein sekundärer Cy3-markierter Antikörper verwendet. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Abb.III.16). Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von SIRT2 hat. Sowohl Wildtyp SIRT2

als auch die Mutanten sind zytoplasmatisch lokalisiert (siehe rote Cy3-Fluoreszenz). Der Zellkern ist der nicht fluoreszierende, rundliche Bereich innerhalb der Zelle. Das Tubulinnetzwerk (siehe grüne EGFP-Fluoreszenz und das digital entfärbte Fluoreszenzbild, ganz rechts) zeigte ebenfalls keine signifikante Veränderung in seiner Struktur. Einzig die Zellen, die das in seiner Aktivität stark inhibierte HA-SIRT2-S331D exprimierten, zeigten eine geringfügig stärkere Verdichtung der Tubulinstrukturen um den Zellkern. Allerdings zeigte die Zellen mit der enzymatisch inaktive HA-SIRT2-H150Y-Mutante keinen solchen Phänotyp. Daher könnte es sich hier bei um einen unspezifischen Effekt handeln.

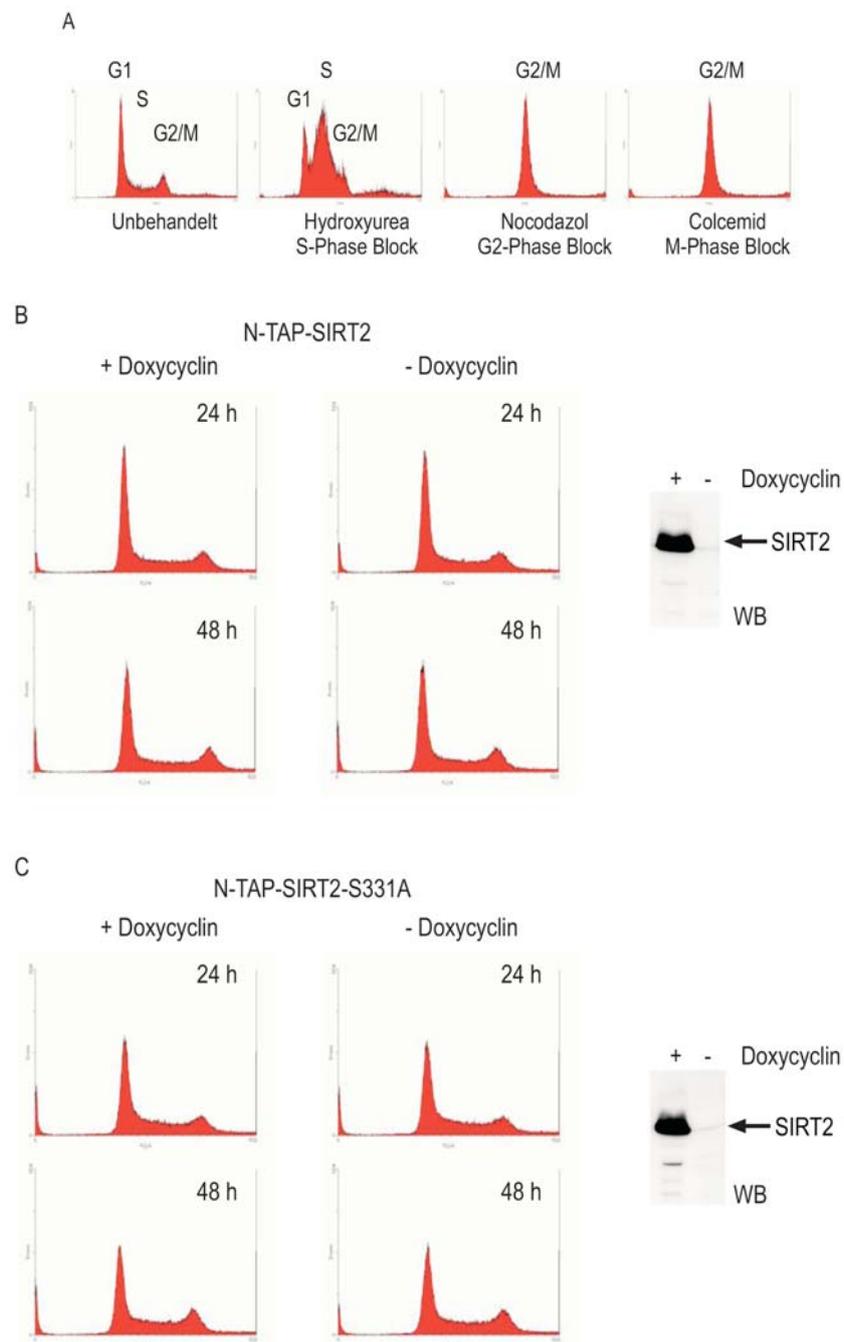


**Abb.III.16: Immunfluoreszenz-Mikroskopie zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von HA-SIRT2 Proteinen.** HeLa Zellen wurden mit HA-SIRT2 Expressionsvektoren (10 µg) und EGFP- $\alpha$ -Tubulin (0,5 µg) kotransfiziert. Nach 36h wurden die Zellen fixiert und für die Detektion der HA-Fusionsproteine mit dem primären anti HA-Ratte-Antikörper behandelt. Die Visualisierung erfolgte mit dem sekundären anti Ratte- Cy3-Antikörper (rote Fluoreszenz). Zur Bestimmung des Tubulinnetzwerkes und der Abgrenzung zwischen Zytoplasma und Zellkern wurde das EGFP des Fusionsproteins angeregt (grüne Fluoreszenz). Die digital entfärbten Bilder, ganz rechts, dienen der besseren Dokumentation der Tubulinstrukturen.

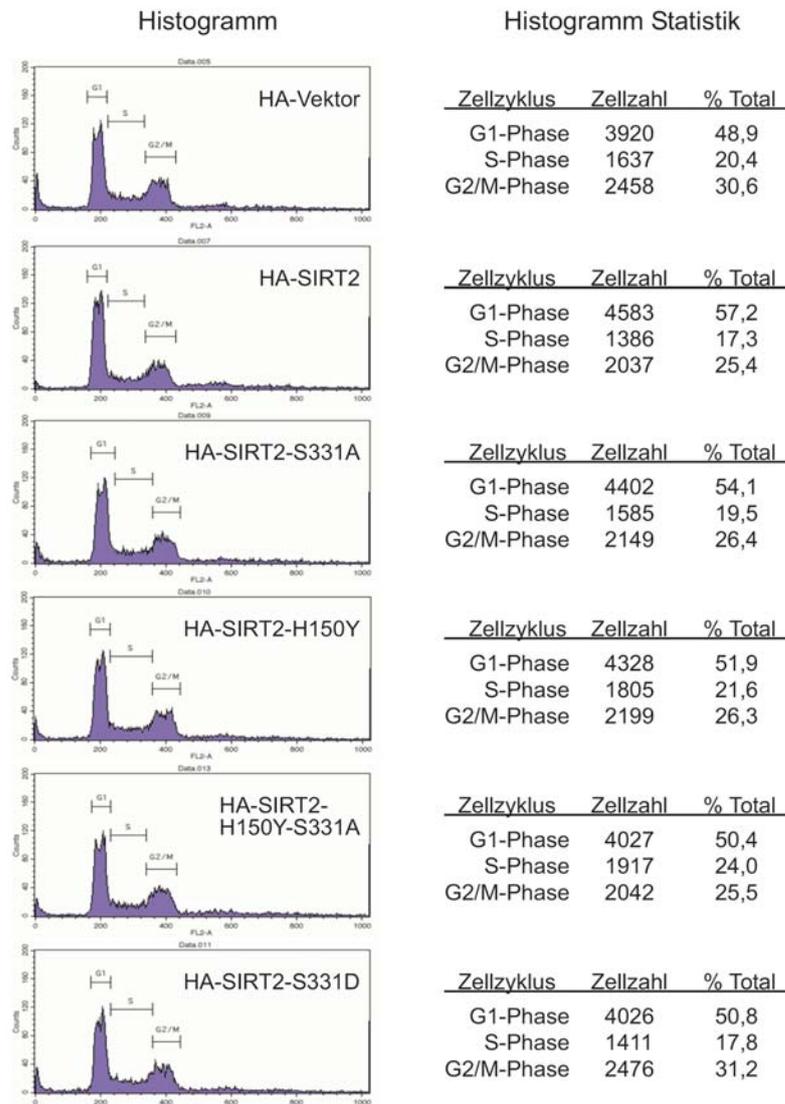
### III.2.7 Einfluss der SIRT2 Phosphorylierung auf den Zellzyklus

Die *in vitro* und *in vivo* Phosphorylierungs- und Deacetylierungsversuche verdeutlichten, dass SIRT2 von den Zellzyklus-regulierenden Cyklin/CDK-Kinasekomplexen modifiziert und inaktiviert wird (III.2.2.-4). Außerdem wurden SIRT2 vermittelte Zellzyklus-Effekte in einer der ersten Publikationen beschrieben (Dryden et al., 2003), dabei wurde ein verspäteter Eintritt von der M-Phase in die G1-Phase in SIRT2 stabil überexprimierenden SAOS2-Zellen beschrieben. Um diesen Befund zu überprüfen und zu klären, ob SIRT2 möglicherweise andere, bisher nicht beschriebene Effekte auf einzelne Phasen des Zellzykluses hat, wurde zunächst der Zellzyklus stabiler, mit Doxycyclin induzierbarer HEK293-N-TAP-SIRT2 und -SIRT2-S331A Zellen in einem Durchflußzytometer (FACS) analysiert (Abb.III.17). Als Kontrolle zur Bestimmung eines normalen Zellzyklus, eines S-Phase Blocks und eines G2/M-Phase Blocks wurden HEK293-N-Tap Zellen ohne Insert zum einen in der log-Phase, zum anderen nach einer 20 stündigen Inkubation mit Hydroxyurea (S-Phase-Block), Nocodazol (Prometa-Phase-Block) und Colcemid (M-Phase-Block) in einem FACS-Experiment untersucht (Abb.III.17 A). In der FACS-Analyse wird der Zellzyklus über die Menge der DNS, die zuvor durch die Inkorporation von Propidium-Iodid markiert wurde, bestimmt. Die G1-Phase enthält die einfache DNS-Menge (erster Peak von links im Zellzyklus-Histogramm), während der S-Phase wird die DNS verdoppelt (Plateau in der Mitte des Zellzyklus-Histogramms). Nach der Verdopplung der DNS beginnt die G2-Phase, die aber in ihrer DNS Menge identisch mit der M-Phase ist (erster Peak von rechts im Histogramm). Daher kann weder die G2-Phase von der M-Phase unterschieden werden noch ein G2-Phasen-Block von einem M-Phasen-Block. Nachdem der Phänotyp eines normalen Zellzykluses und die der einzelnen Zellzyklusphasen im FACS-Experiment bestimmt worden waren (Abb.III.17 A), wurde die Auswirkung einer Überexpression von N-TAP-SIRT2 und N-TAP-SIRT2-S331A auf den Zellzyklus untersucht (Abb.III.17.B-C). Hierfür wurde die Verteilung von HEK293-N-TAP-SIRT2 und-S331A Zellen im Zellzyklus nach 24 und 48h untersucht (Abb.III.B-C). Die zwei Messzeitpunkte dienten zur Sicherstellung, dass auch verzögerte

Zellzyklus-Effekte dokumentiert werden können. Es zeigte sich, dass die stabile Expression von N-TAP-SIRT2 und N-TAP-SIRT2-S331A keinen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklus hatte (Abb.III.17.B-C). Als nächstes sollte überprüft werden, ob die transiente Überexpression von HA-SIRT2-Proteinen in HeLa Zellen einen Zellzykluseffekt bewirkt. Hierfür wurden HeLa Zellen mit den Konstrukte HA-SIRT2, -S331A, -H150Y, -H150Y-S331A, -S331D und dem HA-Vektor transfiziert und die transfizierten Zellen für 24 h mit Puromycin selektioniert. Nach weiteren 24 h wurde die Verteilung des Zellzykluses in einem Durchflußzytometer untersucht (Abb.III.18). Die transiente Überexpression von HA-SIRT2 und HA-SIRT2-S331A zeigte einen geringfügigen Anstieg, der G1-Phase im Vergleich zu den Kontrollen. Die HA-SIRT2-S331D, H150Y und -H150Y-S331A exprimierenden Zellen zeigten eine fast identische Zellzyklusverteilungen wie die transfizierten Zellen mit dem HA-Leervektor. Diese Resultate deuten auf einen möglichen Effekt in der G1-Phase hin. Es wurde aber keine Akkumulation der M-Phase Zellen beobachtet. Allerdings widersprechen sich diese Resultate mit der Beobachtung, dass die Überexpression von SIRT2 zu einer verringerten G1-Phase führt (Bae et al., 2004).



**Abb.III.17: Zellzyklus-Analyse mit stabilen HEK293-N-TAP-SIRT2 und -SIRT2-S331A-Zellen.** HEK293-N-TAP-SIRT2-Zell-Linien wurden vor und nach Induktion mit Doxycyclin (1µg/ml) in einer FACS-Analyse untersucht. In Abb. A wurden HEK293-N-TAP-Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen durch Zytostatika blockiert. In Abb. B und C wurden HEK-N-TAP-SIRT2 und -SIRT2-S331A-Zellen vor und nach Induktion über einen Zeitraum 48h untersucht.

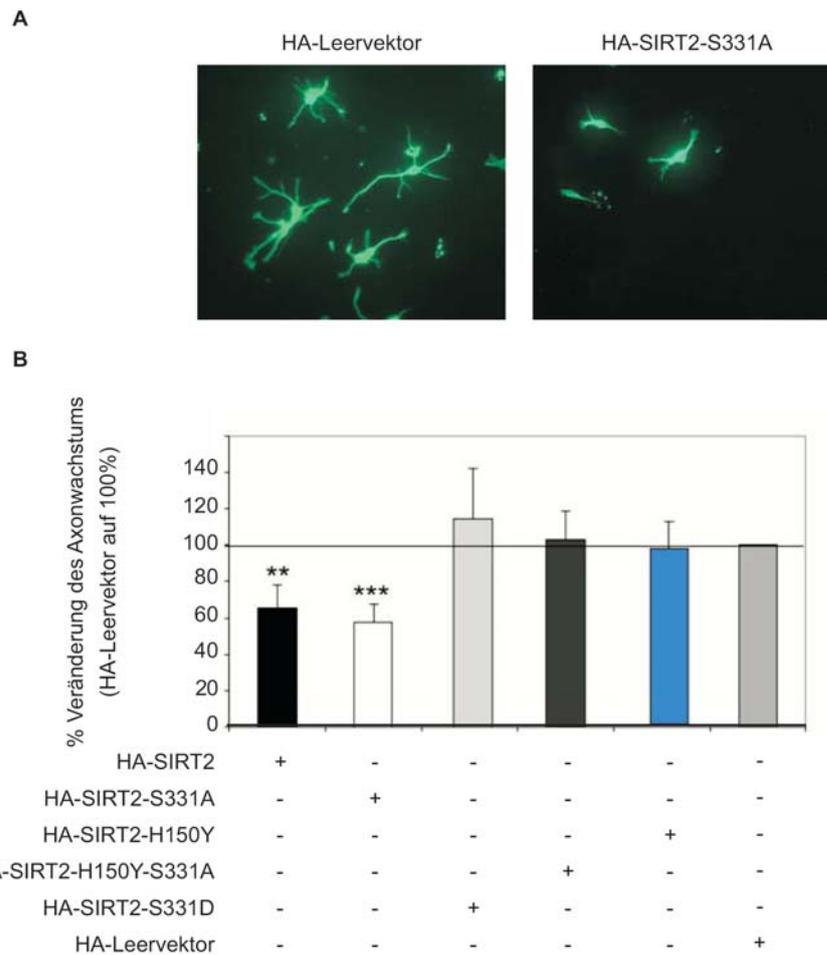


**Abb.III.18: Zellzyklus Analyse von SIRT2 transfizierten HeLa Zellen.** HELA Zellen wurden mit HA-SIRT2 (20 µg), HA-SIRT2-S331A (20 µg), -H150Y,-H150Y-S331A (20 µg), -S331D (20 µg) und dem HA-Vektor (20 µg) transfiziert, für 24h mit Puromycin selektioniert und nach weiteren 24h in einer FACS-Analyse untersucht .

### III.2.8 Einfluss der SIRT2 Phosphorylierung auf das Axonwachstum

Parallel zur Überprüfung eines durch Cyclin/CDK-regulierten SIRT2-Effektes auf den Zellzyklus, wurden auch die möglichen Funktionen außerhalb des Zellzykluses in die Untersuchungen einbezogen. In der Literatur wurde bereits eine Funktion von SIRT2, außerhalb des Zellzykluses, in Migrationsprozessen postuliert (North et al., 2003).

Aufgrund der Tatsache, dass SIRT2 von p35/CDK5 phosphoryliert wird (III.2.2.5) und dass der erst postmitotisch auftretende p35/CDK5-Komplex durch die Phosphorylierung von bestimmten Substrate unter anderem die neuronale Migration, das Axon- und Neuritenwachstum und die Zelladhäsion reguliert, sollte der Einfluss der SIRT2-Phosphorylierung auf das Axon- und Neuritenwachstum von hippocampalen Mausneuronen untersucht werden. All diese Migrationseffekte stehen im engen Zusammenhang mit der Kontrolle der Mikrotubuli- und Aktin-Dynamik des neuronalen Zytoskelettes, wobei der Acetylierungsstatus von  $\alpha$ -Tubulin ein entscheidender Faktor für diese Dynamik ist (Hahn et al., 2005; Hamdane et al., 2003; Nikolic et al., 1996; Tanaka et al., 2004). Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde mit Dr. B. Knöll, (Emmy Noether research group of the DFG, University of Tübingen) eine Kooperation eingegangen. In diesem Axonwachstums-Assay (Drescher and Knoell, 2001) wurden aus dem Hippocampus isolierte Mausneurone mit HA-SIRT2, HA-SIRT2-S331A, -H150Y, -H150Y-S331A, -S331D und dem HA-Leervektor als Kontrolle elektroporiert und in diesen Assay eingesetzt (Abb.III.19). Das Resultat war eine signifikante Reduktion des Neuriten-, bzw. Axonwachstums bei den mit HA-SIRT2 (mit ca 30%) und HA-SIRT2-S331A (ca 50%) transfizierten Neuronen (Abb.III.19 A und B). Die Transfektion mit HA-SIRT2-S331D führte zu einer leichten Verlängerung (ca 10 %) der Axone (Abb.III.19 B). Die übrigen Mutanten zeigten keine Unterschied in der Länge der Axone im Verhältnis zu der HA-Leervektor Kontrolle (Abb.III.19 B). Der Befunde, dass zum einen die durch die Phosphorylierung nicht inhibierbare SIRT2-S331A-Mutante einen stark reduzierenden Effekt auf das Axonwachstum hatte und zum anderen die Pseudo-Phosphorylierung aufweisende SIRT2-S331D den gegenteiligen Phänotyp aufwies, lässt die Vermutung zu, dass der SIRT2-Einfluss auf das Axonwachstum durch die Phosphorylierung an Serin 331 reguliert wird. Allerdings müssen in weiteren Experimenten ein direkter Zusammenhang von p35/CDK5 mit dem SIRT2-vermittelten Reduktion des Axonwachstum überprüft werden.



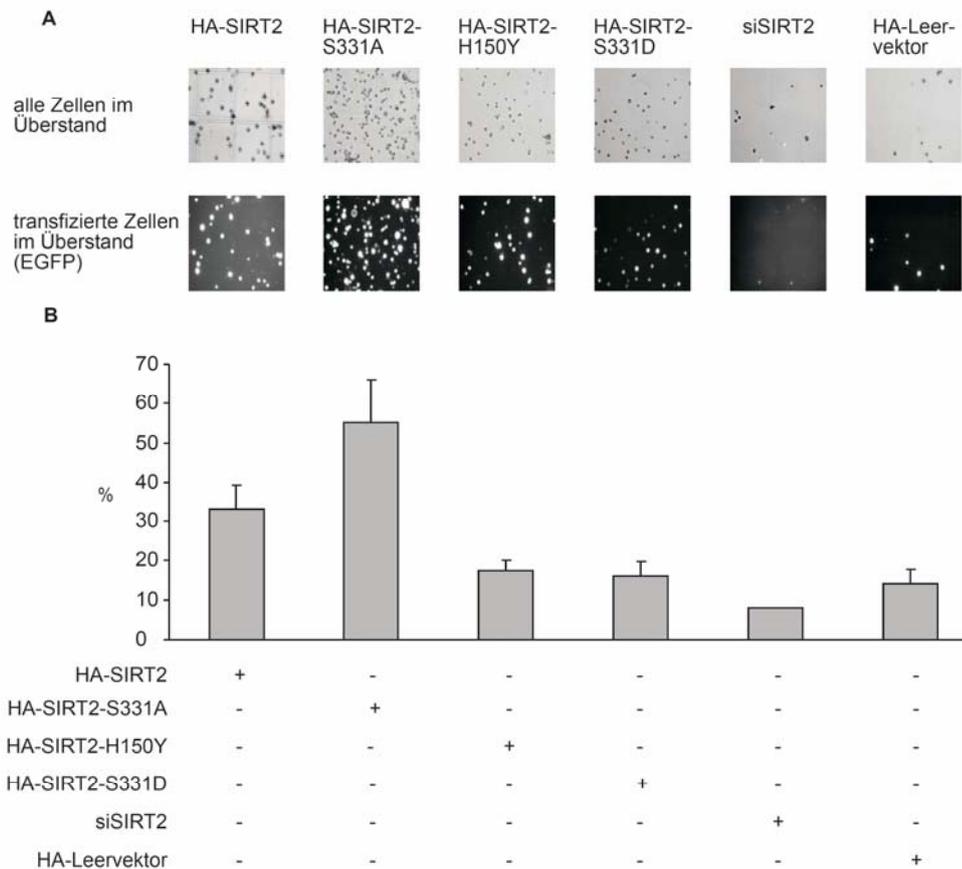
**Abb.III.19: HA-SIRT2 reduziert in Abhängigkeit von der Phosphorylierung das Axonwachstum in Neuronen.** Maus-Hypocampusneurone wurden isoliert und mit HA-SIRT2-Konstrukten (20 µg) elektroporiert. Die Axonlängen wurden nach 2 Tagen gemessen (Abbildung nach B. Knöll).

### III.2.9 Einfluss der SIRT2 Phosphorylierung auf das Adhäsionsverhalten von HEK293-Zellen

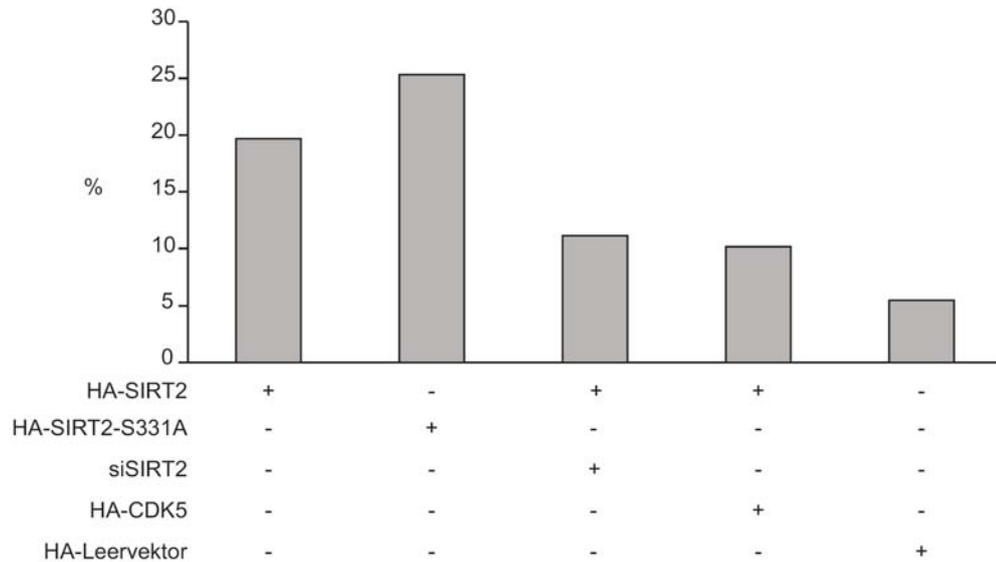
Die Zelladhäsion ist ebenfalls ein über Mikrotubuli- und Aktindynamik kontrollierter Prozess (Saburi and McNeill, 2005), der durch SIRT2 beeinflusst werden könnte. Zudem konnte in Transfektionsexperimenten mit HEK293-Zellen beobachtet werden, dass die HA-SIRT2 und besonders die HA-SIRT2-S331A transfizierten Zellen sich verstärkt ablösen. Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurde ein Adhäsions-Assay etabliert (II.6.10). Dabei wurden HEK293-Zellen mit den Konstrukten HA-SIRT2, -S331A, -H150Y, -S331D, dem HA-Leervektor als Negative-Kontrolle zusammen mit EGFP- $\alpha$ -Tubulin kotransfiziert. Das EGFP- $\alpha$ -Tubulin diente hierbei als

Transfektionskontrolle. Nach 36 h wurde das Medium abgenommen und die darin enthaltenen transfizierten Zellen (Abb.III.20 A, grün fluoreszierend) mittels einer Neubauerkammer gezählt. Die noch adhären Zellen wurden trypsinisiert und die transfizierten Zellen ebenfalls gezählt. Dadurch konnte die Gesamtzahl der transfizierten Zellen ermittelt und somit auch der prozentuale Anteil der abgelösten Zellen von der Gesamtmenge bestimmt werden (Abb.III.20 B). Als erstes wurde die Wirkung des SIRT2 Wildtyps und seiner Mutanten untersucht (Abb.III.20 A und B). Dabei konnte schon der visuelle Eindruck die Vermutung bestärken, dass SIRT2 und besonders die nicht inhibierbare SIRT2-S331A-Mutante einen signifikanten Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Zelle hat (Abb.III.20 A.) Im Mediumüberstand von HA-SIRT2 und -S331A sind fast alle abgelösten Zellen transfiziert und exprimieren somit SIRT2. Zudem sind im Medium der HA-SIRT2-S331A transfizierten Zellen erheblich mehr abgelöste Zellen zu beobachten. Dieser erste visuelle Eindruck konnte durch die Quantifizierung der transfizierten Zellen im Mediumüberstand im Vergleich zu den noch adhären Zellen bestätigt werden (Abb.III.20 B). Der Anteil der abgelösten, SIRT2 exprimierenden Zellen an der Gesamtzahl der transfizierten Zellen betrug ca 30 %, bei der SIRT2-S331A-Mutante betrug dieser Anteil sogar ca 55 %. Im Gegensatz dazu zeigten die mit den HA-Leervektor und den H150Y- und S331D-Konstrukten transfizierten Zellen einen nicht-adhären Anteil von 10% bis 15 %. Dieser Wert scheint dem normalen Anteil der nicht-adhären Zellen in einer transfizierten HEK293-Kultur zu entsprechen. Demnach war der Effekt des Wildtyps doppelt und der der nicht-inhibierbaren S331A-Mutante sogar drei bis vier mal so stark. Diese Ergebnisse erhärten weiter die These, dass dieses Ablöseverhalten der HEK293-Zellen durch die SIRT2 Deacetylaseaktivität herbeigeführt wird und dass die Phosphorylierung des Serin 331 diesen Effekt reguliert. Zusätzlich konnte die Ablösung der Zellen durch die Transfektion von siRNA gegen SIRT2 verringert werden. Der Anteil der nicht-adhären Zellen, die mit siSIRT2 transfiziert waren, lag bei ca. 7% im Gegensatz zu den HA-Leervektor transfizierten Zellen von 15%. Diese Reprimierung des endogenen SIRT2 und die damit verbundene Verringerung der abgelösten Zellen, bestätigt weiter die eingangs aufgestellte Hypothese, dass SIRT2 durch die Regulation der Mikrotubuli-Dynamik durch seine  $\alpha$ -Tubulin-Deacetylaseeigenschaft das Adhäsions- und Migrationsverhalten der Zelle mit

beeinflusst. Als nächstes sollte der direkte Einfluss der Phosphorylierung von SIRT2 auf das Adhäsionsverhalten überprüft werden (Abb.III.21). Hierfür wurde HA-SIRT2 zusammen mit HA-CDK5 in HEK293-Zellen transfiziert und das Adhäsionsverhalten bestimmt. Als zusätzliche Kontrolle wurde HA-SIRT2 mit der siRNA gegen SIRT2 kotransfiziert um so eine Dosisabhängigkeit zu überprüfen. (Abb.III.21). Bei diesem Experiment konnte der inhibierende Einfluss der Phosphorylierung auf die Aktivität von SIRT2, wie bereits in dem Axonwachstums-Assays (II.2.8) gezeigt, bestätigt werden. Die Kotransfektion von HA-SIRT2 und CDK5 verringerte den Ablösungseffekt um ca 50% und die Kotransfektion von siSIRT2 mit dem Wildtyp-Konstrukt führte ebenfalls zu einer Verringerung der Ablösung der Zellen, wie es bei einem dosisbezogenen Effekt zu erwarten wäre. Es wurden auch Experimente in HeLa Zellen durchgeführt, allerdings konnte in dieser Zelllinie diese Daten nicht reproduziert werden. Dies deutet auf eine zelltypspezifische Wirkung von SIRT2 hin. SIRT2 wird hauptsächlich in Gehirn-, Leber- und Nieren-Zellen exprimiert (Michishita et al., 2005). Da HEK293 eine Nierentumorlinie ist und die HeLa-Zelllinie aus einem Cervix-Karzinom stammt, könnte es sein, dass die HeLa-Zellen nicht die nötigen Faktoren besitzen, um die Ablösung der Zellen durch SIRT2 zu forcieren. Zusammenfassend erlauben diese Ergebnisse den Schluss, dass erstens die SIRT2-Aktivität über die Phosphorylierung von Serin 331 reguliert wird. Zweitens deuten alle Ergebnisse daraufhin, dass SIRT2 durch die Phosphorylierung von Cyklin/CDK-Komplexe und im besonderen durch die Phosphorylierung von p35/CDK5 kontrolliert werden könnte. Das postmitotisch exprimierte CDK5 wird in allen Geweben exprimiert, aber besonders stark in Neuronen und es spielt eine Schlüsselrolle in Zellmotilitätsprozessen (Alexander et al., 2004; Dhavan and Tsai, 2001; Gilmore et al., 1998; Hahn et al., 2005; Hamdane et al., 2003; Nikolic et al., 1996; Tanaka et al., 2004). Drittens kann durch die Ergebnisse der SIRT2-Mortalitätsexperimente der bereits in zahlreichen Publikationen postulierte Einfluss auf die Zellbeweglichkeit unterstützt werden.



**Abb.III.20: Einfluss der SIRT2-Phosphorylierung auf das Adhäsionsverhalten von HEK293-Zellen.** HEK293-Zellen wurden mit den Konstrukten HA-SIRT2 (20 µg), HA-SIRT2-S331A (20 µg), HA-SIRT2-H150Y (20 µg), HA-SIRT2-S331D (20 µg), siSIRT2 (20 µg) und dem HA-Leervektor (20 µg) zusammen mit EGFP- $\alpha$ -Tubulin (0,5 µg) kotransfiziert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen im Mediumüberstand und die adhärenen Zellen gezählt. In Abb. A: Visualisierung der abgelösten transfizierten Zellen. In Abb. B: Anteil der abgelösten transfizierten Zellen von der Gesamtzahl der transfizierten Zellen



**Abb.III.21: Einfluss der CDK5-vermittelten SIRT2-Phosphorylierung auf das Adhäsionsverhalten von HEK293-Zellen.** HEK293-Zellen wurden mit den Konstrukten HA-SIRT2 (5 µg), HA-SIRT2-S331A (5 µg), , siSIRT2 (15 µg), HA-CDK5 (10 µg) und dem HA-Leervektor (5 µg) zusammen mit EGFP- $\alpha$ -Tubulin (0,5 µg) kotransfiziert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen im Mediumüberstand und die adhärenen Zellen gezählt. Die Abbildung zeigt den Anteil der abgelösten transfizierten Zellen von der Gesamtzahl der transfizierten Zellen.

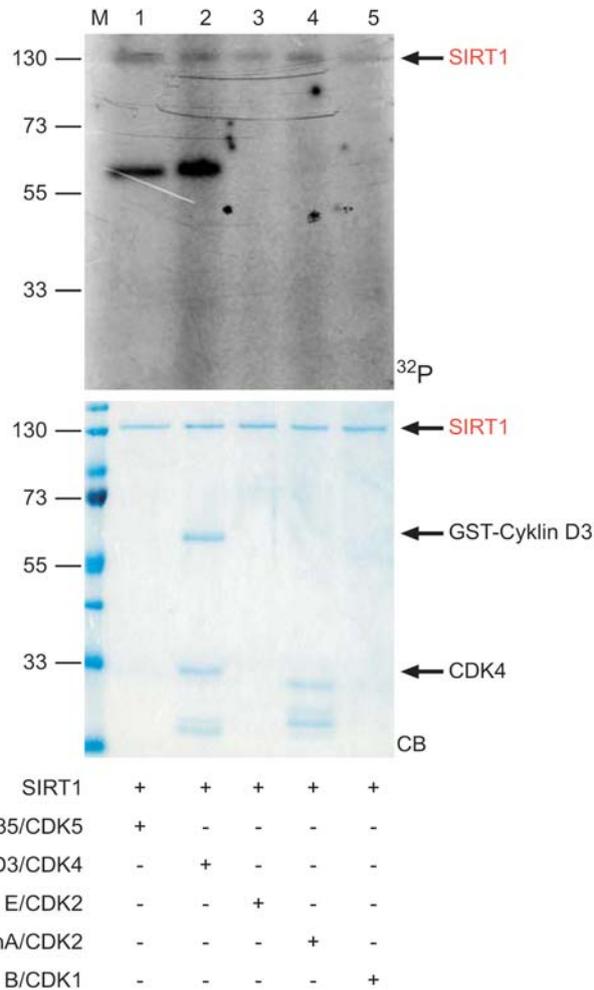
### III.3 Charakterisierung der SIRT1-Phosphorylierung

Aufgrund der gefundenen homologen Konsensus-Sequenz für Cyclin-abhängige Kinasen stellte SIRT1 ebenfalls ein potenzielles CDK-Substrat dar. Das prominenteste SIRT1 Substrat ist das Tumorsuppressorprotein p53. Es spielte eine zentrale Rolle bei der Erhaltung der genomischen Integrität. Unter genotoxischem Stress wird p53 verstärkt exprimiert und vermittelte zum einen einen Zellzyklusarrest in der G1- oder G2-Phase und zum anderen die Aktivierung von DNS-Reparaturmechanismen. Damit ermöglicht p53 den Zellen sich von der genotoxischen Schädigung zu erholen und zu überleben. Wenn die Reparatur einen bestimmten Zeitraum überschreitet überwiegen die ebenfalls von p53 aktivierten Apoptosesignale und die Zelle stirbt (Bode and Dong, 2004; Brooks and Gu, 2003; Lombard et al., 2005). Die spezifische Deacetylierung von p53 durch SIRT1 führt zu einer direkten Deaktivierung von p53. Eine Überexpression von SIRT1 resultiert in einer verminderten p53-abhängigen Apoptoserate nach oxidativem Stress oder DNS-Schädigung (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001). Aufgrund dieser Informationen konnte angenommen werden, dass SIRT1 eine Funktion im

Zellzyklus besitzt. Bisher wurde keine Daten über SIRT1-Modifikationen publiziert. Deshalb sollte die Hypothese einer Cyklin/CDK-vermittelten Regulation von SIRT1 überprüft werden. Die cDNS von SIRT1 (II.3.1) wurde von Dr. Weinberg (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA) zur Verfügung gestellt. Aufgrund der extrem GC-Reichen 5'-Region konnte SIRT1 nicht mittels Gateway-PCR amplifiziert werden. Deshalb wurde die cDNS durch eine klassische Klonierung mit Restriktionsenzymen in den Gateway pDONR™221 Vektor (II.3.1) kloniert (II.8.2) und anschließend weiter in die GWpGST, GWpHA und N-TAP Expressionsvektoren mittels Gateway Cloning Kit rekombiniert (II.8.2.7). Als erstes sollte das Phosphorylierungsmuster von TAP-aufgereinigten SIRT1-Proteinen in einem *in vitro* Kinase-Assay mit Cyklin/CDK-Komplexen überprüft werden (III.3.1).

### **III.3.1 Charakterisierung der Spezifität einzelner Cyklin-CDK-Kinasekomplexe gegenüber SIRT1**

In HEK293 exprimiertes N-TAP-SIRT1 wurde mittels TAP-Aufgereinigung isoliert und in einem radioaktiven *in vitro* Kinase-Assay zusammen mit [<sup>32</sup>P]-ATP und jeweils p35/CDK5, Cyklin D3/CDK4, Cyklin E/CDK2, Cyklin A/CDK2 und Cyklin B/CDK1 eingesetzt (II. 10.1). Die eingesetzte Aktivität aller Kinasen betrug 6 fkat (Abb.III.22). Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* SIRT1 von allen Kinase phosphoryliert wird. Dieses Experiment lieferte den ersten Hinweis, dass auch SIRT1 von Cyklin/CDK-Komplexen reguliert werden könnte.

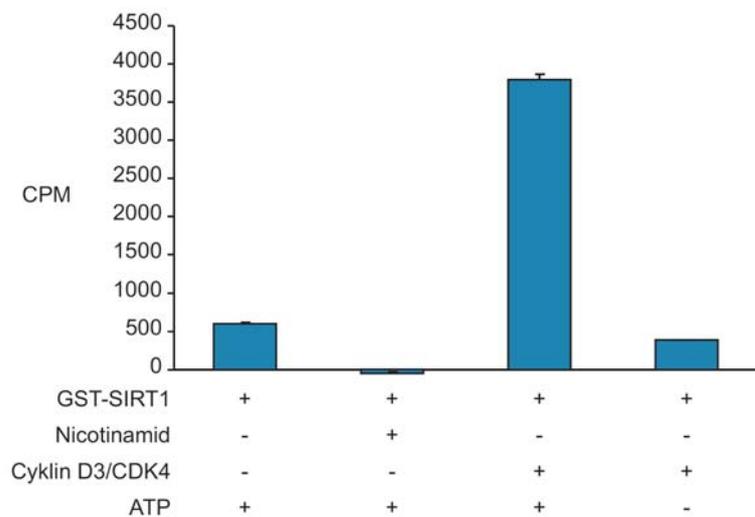


**Abb.III.22: Phosphorylierung von SIRT1 durch verschiedene Cyklin/CDK-Komplexe in einem *in vitro* Kinase-Assay.** TAP aufgereinigtes SIRT1 wurde zusammen mit [<sup>32</sup>P]-ATP und p35/CDK5, Cyklin D3/CDK4, Cyklin E/CDK2, Cyklin A/CDK2 und Cyklin B/CDK1 in einem Kinase-Assay eingesetzt. Nach der Auftrennung der Proteine in einem 12% SDS-Page wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und vakuumgetrocknet (CB). Die Radioaktivität wurde über einen Röntgenfilm detektiert (<sup>32</sup>P).

### III.3.2 Die Aktivität von SIRT1 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung

Als nächstes sollte die Funktion der Phosphorylierung untersucht werden. Da bei SIRT2 die Phosphorylierung die Aktivität hemmt, wurde dem entsprechend als erstes der Einfluss der Phosphorylierung auf die enzymatische Aktivität von SIRT1 überprüft. Hierfür wurde bakteriell exprimiertes GST-SIRT1 in einem Kinase-Assay zusammen mit oder ohne Cyklin D3/CDK4 und ohne radioaktiv markiertes [<sup>32</sup>P]-ATP eingesetzt (Abb.III.23). Da der Kinasereaktionspuffer gleichzeitig auch der HDAC-

Reaktionspuffer ist, wurde nach der „kalten“ Phosphorylierung der GST-SIRT1 Proteine [<sup>3</sup>H]-acetylierte Hühner-Retikulozyten-*core*-Histone, als Substrat, zusammen mit NAD<sup>+</sup>, als Kofaktor in die Ansätze gegeben und der *in vitro* Kinase-Assay somit zu einem *in vitro* HDAC-Assay (II.10.2) weiterentwickelt (Abb.III.23). Von den in unserem Labor hergestellten SIRT1-phosphorylierenden Cyklin/CDK-Komplexen erwies sich der Cyklin D3/CDK4-Komplex als der stabilste. Aus diesem Grund wurde dieses Experiment mit Cyklin D3/CDK4 durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass die *in vitro* Phosphorylierung von GST-SIRT1 dessen Aktivität um mehr als das achtfache steigerte. (Abb.III.23 A). Diese starke enzymatische Aktivierung konnte durch den Wegfall von ATP unterdrückt werden (Abb.III.23. A, Spur 4). Als Kontrolle für die Spezifität des HDAC-Assays wurde die GST-SIRT1 Aktivität mit Nicotinamid inhibiert (Abb.III.23. A).



**Abb.III.23: *In vitro* HDAC-Assay mit Cyklin D3/CDK4-phosphoryliertem GST-SIRT1.** Das bakteriell exprimierte GST-SIRT1 wurden zunächst in einem *in vitro* Kinase-Assay phosphoryliert und darauf zusammen mit [<sup>3</sup>H]-acetylierten-*core*-Histonen als Substrat in einem HDAC-Assay eingesetzt. Die freigesetzten [<sup>3</sup>H]-acetylgruppen wurden in einem Szintillationsgerät gemessen. Die Aktivität wurde in CPM (counts per minute) dargestellt.

## IV Diskussion

### IV.1 Einfluss der Cyklin/CDK-vermittelten Phosphorylierung von SIRT2 auf den Zellzyklus

In dieser Arbeit konnte erstmals eine Phosphorylierung von SIRT2 durch CDK-Komplexe *in vitro* und *in vivo* dokumentiert werden (III.2.2). Die Kinasen CDK5/p35, Cyklin E/CDK2 und Cyklin A/CDK2 phosphorylieren SIRT2 *in vitro* an Serin 331. Dagegen konnte SIRT2 *in vitro* durch Cyklin D3/CDK4 und Cyklin B/CDK1 nicht phosphoryliert werden. Auch *in vivo* konnte das Serin 331 als einzige Phosphorylierungsstelle ermittelt werden und diese Modifikation wurde durch den spezifischen CDK-Inhibitor p27 unterbunden (III.2.3). Weitere *in vitro* und *in vivo* Analysen zur Bestimmung der Funktion der SIRT2-Phosphorylierung zeigten, dass diese Modifikation die enzymatische Aktivität von SIRT2 inhibiert (III.2.4). Ferner konnte kein Einfluss der Phosphorylierung auf die Stabilität (III.2.5) oder die subzelluläre Lokalisation von SIRT2 (III.2.6) festgestellt werden. Da die Komplexe Cyklin E/CDK2 und A/CDK2 essenziell für den Zellzyklus sind (McGowan, 2003), ließen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass SIRT2 von Cyklin/CDK-Komplexen reguliert werden könnte und so an Prozessen im Zellzyklus mitwirkt. Dies wurde durch die Beobachtung einer Phosphorylierung während der frühen M-Phase unterstützt (Dryden et al., 2003). Es stellte sich nun aber die Frage, in wie weit das als zytoplasmatisch beschriebene SIRT2 mit den, überwiegend nukleären CDK-Komplexen assoziieren könnte. Ein erster direkter Hinweis für ein *shuttling* von SIRT2 in den Zellkern war die Beobachtung, dass SIRT2 mit dem Homeobox-Transkriptionsfaktor HOXA 10 im Nukleus interagiert (Bae et al., 2004). In einer weiteren Publikation konnte diese Vermutung durch eine Leptomycin B Behandlung transient transfizierter HeLa Zellen bestätigt werden. Die durch den Leptomycin B Block in ihrem CrmA-abhängigen nukleären Export inhibierten HeLa Zellen, zeigten eine sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Lokalisation von SIRT2 (Inoue et al., 2006). Eine eindeutige Lokalisation von SIRT2 in Nukleus konnte in dieser Arbeit

(III.2.6) nicht beobachtet werden. Es ist möglich, dass in diesen Untersuchungen das überwiegend zytoplasmatische SIRT2, durch sein starkes Fluoreszenzsignal, eine moderate Translokation von SIRT2 in den Nukleus verdeckt haben könnte. Daher ist aufgrund neuerer Publikationen anzunehmen, dass SIRT2 sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus präsent ist. Diese nukleäre Lokalisation von SIRT2 würde die Assoziation mit Cyklin/CDK-Komplexen im Zellkern ermöglichen und die *in vitro* und *in vivo* Experimenten beobachtete SIRT2-Phosphorylierung durch Cyklin/CDK-Komplexe gestatten.

Das *in vitro* Phosphorylierungsmuster von SIRT2 durch die Cyklin/CDK-Komplexe deuten auf eine mögliche Regulation während des G1-/S-Phasen-Übergangs (Cyklin E/CDK2), der S-Phase (Cyklin E/CDK2 und Cyklin A/CDK2), der G2-Phase (Cyklin A/CDK2) und des G2-/M-Phasen-Übergangs (Cyklin A/CDK2) hin. In den FACS-Experimenten zur Bestimmung der Zellzyklusphasen (III.2.7) wurden sowohl stabil als auch transient exprimierende SIRT2 Zellen untersucht. Dabei konnte in den stabil exprimierenden Zellen kein signifikanter unterschied zwischen Wildtyp SIRT2, der nicht-inhibierbare Mutante (SIRT2-S331A) und der Kontrolle festgestellt werden. Jedoch konnte ein leichter Anstieg der G1-Phase-Zellen in den transienten Experimenten, bei denen entweder SIRT2 oder die S331A Mutante exprimiert wurden, beobachtet werden. Dagegen zeigte die Phosphorylierung imitierende, katalytisch weniger aktive Mutante SIRT2-S331D und die enzymatisch inaktiven Kontroll-Mutanten keine Abweichung in der Verteilung der Zellen im Zellzyklus (III.2.7). Diese leichte Zunahme der G1-Phase Zellen weist auf einen verspäteten Eintritt in die S-Phase hin. Da SIRT2 in den *in vitro* Analysen nicht durch die D-Typ Cyklin/CDK-Komplexe phosphoryliert wurde, ist anzunehmen, dass SIRT2 über Cyklin E/CDK2 gegen Ende der G1-Phase kontrolliert werden könnte. Es ist in der Literatur ausführlich dokumentiert, dass die Cyklin E/CDK Aktivität während des G1-/S-Phasen Übergangs wichtig ist (Frolov et al., 2003; Yam et al., 2002). Die Verzögerung des Eintritts in die S-Phase der Wildtyp und SIRT2-S331A exprimierenden Zellen würde die Vermutung unterstützen, dass SIRT2 während des G1-/S-Phasen-Übergangs durch Cyklin E/CDK2 reguliert wird. Allerdings sind diese Effekte sehr moderat und außerdem zeigten Analysen in anderen Publikationen ein gegenteiliges Resultat. So konnte gezeigt werden, dass Wildtyp-Protein exprimierende U937-Zellen

eine verkürzte G1-Phase und somit einen schnelleren Eintritt in die S-Phase haben (Bae et al., 2004). Eine leichte Verlängerung der G1-Phase wurde in primärem MEFs mit einem SIRT2 *knockout* beobachtet (Vaquero et al., 2006). Der Einfluss von SIRT2 auf den G1-S-Phasen-Übergang ist aufgrund der kontroversen Daten noch nicht verstanden, aber die Hinweise verdichten sich, dass SIRT2 eine Funktion in dieser Zellzyklusphase haben könnte.

Während der S-Phase und dem Übergang von der G2- zur M-Phase konnte in primären MEF-Zellen von SIRT2 *knockout*-Mäusen ein Anstieg von hyperacetyliertem Histon H4 an Lysin 16 in heterochromatischen Bereichen nachgewiesen werden (Vaquero et al., 2006). In der gleichen Publikation konnte *in vitro* und *in vivo* die Deacetylierung von Histon H4 an Lysin 16 durch SIRT2 in der späten G2-Phase dokumentiert werden. Damit ist dies neben  $\alpha$ -Tubulin das zweite bisher bekannte Substrat von SIRT2 und ein weiterer Hinweis für eine teilweise nukleäre Lokalisation. Einen direkten Einfluss auf den Verlauf der S-Phase konnte weder in dieser Arbeit noch in der Publikation von Vaquero und Kollegen detektiert werden. Die Daten von Vaquero und Kollegen zusammen mit den in dieser Arbeit dokumentierten Phosphorylierung von SIRT2 durch Cyklin/CDK-Komplexe lassen eine Regulation von SIRT2 durch Cyklin E/CDK2 und auch Cyklin A/CDK2 während der S-Phase möglich erscheinen. In Pflanzen wurde die Histon H4 Lysin 16 Acetylierung in neu gebildeten Nucleosomen festgestellt (Belyaev et al., 1997). In Säugerzellen konnte dies bisher nur an Histon H4 Lysin 5 und Lysin 12 beobachtet werden (Belyaev et al., 1997). Des Weiteren konnte in der Publikation von Vaquero und Kollegen ein rapider Abfall der Histon H4 Lysin 16 Acetylierung mit einhergehender Koloakalisation von SIRT2 und Histon H4 während des G2-/M Übergangs beobachtet werden. Dieser Prozess hat allerdings keinen Einfluss auf die G2- oder M-Phase der Zelle. Eine Auswirkung von SIRT2 auf die G2- und M-Phase konnte in dieser Doktorarbeit ebenfalls nicht detektiert werden. In einer weiteren Publikation wurde über einen verspäteten Eintritt von der M-Phase in die G1-Phase in SIRT2 stabil überexprimierenden SAOS2-Zellen berichtet (Dryden et al., 2003). Dies konnte ebenfalls weder in dieser Arbeit noch in anderen Publikationen gezeigt werden (Bae et al., 2004; Inoue et al., 2006; Vaquero et al., 2006). Insgesamt werden die Auswirkungen von SIRT2 auf einzelne Zellzyklusphasen sehr kontrovers diskutiert.

Die Phosphorylierung von SIRT2 durch Cyklin E/CDK2 und Cyklin A/CDK2 zusammen mit den bereits publizierten Daten lassen vermuten, dass SIRT2 eine Funktion im Zellzyklus haben könnte und dass diese Aktivität über Cyklin E/CDK2 und Cyklin A/CDK2 reguliert werden könnte. Zudem wäre es möglich das CyklinE und A/CDK2-Komplexe auch zytoplasmatisches SIRT2 reguliert, da sowohl Cyklin E als auch Cyklin A wie auch CDK2 im Zytoplasma präsent sind (Jackman et al., 2002). Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals ein Hinweis auf die Regulation von SIRT2 durch Cyklin/CDK-Komplexe im Zellzyklus gegeben werden. Allerdings ist die Funktion von SIRT2 im Zellzyklus nicht verstanden und bedarf weiterer intensiver Forschung.

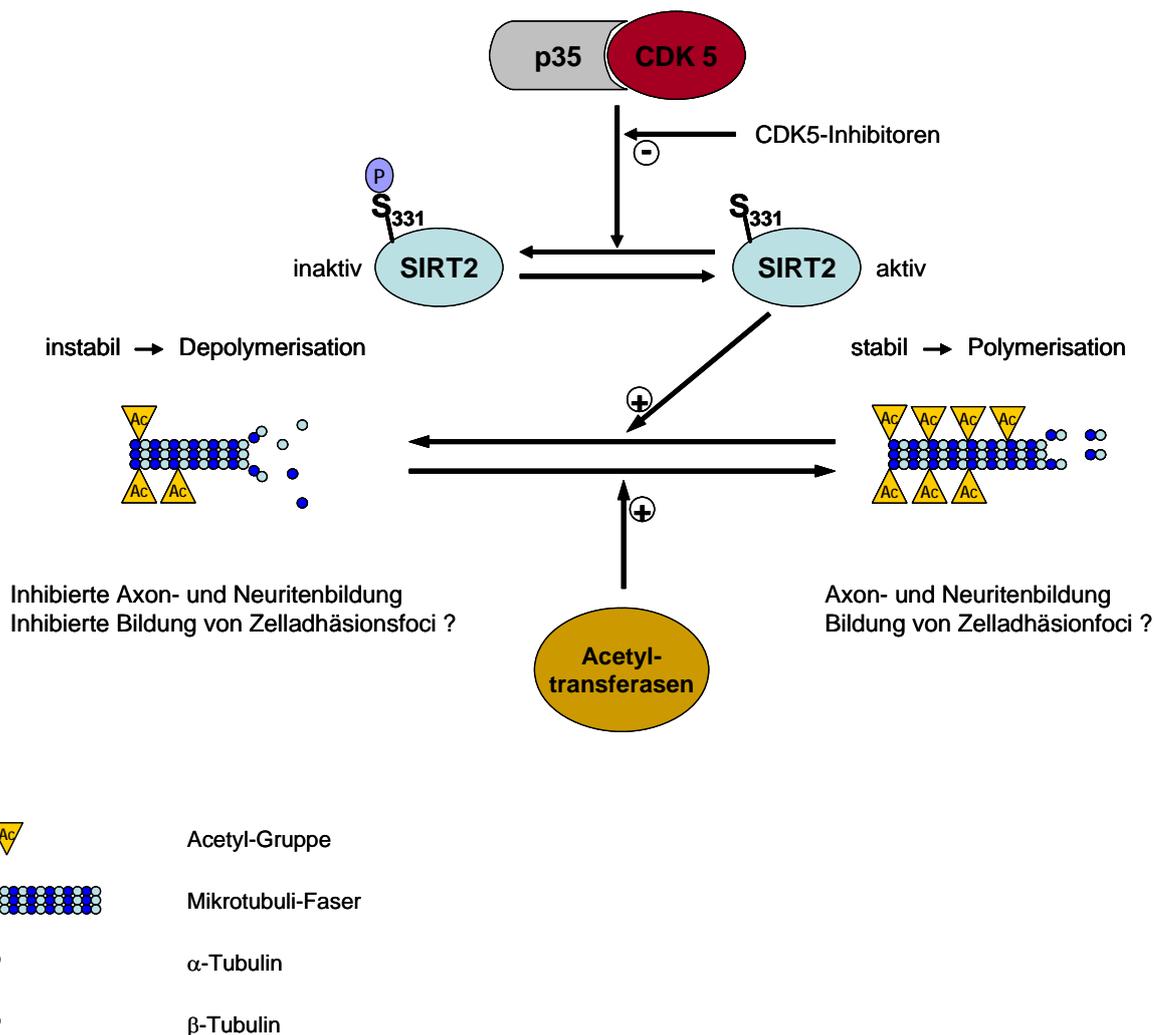
## **IV.2 Einfluss der p35/CDK5-vermittelten Phosphorylierung von SIRT2 auf die Zellmotilität**

Nachdem SIRT2 als mögliches Substrat für Cyklin/CDK identifiziert wurde, sollte dieses Resultat mit der SIRT2-Eigenschaft der Kolo-kalisierung mit dem Mikrotubuli-Netzwerk und der Deacetylierung von  $\alpha$ -Tubulin an Lysin 40 (North et al., 2003) in einen Bezug gebracht werden. Aufgrund der spezifischen  $\alpha$ -Tubulin-Deacetylaseaktivität wurde in der Literatur postuliert, dass SIRT2 einen Einfluss auf die Zellmotilität besitzen könnte. Nach Literaturrecherchen wurde p35/CDK5 als möglicher Modifikator von SIRT2 in Erwägung gezogen. Der postmitotisch aktive CDK5 ist zu 60 % homolog mit CDK1 und CDK2 (Meyerson et al., 1992) und kontrolliert über seine Substrate die neuronale Migration wie das Axon- und Neuritenwachstum und die Zelladhäsion. Diese Effekte stehen im direkten Zusammenhang mit der Kontrolle der Mikrotubuli- und Aktindynamik des neuronalen Zytoskelettes (Alexander et al., 2004; Dhavan and Tsai, 2001; Gilmore et al., 1998; Hahn et al., 2005; Hamdane et al., 2003; Nikolic et al., 1996; Tanaka et al., 2004). Passend dazu wurde in mehreren Publikationen berichtet, dass SIRT2 unter anderem besonders hoch in neuronalem Gewebe exprimiert wird (Hiratsuka et al., 2003; North and Verdin, 2004; Voelter-Mahlknecht et al., 2005). Aufgrund dieser Nachforschungen wurde die vermutete p35/CDK5-vermittelte Phosphorylierung von SIRT2 untersucht.

Es zeigte sich, dass p35/CDK5 SIRT2 an Serin 331 phosphoryliert (III.2.2.2). Da die Daten von der Literaturrecherche zusammen mit der p35/CDK5-vermittelten Phosphorylierung von SIRT2 vermuten ließen, dass SIRT2 einen Einfluss auf das neuronale Migration haben könnte, wurde das Axonwachstum von primären hippocampalen Mausneuronen in Abhängigkeit von der SIRT2-Phosphorylierung untersucht. Es stellte sich heraus, dass SIRT2 und stärker noch die nicht inhibierbare SIRT2-S331A-Mutante das Axonwachstum inhibierte (III.2.8), während die Phosphorylierung imitierende, weniger aktive SIRT2-S331D-Mutante sowie die enzymatisch inaktiven Kontrollen keine Verkürzung der Axonlänge verursachten. Außerdem wurde aufgrund der Beobachtung, dass SIRT2 und SIRT2-S331A überexprimierende HEK293 Zellen eine verstärkten Ablösebereitschaft von der Oberfläche der Zellkulturgefäße aufwiesen, das Adhäsionsverhalten von HEK293 Zellen in Abhängigkeit von der SIRT2-Phosphorylierung analysiert (III.2.9). Dabei konnte festgestellt werden, dass die SIRT2 und SIRT2-S331A überexprimierenden Zellen sich stark ablösten, während die Kontrollen keinen Unterschied zeigten. Außerdem konnte durch die Kotransfektion von CDK5 die Ablösung abgeschwächt werden. Dies war ein direkter Hinweis für eine Regulation von SIRT2 durch p35/CDK5. Durch die Zusammenfassung der *in vitro* und *in vivo* Daten kann nun über den Mechanismus spekuliert werden, der diesen Effekten zu Grunde liegen könnte. Ein zentraler Punkt bei Entwicklung eines möglichen Mechanismus, ist die Bedeutung der  $\alpha$ -Tubulin-Acetylierung an Lysin 40. In Neuronen wird die Acetylierung mit der Stabilisierung der Mikrotubuli-Strukturen in Verbindung gebracht (Dent and Gertler, 2003; Lee and Van Vactor, 2003; Westermann and Weber, 2003). Demnach könnte, wie in Abb.IV.24 schematisch dargestellt, das Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung von  $\alpha$ -Tubulin und somit die Stabilität des Mikrotubuli-Netzwerks durch die p35/CDK5 kontrollierte SIRT2 Deacetylaseaktivität gesteuert werden (Abb.IV. 24 A). Bei einer nicht regulierbaren SIRT2-Aktivität, wie es bei der nicht durch die CDK-Phosphorylierung inhibierbare SIRT2-S331A-Mutante der Fall ist, könnte das Gleichgewicht auf der deacetylierten Form des Lysin 40 liegen und somit auf Seiten der Destabilisierung der Mikrotubuli-Strukturen (Abb.IV.24 B). Dies würde im Falle des Axonwachstums zu einer Verkürzung der Axonlänge oder Inhibition des Wachstums führen, weil zum einen durch die Destabilisierung der Mikrotubuli der

Vesikeltransport für die Bildung von neuen Membranen unterbrochen bzw. nicht ausreichend sein könnte, zum anderen weil die Integrität des Zytoskelettes am Axonwachstumskegel gestört sein könnte (Dent and Gertler, 2003; Lee and Van Vactor, 2003; Valetti et al., 1999). Im Falle der Zelladhäsion würde durch die Destabilisierung die Bildung der Adhäsions-Foci inhibiert. Diese Foci bestehen aus Mikrotubuli-Fasern, die über Aktin mit Integrin und anderen Adhäsionsmolekülen verbunden sind (Krylyshkina et al., 2003; Zamir and Geiger, 2001a; Zamir and Geiger, 2001b). Dieses Szenario konnte durch die Verwendung von siRNA gegen SIRT2 weiter gefestigt werden (III.2.9). Die Inhibition der endogenen SIRT2-Expression führte zu einer verstärkten Adhäsion der HEK293 Zellen. Dies könnte durch eine gesteigerte Bildung von Adhäsions-Foci verursacht werden. Allerdings müssen diese Hypothesen noch in weiteren Experimenten verifiziert werden.

In dieser Arbeit konnte erstmals eine postmitotische Regulation von SIRT2 durch den für die Migration essenziellen CDK5/p35-Komplex dokumentiert werden. Damit wurde der in der Literatur vermutete Zusammenhang zwischen Zellmotilität und SIRT2-Aktivität hergestellt.



**Abb.III.24: Model für den möglichen Mechanismus der SIRT2 vermittelten Destabilisierung von Mikrotubuli.** In normalen Zellen besteht ein Gleichgewicht zwischen acetyliertem und deacetyliertem  $\alpha$ -Tubulin und somit zwischen polymerisierenden und depolymerisierenden Mikrotubulistrukturen. Dieses Gleichgewicht könnte durch die p35/CDK5-vermittelte Phosphorylierung von SIRT2 reguliert werden. Bei einem Verlust der Kontrolle über die Aktivität von SIRT2 wird das Gleichgewicht zunehmend auf die Destabilisierung der Mikrotubuli verschoben.

### IV.3 Cyklin/CDK-vermittelte Phosphorylierung von SIRT1

In dieser Arbeit konnte auch die *in vitro* Phosphorylierung von SIRT1 durch die Kinasen p35/CDK5, Cyklin D3/CDK4, Cyklin E/CDK2 und Cyklin A/CDK2 und Cyklin B/CDK1 erstmals dokumentiert werden (III.3.1). Weitere *in vitro* Analysen zur Bestimmung der Funktion der SIRT1-Phosphorylierung zeigten, dass diese Modifikation die enzymatische Aktivität von SIRT1 steigert (III.3.2). Dies steht im Gegensatz zu SIRT2-Aktivität und deutet möglicherweise auf eine vielfältige Sirtuin-Regulation durch CDK-Komplexe.

Einige SIRT1 Substrate, wie p53 (Vaziri et al., 2001), die FOXO Proteine (Brunet et al., 2004; Kobayashi et al., 2005; Nemoto et al., 2004; van der Horst et al., 2004; Yang et al., 2005) und NFκB (Yeung et al., 2004) spielen eine wichtige Rolle im Zellzyklus, in der Tumorgenese, während der Zelldifferenzierung und in der Apoptose. Eine Regulation dieser Substrate über die SIRT1 Phosphorylierung durch Cyklin/CDK-Komplexe ist daher denkbar. So ist zum Beispiel bekannt, dass SIRT1 durch die Deacetylierung von Lysin 382 p53 inaktiviert (Vaziri et al., 2001). Der Tumorsuppressor p53 funktioniert als ein durch DNA-Schäden induzierbarer Transkriptionsfaktor, der eine große Anzahl von Genen kontrolliert, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Induktion der Apoptose spielen (Bode and Dong, 2004; Brooks and Gu, 2003; Lombard et al., 2005). So wird z.B. durch eine p53-Aktivierung das Cyklin E/CDK2 inhibierende Protein p21 induziert. Die Inhibition von Cyklin E/CDK2 führt zu einem Arrest des Zellzyklus am G1/S-Restriktionspunkt (Kastan and Bartek, 2004; Stevens and La Thangue, 2003). Eine Kontrolle der p53 Aktivierung durch eine Cyklin E/CDK2-vermittelte Phosphorylierung von SIRT1 würde einen positiven *feed-back loop* erzeugen.

Diese *in vitro* Daten bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen in Zellen, um die postulierte Regulation des Zellzyklus, der DNS-Reparatur und Apoptose zu überprüfen.

## V. Literaturverzeichnis

Afshar, G., and Murnane, J. P. (1999). Characterization of a human gene with sequence homology to *Saccharomyces cerevisiae* SIR2. *Gene* 234, 161-168.

Alexander, K., Yang, H. S., and Hinds, P. W. (2004). Cellular senescence requires CDK5 repression of Rac1 activity. *Mol Cell Biol* 24, 2808-2819.

Allfrey, V. G., Faulkner, R., and Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786-794.

Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E., and Moudrianakis, E. N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10148-10152.

Avalos, J. L., Celic, I., Muhammad, S., Cosgrove, M. S., Boeke, J. D., and Wolberger, C. (2002). Structure of a Sir2 enzyme bound to an acetylated p53 peptide. *Mol Cell* 10, 523-535.

Baas, P. W. (1997). Microtubules and axonal growth. *Curr Opin Cell Biol* 9, 29-36.

Baas, P. W., and Ahmad, F. J. (1993). The transport properties of axonal microtubules establish their polarity orientation. *J Cell Biol* 120, 1427-1437.

Baas, P. W., White, L. A., and Heidemann, S. R. (1987). Microtubule polarity reversal accompanies regrowth of amputated neurites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5272-5276.

Bae, N. S., Swanson, M. J., Vassilev, A., and Howard, B. H. (2004). Human histone deacetylase SIRT2 interacts with the homeobox transcription factor HOXA10. *J Biochem (Tokyo)* 135, 695-700.

Bannister, A. J., and Miska, E. A. (2000). Regulation of gene expression by transcription factor acetylation. *Cell Mol Life Sci* 57, 1184-1192.

Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 792-804.

Basile, V., Mantovani, R., and Imbriano, C. (2006). DNA damage promotes histone deacetylase 4 nuclear localization and repression of G2/M promoters, via p53 C-terminal lysines. *J Biol Chem* 281, 2347-2357.

Baumann, K., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Piwnicka-Worms, H., and Mandelkow, E. (1993). Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* 336, 417-424.

Belyaev, N. D., Houben, A., Baranczewski, P., and Schubert, I. (1997). Histone H4 acetylation in plant heterochromatin is altered during the cell cycle. *Chromosoma* 106, 193-197.

Bode, A. M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4, 793-805.

- Benson, L. J., Gu, Y., Yakovleva, T., Tong, K., Barrows, C., Strack, C. L., Cook, R. G., Mizzen, C. A., and Annunziato, A. T. (2006). Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange. *J Biol Chem* 281, 9287-9296.
- Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12, 142-148.
- Bestor, T. H. (1998). Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* 393, 311-312.
- Bitterman, K. J., Medvedik, O., and Sinclair, D. A. (2003). Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 376-399, table of contents.
- Blagosklonny, M. V., and Pardee, A. B. (2002). The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 1, 103-110.
- Blander, G., and Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73, 417-435.
- Bode, A. M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4, 793-805.
- Borra, M. T., and Denu, J. M. (2004). Quantitative assays for characterization of the Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases. *Methods Enzymol* 376, 171-187.
- Borgne, A., and Golsteyn, R. M. (2003). The role of cyclin-dependent kinases in apoptosis. *Prog Cell Cycle Res* 5, 453-459.
- Brachmann, C. B., Sherman, J. M., Devine, S. E., Cameron, E. E., Pillus, L., and Boeke, J. D. (1995). The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev* 9, 2888-2902.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bray, J. J., Fernyhough, P., Bamburg, J. R., and Bray, D. (1992). Actin depolymerizing factor is a component of slow axonal transport. *J Neurochem* 58, 2081-2087.
- Bray, J. J., and Mills, R. G. (1991). Transport complexes associated with slow axonal flow. *Neurochem Res* 16, 645-649.
- Brooks, C. L., and Gu, W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 164-171.
- Brownell, J. E., and Allis, C. D. (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 6, 176-184.
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., and Allis, C. D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.

- Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., *et al.* (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.
- Burgering, B. M., and Kops, G. J. (2002). Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci* 27, 352-360.
- Bushman, W., Thompson, J. F., Vargas, L., and Landy, A. (1985). Control of directionality in lambda site specific recombination. *Science* 230, 906-911.
- Carlier, M. F. (1989). Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int Rev Cytol* 115, 139-170.
- Castedo, M., Roumier, T., Blanco, J., Ferri, K. F., Barretina, J., Tintignac, L. A., Andreau, K., Perfettini, J. L., Amendola, A., Nardacci, R., *et al.* (2002). Sequential involvement of Cdk1, mTOR and p53 in apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *Embo J* 21, 4070-4080.
- Cenciarelli, C., De Santa, F., Puri, P. L., Mattei, E., Ricci, L., Bucci, F., Felsani, A., and Caruso, M. (1999). Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation. *Mol Cell Biol* 19, 5203-5217.
- Chen, C. A., and Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6, 632-638.
- Chen, W. Y., Wang, D. H., Yen, R. C., Luo, J., Gu, W., and Baylin, S. B. (2005a). Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123, 437-448.
- Chen, Z., Merta, P. J., Lin, N. H., Tahir, S. K., Kovar, P., Sham, H. L., and Zhang, H. (2005b). A-432411, a novel indolinone compound that disrupts spindle pole formation and inhibits human cancer cell growth. *Mol Cancer Ther* 4, 562-568.
- Cheng, H. L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J. P., Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, F. W., and Chua, K. F. (2003). Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10794-10799.
- Chodaparambil, J. V., Edayathumangalam, R. S., Bao, Y., Park, Y. J., and Luger, K. (2006). Nucleosome structure and function. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 29-46.
- Chun, K. T., Mathias, N., and Goebel, M. G. (1996). Ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle control in yeast. *Prog Cell Cycle Res* 2, 115-127.
- Cohen, H. Y., Lavu, S., Bitterman, K. J., Hekking, B., Imahiyerobo, T. A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B. M., and Sinclair, D. A. (2004a). Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 13, 627-638.
- Cohen, H. Y., Miller, C., Bitterman, K. J., Wall, N. R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K. T., Gorospe, M., de Cabo, R., and Sinclair, D. A. (2004b). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305, 390-392.

- Coulombe, P. A., and Wong, P. (2004). Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* 6, 699-706.
- Cozzone, A. J. (1993). ATP-dependent protein kinases in bacteria. *J Cell Biochem* 51, 7-13.
- Cress, W. D., and Seto, E. (2000). Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* 184, 1-16.
- Dammermann, A., Desai, A., and Oegema, K. (2003). The minus end in sight. *Curr Biol* 13, R614-624.
- De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., and Kim, S. H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363, 595-602.
- de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370, 737-749.
- Denhardt, D. T., and Noda, M. (1998). Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl* 30-31, 92-102.
- Dent, E. W., and Gertler, F. B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40, 209-227.
- Denu, J. M. (2003). Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases. *Trends Biochem Sci* 28, 41-48.
- Desai, A., and Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 83-117.
- Desai, A., Rybina, S., Muller-Reichert, T., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Hyman, A., and Oegema, K. (2003). KNL-1 directs assembly of the microtubule-binding interface of the kinetochore in *C. elegans*. *Genes Dev* 17, 2421-2435.
- Dhavan, R., and Tsai, L. H. (2001). A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 749-759.
- Draetta, G., Luca, F., Westendorf, J., Brizuela, L., Ruderman, J., and Beach, D. (1989). Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 56, 829-838.
- Draviam, V. M., Orrechia, S., Lowe, M., Pardi, R., and Pines, J. (2001). The localization of human cyclins B1 and B2 determines CDK1 substrate specificity and neither enzyme requires MEK to disassemble the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 152, 945-958.
- Drescher, U., and Knoell, B. (2001). Axon guidance processes in the retinotectal and vomeronasal projection are controlled by Eph receptor tyrosine kinases and ephrins. *Zoology (Jena)* 104, 228-231.
- Drubin, D. G., Feinstein, S. C., Shooter, E. M., and Kirschner, M. W. (1985). Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol* 101, 1799-1807.

- Dryden, S. C., Nahhas, F. A., Nowak, J. E., Goustin, A. S., and Tainsky, M. A. (2003). Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol Cell Biol* 23, 3173-3185.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., and Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-387.
- Dulic, V., Lees, E., and Reed, S. I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257, 1958-1961.
- Eberharter, A., and Becker, P. B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 3, 224-229.
- Ekholm, S. V., and Reed, S. I. (2000). Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12, 676-684.
- Ekholm, S. V., Zickert, P., Reed, S. I., and Zetterberg, A. (2001). Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Mol Cell Biol* 21, 3256-3265.
- Finnin, M. S., Donigian, J. R., and Pavletich, N. P. (2001). Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nat Struct Biol* 8, 621-625.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 15, 172-183.
- Forsberg, E. C., and Bresnick, E. H. (2001). Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world. *Bioessays* 23, 820-830.
- Frolov, M. V., Stevaux, O., Moon, N. S., Dimova, D., Kwon, E. J., Morris, E. J., and Dyson, N. J. (2003). G1 cyclin-dependent kinases are insufficient to reverse dE2F2-mediated repression. *Genes Dev* 17, 723-728.
- Frye, R. A. (1999). Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 273-279.
- Frye, R. A. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 793-798.
- Fuchs, E., and Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63, 345-382.
- Fulco, M., Schiltz, R. L., Iezzi, S., King, M. T., Zhao, P., Kashiwaya, Y., Hoffman, E., Veech, R. L., and Sartorelli, V. (2003). Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell* 12, 51-62.
- Furuno, N., den Elzen, N., and Pines, J. (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* 147, 295-306.

- Futamura, M., Monden, Y., Okabe, T., Fujita-Yoshigaki, J., Yokoyama, S., and Nishimura, S. (1995). Trichostatin A inhibits both ras-induced neurite outgrowth of PC12 cells and morphological transformation of NIH3T3 cells. *Oncogene* 10, 1119-1123.
- Gershey, E. L., Vidali, G., and Allfrey, V. G. (1968). Chemical studies of histone acetylation. The occurrence of epsilon-N-acetyllysine in the f2a1 histone. *J Biol Chem* 243, 5018-5022.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 *Suppl*, S81-96.
- Gilmore, E. C., Ohshima, T., Goffinet, A. M., Kulkarni, A. B., and Herrup, K. (1998). Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J Neurosci* 18, 6370-6377.
- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., and Lamb, N. J. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169-1179.
- Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X., and Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363, 15-23.
- Goldberg, D. J., and Burmeister, D. W. (1986). Stages in axon formation: observations of growth of *Aplysia* axons in culture using video-enhanced contrast-differential interference contrast microscopy. *J Cell Biol* 103, 1921-1931.
- Goslin, K., and Banker, G. (1989). Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 108, 1507-1516.
- Goslin, K., Birgbauer, E., Banker, G., and Solomon, F. (1989). The role of cytoskeleton in organizing growth cones: a microfilament-associated growth cone component depends upon microtubules for its localization. *J Cell Biol* 109, 1621-1631.
- Gottschling, D. E., Aparicio, O. M., Billington, B. L., and Zakian, V. A. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63, 751-762.
- Grana, X., and Reddy, E. P. (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11, 211-219.
- Greer, E. L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24, 7410-7425.
- Guarente, L. (2001). SIR2 and aging--the exception that proves the rule. *Trends Genet* 17, 391-392.
- Guschin, D., Wade, P. A., Kikyo, N., and Wolffe, A. P. (2000). ATP-Dependent histone octamer mobilization and histone deacetylation mediated by the Mi-2 chromatin remodeling complex. *Biochemistry* 39, 5238-5245.
- Hahn, C. M., Kleinholz, H., Koester, M. P., Grieser, S., Thelen, K., and Pollerberg, G. E. (2005). Role of cyclin-dependent kinase 5 and its activator P35 in local axon and growth cone stabilization. *Neuroscience* 134, 449-465.

- Halkidou, K., Cook, S., Leung, H. Y., Neal, D. E., and Robson, C. N. (2004). Nuclear accumulation of histone deacetylase 4 (HDAC4) coincides with the loss of androgen sensitivity in hormone refractory cancer of the prostate. *Eur Urol* 45, 382-389; author reply 389.
- Hamdane, M., Sambo, A. V., Delobel, P., Begard, S., Violleau, A., Delacourte, A., Bertrand, P., Benavides, J., and Buee, L. (2003). Mitotic-like tau phosphorylation by p25-Cdk5 kinase complex. *J Biol Chem* 278, 34026-34034.
- Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* 9, 576-596.
- Harbour, J. W., and Dean, D. C. (2000). Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, E65-67.
- Hartley, J. L., Temple, G. F., and Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10, 1788-1795.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1997). Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Curr Opin Chem Biol* 1, 300-308.
- Hiratsuka, M., Inoue, T., Toda, T., Kimura, N., Shirayoshi, Y., Kamitani, H., Watanabe, T., Ohama, E., Tahimic, C. G., Kurimasa, A., and Oshimura, M. (2003). Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 558-566.
- Howard, A., and Pelc, S. R. (1951). Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. *Nature* 167, 599-600.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., *et al.* (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196.
- Huang, Y., Myers, S. J., and Dingledine, R. (1999). Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nat Neurosci* 2, 867-872.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F., and Yao, T. P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455-458.
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000a). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800.
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800.
- Imai, S., Johnson, F. B., Marciniak, R. A., McVey, M., Park, P. U., and Guarente, L. (2000b). Sir2: an NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65, 297-302.

- Inoue, T., Hiratsuka, M., Osaki, M., Yamada, H., Kishimoto, I., Yamaguchi, S., Nakano, S., Katoh, M., Ito, H., and Oshimura, M. (2006). SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene*.
- Ito, A., Lai, C. H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M. H., Appella, E., and Yao, T. P. (2001). p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *Embo J* 20, 1331-1340.
- Ivy, J. M., Klar, A. J., and Hicks, J. B. (1986). Cloning and characterization of four SIR genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 6, 688-702.
- Jackman, M., Kubota, Y., den Elzen, N., Hagting, A., and Pines, J. (2002). Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Biol Cell* 13, 1030-1045.
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320.
- Jeffrey, P. D., Tong, L., and Pavletich, N. P. (2000). Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes Dev* 14, 3115-3125.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Johnstone, R. W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 1, 287-299.
- Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13, 2570-2580.
- Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3, 221-227.
- Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.
- Kesavapany, S., Lau, K. F., McLoughlin, D. M., Brownlees, J., Ackerley, S., Leigh, P. N., Shaw, C. E., and Miller, C. C. (2001). p35/cdk5 binds and phosphorylates beta-catenin and regulates beta-catenin/presenilin-1 interaction. *Eur J Neurosci* 13, 241-247.
- Kim, K. K., Chamberlin, H. M., Morgan, D. O., and Kim, S. H. (1996). Three-dimensional structure of human cyclin H, a positive regulator of the CDK-activating kinase. *Nat Struct Biol* 3, 849-855.
- Knoblich, J. A., and Lehner, C. F. (1993). Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G2-M transition. *Embo J* 12, 65-74.
- Knoepfler, P. S., and Eisenman, R. N. (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 99, 447-450.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J. P., Gannon, J., and Hunt, T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* 3, 1279-1294.

- Kobayashi, Y., Furukawa-Hibi, Y., Chen, C., Horio, Y., Isobe, K., Ikeda, K., and Motoyama, N. (2005). SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med* 16, 237-243.
- Kodama, Y., Murakumo, Y., Ichihara, M., Kawai, K., Shimono, Y., and Takahashi, M. (2004). Induction of CRMP-2 by GDNF and analysis of the CRMP-2 promoter region. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 108-115.
- Kornberg, R. D., and Lorch, Y. (1999a). Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr Opin Genet Dev* 9, 148-151.
- Kornberg, R. D., and Lorch, Y. (1999b). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285-294.
- Kouzarides, T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo J* 19, 1176-1179.
- Kovacs, J. J., Hubbert, C., and Yao, T. P. (2004). The HDAC complex and cytoskeleton. *Novartis Found Symp* 259, 170-177; discussion 178-181, 223-175.
- Krylyshkina, O., Anderson, K. I., Kaverina, I., Upmann, I., Manstein, D. J., Small, J. V., and Toomre, D. K. (2003). Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions. *J Cell Biol* 161, 853-859.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., and Sternglanz, R. (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5807-5811.
- Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U. M., Frye, R. A., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Kouzarides, T. (2002). Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *Embo J* 21, 2383-2396.
- LaVoie, H. A. (2005). Epigenetic control of ovarian function: the emerging role of histone modifications. *Mol Cell Endocrinol* 243, 12-18.
- Lee, H., and Van Vactor, D. (2003). Neurons take shape. *Curr Biol* 13, R152-161.
- Lees, E. M., and Harlow, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol* 13, 1194-1201.
- Lew, J., Huang, Q. Q., Qi, Z., Winkfein, R. J., Aebersold, R., Hunt, T., and Wang, J. H. (1994). A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371, 423-426.
- Li, M., Luo, J., Brooks, C. L., and Gu, W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* 277, 50607-50611.
- Li, Z., David, G., Hung, K. W., DePinho, R. A., Fu, A. K., and Ip, N. Y. (2004). Cdk5/p35 phosphorylates mSds3 and regulates mSds3-mediated repression of transcription. *J Biol Chem* 279, 54438-54444.

- Liang, G., Lin, J. C., Wei, V., Yoo, C., Cheng, J. C., Nguyen, C. T., Weisenberger, D. J., Egger, G., Takai, D., Gonzales, F. A., and Jones, P. A. (2004). Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7357-7362.
- Lin, S. J., Kaeberlein, M., Andalis, A. A., Sturtz, L. A., Defossez, P. A., Culotta, V. C., Fink, G. R., and Guarente, L. (2002). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418, 344-348.
- Liszt, G., Ford, E., Kurtev, M., and Guarente, L. (2005). Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 280, 21313-21320.
- Lo, W. S., Trievel, R. C., Rojas, J. R., Duggan, L., Hsu, J. Y., Allis, C. D., Marmorstein, R., and Berger, S. L. (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* 5, 917-926.
- Loidl, P., and Grobner, P. (1987). Postsynthetic acetylation of histones during the cell cycle: a general function for the displacement of histones during chromatin rearrangements. *Nucleic Acids Res* 15, 8351-8366.
- Lombard, D. B., Chua, K. F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., and Alt, F. W. (2005). DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 120, 497-512.
- Lorch, Y., Zhang, M., and Kornberg, R. D. (1999). Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* 96, 389-392.
- Luger, K., Rechsteiner, T. J., Flaus, A. J., Wayne, M. M., and Richmond, T. J. (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol* 272, 301-311.
- Luger, K., and Richmond, T. J. (1998). The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* 8, 140-146.
- Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107, 137-148.
- MacRae, T. H. (1997). Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem* 244, 265-278.
- Martin, S. G., Laroche, T., Suka, N., Grunstein, M., and Gasser, S. M. (1999). Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* 97, 621-633.
- Matsumoto, Y., and Maller, J. L. (2004). A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science* 306, 885-888.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., *et al.* (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J* 21, 6820-6831.
- Mayo, M. W., Norris, J. L., and Baldwin, A. S. (2001). Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis. *Methods Enzymol* 333, 73-87.

- McBurney, M. W., Yang, X., Jardine, K., Hixon, M., Boekelheide, K., Webb, J. R., Lansdorp, P. M., and Lemieux, M. (2003). The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol Cell Biol* 23, 38-54.
- McGowan, C. H. (2003). Regulation of the eukaryotic cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 5, 1-4.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., and Olson, E. N. (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* 11, 497-504.
- Meyerson, M., Enders, G. H., Wu, C. L., Su, L. K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E., and Tsai, L. H. (1992). A family of human cdc2-related protein kinases. *Embo J* 11, 2909-2917.
- Michaelis, M. L., Dobrowsky, R. T., and Li, G. (2002). Tau neurofibrillary pathology and microtubule stability. *J Mol Neurosci* 19, 289-293.
- Michishita, E., Park, J. Y., Burneskis, J. M., Barrett, J. C., and Horikawa, I. (2005). Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 16, 4623-4635.
- Mills, K. D., Sinclair, D. A., and Guarente, L. (1999). MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell* 97, 609-620.
- Min, J., Landry, J., Sternglanz, R., and Xu, R. M. (2001). Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. *Cell* 105, 269-279.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Morris, B. J. (2005). A forkhead in the road to longevity: the molecular basis of lifespan becomes clearer. *J Hypertens* 23, 1285-1309.
- Morris, L., Allen, K. E., and La Thangue, N. B. (2000). Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat Cell Biol* 2, 232-239.
- Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M. M., *et al.* (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124, 315-329.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Muth, V., Nadaud, S., Grummt, I., and Voit, R. (2001). Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *Embo J* 20, 1353-1362.
- Naaby-Hansen, S., and Bjerrum, O. J. (1985). Auto- and iso-antigens of human spermatozoa detected by immunoblotting with human sera after SDS-PAGE. *J Reprod Immunol* 7, 41-57.
- Nakatani, T., Mizuhara, E., Minaki, Y., Sakamoto, Y., and Ono, Y. (2004). Helt, a novel basic-helix-loop-helix transcriptional repressor expressed in the developing central nervous system. *J Biol Chem* 279, 16356-16367.

- Nalivaeva, N. N., and Turner, A. J. (2001). Post-translational modifications of proteins: acetylcholinesterase as a model system. *Proteomics* 1, 735-747.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y., and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.
- Nemoto, S., Fergusson, M. M., and Finkel, T. (2004). Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* 306, 2105-2108.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- Nguyen, M. D., Mushynski, W. E., and Julien, J. P. (2002). Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Death Differ* 9, 1294-1306.
- Nigg, E. A. (1993). Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Curr Opin Cell Biol* 5, 187-193.
- Nikolic, M., Dudek, H., Kwon, Y. T., Ramos, Y. F., and Tsai, L. H. (1996). The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev* 10, 816-825.
- Nogales, E. (2001). Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30, 397-420.
- North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., and Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11, 437-444.
- North, B. J., and Verdin, E. (2004). Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol* 5, 224.
- Oelgeschlager, T. (2002). Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control. *J Cell Physiol* 190, 160-169.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., and Pagano, M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15, 2612-2624.
- Onyango, P., Celic, I., McCaffery, J. M., Boeke, J. D., and Feinberg, A. P. (2002). SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13653-13658.
- Orphanides, G., and Reinberg, D. (2002). A unified theory of gene expression. *Cell* 108, 439-451.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* 11, 961-971.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* 11, 961-971.
- Palladino, F., Laroche, T., Gilson, E., Axelrod, A., Pillus, L., and Gasser, S. M. (1993). SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* 75, 543-555.

- Pardee, A. B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1286-1290.
- Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-608.
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., and Tsai, L. H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615-622.
- Perrod, S., Cockell, M. M., Laroche, T., Renauld, H., Ducrest, A. L., Bonnard, C., and Gasser, S. M. (2001). A cytosolic NAD-dependent deacetylase, Hst2p, can modulate nucleolar and telomeric silencing in yeast. *Embo J* 20, 197-209.
- Pines, J., and Hunter, T. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 346, 760-763.
- Pines, J., and Rieder, C. L. (2001). Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* 3, E3-6.
- Planas-Silva, M. D., and Weinberg, R. A. (1997a). Estrogen-dependent cyclin E-cdk2 activation through p21 redistribution. *Mol Cell Biol* 17, 4059-4069.
- Planas-Silva, M. D., and Weinberg, R. A. (1997b). The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 768-772.
- Polevoda, B., and Sherman, F. (2000). Nalpha -terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Biol Chem* 275, 36479-36482.
- Polevoda, B., and Sherman, F. (2002). The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol* 3, reviews0006.
- Prives, C., and Manley, J. L. (2001). Why is p53 acetylated? *Cell* 107, 815-818.
- Puig, O., and Tjian, R. (2005). Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev* 19, 2435-2446.
- Ranallo, R. T., Struhl, K., and Stargell, L. A. (1999). A TATA-binding protein mutant defective for TFIID complex formation in vivo. *Mol Cell Biol* 19, 3951-3957.
- Reid, R. J., and Rothstein, R. (2004). Stay close to your sister. *Mol Cell* 14, 418-420.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., and Reed, S. I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 14, 1669-1679.
- Resnitzky, D., Hengst, L., and Reed, S. I. (1995). Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol* 15, 4347-4352.
- Rine, J., and Herskowitz, I. (1987). Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 116, 9-22.

- Roth, S. Y., Denu, J. M., and Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70, 81-120.
- Rouaux, C., Loeffler, J. P., and Boutillier, A. L. (2004). Targeting CREB-binding protein (CBP) loss of function as a therapeutic strategy in neurological disorders. *Biochem Pharmacol* 68, 1157-1164.
- Ruas, M., and Peters, G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378, F115-177.
- Saburi, S., and McNeill, H. (2005). Organising cells into tissues: new roles for cell adhesion molecules in planar cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 17, 482-488.
- Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324, 163-166.
- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12, 2831-2841.
- Salghetti, S. E., Kim, S. Y., and Tansey, W. P. (1999). Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *Embo J* 18, 717-726.
- Sambrook, J., and Gething, M. J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342, 224-225.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sarcevic, B., Lilischkis, R., and Sutherland, R. L. (1997). Differential phosphorylation of T-47D human breast cancer cell substrates by D1-, D3-, E-, and A-type cyclin-CDK complexes. *J Biol Chem* 272, 33327-33337.
- Sartorelli, V., and Puri, P. L. (2001). The link between chromatin structure, protein acetylation and cellular differentiation. *Front Biosci* 6, D1024-1047.
- Schmit, A. C., and Lambert, A. M. (1988). Plant actin filament and microtubule interactions during anaphase-telophase transition: effects of antagonist drugs. *Biol Cell* 64, 309-319.
- Schubeler, D., MacAlpine, D. M., Scalzo, D., Wirbelauer, C., Kooperberg, C., van Leeuwen, F., Gottschling, D. E., O'Neill, L. P., Turner, B. M., Delrow, J., *et al.* (2004). The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* 18, 1263-1271.
- Schwer, B., North, B. J., Frye, R. A., Ott, M., and Verdin, E. (2002). The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol* 158, 647-657.
- Seger, R., and Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9, 726-735.
- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-1065.

- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-1065.
- Sherr, C. J. (1995). Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am Physicians* 107, 181-186.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
- Sherr, C. J. (2000). Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect* 96, 73-92.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149-1163.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Shore, D. (2001). Telomeric chromatin: replicating and wrapping up chromosome ends. *Curr Opin Genet Dev* 11, 189-198.
- Shore, D., Squire, M., and Nasmyth, K. A. (1984). Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *Embo J* 3, 2817-2823.
- Sinclair, D. A., Lin, S. J., and Guarente, L. (2006). Life-span extension in yeast. *Science* 312, 195-197; author reply 195-197.
- Smith, J. (2002). Human Sir2 and the 'silencing' of p53 activity. *Trends Cell Biol* 12, 404-406.
- Smith, J. S., and Boeke, J. D. (1997). An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev* 11, 241-254.
- Smith, J. S., Brachmann, C. B., Celic, I., Kenna, M. A., Muhammad, S., Starai, V. J., Avalos, J. L., Escalante-Semerena, J. C., Grubmeyer, C., Wolberger, C., and Boeke, J. D. (2000). A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6658-6663.
- Solomon, J. M., Pasupuleti, R., Xu, L., McDonagh, T., Curtis, R., DiStefano, P. S., and Huber, L. J. (2006). Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol Cell Biol* 26, 28-38.
- Steinman, R. A. (2002). Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene* 21, 3403-3413.
- Stevens, C., and La Thangue, N. B. (2003). E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Arch Biochem Biophys* 412, 157-169.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J., and Stock, A. M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* 53, 450-490.
- Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Takata, T., and Ishikawa, F. (2003). Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 250-257.

- Tanaka, E. M., and Kirschner, M. W. (1991). Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *J Cell Biol* 115, 345-363.
- Tanaka, T., Serneo, F. F., Tseng, H. C., Kulkarni, A. B., Tsai, L. H., and Gleeson, J. G. (2004). Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* 41, 215-227.
- Tang, B. L. (2006). SIRT1, neuronal cell survival and the insulin/IGF-1 aging paradox. *Neurobiol Aging* 27, 501-505.
- Tang, X., Wang, X., Gong, X., Tong, M., Park, D., Xia, Z., and Mao, Z. (2005). Cyclin-dependent kinase 5 mediates neurotoxin-induced degradation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *J Neurosci* 25, 4823-4834.
- Tanner, K. G., Landry, J., Sternglanz, R., and Denu, J. M. (2000). Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14178-14182.
- Tanny, J. C., Dowd, G. J., Huang, J., Hilz, H., and Moazed, D. (1999). An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing. *Cell* 99, 735-745.
- Tanny, J. C., and Moazed, D. (2001). Coupling of histone deacetylation to NAD breakdown by the yeast silencing protein Sir2: Evidence for acetyl transfer from substrate to an NAD breakdown product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 415-420.
- Taunton, J., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272, 408-411.
- Tissenbaum, H. A., and Guarente, L. (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410, 227-230.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1989). Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* 27, 495-501.
- Tsai, L. H., Delalle, I., Caviness, V. S., Jr., Chae, T., and Harlow, E. (1994). p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371, 419-423.
- Tsai, L. H., Harlow, E., and Meyerson, M. (1991). Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature* 353, 174-177.
- Vale, R. D., and Milligan, R. A. (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288, 88-95.
- Valetti, C., Wetzel, D. M., Schrader, M., Hasbani, M. J., Gill, S. R., Kreis, T. E., and Schroer, T. A. (1999). Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell* 10, 4107-4120.
- Van der Horst, A., Tertoolen, L. G., de Vries-Smits, L. M., Frye, R. A., Medema, R. H., and Burgering, B. M. (2004). FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2 (SIRT1). *J Biol Chem* 279, 28873-28879.
- Van Duyne, G. D. (2005). Lambda integrase: armed for recombination. *Curr Biol* 15, R658-660.

- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell* 16, 93-105.
- Vaquero, A., Scher, M. B., Lee, D. H., Sutton, A., Cheng, H. L., Alt, F. W., Serrano, L., Sternglanz, R., and Reinberg, D. (2006). SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev.*
- Varga-Weisz, P. (2001). ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. *Oncogene* 20, 3076-3085.
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L., and Weinberg, R. A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149-159.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Verdone, L., Caserta, M., and Di Mauro, E. (2005). Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol* 83, 344-353.
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J. M., Rottmann, S., Lilischkis, R., Walsemann, G., Dohmann, K., Austen, M., and Luscher, B. (2003). Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep* 4, 484-490.
- Vidali, G., Gershey, E. L., and Allfrey, V. G. (1968). Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones. *J Biol Chem* 243, 6361-6366.
- Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E., and Workman, J. L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 20, 1899-1910.
- Voelter-Mahlknecht, S., Ho, A. D., and Mahlknecht, U. (2005). FISH-mapping and genomic organization of the NAD-dependent histone deacetylase gene, Sirtuin 2 (Sirt2). *Int J Oncol* 27, 1187-1196.
- Weinert, T. (1997). Yeast checkpoint controls and relevance to cancer. *Cancer Surv* 29, 109-132.
- Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 112, 441-451.
- Westermann, S., and Weber, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 938-947.
- Wolffe, A. P., and Guschin, D. (2000). Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol* 129, 102-122.
- Wu, D. Y., Ugozzoli, L., Pal, B. K., Qian, J., and Wallace, R. B. (1991). The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* 10, 233-238.

- Yam, C. H., Fung, T. K., and Poon, R. Y. (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* 59, 1317-1326.
- Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. (2004). I $\kappa$ B kinases: key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends Biochem Sci* 29, 72-79.
- Yang, Y., Hou, H., Haller, E. M., Nicosia, S. V., and Bai, W. (2005). Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation. *Embo J* 24, 1021-1032.
- Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A., and Mayo, M. W. (2004). Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *Embo J* 23, 2369-2380.
- Yu, T. T., McIntyre, J. C., Bose, S. C., Hardin, D., Owen, M. C., and McClintock, T. S. (2005). Differentially expressed transcripts from phenotypically identified olfactory sensory neurons. *J Comp Neurol* 483, 251-262.
- Zamir, E., and Geiger, B. (2001a). Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114, 3577-3579.
- Zamir, E., and Geiger, B. (2001b). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114, 3583-3590.
- Zhang, H. S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A. A., Ma, D., Luo, R. X., Harbour, J. W., and Dean, D. C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 101, 79-89.
- Zhao, J., Dynlacht, B., Imai, T., Hori, T., and Harlow, E. (1998). Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S-phase entry. *Genes Dev* 12, 456-461.
- Zhao, K., Chai, X., Clements, A., and Marmorstein, R. (2003). Structure and autoregulation of the yeast Hst2 homolog of Sir2. *Nat Struct Biol* 10, 864-871.

## **VI. Anhang**

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendethabe. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Ruwin Pandithage

Aachen, den 20.02.2007

---

## Lebenslauf

**Name:** Pandithage  
**Vorname:** Ruwin  
**Geburtstag:** 18.07.1974  
**Geburtsort:** Colombo/Sri Lanka  
**Familienstand:** ledig  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Anschrift:** Eynattenerstraße 60-62  
52064 Aachen

**Telefon:** 0241 / 5594169  
**E-mail:** RuwinP@web.de

### Studium

06/2003 – 12/2006 Promotion am Institut für Biochemie und Molekularbiologie,  
Universitätsklinikum Aachen

Promotionsstipendium der Rheinisch-Westfälischen-  
Technischen-Hochschule Aachen (RWTH-Aachen)

04/2002 – 05/2003 Diplomarbeit am Institut für Molekulare Biotechnologie,  
RWTH-Aachen in Kooperation mit der Firma PAION

10/1996 – 05/2003 Biologie Studium an der RWTH-Aachen

10/1995 – 09/1996 Maschinenbau Studium an der RWTH-Aachen

### Schule

09/1985 – 05/1995 Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium in Köln

09/1981 – 07/1985 Grundschule in Köln-Mülheim

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Pandithage R., Lilischkis R, Jedamzik B., Lasonder E., Knöll B., Lüscher R.  
Regulation of SIRT2 function by Cyclin-dependent kinases affects cell adhesion, neurite outgrowth and growth cone collapse. Eingereicht bei *Genes & Development* (02.2007).

### Posterpräsentation

Kai Volker Harting, Ruwin Pandithage, Bernhard Lüscher and Bernd Knöll.  
The histone deacetylase SIRT2 in neurite outgrowth and axon guidance.  
Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2007.

## Danksagung

Prof. Dr. Bernhard Lüscher möchte ich für die interessante Themengebung, die Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit, für seine Diskussionsbereitschaft, den ansteckende Optimismus und das Engagement danken.

PD. Dr. Christoph Peterhänsel danke ich für die Übernahme des Ko-Referats.

PD. Dr. Richard Lilischkis möchte ich für die gute Betreuung und die Unterstützung danken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie des Instituts für Biochemie an der Uniklinik Aachen möchte ich für die angenehme Atmosphäre, Freundlichkeit und ständige Hilfsbereitschaft danken, insbesondere den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lüscher, Poornima Basavarajaiah, Ulrike Bongers, Gabi Lützeler, Isabella Gawlista, Andrea Graf, Nadine Hein, Kan Jiang, Karsten Kapelle, Dr. Juliane Lüscher-Firzlaff, Marcel Robbertz, Alexandra Neuss, Henning Schuchlantz, Vera Schuhmacher, Stefanie Speckgens, Jürgen Stahl, Angelika Szameit, Hubert Szameit, Aleksandra Velkova.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Freunden für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Meiner spanischen Blume Danke ich für das Lachen und die Unterstützung.