

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Department Chemie

Lehrstuhl für Biotechnologie

Auswirkungen des alternativen Spleißens auf humane Sirtuine und α -Kristalline

Waldemar Preis

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Kathrin Lang

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

2. Univ.-Prof. Dr. Michael Sattler

Die Dissertation wurde am 23.02.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 19.04.2017 angenommen.

Für meine Familie und Corinna

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	5
2.1	Alternatives Spleißen	5
2.1.1	Die posttranskriptionelle Spleißmaschine – Das Spleißosom	7
2.1.2	Typen des alternativen Spleißens	12
2.2	Sirtuine als Deacylasen	14
2.3	α-Kristallin	22
3	Zielsetzung.....	31
4	Material und Methoden	33
4.1	Geräte und Materialien	33
4.1.1	Geräte.....	33
4.1.2	Chemikalien.....	35
4.1.3	Enzyme, Lösungen, Standards und Kits	37
4.1.4	Verbrauchsmaterial.....	38
4.1.5	Primer und Peptide	39
4.1.6	Bakterienstämme und Zelllinien.....	41
4.1.7	Medien und Antibiotika für die <i>E. coli</i> - und Zellkultur	42
4.1.8	Chromatographische Materialien	42
4.1.9	Datenbanken, Software und Onlinewerkzeuge	43
4.2	Molekularbiologische Methoden	44
4.2.1	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	44
4.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	44
4.2.3	Restriktionsverdau	45
4.2.4	Agarosegelelektrophorese	46
4.2.5	Ligation.....	47
4.2.6	Klonierungen	47
4.2.7	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	48

4.2.8	Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	49
4.3	Zellkultur.....	50
4.3.1	Haltung eukaryotischer Zellen	50
4.3.2	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	50
4.3.3	Herstellung von Zellysaten eukaryotischer Zellen.....	51
4.4	Proteinchemische Methoden.....	51
4.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	51
4.4.2	Westernblot	53
4.4.3	Expressionstests	54
4.4.4	Proteinexpression und -reinigung.....	55
4.4.5	Konzentrationsbestimmung der Proteine	60
4.5	Spektroskopische Methoden.....	61
4.5.1	UV/VIS-Spektroskopie	61
4.5.2	Fluoreszenzspektroskopie	61
4.5.3	Circulardichroismusspektroskopie	62
4.6	Quartärstrukturanalysen.....	63
4.6.1	Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC).....	63
4.6.2	<i>Multi angle light scattering</i> (MALS)	64
4.6.3	Analytische Ultrazentrifugation	65
4.7	Massenspektrometrie	66
4.7.1	Native Massenspektrometrie	66
4.7.2	HDX-Massenspektrometrie.....	66
4.8	Bioinformatische Methoden.....	67
4.8.1	Sekundärstrukturvorhersagen.....	67
4.8.2	Alignments	67
4.9	Funktionsanalysen	68
4.9.1	Thermische Stabilitätsuntersuchungen.....	68
4.9.2	Demyristoylierungsassay	68
4.9.3	Aggregationsassays	69
5	Ergebnisse	71
5.1	Klonierungen.....	71

5.2	Spleißvarianten von Sirtuin 2 und 5	73
5.3	Sirtuin 6	76
5.3.1	Die Genstruktur von Sirtuin 6	76
5.3.2	Expressionsanalysen und Konservierung von Sirtuin 6	76
5.3.3	Sequenzvergleich, Expression und Reinigung von Sirt6.....	79
5.3.4	Strukturelle Charakterisierung von Sirt6.....	84
5.3.4.1	Faltungszustand von Sirt6	84
5.3.4.2	Stabilitätsuntersuchung von Sirt6	87
5.3.4.3	Proteindynamik und Lösungsmittelzugänglichkeit	89
5.3.4.4	Bindung von Metallionen durch Sirt6.....	92
5.3.5	Funktionelle Analyse von Sirt6	93
5.4	α-Kristallin	97
5.4.1	Die Genstruktur von α A-Kristallin.....	97
5.4.2	Expressionsanalysen und Konservierung von α A-Kristallin.....	98
5.4.3	Die Genstruktur von α B-Kristallin	100
5.4.4	Expressionsanalysen und Konservierung von α B-Kristallin.....	101
5.4.5	Sequenzvergleich, Expression und Reinigung der α -Kristalline.....	103
5.4.6	Strukturelle Charakterisierung von α A-Kristallin	108
5.4.6.1	Faltungszustand von α A-Kristallin	108
5.4.6.2	Die Quartärstruktur von α A-Kristallin.....	112
5.4.7	Funktionelle Analyse von α A-Kristallin	115
5.4.7.1	Die Chaperonaktivität von α A-Kristallin Isoform 2	115
5.4.7.2	Heterooligomerbildung mit den kanonischen Isoformen.....	117
5.4.7.3	Einfluss auf die Chaperonaktivität der kanonischen Isoformen.....	120
6	Diskussion.....	123
7	Abkürzungsverzeichnis	133
8	Literaturverzeichnis	137
9	Anhang.....	161
10	Veröffentlichungen	163
11	Danksagungen.....	165
12	Eidesstattliche Erklärung	167

1 Zusammenfassung

Das prä-mRNA-Spleißen ist besonders weit verbreitet in höheren Eukaryoten wie dem Menschen, bei dem nahezu alle Gene alternativ gespleißt sind. Dadurch entsteht eine Vielzahl zusätzlicher Transkripte und Proteine die von der Menge weit über die Anzahl der Gene eines Organismus hinaus gehen und zur Diversität des Proteoms beitragen. In dieser Arbeit wurde der Effekt des alternativen Spleißens auf die sehr verschiedenartigen Proteinfamilien der humanen Sirtuine und α -Kristalline untersucht. Sirtuine sind NAD^+ -abhängige Deacylasen, während α -Kristalline Teil des Proteostasenetzes sind und über ihre Chaperonaktivität anfällige Proteine vor irreversibler Aggregation bewahren.

Für Sirt2, Sirt5 und Sirt6 und auch für α A- und α B-Kristallin wurden mehrere potentielle alternative Spleißvarianten identifiziert. Für jedes der Proteine wurden neben der kanonische Isoform auch weitere Transkriptvarianten nachgewiesen und Expressions- und Reinigungsversuche unternommen. Als stabile und lösliche Proteine konnten Sirt6 Isoform 1 und 2, sowie α A-Kristallin Isoform 1, 2 und SV153 erhalten werden. Sirt6 Isoform 2 zeigte eine hohe Konservierung zu vorhergesagten Proteinen aus Primaten, wobei für die alternativen α -Kristallin-Isoformen einige wenige vergleichbare Proteine in anderen Spezies auftraten. Sirt6 Isoform 2 fehlt die Helix $\alpha 6$, die Teil der NAD^+ -bindenden Rossmann-Faltungs-Domäne ist und der $\beta 6$ -Stang der zum Zinkbindemotiv gehört. Beides sind hochkonservierte Abschnitte in humanen Sirtuinen. Fluoreszenzmessungen zeigten Unterschiede zwischen Sirt6 Isoform 1 und 2, welche durch ein fehlendes Tryptophan in der Isoform 2 ausgelöst werden könnten. Andererseits wiesen CD-Spektren auf eine große Ähnlichkeit hinsichtlich der Anteile von Sekundärstrukturelementen hin. Aus ihnen kann auf eine Mischung aus α -helikalen und β -Faltblattstrukturen geschlossen werden. Über Vergleiche mit CD-Messungen von Proteinen, die einen deletierten C-Terminus aufwiesen, wurde gezeigt, dass der in publizierten Kristallstrukturen nicht aufgelöste C-Terminus vornehmlich einen β -Faltblattcharakter aufweist. Die Analyse der thermischen Stabilität, zeigte, dass Sirt6 Isoform 2 eine zum Teil höhere thermische Toleranz aufweist als die kanonische Isoform. HDX-Messungen erwiesen hochflexible C-terminale Regionen in beiden Sirt6 Isoformen. Der HD-Austausch beider Isoformen war vergleichbar, was ähnliche konformationelle Dynamik andeutet. Einige Regionen der Rossmann-Faltungs-Domäne

sowie das Zinkbindemotiv zeigten unterschiedliche Deuteriumaufnahmen auf. Nativ-MS-Messungen zeigten, dass Sirt6 Isoform 1 ein Zinkion koordiniert, während Isoform 2 dies nicht tut, was durch das Fehlen eines Teils des Zinkbindemotivs hervorgerufen werden könnte. Obwohl Sirt6 Isoform 2 für die Bindung von Substraten wichtige Abschnitte fehlen, war es, wie auch Isoform 1, in der Lage das Substratpeptid H3K9Myr zu binden. Dennoch konnte es in einem Aktivitätstest eben dieses nicht deacylieren. Dies konnte nur durch Sirt6 Isoform 1 erreicht werden.

α A-Kristallin Isoform 2 und SV153 entstehen, wenn das erste Exon das zur kanonischen Isoform gehört, durch kürzere alternative Varianten ersetzt wird. Dies führt auf Proteinebene zu Proteinen die gänzlich andere und kürzere N-terminalen Sequenzen (NTS) besitzen. Dadurch nimmt im Vergleich zur Isoform 1 der Anteil positiver Ladungen deutlich zu, wobei die theoretische Hydrophobizität nahezu unverändert bleibt. α A-Kristallin Isoform 2 zeigte ein ähnliches CD-Spektrum zu α A- und α B-Kristallin Isoform 1 und lässt damit einen hohen Anteil an β -Faltblättern erkennen. Sekundärstrukturvorhersagen deuteten für alle drei α A-Kristallin-Isoformen auf helikale Elemente in der NTS hin. SV153 bildete extrem große Oligomere bzw. Aggregate, wohingegen α A-Kristallin Isoform 2 in einem konzentrationsabhängigen Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren auftrat. α A-Kristallin Isoform 2 besaß im Vergleich zur Isoform 1 nur eine sehr geringe Chaperonaktivität. Es verringerte in Mischungen mit den kanonischen α -Kristallinen die Oligomergroße und führte zu einer Verstärkung der Chaperonaktivität, was einen modulierenden Effekt auf das α -Kristallin-Ensemble und die Chaperonaktivität verdeutlicht.

Summary

Pre mRNA splicing is particularly prevalent in higher eukaryotes such as humans, in which nearly all genes undergo alternative splicing. Through this a multitude of additional transcripts and proteins is generated, which go way above the number of genes of an organism. This contributes to the diversity of the proteome. Here the effect of alternative splicing on the distinct protein families of human Sirtuins and α -crystallins was examined. Sirtuins are NAD⁺-dependent deacylases, while α -crystallins are part of the proteostasis network and through their chaperone activity protect vulnerable proteins from irreversible aggregation.

Several potential alternative splice variants were identified for Sirt2, Sirt5, Sirt6 as well as for α A- and α B-crystallin. Apart from the canonical isoforms for each of the proteins further

transcript variants were verified. The expression and purification of these were attempted. Sirt6 isoform 1 and 2 as well as α A-crystallin isoform 1, 2 and SV153 were obtained as stable and soluble proteins. Sirt6 isoform 2 displayed a high conservation to predicted proteins from primates. For the alternative α -crystallin isoforms only a few similar proteins were found in other species. Sirt6 isoform 2 lacks helix α 6, which is part of the NAD⁺ binding rossmann fold domain, as well as the β 6 strand of the zinc binding motif. Both are highly conserved segments of human Sirtuins. Fluorescence measurements showed differences between Sirt6 Isoform 1 and 2, which could be explained with the absence of a tryptophan in isoform 2. On the other hand, CD spectra indicated a high similarity regarding the amount of secondary structure elements. Hence, a combination of α -helikal and β -strain structures can be concluded. Comparing the CD measurements of proteins with deleted C-termini, it was shown that the C-terminus, which is not resolved in the published structures has mainly β -strain character. Analysis of the thermal stability showed that Sirt6 isoform 2 has a partly higher thermal tolerance compared to the canonical isoform. HDX measurements revealed a highly flexible C-terminal region in both Sirt6 isoforms. The HD exchange of both isoforms was comparable, which indicates similar conformational dynamics. Certain regions in the rossmann fold domain as well as the zinc binding motif displayed different deuterium uptakes. Native-MS measurements revealed that Sirt6 isoform 1 coordinates a zinc ion, while isoform 2 does not. This could be due to the absence of parts of the zinc binding motif. Despite Sirt6 isoform 2 lacking regions important for the binding of the substrate, it was still able to bind the substrate peptide H3K9Myr. This was also true for Sirt6 isoform 1. Nevertheless, it failed to deacylate the very same peptide, which isoform 1 was capable of.

α A-crystallin isoform 2 and SV153 result from the substitution of the first exon of the canonical isoform by shorter alternative variants. This yields proteins with completely different and shortened N-terminal sequences (NTS) on protein level. As a result, compared to isoform 1 the ratio of positive charges increases significantly, whereas the hydrophobicity nearly remains the same. The CD spectrum of α A-crystallin isoform 2 has a high similarity to the spectra of α A- and α B-crystallin isoform 1. This indicates a high ratio of β -strains. Secondary structure predictions for all three α A-crystallin isoforms point to helikal elements in the NTS. SV153 consists of extremely large oligomers or aggregates. On the other hand, α A-crystallin isoform 2 exists in a concentration dependent equilibrium of monomers and dimers. α A-crystallin isoform 2 showed only a minor chaperone activity compared to isoform 1. In mixtures with the canonical α -crystallins it decreased the size of oligomers and

increased the chaperone activity, which reveals a modulating effect on the α -crystallin ensemble and the chaperone activity.

2 Einleitung

2.1 Alternatives Spleißen

Eine der wichtigsten Entdeckungen in der Molekularbiologie war die, dass insbesondere eukaryotische Gene diskontinuierlich sind. Kodierende DNA-Abschnitte werden dabei durch nicht-kodierende Sequenzen unterbrochen, welche aus dem prä-mRNA-Transkript durch die Ansammlung von *small nuklear RNAs* (snRNAs) entfernt werden müssen, um zur reifen mRNA zu gelangen (Matera und Wang 2014).

In den späten 70er Jahren wurde das alternative Spleißen bei Adenoviren entdeckt, die Säugetierzellen infizieren und sich in ihnen vermehren. Dabei wurde ein Vergleich zwischen genomischer und mRNA-Sequenz hergestellt und es fiel auf, dass mRNA-Moleküle Sequenzen von nicht benachbarten Abschnitten des viralen Genoms aufwiesen. Diese wurden als „*mosaics*“ bezeichnet (Chow *et al.* 1977; Berget *et al.* 1977; Clancy 2008). Kurze Zeit später wurde bewiesen, dass auch eukaryotische mRNAs aus langen Primärtranskripten entstehen (Darnell 1978). Sie wiesen ebenfalls Nukleotidsequenzen auf, die nicht zusammenhängenden genomischen Abschnitten entsprachen. Unter anderem wurde dies früh für die mRNAs von Hämoglobin (Tilghman *et al.* 1978; Jeffreys und Flavell 1977), Immunoglobulin (Gilmore-Hebert und Wall 1978; Brack und Tonegawa 1977; Tonegawa *et al.* 1978), Ovalbumin (Weinstock *et al.* 1978; Breathnach *et al.* 1977) und weiteren Proteinen (Goldberg *et al.* 1977; Giorno und Sauerbier 1978) gezeigt. Nahezu alle Transkripte von Säugetieren durchliefen diesen Prozess, der als prä-mRNA-Spleißen bezeichnet wurde. Lediglich kurze Abschnitte der Primärsequenz wurden als Exons zusammengefügt und im Anschluss als reife mRNA in das Cytosol exportiert. Der größte Teil des Primärtranskripts verbleibt jedoch als zusammengefügte Introns (*intragenic region* Gilbert 1978) im Nukleus und wird dort degradiert. Heute wird angenommen, dass die große Mehrheit der prä-mRNAs mehrere Exons besitzen. Diese können in die reife mRNA eingebaut, aber auch aus ihr entfernt sein. Dies wird als alternatives Spleißen bezeichnet (Kelemen *et al.* 2013). Das konstitutive Spleißen liegt hingegen vor, wenn die Introns entfernt und alle Exons zusammengefügt werden (Stamm *et al.* 2012). Durch das alternative Spleißen können aus einem Gen mehrere Transkripte entstehen, die in mehrere, sich unterscheidende Proteine translatiert werden können. Die Präsenz des alternativen Spleißens wird vor allem durch

expressed sequence tags (EST) und cDNA Sequenzen (Harrow *et al.* 2012), sowie Microarray-Daten (Sanchez-Pla *et al.* 2012) und RNA-Sequenzierungen (Uhlen *et al.* 2015; Juntawong *et al.* 2014) unterstützt (Tress *et al.* 2017). Zudem gehen aktuelle Schätzungen, die auf RNA- und EST-cDNA-Sequenzierungen beruhen, davon aus, dass ~95 % (Wang *et al.* 2008; Pan *et al.* 2008) der Transkripte von Multi-Exon-Genen des Menschen und ~60 % (Graveley *et al.* 2010) der Transkripte von Multi-Exon-Genen von *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) alternativ gespleißt werden. Dabei sind beim Menschen ~94 % aller Gene Multi-Exon-Gene (Wang *et al.* 2008). Ferner unterliegen in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) etwa ein Viertel aller Gene dem alternativen Spleißen (Gerstein *et al.* 2010; Ramani *et al.* 2011). Damit ist der Prozess des alternativen Spleißens in höheren Eukaryoten stärker ausgeprägt als in niederen. Zudem ist er in Wirbeltieren häufiger vorzufinden als in Wirbellosen (Artamonova und Gelfand 2007; Alekseyenko *et al.* 2007). Das alternative Spleißen ist ein ubiquitärer Prozess in Eukaryoten, kommt jedoch auch in niederen Metazoen sowie in Fungi (Okazaki 2000; Yatzkan und Yarden 1999; Ebbole *et al.* 2004; Loftus *et al.* 2005) und Protozoen wie *Dictyostelium discoideum* (Escalante *et al.* 2003) vor. Jedoch ist das alternative Spleißen in diesen Spezies selten (Kim *et al.* 2008). Auch Pflanzen zeigen einen hohen Anteil an alternativem Spleißen von Multi-Exon-Genen (Zhang *et al.* 2010; Guo *et al.* 2010; Zenoni *et al.* 2010). Für *Arabidopsis thaliana* wurden ein Anteil von ~61 % gefunden (Marquez *et al.* 2012). Durch die Genom-Annotations-Projekte GENCODE (Harrow *et al.* 2012) und RefSeq (Pruitt *et al.* 2014) wurden in den letzten Jahren immer mehr alternativ gespleißte Transkripte vorhergesagt. GENCODE (Version 25) enthält danach über 80000 proteinkodierende Transkripte für den Menschen. Andere Studien gehen von deutlich mehr aus. Kürzlich wurden etwa 205000 Transkripte mit proteinkodierendem Potential gefunden (Hu *et al.* 2015). Bei den etwa 20000 (GENCODE Version 25) proteinkodierenden Genen des Menschen wären das durchschnittlich mehr als 4 kodierende Transkripte und damit Spleißvarianten pro Gen.

Ein extremes Beispiel für das alternative Spleißen wurde in *D. melanogaster* gefunden. Das *Down syndrom cell adhesion molecule* (*Dscam*) zeigte 38016 unterschiedliche mRNA-Isoformen (Schmucker *et al.* 2000). Dies übersteigt selbst die Gesamtzahl aller Gene der Fliege, die etwa 13600 beträgt (Adams *et al.* 2000).

Auf Proteinebene sind die Spleißvarianten jedoch weniger gut z. B. massenspektrometrisch (MS) nachweisbar (Tress *et al.* 2017). Limitierend ist hier, dass die Falsch-negativ-Rate unbekannt ist. Eine spezielle Isoform könnte zu einer bestimmten Zeit, in einem bestimmten Gewebe oder einem experimentellen Aufbau nicht exprimiert sein oder die Peptide, die die

alternative von der kanonischen Isoform unterscheiden, sind schwer über MS nachweisbar (Blakeley *et al.* 2010). Dies führte zu einer kontroversen Debatte über den Anteil der stabil gefalteten Proteine (Hao *et al.* 2015).

Interessanterweise werden auch immer mehr nicht-kanonische Spleißvorgänge gefunden. Dazu gehören kryptische Spleißstellen, die weit entfernt zum annotierten Exon liegen, und unkonventionelle Mechanismen, die von den klar definierten Regeln des Spleißens abweichen. Dadurch entstehen nach Sibley *et al.* (Sibley *et al.* 2016) u. a. kryptische Exons (Jangi *et al.* 2014; Eom *et al.* 2013; Zarnack *et al.* 2013; Ling *et al.* 2015; Yan *et al.* 2015), Mikroexons (Wu *et al.* 2013; Irimia *et al.* 2014; Li *et al.* 2015b), rekursives Spleißen (Sibley *et al.* 2015; Duff *et al.* 2015), zirkuläre RNAs (*circular RNAs*, *circRNAs*) (Hansen *et al.* 2013; Memczak *et al.* 2013; Salzman *et al.* 2012; Danan *et al.* 2012; Chen 2016), beibehaltene Introns (Braunschweig *et al.* 2014; Yap *et al.* 2012; Boutz *et al.* 2015; Wong *et al.* 2013; Marquez *et al.* 2012) und exonische Introns (Exitrons) (Marquez *et al.* 2012; Marquez *et al.* 2015).

Das alternative Spleißen kann zu dem kompletten Verlust der Funktion führen oder aber zum Gewinn einer neuen Funktion. In der Mehrheit der Fälle, die beschrieben wurden, wurden leichte funktionelle Modulationen vorhergesagt (Hao *et al.* 2015). Strukturinformationen sind bis heute jedoch sehr rar. 2010 waren bei ~4000 humanen Proteinen in der *Protein Data Bank* (PDB) nur 14 Strukturen von mindestens zwei alternativen Isoformen bekannt (Hegyí *et al.* 2011). Dennoch wurde vorhergesagt, dass etwa ein Drittel der durch den Vorgang des *Exon-Skippings* entstehenden alternativen Isoformen stabile Proteine bilden (Hao *et al.* 2015). Das alternative prä-mRNA-Spleißen ist damit essentiell für die strukturelle und funktionelle Diversität von Proteinen in höheren Eukaryoten. Es leistet damit einen signifikanten Beitrag zur Komplexität des humanen Proteoms und zur phänotypischen Heterogenität (Lander *et al.* 2001; Johnson *et al.* 2003; Nilsen und Graveley 2010). Man fand zudem heraus, dass etwa die Hälfte der Spleißvorgänge hochkonservierte und strukturierte Bereiche betreffen, was als nicht-triviales Spleißen bezeichnet wird (Birzele *et al.* 2007).

2.1.1 Die posttranskriptionelle Spleißmaschine – Das Spleißosom

Das Spleißen (*splicing*) tritt auf, wenn aus intronhaltiger prä-mRNA, prä-tRNA oder prä-rRNA die Introns entfernt und die Exons aneinandergesetzt werden. Ein Sonderfall sind hier

die Gruppe-I- und Gruppe-II- Introns. Sie benötigen *in vitro* kein Spleißosom und sind selbstspleißend. Aus diesem Grund werden sie auch als Ribozyme bezeichnet. *In vivo* wird dies jedoch häufig durch Proteine unterstützt, die sie zum Teil selbst codieren (Bonen und Vogel 2001). Gruppe-I-Introns können unter Anwesenheit von Guanodin als Cofaktor das Spleißen über zwei gekoppelte Umesterungen durchführen (Nielsen und Johansen 2014). Gruppe-II-Introns sind hingegen Guanodin-unabhängig (Lehmann und Schmidt 2003; Bonen und Vogel 2001).

Das Spleißen von mRNA ist ein sehr komplexer Vorgang und findet in den meisten Fällen an einem großen Komplex aus RNA und Proteinen statt, dem Spleißosom. Dagegen sind die chemischen Vorgänge beim Spleißen einfach. Die Phosphodiesterbindung an der 5'-Spleißstelle (SS) zwischen dem stromaufwärts liegenden Exon 1 und dem 5'-Ende des Introns wird durch den Angriff des 2'OH eines Adenylatrests an der Verzweigungsstelle gespalten (**Abbildung 1**). Es entsteht eine neue 2',5'-Phosphodiesterbindung zwischen Adenosin und dem terminalen 5'-Phosphat des Introns (1. Umesterung). Dadurch wird eine Verzweigung (*branch*) bzw. eine intermediäre Lassostruktur (*Lariat*) gebildet. Anschließend greift das 3'OH von Exon 1 das Phosphat der Phosphodiesterbindung zwischen Intron und Exon 2 an (2. Umesterung). Daraus entsteht eine Verknüpfung von Exon 1 und 2. Das Intron

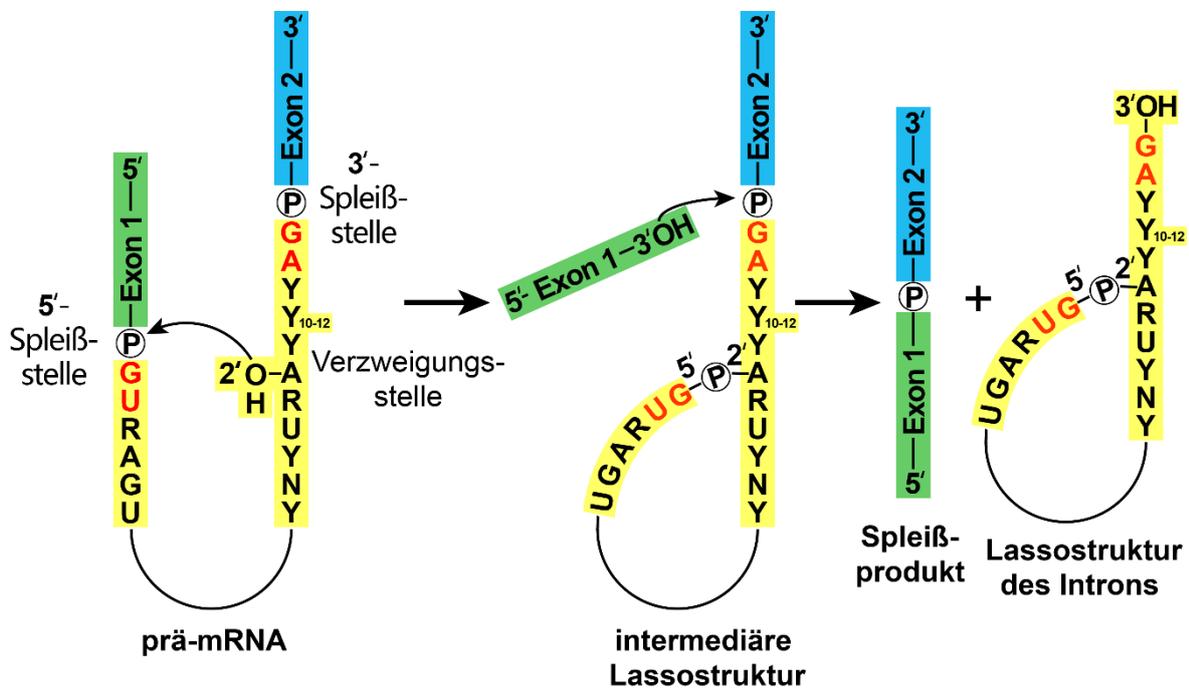


Abbildung 1: Der Spleißmechanismus von prä-mRNA. Das (5') stromaufwärts liegende Exon 1 ist grün, das stromabwärts liegende Exon 2 blau und das Intron gelb dargestellt. Die Sequenzen entsprechen Wahl *et al.* (2009). Rot markierte Nukleotide stellen häufige Anfangs- und Endsequenzen von Introns dar. Y bezeichnet ein Pyrimidin-, R ein Purin- und N ein beliebiges Nukleotid. Y₁₀₋₁₂ stellt den Polypyrimidintrakt dar.

wird in einer Lassoform freigesetzt. Dies wurde zusammengefasst nach Stryer Biochemie S. 942-943 (Berg *et al.* 2007).

Im Folgenden wird u. a. nach Wahl *et al.* (Wahl *et al.* 2009) zusammengefasst. Erst die reife mRNA wird aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert und dort von den Ribosomen als Matrize zur Bildung von Proteinen eingesetzt. Zusammengesetzt wird das Spleißosom aus über 100 Proteinen und fünf kleinen RNA-Molekülen, den *small nuclear RNAs* (snRNAs). Damit ist das Spleißosom ein riesiger proteinreicher Komplex. RNA und Proteine lagern sich in Subkomplexen zusammen, die als *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNP) U1, U2, U4/U6 und U5 bezeichnet werden. Die Spleißosomen sind keine fest vorgefertigten Maschinen. Sie werden vielmehr auf jedem zu spleißenden Intron aus ihren Bausteinen von neuem aufgebaut. Die 5'- und 3'-SS, sowie die Verzweigungsstelle, sind essentiell für die Festlegung der Spleißstelle. Selbst eine Verschiebung um ein Nukleotid würde das Leseraster verschieben und zu einer völlig anderen Aminosäuresequenz führen. Zudem variieren Introns in der Länge von 50 bis 10000 Nukleotiden, sodass das Spleißosom mehrere Tausend Nukleotide entfernt voneinander liegende Enden verknüpfen muss (Berg *et al.* 2007). Dies wird u. a. durch die große Zahl an Untereinheiten des Spleißosoms gewährleistet. Die Erkennungssequenzen der 5'-SS, der Verzweigungsstelle (*branch point sequence*, BPS), sowie der 3'-SS sind durch sehr kurze Konsensuselemente wiedergegeben (**Abbildung 2 A**). Diese sind in Metazoen nur wenig konserviert. Dadurch besitzen diese Elemente im Gegensatz zu den selbstspleißenden Gruppe-II Introns, auch nur wenig konsistente Sekundär- und Tertiärstrukturen. Somit werden *trans*-wirkende Faktoren benötigt.

Der Vorgang beginnt mit der ATP-unabhängigen Basenpaarbindung des 5'-Endes des snRNPs U1 an die 5'-SS des Introns. Diese Interaktion wird in höheren Eukaryoten durch Serin/Arginin-reiche Proteine stabilisiert. Zusätzlich bindet das SF1/BBP-Protein und der U2-Hilfsfaktor (U2 *auxiliary factor*, U2AF), welcher als Heterodimer aus dem 65 kDa schweren U2AF65 und dem kleineren U2AF35 besteht, an die BPS und den Polypyrimidintrakt stromabwärts der BPS (**Abbildung 3 oben**). Dabei bindet U2AF35 an das AG-Dinukleotid der 3'-SS. Dieser Vorgang, aus dem der E-Komplex hervorgeht, ist entscheidend für die initiale Erkennung der 5'- und 3'-SS eines Introns. Anschließend wird der A-Komplex gebildet, indem die U2 snRNA ATP-abhängig eine Basenpaarung mit der BPS eingeht. Dabei ersetzt U2 den SF1/BBP-Komplex an der BPS (**Abbildung 3 unten**). U4/U6 bilden zusammen mit U5 den vorassemblierten tri-snRNP-Komplex U4/U6.U5. Dieser kann nach Bildung des A-Komplexes binden und den B-Komplex entstehen lassen

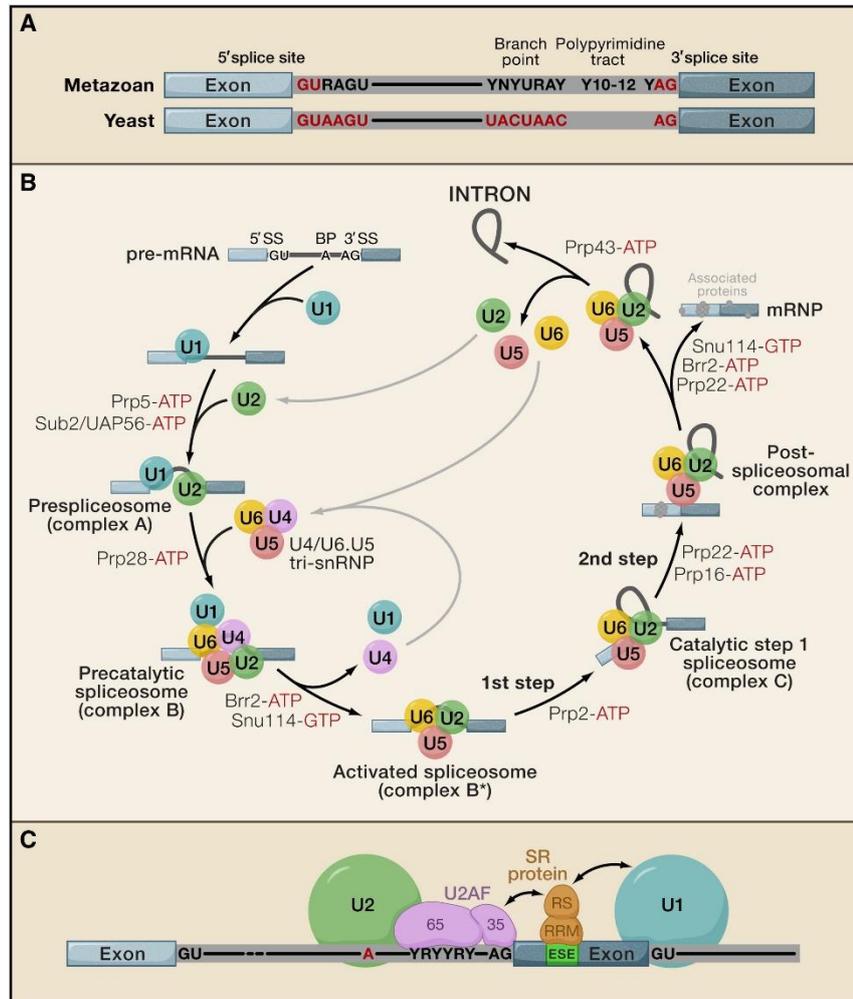


Abbildung 2: Prä-mRNA-Spleißen durch das Hauptspleißosom. **A** zeigt die konservierten Sequenzelemente von Metazoen- und Hefe-prä-mRNAs. Zwei Exons (blau) sind durch ein Intron (grau) getrennt. Die Konsensussequenz an der 5'-SS, dem Verzweigungspunkt (BPS) und der 3'-SS sind wie angegeben, wobei N ein beliebiges Nukleotid, R ein Purin- und Y ein Pyrimidinnukleotid ist. Der Polypyrimidintrakt ist ein pyrimidinreicher Abschnitt zwischen BPS und 3'-SS. **B** stellt den *Cross*-Intron-Assemblierungs- und Disassemblierungszyklus des Hauptspleißosoms dar. Die stufenweise Interaktion der spleißosomalen snRNPs (farbige Kreise) beim Entfernen eines Introns von einer prä-mRNA mit zwei Exons (blau) ist abgebildet. Nur die spleißosomalen Komplexe, die biochemisch in Säugetierspleißextrakten aufgelöst werden konnten, sind gezeigt. Acht evolutionär konservierte DexD/H-Typ-RNA-abhängige ATPasen/Helikasen wirken an spezifischen Stellen im Spleißzyklus und katalysieren RNA-RNA-Umlagerungen und RNP-Umformungen. Dazu gehören Sub2 (UAP56 beim Menschen), Prp5, Prp28, Brr2, Prp2, Prp16, Prp22 und Prp43 (Brr2 und Prp22 agieren mehr als einmal im Zyklus). Die GTPase Snu114 kommt ebenfalls mehrmals im Zyklus zum Einsatz. Mehrere der Proteine wie Prp5, Prp16 und Prp22 haben an den abgebildeten Stellen zudem eine Korrekturlesefunktion. **C** zeigt den *Cross*-Exon-Spleißkomplex, der bei langen Introns an den frühesten Stellen der Spleißosomassemblierung gebildet wird. Ein SR-Protein mit einer Serin/Arginin-reichen Domäne und einer RRM (RNA-Erkennungsmotiv, RNA recognition motif) interagiert mit einem exonischen Spleißverstärker (*exonic splicing enhancer*, ESE). U1 (blau), U2 (grün) und die zwei Untereinheiten des U2-Hilfsfaktors (U2AF) U2AF65 und U2AF35 interagieren ebenfalls mit den Spleißstellen, die das Exon flankieren. Abbildung adaptiert nach Wahl *et al.* (2009) mit Erlaubnis von Elsevier.

(Abbildung 2 B). Doch obwohl alle snRNPs gebunden sind, ist dieser Komplex noch

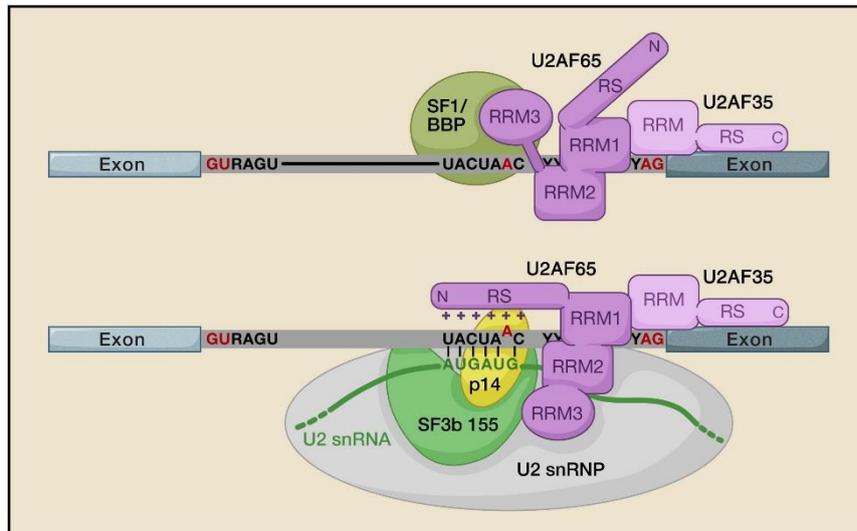


Abbildung 3: Molekulare Interaktionen an der Verzweigungsstelle und der 3'-SS in dem spleißosomalen E- und A-Komplex. Oben ist der E-Komplex abgebildet, bei dem die Verzweigungsstelle der prä-mRNA (Exons blau, Introns grau) durch SF1/BBP gebunden ist. Der Polypyrimidintrakt und die 3'-SS sind durch die U2AF-Untereinheiten U2AF65 und U2AF35 gebunden. Unten ist gezeigt, wie durch die stabile Bindung des U2 snRNP während der Bildung des A-Komplexes SF1/BBP ersetzt wird. Das U2-assoziierte Protein p14 kann dadurch die BPS binden und U2AF65 kann mit SF3b155 interagieren. Abbildung adaptiert nach Wahl *et al.* (2009) mit Erlaubnis von Elsevier.

katalytisch inaktiv. Der aktivierte B*-Komplex entsteht, wenn U1 und U4 destabilisiert oder abgelöst werden. Der erste katalytische Schritt des Spleißens wird durchgeführt, was zur Bildung des C-Komplexes führt. Nach weiteren Umlagerungen kann der zweite katalytische Schritt durchgeführt werden (Konarska *et al.* 2006). Zudem werden die mRNA in Form einer mRNP, sowie die U2, U5 und U6 snRNPs abgelöst. Die snRNPs werden in weiteren Spleißvorgängen eingesetzt, während die zusammengefügteten Introns in ihrer Lassoform degradiert werden.

Die initiale Bindung des Spleißosoms über ein Intron tritt jedoch vor allem bei prä-mRNAs mit sehr kurzen Introns auf. Bei den in Metazoen häufiger auftretenden langen Introns sammeln sich die Komponenten des Spleißosoms an einem Exon (Exon-Definition (Berget 1995)). U1 erkennt dabei die stromabwärts liegende 5'-SS, U2AF und U2 snRNP binden den stromaufwärts liegenden Polypyrimidintrakt und die BPS (**Abbildung 2 C**). Über Interaktionen mit SR-Proteinen werden beide Seiten miteinander verbunden (*Cross-Exon-Interaktion*). Im Anschluss müssen die *Cross-Exon-Interaktionen* durch *Cross-Intron-Interaktionen* ersetzt werden, was jedoch noch ungenügend erforscht ist.

2.1.2 Typen des alternativen Spleißens

Es werden sieben verschiedene Typen des alternativen Spleißens unterschieden (**Abbildung 4**). Die Prävalenz der jeweiligen Typen unterscheidet sich zwischen den Spezies. Die Intronretention (**Abbildung 4 D**) kommt vor allem in Fungi und Protozoen vor, ist jedoch in Wirbeltieren und Wirbellosen die seltenste Form, bei welchen sie etwa 5 % ausmacht (Kim *et al.* 2007; Sugnet *et al.* 2004; Kim *et al.* 2008). Demgegenüber ist das *Exon Skipping* (**Abbildung 4 A**) mit ~40 % die häufigste Form des alternativen Spleißens in Vertebraten (jedoch nicht in Invertebraten) (Kim *et al.* 2007; Sugnet *et al.* 2004) und gleichzeitig die seltenste Form, falls nicht komplett fehlend, in Fungi und Protozoen (Kim *et al.* 2008). Hierbei wird ein Exon, welches als Kassettenexon bezeichnet wird, zusammen mit seinen flankierenden Introns entfernt (Keren *et al.* 2010). Pflanzen unterscheiden sich in dieser Hinsicht von Metazoen. Sie besitzen ein hohes Level an Intronretention, wohingegen *Exon Skipping* die seltenste Form des alternativen Spleißens ist (Kim *et al.* 2007; Ner-Gaon *et al.* 2004; Iida *et al.* 2004; Marquez *et al.* 2012; Guo *et al.* 2010). Da die relative Häufigkeit des *Exon Skippings* entlang des eukaryotischen Stammbaums leicht zunimmt, wird vermutet, dass dieser Typ besonders wichtig für die phänotypische Komplexität ist (Kim *et al.* 2008; Kim *et al.* 2007). Bei den alternativen 3'- und 5'-SS-Spleißvorgängen werden Teile der Exons an den jeweiligen Enden alternativ in die reife mRNA eingeschlossen oder entfernt (**Abbildung 4 B** und **C**). Es wird angenommen, dass diese einen intermediären Zustand zwischen dem konstitutiven und dem alternativen Kassettenexon darstellen (Koren *et al.* 2007). In höheren Eukaryoten machen alternative 3'-SS etwa 20 % und alternative 5'-SS ~8-20 % aus (Kim *et al.* 2007; Sugnet *et al.* 2004). Seltener vorkommende komplexe Vorgänge, die alternative Transkriptvarianten erzeugen, sind sich wechselseitig ausschließende Exons (*mutually exclusive exons*, **Abbildung 4 E**), die Nutzung alternativer Promotoren (**Abbildung 4 F**), sowie die alternative Polyadenylierung (**Abbildung 4 G**). Diese machen den restlichen Anteil des alternativen Spleißens aus (Kim *et al.* 2008; Ast 2004; Black 2003).

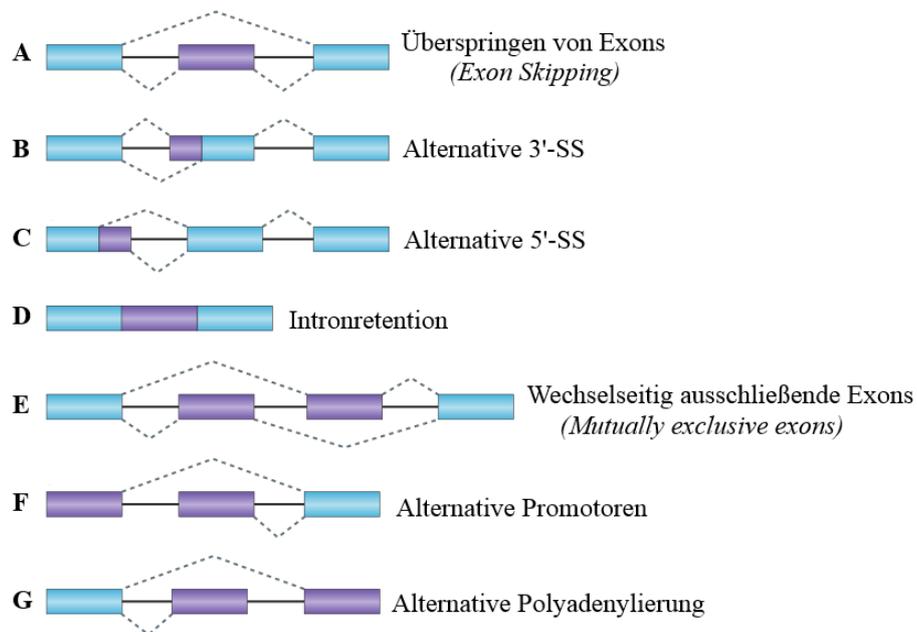


Abbildung 4: Es gibt sieben unterschiedliche Typen des alternativen Spleißens. Konstitutive Exons sind als blaue und alternative Exons als violette Rechtecke, Introns als durchgezogene Linien und Spleißoptionen als gestrichelte Linien dargestellt. **A** zeigt das *Exon Skipping* bei dem ein Kassettenexon mitsamt seinen benachbarten Introns entfernt wird. **B** und **C** zeigen alternative 3'- und 5'-SS, welche auftreten, wenn mehrere Spleißstellen an einer Exonseite erkannt werden. Bei der Intronretention in **D** verbleibt ein Intron in der reifen mRNA. Komplexere Vorgänge wie wechselseitig ausschließende Exons in **E**, alternative Promotornutzung in **F** und alternative Polyadenylierungen in **G** sind seltenere Formen. Abbildung adaptiert nach Keren *et al.* (2010) mit Erlaubnis von Nature Publishing Group.

2.2 Sirtuine als Deacylasen

Sirtuine sind evolutionär konservierte Nikotinadenindinukleotid (NAD⁺)-abhängige Lysin-deacylasen. Eine weitere Funktion, die sie besitzen, ist die einer ADP-Ribosyltransferasen. Dabei katalysieren sie die Co- und Posttranslationalen Modifikationen (PTM) sowohl von Histonen als auch von anderen Proteinen. Der Name Sirtuin geht auf Sir2 (*Silent-information regulator 2*) von *Saccharomyces cerevisiae* zurück (Rine *et al.* 1979), welches die Langlebigkeit von Hefezellen fördert und das Gen-Silencing beeinflusst (Imai *et al.* 2000). Der Mensch hat wie die meisten Vertebraten sieben Sirtuine (SIRT1-SIRT7), welche früh in der tierischen Evolution auftraten (Greiss und Gartner 2009). Sirtuine kommen nahezu ubiquitär vor. Sie wurden nicht nur in Tieren, sondern auch in Pflanzen, Bakterien und Archaea gefunden (Greiss und Gartner 2009). Sie sind u. a. wichtig für Energiemetabolismus, zelluläre Stressresistenz, genomische Stabilität, Alterung und Tumorentstehung (Finkel *et al.* 2009).

Sie gehören zu der Klasse III der Histondeacetylasen (HDAC) bzw. Lysin-deacetylasen (KDAC). Neueste Untersuchungen zeigen jedoch, dass sie eher als NAD-abhängige Deacylasen bezeichnet werden sollten, da sie die Amidbindung verschiedenster Reste hydrolysieren können (Li *et al.* 2015a). Sie unterscheiden sich von den anderen KDAC-Klassen u. a. darin, dass sie NAD⁺ als Cofaktor benötigen (Buler *et al.* 2016). Bei der katalytischen Hydrolyse der Amidbindung wird die Acylgruppe samt variierendem Rest R auf das 2'-OH der NAD⁺-Ribose übertragen. Deshalb konsumieren Sirtuine während der Katalyse NAD⁺ in stöchiometrischen Mengen und generieren dabei, abgesehen von dem deacylierten Substrat, Nikotinamid und acylierte ADP-Ribose als Nebenprodukte (**Abbildung 5 A**) (Sauve und Youn 2012). Verschiedene Sirtuine sind dabei in der Lage unterschiedliche Reste R zu erkennen und die Spaltung zu katalysieren (Bheda *et al.* 2016). Dazu gehören Acetyl-, Propionyl-, Butyryl-, Crotonyl-, Malonyl-, Succinyl-, Glutaryl-, Myristoyl- und Palmitoyl-Gruppen (Bheda *et al.* 2016). Bei der ADP-Ribosylierung wird die Übertragung der ADP-Ribose eines NAD⁺-Moleküls auf ein Zielprotein katalysieren (**Abbildung 5 B**). Die Übertragung geschieht vermutlich auf Arginin und die negativ geladenen Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure und auch hier entsteht als Nebenprodukt Nikotinamid (Fahie *et al.* 2009; Bheda *et al.* 2016). Nicht alle Sirtuine besitzen diese Funktion und bei denen die sie besitzen ist sie schwach ausgeprägt (Bheda *et al.* 2016). Vor kurzem wurde jedoch eine neue Klasse von Sirtuinen mit einer ausgeprägten und physiologisch relevanten ADP-Ribosyltransferase-Aktivität beschrieben. Sie wurde

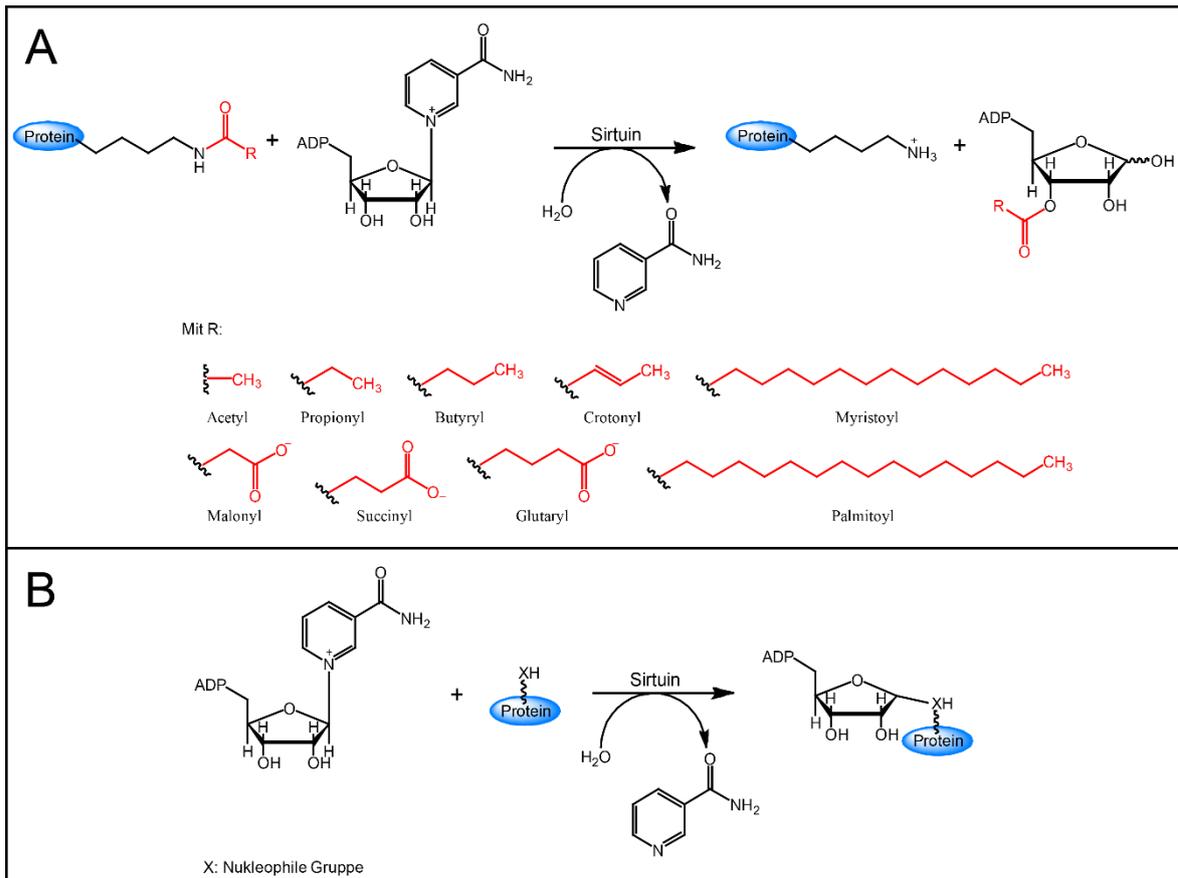


Abbildung 5: Durch die Deacylierung der ϵ -Aminogruppen der Lysine und ADP-Ribosylierung eines Substratproteins modifizieren Sirtuine die PTM (Bheda *et al.* 2016). **A zeigt die Deacylierungsreaktion die durch Sirtuine katalysiert wird. Die Reste R variieren unter den Sirtuinen. **B** stellt die ADP-Ribosylierungsreaktion eines Substratproteins mit nukleophiler Gruppe X (möglicherweise Arg oder Glu/Asp) durch Sirtuine dar.**

ausschließlich in bestimmten pathogenen Bakterien und Pilzen gefunden und wird als SirTM (M für mikrobielle Sirtuine) bezeichnet, ist jedoch abhängig von einer vorherigen Lipoylierung (Rack *et al.* 2015). Sequenz und Struktur der katalytischen Domänen weisen Ähnlichkeit zu anderen Sirtuinen auf, doch ist ein konserviertes Histidin zu Glutamin mutiert, welches wichtig ist für die ADP-Ribosylierungsreaktion (Rack *et al.* 2015). Die Umkehrung der Reaktion und damit die Spaltung der Bindung zur ADP-Ribose wurde durch bestimmte Proteine gefunden die Makrodomänen enthalten (Rosenthal *et al.* 2013; Jankevicius *et al.* 2013).

Alle Sirtuine besitzen eine konservierte katalytisch aktive Kernregion aus etwa 275 Aminosäuren. Dazu kommen variable N- und C-terminale Erweiterungen (*N-/C-terminal extensions*, NTE, CTE) die sich in der Länge und den Sequenzen unterscheiden. Es wird vermutet, dass sie regulierend wirken, Stellen für PTM besitzen und Andockregionen für die Bildung von Proteinkomplexen aufweisen (Flick und Luscher 2012; Feldman *et al.* 2012).

Die katalytische Kernregion besitzt eine große und strukturell homologe Rossmann-Faltungsmotiv, die wichtig für die Bindung von NAD⁺ ist. Hinzu kommt eine strukturell vielfältigere und kleinere Zinkbindedomäne (Feldman *et al.* 2012; Roy A. Frye 2000; Frye 1999). Beide Domänen sind durch Schleifen verbunden die eine ausgedehnte Kluft zwischen großer und kleiner Domäne bilden. Hier können NAD⁺ und das Substrat an das Enzym binden. Die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren und die reaktiven Gruppen beider Substratmoleküle sind eingebettet in einem Tunnel zwischen beiden Domänen. Hier tritt die höchste Sequenzkonservierung unter den Sirtuinen auf (Sanders *et al.* 2010).

Jedes der sieben Säugetier-Sirtuine hat eigene Funktionen und Substratproteine (**Tabelle 1**). Zudem unterscheiden sich die Lokalisationen. Sirt1 wurde sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma gefunden (Michishita *et al.* 2005). Ein Pendeln zwischen beiden Kompartimenten findet statt (Tanno *et al.* 2007). Sirt2 kommt hauptsächlich im Cytosol vor, doch wurde gezeigt, dass die Lokalisation vom Zellzyklus abhängig ist. Beim Übergang G₂/M in die Prophase tritt es im Zellkern am Chromatin auf (Michishita *et al.* 2005; Vaquero *et al.* 2006) und es besitzt eine nukleäre Exportsequenz (North und Verdin 2007). Sirt3, 4 und 5 sind hingegen mitochondriale Proteine (Michishita *et al.* 2005; Onyango *et al.* 2002; Schwer *et al.* 2002; Haigis *et al.* 2006). Interessanterweise wurde auch eine alternative Spleißvariante von Sirt5 in dieser Hinsicht untersucht (Matsushita *et al.* 2011). Sirt5 Isoform 2 (UniProt-Kennung: Q9NXA8-2) besitzt einen kürzeren C-Terminus der zusätzlich eine veränderte Sequenz aufweist (286-299: RFHFQGPCGTTLPE → SHLISISSLIINKN, 300-310 fehlen) und es wurde gezeigt, dass dies eine primaten-spezifische Isoform ist. Dabei wurde eine MTS (*mitochondrial targeting signal*) identifiziert, das beide Isoformen gemeinsam haben. Sirt5 Isoform 2 besitzt im Gegensatz zur Isoform 1 jedoch in seinem veränderten C-Terminus, der reich an hydrophoben Aminosäuren ist, ein Membraninsertionssignal. Zudem ist anders als die kanonische Isoform die Isoform 2 mit deletiertem N-Terminus und MTS weiterhin in den Mitochondrien aufzufinden (Matsushita *et al.* 2011). Sirt6 kommt dagegen im Nukleus vor. Das Entfernen der CTE von Sirt6 führte dazu, dass es nicht mehr im Nukleus, sondern im Cytoplasma gefunden wurde. Interessanterweise war dieser Effekt noch deutlicher wenn beide Termini deletiert waren, was darauf hindeutet, dass die NTE eine zum Teil synergistische Funktion mit der CTE einnimmt und Sirt6 in den Nukleus dirigiert (Tennen *et al.* 2010). Es besitzt ein C-terminales NLS (*nuclear localization signal*) mit der Sequenz ³⁴⁵PKRVKAK³⁵¹, welches essentiell für die korrekte Lokalisation des Proteins ist (Michishita *et al.* 2005; Tennen *et al.* 2010). Deletion oder Mutation dieses C-terminalen Bereichs führt zu einer teilweisen

Tabelle 1: Subzelluläre Lokalisation, Enzymatische Aktivitäten und ausgewählte Substrate von Sirt1-7.

Sirtuin	Subzelluläre Lokalisation	Enzymatische Aktivität	Substrate	Referenz
SIRT1	Nukleus, Cytoplasma	Deacetylase, Deacylase (unterschiedliche Kettenlängen), Decrotonylase, Delipoylase	p53, PGC-1 α , FoxO1, FoxO3a, FoxO4, eNOS, Tat, MEF2, AceCS1, LXR	(Vaziri et al. 2001; Jianyuan Luo et al. 2001; Rodgers et al. 2005; Nemoto et al. 2005; Yang et al. 2005; Motta et al. 2004; van der Horst et al. 2004; Mattagajasingh et al. 2007; Pagans et al. 2005; Zhao et al. 2005; Hallows et al. 2006; Li et al. 2007; Michishita et al. 2005; Tanno et al. 2007; Feldman et al. 2013)
SIRT2	Nukleus, Cytoplasma	Deacetylase, Deacylase (unterschiedliche Kettenlängen), Decrotonylase, Delipoylase	α -Tubulin, FoxO1, FoxO3a, 14-3-3 β/γ , p53, p300, p65, PEPCK1	(North et al. 2003; Jing et al. 2007; Wang et al. 2007; Jin et al. 2008; Black et al. 2008; Rothgiesser et al. 2010; Jiang et al. 2011; Vaquero et al. 2006; North und Verdin 2007; Michishita et al. 2005; Feldman et al. 2013)
SIRT3	Mitochondrium	Deacetylase, Deacylase (unterschiedliche Kettenlängen), Decrotonylase, Delipoylase	AceCS2, GDH, ICDH2,	(Hallows et al. 2006; Schwer et al. 2006; Christine Schlicker et al. 2008; Michishita et al. 2005; Onyango et al. 2002; Schwer et al. 2002; Feldman et al. 2013)
SIRT4	Mitochondrium	Deacetylase, Deacylase (unterschiedliche Kettenlängen), Delipoylase, ADP- Ribosyltransferase	GDH, E2 (DLAT)	(Ahuja et al. 2007; Haigis et al. 2006; Rommel A. Mathias et al. 2014; Michishita et al. 2005; Feldman et al. 2013)
SIRT5	Mitochondrium	Deacetylase, Deacylase (unterschiedliche Kettenlängen), Deglutarylase	Cytochrom C, CPS1, UOX	(Christine Schlicker et al. 2008; Peng et al. 2011; Nishida et al. 2015; Nakagawa et al. 2009; Tan et al. 2014; Michishita et al. 2005; Feldman et al. 2013)
SIRT6	Nukleus	Deacetylase, Deacylase (unterschiedliche Kettenlängen), ADP- Ribosyltransferase	H3, CtIP, NPM1, PKM2, GCN5, FoxO3a, TNF α , Sirt6, PARP1, KAP1	(Michishita et al. 2008; Michishita et al. 2009; Yang et al. 2009; Wang et al. 2016; Tasselli et al. 2016a; Kaidi et al. 2010; Lee et al. 2014; Bhardwaj und Das 2016; Dominy, JR et al. 2012), (Jiang et al. 2013; Liszt et al. 2005; Mao et al. 2011; van Meter et al. 2014; Michishita et al. 2005; Feldman et al. 2013)
SIRT7	Nukleus (Nucleolus)	Deacetylase	NPM1, H3, PAF53	(Lee et al. 2014; Barber et al. 2012; Michishita et al. 2005; Ford et al. 2006; Chen et al. 2013)

GFP aus, um dieses in den Nukleus zu transportieren (Tennen *et al.* 2010). Sirt7 ist das einzige Sirtuin, das vornehmlich in den Nukleoli vorgefunden wurde (Michishita *et al.* 2005; Ford *et al.* 2006). Unter bestimmten Stressbedingungen kann bei Sirt7 eine Translokation von den Nukleoli in das Nukleoplasma stattfinden (Chen *et al.* 2013).

Auch hinsichtlich ihrer Funktion gibt es Unterschiede. Anfangs wurden Sirtuine nur als Deacetylasen beschrieben und nachdem Histonacetylierungen wichtig für die transkriptionelle Aktivierung waren (Grunstein 1997), machte es Sinn, dass Sir2 aus der Hefe im transkriptionellen Silencing involviert ist (Shore *et al.* 1984). In den letzten Jahren wurden jedoch viele weitere Acylreste identifiziert die durch Sirtuine abgespalten werden können. Der erste Bericht, dass Sirtuine auch weitere Acylgruppen erkennen, wurde anhand des CobB Sirtuins aus *Salmonella enterica* erstellt. Hier war das Enzym in der Lage die Propionyl-CoA-Synthetase zu depropionieren (Garrity *et al.* 2007; Bheda *et al.* 2016). Kurz darauf wurde auch gezeigt, dass mehrere eukaryotische Sirtuine die Fähigkeit haben Propionyl- und Butyrylgruppen zu entfernen (Smith und Denu 2007). Außerdem wurde etwas später entdeckt, dass viele Proteine propionyliert und butyryliert sind (Zhang *et al.* 2009; Cheng *et al.* 2009; Liu *et al.* 2009; Chen *et al.* 2007). Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass die Aktivität von Sirt6 durch Fettsäuren stimuliert werden kann (Feldman *et al.* 2013). Zudem sind alle Säugetier-Sirtuine in der Lage Deacetylierungs- bzw. Deacylierungsreaktionen zu katalysieren, doch besitzen sie unterschiedliche Spezifitäten und Effizienzen abhängig von der Kettenlänge und dem Aufbau des Restes (**Tabelle 1**) (Feldman *et al.* 2013; Feldman *et al.* 2015; Tong *et al.* 2016; Tong *et al.* 2017).

Sirt6 ist dabei eine Deacylase mit einzigartigen Aufgaben innerhalb der Zelle. Im Folgenden werden Aussagen aus Kugel *et al.* (Kugel und Mostoslavsky 2014) zusammengefasst. Sirt6 nimmt an den verschiedensten biologischen Prozessen teil und kann in Zusammenhang mit der Alterung und Krankheiten wie Diabetes, Herzerkrankungen, Fettleibigkeit und Krebs gebracht werden. Am besten charakterisiert ist es als Deacetylase von Histon H3 Lysin 9 (H3K9) (Michishita *et al.* 2008), H3 Lysin 18 (H3K18) (Wang *et al.* 2016; Tasselli *et al.* 2016a) und H3 Lysin 56 (H3K56) (Michishita *et al.* 2009; Yang *et al.* 2009). Daneben wurden auch weitere Lysine als Angriffspunkt für Sirt6 gefunden (Wang *et al.* 2016). Der Verlust von Sirt6 führt zur Bildung von dysfunktionalen Telomeren. Die Deacetylierung von telomerischen H3K9 und H3K56 durch Sirt6 während der S-Phase wird benötigt damit das Werner-Syndrom (WRN)-Protein an telomerisches Chromatin binden kann (Michishita *et al.* 2008; Michishita *et al.* 2009) (**Abbildung 6**). Das WRN-Protein besitzt eine wichtige Rolle für die Genomstabilität, insbesondere während der DNA-Replikation und dem

Telomermetabolismus (Chen *et al.* 2003). Sirt6 ADP-ribosyliert Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP1) und führt zu einer Steigerung ihrer Poly-ADP-Ribosylierungsaktivität (Mao *et al.* 2011). Zudem deacetyliert es das CtIP (*C-terminal binding protein (CtBP) interacting protein*) (Kaidi *et al.* 2010) und interagiert mit SNF2H (*SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin*; auch bekannt

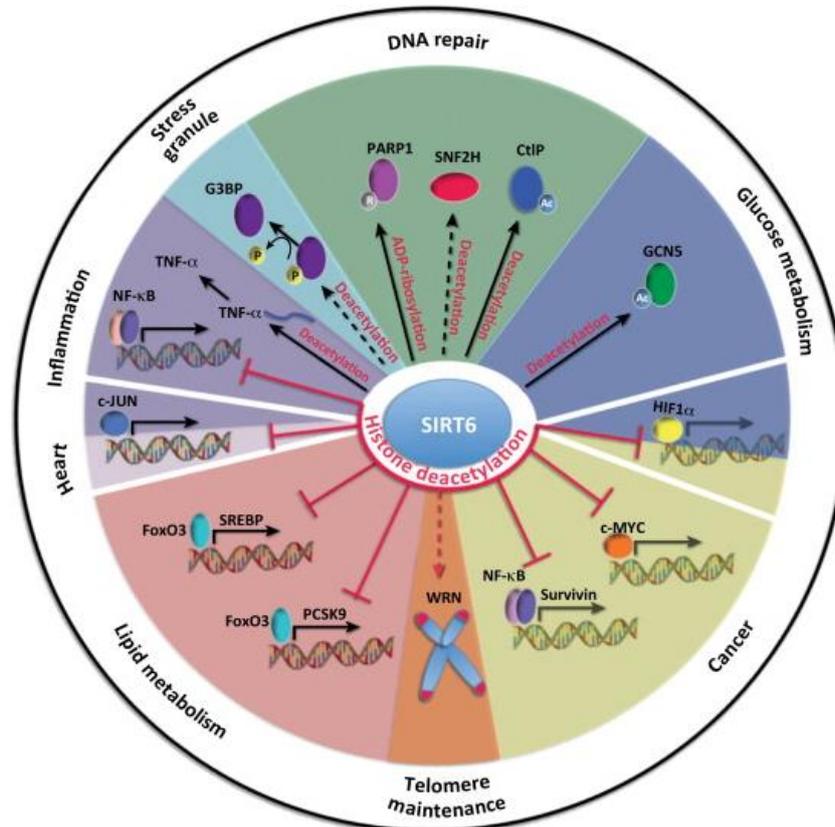


Abbildung 6: Sirt6 hat verschiedenen zelluläre Funktionen und Einfluss auf biologische und krankheitsassoziierte Prozesse. Sirt6 fungiert primär als H3K9- und H3K56-Histondeacetylase die die Chromatinzugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor κB* (NF-κB), c-JUN, FoxO3, MYC und dem *hypoxia inducible factor 1α* (HIF1α) zu den entsprechenden Promotoren verringert und so die Expression ihrer Zielgene inhibiert. Es reguliert die Proteinaktivität durch direkte Deacetylierung von GCN5 (*general control non-repressed protein 5*) und CtIP (*C-terminal binding protein (CtBP) interacting protein*) und die ADP-Ribosylierung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1). Sirt6 interagiert mit SNF2H um die Rekrutierung an Schadensstellen zu verbessern und damit die DSB-Reparatur zu intensivieren. Es assoziiert mit telomerischem Chromatin und deacetyliert H3K9 und H3K56, was zu einer Stabilisierung des WRN (Werner-Syndrom-Protein) und wirkt bei der Telomererhaltung mit. Sirt6 hat auch cytosolische Rollen, indem es die Bildung von Stress-Granula (SG) durch die Forcierung der G3BP-Dephosphorylierung und des *tumor necrosis factor α* (TNF-α)-Sekretion durch Lysin-deacetylierung zeigt. Diese zellulären Funktionen haben Einfluss auf Aspekte wie DNA-Reparatur, Telomererhaltung, SG-Bildung, Glucose/Lipid-Metabolismus, Inflammation, Herzhypertrophie und Krebs. Ein durchgezogener Pfeil zeigt, dass Sirt6 das Protein direkt modifiziert oder die Histondeacetylierung an den Promotoren der Zielgene beeinflusst. Gestrichelte Pfeile zeigen, dass die Deacetylaseaktivität von Sirt6 notwendig aber nicht direkt ist. Rote Pfeile weisen auf Histondeacetylierungen hin. Ac, Acetylierung; P, Phosphorylierung; R, ADP-Ribosylierung. Abbildung adaptiert nach Kugel und Mostoslavsky (2014) mit Erlaubnis von Elsevier.

als SMARCA5) (Toiber *et al.* 2013). Diese sind in der DNA-Reparatur involviert. Daher spielt es eine wichtige Rolle für die Basenexzisionsreparatur (BER) und die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB). Sirt6 ist ein zentraler Regulator der Glucosehomeostase und hat sowohl Einfluss auf die Glykolyse als auch auf die Gluconeogenese. Es interagiert mit HIF1 α (*Hypoxia-inducible factor 1 α*) und deacetyliert H3K9 am Promotor von HIF1 α -Zielgenen. Dabei moduliert HIF1 α diverse Gene die die Glykolyse aktivieren und die mitochondriale Respiration unterdrücken (Zhong *et al.* 2010). Sirt6 deacetyliert und aktiviert GCN5 (*general control non-repressed protein 5*), welches seinerseits als Acetyltransferase PGC-1 α (*peroxysome proliferator-activated receptor- α coactivator 1 α*) acetyliert (Dominy, JR *et al.* 2012). Dieses ist der Hauptregulator der hepatischen Glukoneogenese, kann jedoch nach Acetylierung seine Zielgene nicht mehr aktivieren (Puigserver *et al.* 2003). Zusätzlich könnte Sirt6 die Gluconeogenese über FoxO1 (*forkhead box O1*) beeinflussen (Xiong *et al.* 2013). Außerdem ist es am Lipidmetabolismus beteiligt indem FoxO3 Sirt6 zum *Pcsk9* (Proproteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9) Genpromotor rekrutiert und dadurch seine Genexpression durch H3K9- und H3K65-Deacetylierung verringert (Tao *et al.* 2013a; Lambert *et al.* 2012). Durch drei unterschiedliche Mechanismen unterdrückt Sirt6 zudem SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*), welches ein Regulator der Cholesterolsynthese ist (Tao *et al.* 2013b; Elhanati *et al.* 2013; Najafi-Shoushtari *et al.* 2010). Interessanterweise kann Sirt6 abhängig vom Zelltyp und Kontext proinflammatorisch und antiinflammatorisch wirken. Es entfernt die Myristoylierungen an den Lysin 19 und 20 des Tumornekrosefaktors α (TNF- α), wodurch dieses Zytokin sekretiert werden kann (Jiang *et al.* 2013). Dagegenwirkend interagiert Sirt6 mit der NF- κ B-Untereinheit RELA (*v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A*) was es zu einigen Promotoren von NF- κ B-Zielgenen transportiert. Dort Deacetyliert es H3K9 und verringert die NF- κ B-abhängige Apoptose und Seneszenz (Kawahara *et al.* 2009). Ein ähnliches Verhalten zeigt Sirt6 mit c-JUN. Durch die Interaktion mit c-JUN kann Sirt6 H3K9 an Promotoren proinflammatorischer Gene wie MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*), IL-6 (Interleukin-6) und TNF- α deacetylieren und so deren Expression und proinflammatorische Wirkung inhibieren (Xiao *et al.* 2012). Zusätzlich werden durch die Interaktion mit c-JUN und Deacetylierung die IGF (*Insulin-like growth factor*)-abhängigen Zielgene weniger stark exprimiert, wodurch Sirt6 als negativer Regulator der Herzhypertrophie wirkt (Sundaresan *et al.* 2012). Dass Sirt6 ein wichtiges krebsassoziiertes Protein ist hat mehrere Gründe. Wie bereits beschrieben, kann es die Aktivierung von HIF1 α -abhängigen Genen verhindern. Ist Sirt6 deletiert oder unfunktional, werden glykolytische Gene abgelesen und eine erhöhte

Glykolyse und gleichzeitige Verringerung der mitochondrialen Respiration ist zu verzeichnen, was die Tumorpherlieration unterstüzt (Zhong *et al.* 2010; Warburg 1927). Dieser Effekt wird dadurch verstärkt, dass Sirt6 neben HIF1 α auch die transkriptionelle Aktivität von MYC verringert. Dadurch wird die Expression von ribosomalen Proteinen inhibiert (Sebastian *et al.* 2012). Zusätzlih wird die Transkription von Sirt6 durch c-FOS induziert, wodurch über H3K9-Deacetylierung die Expression von Survivin und die NF- κ B-Aktivierung verringert wird (Min *et al.* 2012). Auch bei Alterungsprozessen spielt Sirt6 eine Rolle. Zum Beispiel führte eine Überexpression von Sirt6 in männlihen (aber nicht in weiblihen) Mäusen zu einer Lebensverlängerung um 15 % (Kanfi *et al.* 2012). Ferner ist Sirt6 in der Lage mit G3BP (*GTPase-activating protein (SH3 domain) binding protein*) zu interagieren und indirekt dessen Dephosphorylierung anzuregen, was ein wichtiger Schritt in der Ausbildung von Stress-Granula ist (Jedrusik-Bode *et al.* 2013). Damit ist Sirt6 ein sehr vielfältiger Regulator von Schlüsselfunktionen innerhalb der Zelle (weitere Funktionen zusammengefasst durch Tasselli *et al.* Tasselli *et al.* 2016b).

Es existieren mehrere Kristallstrukturen von Sirt6 die im Folgenden nach Pan *et al.* (Pan *et al.* 2011) und Jiang *et al.* (Jiang *et al.* 2013) erläutert werden.

Strukturell gesehen bildet Sirt6 globuläre Domänen mit acht α -Helices und neun β -Strängen aus (**Abbildung 7**). Die in den Kristallstrukturen sichtbaren N- und C-Termini bestehen aus langen unstrukturierten *coils*. Die große Rossmannfaltung wird durch die Regionen 25-128 und 191-266 gebildet, während die kleinere Zinkbindedomäne durch 129-190 entsteht. Die Rossmannfaltungs-Domäne wird durch das sechssträngige (β 1, β 2, β 3, β 7, β 8, β 9) parallele

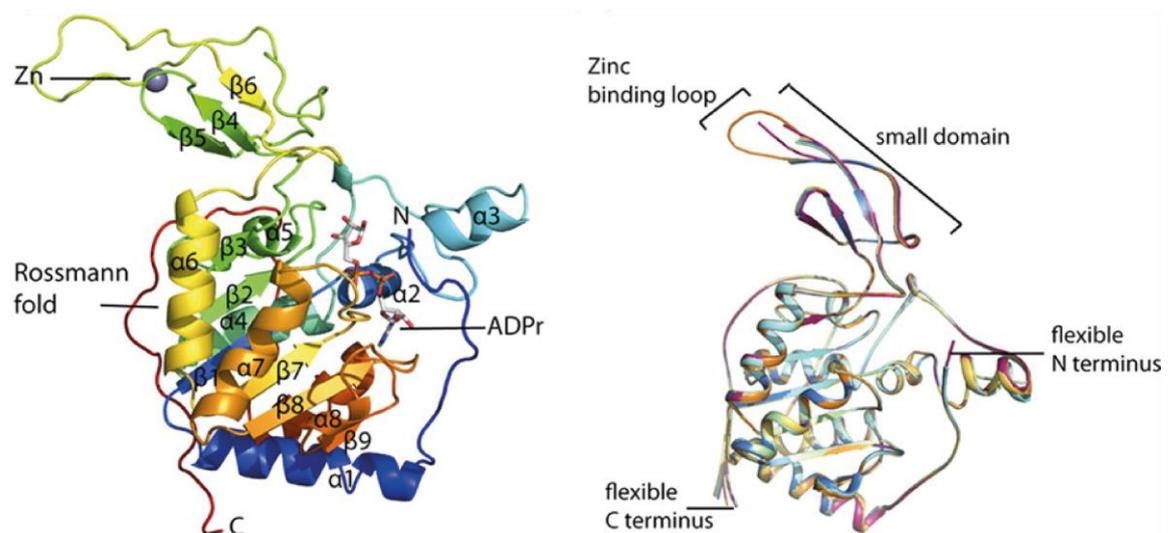


Abbildung 7: Sirt6 bildet eine für Sirtuine typische Rossmannfaltungs-Domäne (Pan *et al.* 2011). Links sind die Struktureigenschaften des Sirt6-Monomers gezeigt und rechts die Überlagerung der Moleküle in der asymmetrischen Einheit.

β -Faltblatt, welches durch zwei Helices ($\alpha 6$ und $\alpha 7$) auf der einen Seite und vier Helices ($\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 8$) auf der anderen Seite umgeben ist, gebildet. Die kleine Domäne besteht aus dem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt ($\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$). Die meisten Sirtuine besitzen als Zinkbindemotiv eine Cys-X-X-Cys-X₁₅₋₂₀-Cys-X-X-Cys-Sequenz, doch enthält Sirt6 interessanterweise eine zehn Aminosäuren lange Insertion zwischen dem zweiten Satz Cysteine, was zu einer verlängerten Schleife führt. Es wurde gefunden, dass das Substratpeptid über unspezifische Bindungen an das Proteinrückgrad mit Sirtuinen interagiert (Jin *et al.* 2009). Dort wurde eine Schleife mit der Sequenz FGEXL gefunden, die Wasserstoffbrücken zum Substratpeptid bildet (Avalos *et al.* 2002). Bei Sirt6 ist an dieser Stelle jedoch die Sequenz WEDSL.

2.3 α -Kristallin

Damit Proteine innerhalb der Zelle ihre korrekte Funktion einnehmen können, müssen sie während und nach der Expression am Ribosom als lineare Aminosäureketten in ihren nativen Faltungszustand kommen. Im Folgenden werden Abschnitte aus Hartl *et al.* (Hartl *et al.* 2011) zusammengefasst. Um ihre Funktionen wahrnehmen zu können, müssen Proteine eine konformationelle Flexibilität erhalten und sind deshalb nur marginal thermodynamisch stabil in ihrer physiologischen Umgebung. Zeigen einige der metastabilen Proteine ein anomales Verhalten, kann dies hingegen zu fibrillärer Aggregation führen, die mit Demenz und der Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht wird. Deshalb ist die Proteinqualitätskontrolle ein entscheidender Mechanismus für die Erhaltung der Proteomhomöostase, welche als Proteostase bezeichnet wird. Dies wird durch ein ausgedehntes Netzwerk aus ~1400 Proteinen in der humanen Zelle sichergestellt (Hartl 2016). Dazu gehören auch die Chaperone und ihre Regulatoren, die aus mehr als 300 (Brehme *et al.* 2014) Proteinen bestehen und sowohl die *de novo* Faltung als auch die Rückfaltung aus einem unfunktionalen nicht-nativen Zustand unterstützen. Kleine Proteine sind häufig in der Lage ohne Unterstützung im Microsekundenbereich von selbst zu falten (Kubelka *et al.* 2004). Größere Proteine mit mehreren Domänen brauchen hingegen mehrere Minuten bis Stunden, um die exakte native Faltung einzunehmen (Herbst *et al.* 1997), erreichen diese jedoch häufig *in vitro* nicht. Die Anzahl unterschiedlicher möglicher Konformationen die eine Proteinkette einnehmen kann, ist extrem hoch, weshalb Faltungsreaktionen hochkomplex und heterogen sind und auf vielen schwachen nicht-kovalenten Interaktionen beruhen. Für lösliche Proteine sind im polaren wässrigen Medium

insbesondere hydrophobe Kräfte für das mit der Faltung einhergehende Einschließen der unpolaren Aminosäuren im Innern des Proteins verantwortlich. Durch den Faltungsprozess durchlaufen Proteine auf dem Weg hin zu einem energetischen Minimum eine trichterförmige Potentialhyperfläche (**Abbildung 8**). Durch den Kettenkollaps und häufiger werdenden nativen Interaktionen, wird der konformationell zugängliche multidimensionale Raum eingeschränkt. Die Gibbs-Energie-Oberfläche ist jedoch sehr uneben, wodurch die Moleküle zur Faltung kinetische Barrieren überwinden müssen. Dadurch resultieren partiell gefaltete Intermediate als kinetisch festsitzende Spezies. Diese exponieren häufig hydrophobe Aminosäureseitenketten und tendieren zur konzentrationsabhängigen Aggregation zu amorphen Strukturen. Alternativ können sich auch fibrilläre Aggregate, die als Amyloide bezeichnet werden, ausbilden. Sie bestehen aus β -Strängen die senkrecht zur Fibrillenachse stehen (*cross- β -Struktur*). Dies muss durch das Chaperonnetzwerk unterbunden werden. Molekulare Chaperone sind dabei alle Proteine die mit anderen Proteinen interagieren, sie stabilisieren oder ihnen bei der Bildung der funktional aktiven

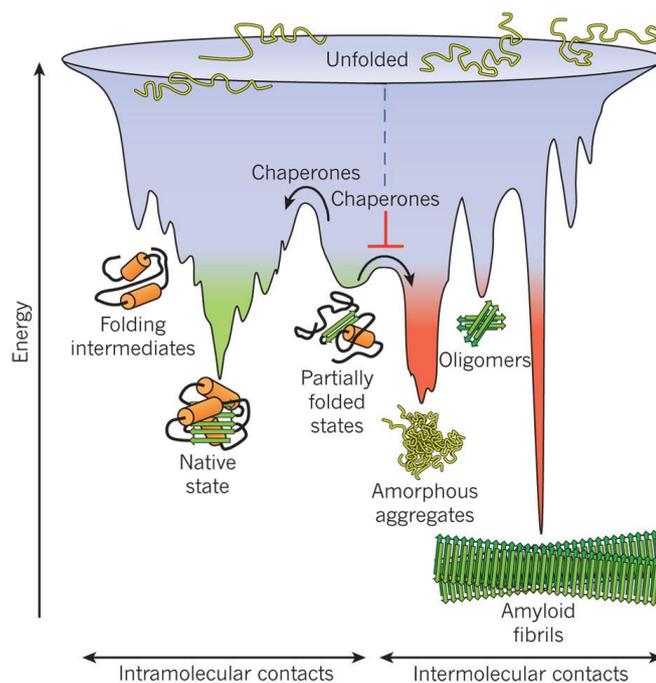


Abbildung 8: Verschiedene Reaktionen konkurrieren bei der Proteinfaltung und Aggregation.

Das Schema des trichterförmigen Gibbs-Energie-Diagramms zeigt, dass Proteine auf ihrem Weg zum nativen Zustand (grün) intramolekulare Kontakte bilden. Durch die Unebenheit der Energielandschaft akkumulieren kinetisch festsitzende Konformationen, die freie Energiebarrieren überwinden müssen, um einen begünstigten abwärtsführenden Weg zu erreichen. Dies kann *in vivo* durch Chaperone katalysiert werden. Falten mehrere Moleküle simultan, kann die Gibbs-Energieoberfläche der Faltung mit der intermolekularen Aggregation überlappen, was zur Bildung von amorphen Aggregaten, toxischen Oligomeren oder geordneten Amyloid-Fibrillen (rot) führt. Die fibrilläre Aggregation verläuft typischerweise über eine nukleationsabhängige Polymerisation. Abbildung adaptiert nach Hartl *et al.* (2011) mit Erlaubnis von Nature Publishing Group.

Konformation unterstützen (Hartl 1996). Sie werden auch als Hitzeschockproteine (Hsp) bezeichnet, da sie unter Stressbedingungen hochreguliert sind, wo die Konzentration der aggregationsanfälligen Proteine zunimmt. Die Chaperone werden nach ihrer Molmasse eingeteilt (HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 und kleine Hitzeschockproteine (*small heat shock proteins*, sHsps)). Die Hsp60-, Hsp70- und Hsp90-Proteine sind Multikomponentenmaschinerien die die Faltung durch Zyklen aus Bindung, Faltung und Freisetzung, welche ATP- und kofaktorabhängig sind, fördern. Die kleinen Hitzeschockproteine binden die partiell gefalteten Intermediate und begünstigen die korrekte Faltung ATP-unabhängig und werden deshalb auch als *holdases* angesehen. Allerdings ist die Interaktion der sHsps mit ihren Substraten facettenreich, wodurch dieser Begriff zur Diskussion steht (Tanguay und Hightower 2015)

Die sHsps bilden die am weitesten verbreitete, aber auch die am schlechtesten konservierte Familie der Chaperone. Durch phylogenetische Analysen wurde gezeigt, dass sie sehr früh in der Evolution divergierten (Müller *et al.* 2002; Waters *et al.* 1996). Vertreter der sHsp-Familie wurden in allen Reichen der Lebewesen gefunden (**Abbildung 9**) (Kappé *et al.* 2002b; Narberhaus 2002; Haslbeck *et al.* 2005). Bakterien (mit Ausnahme von Rhizobien), Archaea und einzellige Eukaryoten besitzen typischerweise ein oder zwei sHsps (Kappé *et*

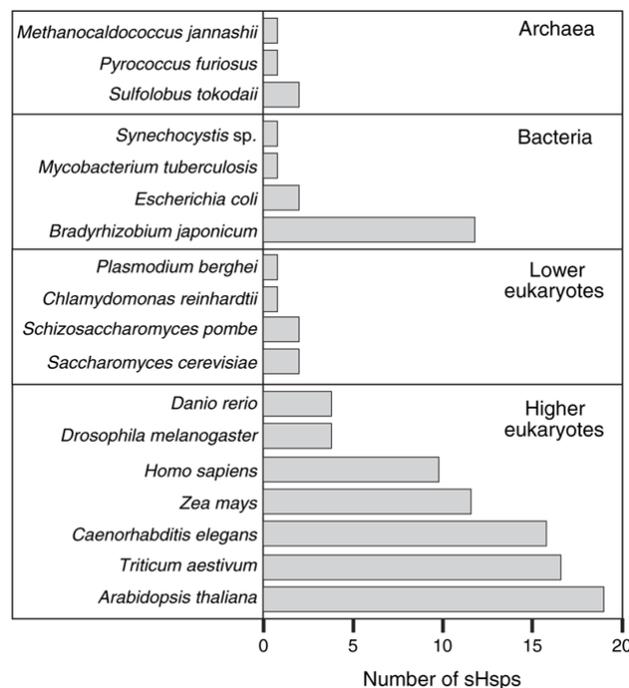


Abbildung 9: Schematische Übersicht über die Anzahl der Vertreter der sHsp-Familie in verschiedenen Organismen. Generell wird eine wesentliche Zunahme an sHsps pro Organismus von Bakterien zu höheren Eukaryoten verzeichnet. Rhizobien sind dabei eine Ausnahme. Abbildung adaptiert nach Haslbeck *et al.* (2005) mit Erlaubnis von Nature Publishing Group.

al. 2002b; Laksanalamai und Robb 2004). In den meisten höheren multizellulären Eukaryoten nimmt die Zahl der Gene die für sHsps codieren deutlich zu. So wurden für *D. melanogaster* 4, *C. elegans* 16, den Menschen 10 und *Arabidopsis thaliana* sogar 19 vorhergesagt. Der Mechanismus der für die Genvielfalt gesorgt hat, ist nicht bekannt, doch die Diversifikation könnte, durch die Notwendigkeit von sHsps mit spezifischen Funktionen in bestimmten Zelltypen, Organellen und während der Differenzierung zu höheren Spezialisierungen, ausgelöst worden sein. Dieser Abschnitt wurde aus Haslbeck *et al.* (Haslbeck *et al.* 2005) zusammengefasst.

Ausgehend von der Sequenz des humanen kleinen Hitzeschockproteins Hsp27 wurden neun weitere sHsps für den Menschen identifiziert, die HSPB1-HSPB10 genannt wurden (Kappé *et al.* 2002a; Fontaine *et al.* 2003; Kappe *et al.* 2010) (**Tabelle 2**). Obschon es der Name impliziert, sind nicht alle humanen sHsps durch einen Hitzeschock induzierbar. Ausschließlich HSPB1, HSPB4, HSPB5 und HSPB8 werden als hitze-induzierbar

Tabelle 2: Vergleich der biologischen Eigenschaften und Gewebsverteilung der humanen kleinen Hitzeschockproteine. Angepasst nach Mymrikov *et al.* (Mymrikov *et al.* 2016) und The Big Book on Small Heat Shock Proteins S. 7 (Tanguay und Hightower 2015). Siehe auch (Mymrikov *et al.* 2011; Vos *et al.* 2009; Nakagawa *et al.* 2001). ^aZelltypabhängig.

Name	Hitze-induzierbarkeit	Mol-masse [Da]	Theoretischer pI	Gewebespezifität	Oligomerstatus isolierter Proteine
HspB1 (Hsp27)	Ja	22783	5,98	Ubiquitär	Große Oligomere, abhängig von Phosphorylierung
HspB2	Nein	20233	5,07	Herz- und Skelettmuskel	Kleine Oligomere, abhängig von Konzentration
HspB3	Nein	16966	5,66	Herz- und Skelettmuskel	Dimer oder Trimer (?)
HspB4 (α A-Kristallin)	Ja	19909	5,77	Augenlinse	Große Oligomere
HspB5 (α B-Kristallin)	Ja	20159	6,76	Ubiquitär, angereichert in Augenlinse und Muskeln	Große Oligomere, abhängig von Phosphorylierung
HspB6 (Hsp20)	Nein	17136	5,95	Ubiquitär, angereichert in glatten Muskeln und Herzmuskel	Dimer
HspB7	Nein	18611	6,04	Ubiquitär (?), angereichert in Herz- und Skelettmuskel	Oligomere/Dimer (?)
HspB8 (Hsp22)	Ja ^a	21604	5,00	Ubiquitär, angereichert in Gehirn und Muskeln	Dimer/Monomer
HspB9	NA	17486	9,16	Testis	?
HspB10	NA	28366	8,46	Testis	?

angesehen. Einige Vertreter werden, obgleich in unterschiedlichem Ausmaße, auch konstitutiv in verschiedenen Geweben und Zellen exprimiert (Vos *et al.* 2009). Die sHsps sind hinsichtlich ihrer Oligomerstruktur sehr dynamisch und polydispers. Sie können aus Dimeren bestehen, die häufig als Grundbausteine angesehen werden, die sich zu gewaltigen Komplexen, bestehen aus bis zu 50 Untereinheiten, heterologer Homo- und Heterooligomere zusammensetzen. Die Dynamik der Oligomerisation wird zudem dadurch verstärkt, dass ein Austausch von Untereinheiten auftritt, der zellulären Stress wie Hitze oder niedrigen pH beschleunigt wird. Hinzu kommt, dass PTM wie Phosphorylierungen eine Möglichkeit für die Zelle darstellen die Oligomerisation zu beeinflussen. Dies wurde nach Tanguay *et al.* (Tanguay und Hightower 2015) zusammengefasst.

Was die Proteinfamilie der sHsps vereint, ist vor allem die Konservierung der etwa 90 Aminosäuren umfassenden α -Kristallin-Domäne (*α -crystallin domain*, ACD). Diese wurde nach dem α -Kristallin aus der Linse benannt, das lange vor der Entdeckung der Homologie bekannt war (Jong *et al.* 1993). Zudem wurde auch mit limitierten Sequenzen von sHsps früh gefunden, dass die ACD von den wenig konservierten N- und C-terminalen Sequenzen (NTS und CTS, **Abbildung 10**) flankiert wird (Jong *et al.* 1998). Dennoch wurde in der CTS ein drei Aminosäuren umfassendes Motiv identifiziert, das häufig vorkommt. Es wird als IXI- oder IXV-Motiv bezeichnet, da das häufig an erster und letzter Position vorkommende Isoleucin auch durch weitere hydrophobe Aminosäuren wie Valin und Leucin ersetzt sein



Abbildung 10: sHsps setzen sich zusammen aus einer konservierten α -Kristallin-Domäne (ACD, grün) und sie flankierende variable N- und C-terminale Sequenzen (NTS, blau und CTS orange). Das konservierte IXI/V-Motiv liegt am C-Terminus und unterteilt die CTS in zwei Bereiche (hell- und dunkelorange).

kann. Vom Ende der ACD bis zum Ende dieses Motivs beträgt die Länge im Durchschnitt 14 Aminosäuren. Dieser Abschnitt wird als *C-terminal Anchoring Module* (CAM) bezeichnet, im Gegensatz zu dem Teil der CTS nach dem IXI-Motiv, welcher als C-terminaler Schwanz definiert wurde (Poulain *et al.* 2010).

α A- (HSPB4) und α B-Kristallin (HSBP5) weisen unter den humanen sHsps eine hohe Homologie auf. Sie machen den Hauptanteil der Proteine in der Augenlinse aus. Gemeinsam mit β - und γ -Kristallinen bilden sie etwa 90 % aller Proteine in der Linse (Piatigorsky 1981). Des weiteren ist α B-Kristallin konstitutiv in einer Vielzahl weiterer Gewebe wie dem Gehirn, Herz- und Skelettmuskeln und der Niere exprimiert (Bhat und Nagineni 1989; Dubin *et al.* 1989; Iwaki *et al.* 1989; Iwaki *et al.* 1990; Kato *et al.* 1991b). Demgegenüber wird α A-

Kristallin hauptsächlich in der Linse exprimiert (Robinson und Overbeek 1996) und kommt nur in geringen Mengen in anderen Geweben wie der Milz, dem Herzen und dem Thymus vor (Kato *et al.* 1991a; Srinivasan *et al.* 1992). Die Augenlinse stellt eine Umgebung mit einer außergewöhnlich hohen Konzentration an Proteinen mit etwa 450 mg/mL (Fagerholm *et al.* 1981; PHILIPSON 1969) und wenig oder keinem Proteinumsatz (*turnover*) (Wistow und Piatigorsky 1988; Hoehenwarter *et al.* 2006) dar. Folglich stellt sich die Frage wie gewährleistet werden kann, dass bei einer so dicht gepackten Lösung über viele Jahre keine Aggregation auftritt und die Linse klar bleibt. Eine der ersten Beschreibungen des Problems der Transparenz der Augenlinse wurde bereits 1962 von Trokel erstellt (TROKEL 1962). Dies wird insbesondere durch das Ensemble aus beiden α -Kristallinen sichergestellt (Delaye und Tardieu 1983; Tardieu 1988; Bloemendal *et al.* 2004; Clark *et al.* 2012). Im Verlauf der Entwicklung der Linse und des Alterns durchlaufen die Linsenproteine kovalente und nicht-kovalente Modifikationen, die sie zunehmend anfällig für Entfaltungen und Aggregationen machen können. Kleine Hitzeschockproteine wie die α -Kristalline binden diese fragilen, nicht-nativen Proteine bewahren sie durch ihre Chaperonaktivität vor irreversibler Aggregation und gewährleisten dadurch eine einwandfreie Klarheit und Lichtbrechung (**Abbildung 11**). Da sie selbst nicht die Fähigkeit besitzen Proteine rückzufalten, müssen sie diese an ATP-abhängige Proteine abgeben (Haslbeck *et al.* 2005). Für beide α -Kristalline wurde *in vitro* gefunden, dass sie die thermisch induzierte Aggregation (Horwitz 1992, 1993; Jakob *et al.* 1993), Aggregation induziert durch die Reduktion von Disulfidbrücken (Bhattacharyya und Das 1998; Raman *et al.* 1995, 1995) und hochenergetische elektromagnetische Strahlung wie UV-Licht (Bhattacharyya und Das 1998; Raman und Rao 1994; Reddy *et al.* 2001) unterbinden. Die Linsentrübung, die klinisch als Katarakt oder grauer Star bezeichnet wird, kann durch Störungen wie z. B. Mutationen, Degradationen oder unspezifische PTM entstehen (Clark *et al.* 2012).

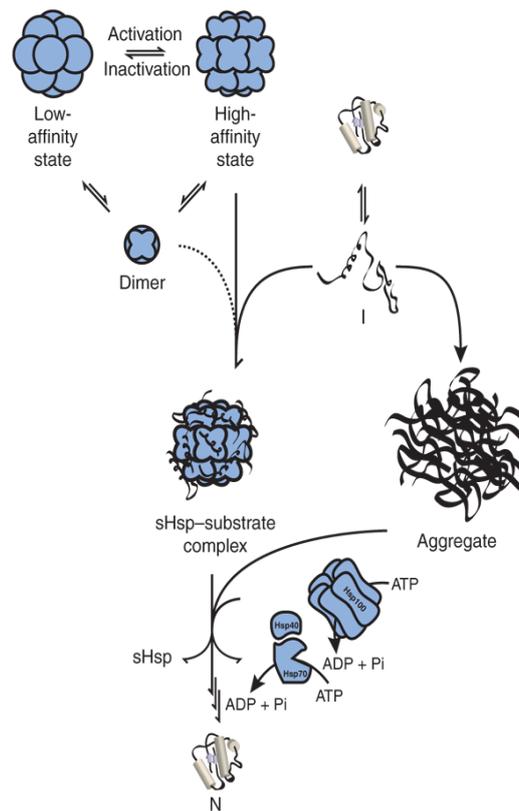


Abbildung 11: sHsps sind dynamische Oligomere, die permanent Untereinheiten austauschen. Sie kommen in einem Zustand mit niedriger und einer hohen Affinität gegenüber nicht-nativen Proteinen vor. Das Äquilibrium zwischen den beiden Zuständen ist temperaturabhängig. Durch einen Hitzeshock wird das Äquilibrium hin zum Hochaffinitätszustand verschoben und das aktive Oligomer kann einen stabilen sHsp-Substratkomplex bilden. Damit wird eine effiziente Prävention der Substrataggregation erreicht. Zur Freisetzung der aktiven Substratproteine von diesen Komplexen ist eine Kooperation mit Proteinen der ATP-abhängigen Chaperonfamilie wie Hsp70-Hsp40 oder Hsp100 nötig. Obwohl Hsp70-Hsp40 und Hsp100 direkt auf die Proteinaggregation wirken, erhöht die Präsenz von sHsps die Effizienz des Prozesses. I, Intermediat; N, nativer Zustand. Abbildung adaptiert nach Haslbeck *et al.* (2005) mit Erlaubnis von Nature Publishing Group.

α -Kristalline bilden häufig Ensemble aus großen homo- und hetero-oligomeren Komplexen die polydispers und dynamisch sind (**Abbildung 12**). Der Austausch von Untereinheiten zwischen den Komplexen *in vivo* und *in vitro*, der auch weitere sHsps einschließen kann, erhöht zudem die Komplexität des Ensembles und deren Eigenschaften (Bova *et al.* 1997; Kundu *et al.* 2007). Zudem wird zwischen rekombinant gereinigten, rückgefalteten und aus der Linse gereinigten bzw. rekonstituierten Proteinen unterschieden (Haslbeck *et al.* 2016). Die Beschaffenheit des dynamischen Ensembles ist dabei eng verknüpft mit der Chaperonaktivität der sHsps. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass PTM, mit der Phosphorylierung als prominentester Form, Einfluss auf die Ensemblekomposition und Aktivität haben (Hohenwarter *et al.* 2006; Peschek *et al.* 2013).

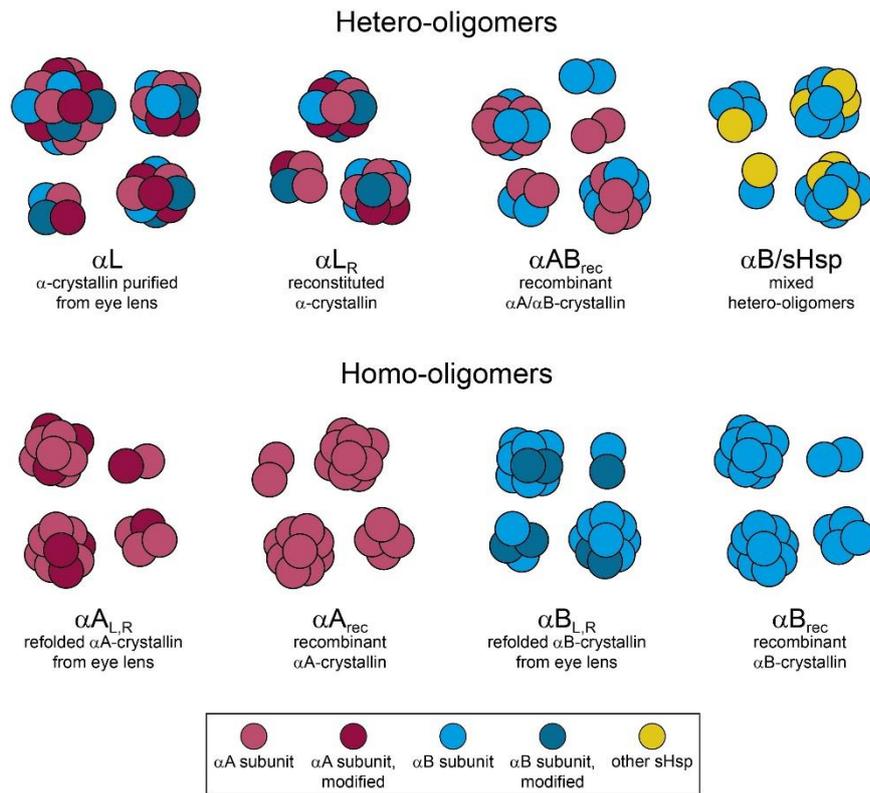


Abbildung 12: Vereinfachte Übersicht über die Mannigfaltigkeit der oligomeren α -Kristallin-Ensembles. Rot stellt αA - und blau αB -Kristallin dar. Dunkelrot und dunkelblau zeigen αA - und αB -Varianten, die aus Posttranslationalen Modifikation stammen, an. Gelb markiert andere sHsps die in die Hetero-Oligomere integriert werden können. R, rekonstituiert; L, isoliert aus der Augenlinse; rec, rekombinant exprimiert und gereinigt. Abbildung adaptiert nach Haslbeck *et al.* (2016) mit Erlaubnis von Elsevier.

Hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur bestehen die α -Kristalline aus β -Faltblättern die eine immunoglobulin-ähnliche β -Sandwich-Faltung einnehmen (Laganowsky *et al.* 2010; Laganowsky und Eisenberg 2010; Bagneris *et al.* 2009). Die NTS von humanem αA - bzw. αB -Kristallin hat eine Länge von 63 bzw. 67 Aminosäuren. Gegenwärtig ist es noch unklar welche Faltung die NTS von αA -Kristallin einnimmt, doch sind die ersten fünf Aminosäuren von αB -Kristallin hochflexibel und basierend auf ssNMR und Sekundärstrukturvorhersagen wurden vorgeschlagen, dass dieser mehrere kurze Helices und gegebenenfalls auch kurze β -Faltblätter enthält (Carver *et al.* 1992; Braun *et al.* 2011; Jehle *et al.* 2011). Zudem zeigen die NTS beider Proteine eine hohe Hydrophobizität und konformationale Flexibilität und sind wesentlich an der Ausbildung höherer Oligomere beteiligt (Eifert *et al.* 2005; Haslbeck *et al.* 2005; Haslbeck *et al.* 2016).

Die CTS der α -Kristalline hat eine Länge von ~ 20 Aminosäuren und das IXI-Motiv lautet in αA -Kristallin Ile159-Pro160-Val161 und in αB -Kristallin Ile159-Pro160-Ile16. Die CTS ist polar, lösungsmittelzugänglich und wird als flexibel beschrieben (Carver und Lindner 1998). Die hydrophile Natur der CTS ist u. a. wichtig für die Löslichkeit und Aktivität der Proteine.

Wurden hydrophobe Aminosäuren eingefügt oder polare Abschnitte deletiert, so ging die Thermostabilität herunter und Aktivitätsverlust war zu verzeichnen (Ghosh *et al.* 2006; Smulders *et al.* 1996).

Folglich könnte das alternative Spleißen als co- und posttranskriptionelle Modifikationsmöglichkeit, wie auch die PTM, jede der drei Proteinabschnitte mit ihren variierenden Eigenschaften und Funktionen beeinflussen. Erstaunlicherweise wurden schon früh alternative gespleißte Isoformen für die sHsps erwähnt, doch nie detailliert untersucht (Kappé *et al.* 2002a; Graw 2009).

3 Zielsetzung

Obwohl unklar ist in welchem Ausmaß das alternative Spleißen neben anderen Mechanismen und Modifikationen tatsächlich den Phänotyp eines Organismus beeinflusst, wird angenommen, dass es eine Hauptquelle für die proteomische Diversität vor allem in mehrzelligen Eukaryoten ist (Nilsen und Graveley 2010). Sowohl für die humanen Sirtuine als auch für die sHsps sind nur sehr wenige Informationen über alternativ gespleißte Isoformen und deren Struktur und Aktivität bzw. Funktion bekannt.

Ziel der Arbeit war es daher den Einfluss des alternativen Spleißens humaner mRNA auf die resultierenden Proteine zu untersuchen. Hierzu sollten die Gene und Transkripte der Sirtuine und α -Kristalline betrachtet und überprüft werden ob und welche Spleißvarianten hier vorkommen. Dazu sollte das Vorhandensein der alternativ gespleißten Isoformen auf RNA- sowie auf Proteinebene so weit wie möglich nachgewiesen werden. Nach Klonierung der nachgewiesenen kodierenden Sequenzen in Expressionsvektoren sollten diese exprimiert und gereinigt werden, um anschließend charakterisiert und mit der kanonischen Isoform verglichen zu werden.

Zur Charakterisierung sollten allgemeine strukturbestimmende Methoden wie Circular Dichroismus eingesetzt werden. Ferner sollten spezifische Aktivitätsmessungen der Zielproteine, wie die Messung der Deacylierungsaktivität der Sirtuine durch acyliert Substratpeptide oder die Messung der Chaperonaktivität durch Aggregationsassays mit bekannten Substraten der kanonischen Isoform Anwendung finden.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Materialien

4.1.1 Geräte

Tabelle 3: Geräte und Laborartikel.

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller – Stadt, Land
CD-Spektrometer	Chirascan-plus CD Spektrometer	Applied Photophysics – Leatherhead, England
Eismaschine		Ziegra - Isernhagen, Deutschland
Fluorometer	FP-6500 Spectrofluorometer	Jasco - Tokyo, Japan
Heizrührer	MR 3001	Heidolph Instruments - Schwabach, Deutschland
Küvetten	Demontierbare Küvette 106-QS ($d = 0,2$ mm, $V = 52$ μ L)	Hellma - Müllheim, Deutschland
	Polystyrol-Küvette	Sarstedt – Nürnberg, Deutschland
	Ultra-Mikro-Küvette 105.201 QS ($d = 10$ mm, $V = 100$ μ l)	Hellma - Müllheim, Deutschland
	Ultra-Mikro-Küvette 105.250-QS ($d = 10 \times 2$ mm, $V = 100$ μ l)	Hellma - Müllheim, Deutschland
	Quarz-Küvette (SUPRASIL) ($d = 0,5$ mm)	Hellma - Müllheim, Deutschland
PCR-Thermocycler	MJ Mini Gradient Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories - Hercules (CA), USA
	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories - Hercules (CA), USA

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller – Stadt, Land
pH-Meter	pH 538	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten - Weilheim, Deutschland
Photometer	NanoDrop 2000 UV-Vis Spektrophotometer	Thermo Scientific - Waltham (MA), USA
	Ultrospec 3100 pro UV/Vis- Spektrometer	GE Healthcare – Chicago (IL), USA
	Ultrospec 1100 pro UV/Vis- Spektrometer	GE Healthcare – Chicago (IL), USA
Pipetten	Pipetman	Gilson - Middleton (WI), USA
	Einkanalpipetten	Eppendorf - Hamburg, Deutschland
Scanner	ImageScanner III	GE Healthcare – Chicago (IL), USA
Schüttler	Certomat RM	Sartorius - Göttingen, Deutschland
	Certomat S	Sartorius - Göttingen, Deutschland
	GFL 3005	Gesellschaft für Labortechnik - Burgwedel, Deutschland
	Rotamax 120	Heidolph Instruments - Schwabach, Deutschland
Schwingmühle	MM400	Retsch - Haan, Deutschland
Thermomixer/- shaker	Thermomixer comfort	Eppendorf - Hamburg, Deutschland
	Thermomixer compact	Eppendorf - Hamburg, Deutschland
	Grant Bio PHMP Thermoshaker	Grant Instruments - Cambridge, England
UV- und Blaulicht- Transilluminator	BlueLight Table	Serva Electrophoresis - Heidelberg, Deutschland
	Image Quant 300	GE Healthcare – Chicago (IL), USA

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller – Stadt, Land
	UVstar WL	Biometra - Göttingen, Deutschland
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries - Bohemia (NY), USA
Waage	Sartorius BL 1500 S Data-Weihing Systems, Inc. (Elk Grove, USA)	Data-Weighing Systems - Elk Grove (IL), USA
	SI-234	Denver Instruments - Bohemia (NY), USA
Zellaufschluss	Basic Z	Constant Systems - Daventry, England
Zentrifugen	Avanti J-25 Zentrifuge	Beckman Coulter - Brea (CA), USA
	Avanti J-26 XP Zentrifuge	Beckman Coulter - Brea (CA), USA
	Eppendorf Centrifuge 5418 (R)	Eppendorf - Hamburg, Deutschland
	ProteomLab XL-I	Beckman Coulter - Brea (CA), USA
	Rotina 420 R	Hettich - Tuttlingen, Deutschland

4.1.2 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller - Stadt, Land
1,4-Dithiothreit (DTT)	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich - St. Louis (MO), USA
2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril	Merck - Darmstadt, Deutschland
Acrylamide/Bis Solution, 19:1	Serva Electrophoresis - Heidelberg, Deutschland
Adenosine 5'-diphosphoribose sodium salt	Sigma Aldrich - St. Louis (MO), USA

Bezeichnung	Hersteller - Stadt, Land
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
Bakto-Trypton	Becton, Dickinson and Company - Franklin Lakes (NJ), USA
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva Electrophoresis - Heidelberg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck - Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
Extran MA 01	Merck - Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Valeant Pharmaceuticals International - Laval (QC), Kanada
Guanidiniumchlorid	Merck - Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	Merck - Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Serva Electrophoresis - Heidelberg, Deutschland
Imidazol	Merck - Darmstadt, Deutschland
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)	Serva Electrophoresis - Heidelberg, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
NAD ⁺ β -Nicotinamide-adenine-dinucleotide, oxidized form	Sigma Aldrich - St. Louis (MO), USA
Natriumchlorid	Merck - Darmstadt, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Merck - Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck - Darmstadt, Deutschland
Nicotinamid	Sigma Aldrich - St. Louis (MO), USA
Salzsäure (32 %)	Merck - Darmstadt, Deutschland
Trichloressigsäure (TCA)	Merck - Darmstadt, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck - Darmstadt, Deutschland
Tris	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Sigma Aldrich - St. Louis (MO), USA
Tween 20 Detergent, Molecular Biology Grade	Merck - Darmstadt, Deutschland

4.1.3 Enzyme, Lösungen, Standards und Kits

Tabelle 5: Proteine, Lösungen, Standards und Kits.

Bezeichnung	Hersteller - Stadt, Land
Proteine	
DNase I	AppliChem - Darmstadt, Deutschland
GoTaq G2 DNA Polymerase	Promega - Fitchburg (WI), USA
Loading Dye (purple, 6x;)	New England Biolabs - Ipswich (MA), USA
Malatdehydrogenase (MDH, Schweineherz)	F. Hoffmann-La Roche - Basel, Schweiz
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega - Madison (WI), USA
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs - Ipswich (MA), USA
<i>Pwo</i> DNA-Polymerase	F. Hoffmann-La Roche - Basel, Schweiz
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs - Ipswich (MA), USA
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega - Madison (WI), USA
Rhodanase (Rinderleber)	Sigma Aldrich - St. Louis (MO), USA
T4 DNA Ligase	Promega - Fitchburg (WI), USA
Lösungen	
5xGreen GoTaq Reaction Buffer	Promega - Madison (WI), USA
Bradford reagent 5x	Serva Electrophoresis - Heidelberg, Deutschland
Colorless GoTaq Reaction Buffers (5x)	Promega - Fitchburg (WI), USA
DNA Stain Clear G	Serva Electrophoresis - Heidelberg, Deutschland
dNTP Mix	Promega - Fitchburg (WI), USA
MgSO ₄ solution (25 mM)	F. Hoffmann-La Roche - Basel, Schweiz
M-MLV RT Reaktionspuffer	Promega - Madison (WI), USA
Oligo (dT) 15 Primer	Promega - Madison (WI), USA
PCR Buffer with MgSO ₄ (10x)	F. Hoffmann-La Roche - Basel, Schweiz
PCR Buffer without MgSO ₄ (10x)	F. Hoffmann-La Roche - Basel, Schweiz
Protease-Inhibitor Mix HP/M/G	Serva Electrophoresis - Heidelberg, Deutschland
Q5 High GC Enhancer	New England Biolabs - Ipswich (MA), USA
Q5 Reaction Buffer	New England Biolabs - Ipswich (MA), USA
Standards	
1 kb DNA-Leiter Orange G	Peqlab Biotechnologie - Erlangen, Deutschland
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific - Waltham (MA), USA
FastLoad 100 bp DNA Ladder	Serva Electrophoresis - Heidelberg, Deutschland
Gel Filtration Standard	Biorad Laboratories – Hercules (CA), USA
Protein Marker IV	VWR – Radnor (PA), USA

Bezeichnung	Hersteller - Stadt, Land
SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range	Bio-Rad Laboratories - Hercules (CA), USA
Kits	
Quick Ligation Kit	New England Biolabs - Ipswich (MA), USA
Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega - Madison (WI), USA
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega - Madison (WI), USA

4.1.4 Verbrauchsmaterial

Tabelle 6: Verbrauchsmaterial.

Bezeichnung	Hersteller - Stadt, Land
Acrodisc Syringe Filter mit Supor-Membran (0,45 µm)	Pall Corporation – Port Washington (NY), USA
Adhäsionsverschlussfolie für PCR-Platte	Nerbe Plus - Winsen/Luhe, Deutschland
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare – Chicago (IL), USA
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare – Chicago (IL), USA
Amicon Ultra-0,5 mL Centrifugal Filter	Merck - Darmstadt, Deutschland
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter	Merck - Darmstadt, Deutschland
Cell Star Zentrifugengefäße	Greiner bio-one - Kremsmünster, Österreich
Dialyseschlauch (Standard Grade RC Membranes: Spectra/Por 1 (MWCO: 6000 - 8000 Da))	Spectrum Laboratories - Rancho Dominguez (CA), USA
Millex-GS Spritzenfilter mit Zellulosemischester-Filter (0,22 µm)	Merck - Darmstadt, Deutschland
Parafilm M	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Nerbe Plus - Winsen/Luhe, Deutschland
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional - Roswell (GA), USA
XPRESS Mini Dialyzer MD100-1000 Segments 3,5 kDa	Scienova – Jena, Deutschland

4.1.5 Primer und Peptide

Tabelle 7: Primer die für die RT-PCRs und Klonierungen der Isoformen von Sirt2, Sirt5, Sirt6, α A- und α B-Kristallin und die Peptide die in Messungen eingesetzt wurden.

Primer	Sequenz 5' zu 3'
RT-PCR	
Sirt2fw_Iso1/4	ATG GCA GAG CCA GAC CCC
Sirt2fw_Iso1-4UTR	GTC GGT GAC AGG ACA GAG CAG TCG G
Sirt2fw_Iso4SS1	GCA GAG CCA GAC CGA CTC AGA TTC AG
Sirt2rv_Iso1	TCA CTG GGG TTT CTC CCT CTC
Sirt2rv_Iso1-4	CCC AGC CAG GCC ACG TC
Sirt2rv_Iso1kurz	GGA GGC AAA GGG CTG CAC
Sirt2rv_Iso4SS2	GGC CAC GTC CCT GCA AGG AG
Sirt5fw_Iso1	GCC TCC AGC GTC CAC ACG AA
Sirt5fw_Iso3	TTT ATC AGG AAA AGG GTG TGA AGA GGC
Sirt5fw_Iso4	GCC AAG TTC AAG ACC TGG CGA C
Sirt5rv_Iso1-4	TGA CAG GCA AGG GCT TCA GGA
Sirt6rv_Iso1	GAG GTC AGC ATG GCG GTC GT
Sirt6rv_Iso2	TCA GCT GGG GAC CGC CTT G
Sirt6rw_Iso1	AAC TGG CAG AGC TCC ACG GG
Sirt6rw_Iso2	CGA GCC TGC AGG AAC GCC
α A-Kristallin (I)	TGA CTC CTG CCA GCC TCC AG
α A-Kristallin (II)	CCC CGT GGT ACC AAA GCT GAA C
α A-Kristallin (III)	GGT CAT AGT CCT GAA AGC CAG AGA GC
α A-Kristallin (IV)	GGC GTT CCT AGC ACC TCC TCC
α A-Kristallin (IX)	AGC CGA GGC AAT GCC TGC
α A-Kristallin (V)	ATG AGC TCG GCC TGC CCA C
α A-Kristallin (VI)	ACC AGT AGC ATT CAG CCC CTC AG
α A-Kristallin (VII)	GGT TTG GAG ACA GGT CGA GGG TC
α A-Kristallin (VIII)	ATG CCT GTC TGT CCA GGA GAC AG
α A-Kristallin (X)	CAT GAT GGG CCA GGG CTG C
Klonierungen	
Sirt2_Iso1/2fwpET-SUMO	GAT GAC <u>GGT CTC GGA TCC</u> ATG GCA GAA CCG GAT CCG AGC CAT C
Sirt2_Iso1/2fwpET-SUMO (34-356/34-271)	GAT GAT <u>GGA TCC</u> GGT GAA GCA GAT ATG GAT TTT CTG CGT AA
Sirt2_Iso1rvpET-SUMO	GAT GAC <u>CTC GAG</u> TTA CTG CGG TTT TTC ACG TTC GGT GGT AC
Sirt2_Iso1rvpET-SUMO (34-356)	GAT GAT <u>CTC GAG</u> TTA GCT CTG TGC ATC AAT GCT TGC ATG
Sirt2_Iso2rvpET-SUMO	GAT GAC <u>CTC GAG</u> TTA ACC TGC CAG ACC ACG ACC CTG C

Primer	Sequenz 5' zu 3'
Sirt5_3'_Iso3Del	PO ₄ ²⁻ -CTT TTC CTG ATA AAG CTG GAC AAA TTG
Sirt5_5'_Iso3Del	PO ₄ ²⁻ -GGT GTG AAG AGG CAG GCT
Sirt5_Iso1/4rvpET-SUMO	GAC GAC <u>CTC GAG</u> TTA AGA AAC AGT TTC ATT TTC ATG ACA GGC
Sirt5_Iso1fwpET-SUMO	GAT GAT <u>AGA TCT</u> ATG CGA CCT CTC CAG ATT GTC C
Sirt5_Iso4fwpET-SUMO	GAT GAT <u>AGA TCT</u> ATG GGG AGC AAG GAG CCC
Sirt6_3'_Iso2Del	PO ₄ ²⁻ -GCA GGC TCG CAG CCC CC
Sirt6_5'_Iso2Del	PO ₄ ²⁻ -AGG AAC GCC GAC CTG TCC ATC AC
Sirt6_Iso1/2fwpE-SUMOpro	TAG <u>GTC TCA AGG TAT</u> GTC GGT GAA TTA CGC GGC GGC GGG GCT G
Sirt6_Iso1/2fwpET-28b	GTT <u>ACA TAT GTC</u> GGT GAA TTA CGC GGC GGG GCT G
Sirt6_Iso1/2rvpE-SUMOpro	TAT <u>CTA GAT CAG</u> CTG GGG ACC GCC TTG GCC
Sirt6_Iso1/2rvpE-SUMOpro (1-296/1-269)	TAG GTC <u>TCT CTA GAT</u> CAC TTG GGG GTG GGC GGG CGG
Sirt6_Iso1/2rvpET-28b (1-296/1-269)	TTA <u>TCT CGA GTC</u> A CAG CTT GGG GGT GGG CGG GC
Sirt6_Iso1fwpET-28b-(SUMO)	GTA <u>GGA TCC</u> ATG TCG GTG AAT TAC GCG GCG GGG CTG
Sirt6_Iso1rvpET-28b-SUMO	TGA <u>TCT CGA GTC</u> AGC TGG GGA CCG CCT TGG C
α A-Kristallin_Iso2 fwpE-SUMOpro	ATG <u>GTC TCA AGG TAT</u> GCC TGT CTG TCC AGG AGA C
α A-Kristallin_Iso2/SV153rvpE-SUMOpro	ATT <u>CTA GAT</u> TAG GAC GAG GGA GCC GAG G
α A-Kristallin_Iso2/SV153rvpET-21a	GAC GAT <u>GAA TTC</u> TTA GGA CGA GGG AGC CGA GG
α A-Kristallin_Iso2/SV153rvpET-28b-SUMO	CAA <u>TCT CGA GTT</u> AGG ACG AGG GAG CCG AGG
α A-Kristallin_Iso2fwpET-21a	GAC GAT <u>CAT ATG</u> CCT GTC TGT CCA GGA GAC
α A-Kristallin_Iso2fwpET-28b-SUMO	CGA <u>TGG ATC CAT</u> GCC TGT CTG TCC AGG AGA C
α A-Kristallin_SV153 fwpE-SUMOpro	ATG <u>GTC TCA AGG TAT</u> GAG CTC GGC CTG CCC
α A-Kristallin_SV153fwpET-21a	GAT GAT <u>CAT ATG</u> AGC TCG GCC TGC CC

Primer	Sequenz 5' zu 3'
αA-Kristallin_SV153fwpET-28b-SUMO	TTA <u>TGG ATC</u> CAT GAG CTC GGC CTG CCC
αB-Kristallin_SV155fwpET-21a	GAT GAT <u>CAT ATG</u> GAC ATC GCC ATC CAC CAC
αB-Kristallin_SV155fwpET-28b-SUMO	TGT <u>AAG ATC</u> TAT GGA CAT CGC CAT CCA CCA C
αB-Kristallin_SV155rvpET-21a	GAC GAC <u>GAA TTC</u> CTA GAC ATT GAT TTG TAA CCC CTG ATC CC
αB-Kristallin_SV155rvpET-28b-SUMO	CGA <u>CCT CGA</u> GCT AGA CAT TGA TTT GTA ACC CCT GAT CCC

Peptide		
Name	Sequenz	Hersteller - Stadt, Land
H3K9	NH ₂ -KQTARKSTGGWW-COOH	Biomatik – Cambridge (ON), Kanada
H3K9Myr	NH ₂ -KQTARK[Myr]STGGWW-COOH	Biomatik – Cambridge (ON), Kanada

4.1.6 Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 8: Bakterienstämme und Zelllinien.

Name	Genotyp/Typ	Quelle
ArcticExpress (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>cpn10 cpn60</i> Gent ^r]	Stratagene
BL21- CodonPlus (DE3)-RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [argU ileY leuW CamR]	Stratagene
C43 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	J. E. Walker
HEK293	Humane embryonische Nierenzellen	
JM109 (DE3)	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>relA1, supE44, λ-</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [F', <i>traD36, proAB, lacI</i> ^q Δ M15]	Merck - Darmstadt, Deutschland
Mach1 T1R	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 hsdR</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i>	Thermo Fisher Scientific - Waltham (MA), USA
Rosetta (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)	Merck - Darmstadt, Deutschland
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^q Δ M15 Tn10 (Tet ^r)	Stratagene

4.1.7 Medien und Antibiotika für die *E. coli*- und Zellkultur

Tabelle 9: Medien und Antibiotika für *E. coli*- und Zellkultur.

Bezeichnung	Hersteller - Stadt, Land
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
Chloramphenicol	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific - Waltham (MA), USA
Fötales Rinderserum	Sigma Aldrich - St. Louis (MO), USA
Gentamycin	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
Kanamycinsulfat	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland
LB Medium (Lennox), Pulver	Serva Electrophoresis - Heidelberg, Deutschland
Terrific-Broth-Medium	Carl Roth - Karlsruhe, Deutschland

Alternativ wurde, um Präzipitation vorzubeugen, TB-Medium selbst hergestellt, indem 24 g Trypton, 48 g Hefeextrakt und 8 mL Glycerin in Wasser gelöst und auf ein Endvolumen von 1800 mL gebracht. Nach dem Autoklavieren wurde eine ebenfalls autoklavierte Lösung aus KH_2PO_4 0,17 M, K_2HPO_4 0,72 M zugegeben.

4.1.8 Chromatographische Materialien

Tabelle 10: Chromatographische Materialien.

Bezeichnung	Hersteller - Stadt, Land
Präparativ	
HiPrep 26/10 desalting	GE Healthcare – Chicago (IL), USA
HisTrap FF 5 mL	GE Healthcare – Chicago (IL), USA
RESOURCE Q	GE Healthcare – Chicago (IL), USA
RESOURCE S	GE Healthcare – Chicago (IL), USA
Superdex 75 or 200 pg	GE Healthcare – Chicago (IL), USA
Analytisch	
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare – Chicago (IL), USA
Superdex 200 5/150 GL	GE Healthcare – Chicago (IL), USA

4.1.9 Datenbanken, Software und Onlinewerkzeuge

Tabelle 11: Datenbanken, Software und Onlinewerkzeuge.

Datenbanken	
Name	Uniform Resource Locator (URL)
Ensemble (Version 87)	http://www.ensembl.org/index.html
UniProt	http://www.uniprot.org/
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
PDB	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
PDBe	http://www.ebi.ac.uk/pdbe/
Software	
Name	Hersteller/Entwickler
Adobe Illustrator CS2 und CC 2015.3.0	Adobe Systems – San Jose (CA), USA
ImageQuant TL	GE Healthcare – Chicago (IL), USA
Citavi5	Swiss Academic Software – Wädenswil, Schweiz
Office 365 ProPlus	Microsoft Corporation – Redmond (WA), USA
OriginPro 2016G	OriginLab – Northampton (MA), USA
SEDFIT 15.01b	Peter Schuck (<i>National Institutes of Health</i>)
Pymol 1.8.x	Schrödinger – New York (NY), USA
ApE- A plasmid Editor v2.0.50	M. Wayne Davis
CDNN 2.1 (Bohm <i>et al.</i> 1992)	Gerald Böhm
Online-Werkzeuge	
Name	Uniform Resource Locator (URL)
Sednterp	http://sednterp.unh.edu/#
NCBI BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
UniProt BLAST	http://www.uniprot.org/blast/
NCBI Graphical Sequence Viewer 3.19.0	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/sviewer/
Clustal Omega (Sievers <i>et al.</i> 2011)	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/
ProtScale	http://web.expasy.org/protscale/
OligoAnalyzer 3.1	Integrated DNA Technologies
RestrictionMapper	http://restrictionmapper.org/
NEBcutter 2.0	http://www.labtools.us/nebcutter-v2-0/
I-TASSER (Zhang 2008; Roy <i>et al.</i> 2010; Yang <i>et al.</i> 2015)	http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/
Phyre2 (Kelley <i>et al.</i> 2015)	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Zur Vervielfältigung von Plasmiden und bei Klonierungen wurden Mach1 oder XL1-Blue eingesetzt. Weitere *E. coli*-Stämme wurden zur Expression von Proteinen verwendet. Die Bakterien wurden, sofern nicht anders angegeben, zur Vermehrung entweder auf LB-Platten oder in LB-Flüssigkulturen bei 37 °C inkubiert und bei 4 °C auf Platten gelagert. Entsprechende Stämme wurden durch passende Antibiotika ($\beta_{\text{end}}(\text{Ampicillin}) = 100 \mu\text{g/mL}$, $\beta_{\text{end}}(\text{Kanamycin}) = 35 \mu\text{g/mL}$, $\beta_{\text{end}}(\text{Gentamycin}) = 20 \mu\text{g/mL}$, $\beta_{\text{end}}(\text{Chloramphenicol}) = 34 \mu\text{g/mL}$) selektiert. Zur Inokulation wurden entweder einzelne Kolonien oder eine 1:100 Verdünnung mit Flüssigkulturen eingesetzt. Die Zelldichte wurde gegebenenfalls über die Extinktion bei 600 nm (E_{600}) abgeschätzt.

Zur Langzeitlagerung wurden 700 μL einer Über-Nacht-Kultur mit 300 μL sterilem 50 %igem Glycerin in Cryogefäßen versetzt und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

4.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde zur Amplifikation gewünschter DNA eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden mithilfe der Programme OligoAnalyzer, RestrictionMapper und NEBcutter entworfen und durch Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Bei einer typischen PCR (**Tabelle 12**) wurde die Polymerase, Primerkonzentration und Pufferzusammensetzung entsprechend der Länge der Zielsequenz und des GC-Gehalts der Primer eingestellt.

Tabelle 12: Typischer PCR-Ansatz.

Komponente	Volumen [μL]
Templat-DNA	0,5
10x Reaktionspuffer	5
dNTPs (je 10 mM)	1
Forwärts-Primer (100 μM)	0,5
Rückwärts-Primer (100 μM)	0,5
Nukleasefreies Wasser	42,25 - x
Polymerase	0,25
MgCl ₂ oder DMSO	x
Σ	50

Zudem wurden für die PCR Temperaturprogramme eingesetzt, bei denen die Temperatur für die Hybridisierung (*annealing*) der Primer etwa 5 °C unter der berechneten Schmelztemperatur (T_{schmelz}) der Primer lag (**Tabelle 13**).

Tabelle 13: Typisches Temperaturprogramm für PCRs.

Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Primäre Denaturierung	95	2 min	
Denaturierung	95	45 s	
Primerhybridisierung	$T_{\text{schmelz}}-5$	45 s	35x
Elongation	72	1 min/kb	
Finale Elongation	72	5 min	
Lagerung	4	∞	

Über Kolonie-PCRs wurden die Längen der Inserts bei einer Klonierung überprüft. Dazu wurden einzelne *E. coli*-Kolonien als Template eingesetzt und T7-Primer eingesetzt.

Zum Nachweis von Transkripten in total-RNA-Isolaten oder zum klonieren kodierender Sequenzen aus diesen wurde die RNA mittels M-MLV-Polymerase in cDNA revers-transkribiert. Dazu wurden oligo (dT)-Primer eingesetzt und nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Für anschließende PCRs wurden 0,25 bis 1 μL cDNA als Templat und GoTaq G2 als Polymerase eingesetzt. Gegebenenfalls wurden nested-PCRs eingesetzt, wenn die amplifizierte DNA-Menge zu gering für Sequenzierungen war. Zudem konnte dadurch die durch das komplexe Templat resultierende Unspezifität des Amplifikats verringert werden. Dazu wurde das Amplifikat der primären PCR über ein Agarosegel aufgetrennt und entsprechende Banden ausgeschnitten und präpariert. Ein Teil der DNA wurde als Templat für eine sekundäre PCR mit Primern, die komplementär zu einer Sequenz näher am Zentrum der Zielsequenz sind, eingesetzt.

Die PCR-Produkte wurden über Agarosegelelektrophorese untersucht. Gewünschte Banden wurden aus dem Gel präpariert und mit eigenen oder Standard-Primern durch Eurofins Genomics sequenziert.

4.2.3 Restriktionsverdau

Nach Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente, Agarosegelelektrophorese und Gelpräparation wurden diese präparativ verdaut, um lineare DNA-Fragmente mit klebrigen Enden zu erhalten (**Tabelle 14**). Zudem wurde zur Erkennung erfolgreicher Ligationen entweder ein analytischer Verdau oder eine Kolonie-PCR eingesetzt.

Tabelle 14: Ansätze des präparativen und analytischen Verdaus.

Komponente	Präparativ	Analytisch
	Volumen [μL]	
DNA-Lösung	50	10
10x Puffer	6	1,22
Restriktionsenzym 1	2	0,5
Restriktionsenzym 2	2	0,5
Σ	60	12,22

Die Reaktionen wurden abhängig von der Effizienz der Restriktionsenzyme zwischen 3 und 24 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe des DNA-Laufpuffers wurde die Reaktion gestoppt.

4.2.4 Agarosegelelektrophorese

Agarosegele wurden eingesetzt, um DNA analytisch und präparativ aufzutrennen. Dazu wurden 1 bis 2 %ige Gele mit TAE-Puffer (**Tabelle 15**) hergestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung von 50x TAE-Puffer.

Komponente	Konzentration
EDTA	50 mM
Eisessig	1 M
Tris	2 M
pH	8,0

Um DNA sichtbar zu machen, wurden zusätzlich 1 bis 2 μ L DNA Stain G pro 100 mL Agaroselösung hinzugegeben. Dieses hat bei Bindung an DNA oder RNA Anregungsmaxima der Fluoreszenz bei 300 und 450 nm und emittiert mit einem Maximum bei 530 nm. Als Ladepuffer wurde entweder der 10x Ladepuffer (**Tabelle 16**) oder der Gel Loading Dye (purple, 6x;) eingesetzt. 1x TAE-Puffer wurde als Laufpuffer eingesetzt.

Tabelle 16: Zusammensetzung des 10x DNA-Ladepuffers.

Komponente	Konzentration oder Anteil
Glycerin	50 % (v/v)
Bromphenolblau	2,5 g/L
Xylencyanol	2,5 % g/L

Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V bis zur gewünschten Separation durchgeführt. DNA wurde über ImageQuant 300 im UV-Bereich oder dem BlueLight Table bei 470 nm sichtbar gemacht.

Die Banden wurden ausgeschnitten und mittels Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System nach Herstellerangaben präpariert.

4.2.5 Ligation

Nach dem Restriktionsverdau, der Agarosegelelektrophorese und Gelpräparation wurden Vektoren und kodierenden Sequenzen (CDS) mit klebrigen oder glatten Enden ligiert. Dazu wurden bei Verwendung von T4-DNA-Ligase Molverhältnisse von Insert und Vektor zwischen 1:3 und 1:10 eingesetzt und bei 4 oder 16 °C über Nacht inkubiert. Alternativ wurde die Quick Ligase eingesetzt und für 5 min auf Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde eine Transformation in Mach1 oder XL1-Blue durchgeführt und auf Selektionsplatten ausplattiert.

4.2.6 Klonierungen

Die CDS für die beiden Isoformen von Sirt2 und die alternativen Spleißvarianten von α A-Kristallin Isoform 2, SV153 und α B-Kristallin SV155 wurden synthetisch hergestellt (Thermo Fischer Scientific) und im pMA-T Vektor erhalten. Die Sequenzen der Sirt2 Isoformen waren dabei für die Expression in *E. coli* optimiert, während die für die α A- und α B-Kristallin Isoformen den CDS aus der Ensemble Datenbank entsprachen. Die CDS der Isoformen von Sirt5 und Sirt6 wurden mittels reverser Transkription aus den total-RNA-Isolaten der humanen Gewebeproben gewonnen. Die 5'- und 3'-Termini der CDS von Sirt5 Isoform 1 und 3 bzw. Sirt6 Isoform 1 und 2 sind identisch, da eine interne Deletion eines Exons stattfindet. Daher konnte die weniger häufig vorkommende Isoform 3 nicht direkt aus der cDNA amplifiziert werden. Hierbei wurden Primer eingesetzt, die am 5'-Ende phosphoryliert und komplementär zu den an die Deletion anschließende Sequenzen waren. Nach der PCR mit Q5-Polymerase wurde das etwa 6 kbp große Fragment über ein Agarosegel gereinigt und aus dem Gel präpariert. Ein Verdau der methylierten Templat-DNA wurde für 3 h bei 37 °C in CutSmart buffer durchgeführt. Nach Reinigung über das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System wurden die langen, linearen Fragmente über die Quick Ligase ligiert. Die zirkuläre DNA wurde in XL1-Blue transformiert, vervielfältigt und gelagert.

Der pET28b-SUMO Vektor stammte von Bepperling *et al.* (Bepperling *et al.* 2012).

Nach abgeschlossener Klonierung wurden von den erfolgreichen Konstrukten Amplifikationen mittels kleiner 3 mL-Kulturen bzw. großen 100 mL-Kulturen angesetzt und

über Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System bzw. PureYield Plasmid Midipreps System gereinigt.

Die DNA wurde entweder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Wasser oder als Mach1- bzw. XL1-Blue-Klon auf Selektionsplatte oder Glycerinstock gelagert.

4.2.7 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach zwei verschiedenen Protokollen hergestellt. Bei allen Schritten wurde steril gearbeitet und es wurden sterile Gefäße verwendet.

Standard-Protokoll:

1. 200 mL LB-Medium (gegebenenfalls mit Antibiotikum) mit 10 mL einer Über-Nacht-Kultur des gewünschten Stammes inokulieren
2. Inkubation bei leichtem Schütteln bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, bis E_{600} von ~ 1 erreicht ist
3. Zugabe von 4 mL steriler MgCl_2 -Lösung (1 M)
4. Inkubation für 10 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Schütteln
5. Inkubation für 60 min auf Eis und anschließend Zentrifugation (10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4400\text{ } \times g$)
6. Verwerfen des Überstands, Resuspendieren des Pellets in 40 mL Lösung A (**Tabelle 17**) und Inkubation auf Eis für weitere 60 min
7. Zentrifugation (10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4400\text{ } \times g$) und Verwerfen des Überstands
8. Resuspendieren des Pellets in 8 mL Lösung A, die 15 % Glycerin enthält
9. Aliquotieren in 200 μL -Fraktionen, Einfrieren in Flüssigstickstoff und Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tabelle 17: Zusammensetzung von Lösung A. Die MnCl_2 -Lösung muss nach dem Autoklavieren separat über einen Sterilfilter ($0,45\text{ }\mu\text{m}$) dazugegeben werden.

Komponente	Konzentration [M]	Eingesetztes Volumen [mL]
NaAc	3	13
CaCl_2	1	100
MnCl_2^*	2,8	25
Wasser	55,4	862
pH	5,5	
Σ		1000

Zudem wurde ein modifiziertes Protokoll von *Inoue et al.* (*Inoue et al.* 1990) zur Herstellung „ultra-kompetenter“ Zellen eingesetzt:

1. Inokulation von 250 mL SOB-Medium (**Tabelle 18**) mit einer großen Kolonie des gewünschten Stammes von der Platte
2. Inkubation bei 19 °C und Schütteln, bis E_{600} etwa 0,5 erreicht (etwa 24-36 h)
3. Inkubation auf Eis für 10 min und Zentrifugation (10 min, 4 °C, 4000 xg)
4. Verwerfen des Überstands und schonendes Resuspendieren des Pellets in 80 mL eiskaltem TB-Puffer (**Tabelle 18**)
5. Zentrifugation (10 min, 4 °C, 4000 xg)
6. Verwerfen des Überstands und schonendes Resuspendieren des Pellets in 20 mL eiskaltem TB-Puffer, der mit 1,4 mL DMSO versetzt wurde
7. Aliquotieren in 50 µL-Fractionen, Einfrieren in Flüssigstickstoff und Lagerung bei -80 °C

Tabelle 18: Zusammensetzung des SOB-Mediums und TB-Puffers. Das $MnCl_2$ wurde als letztes nach dem Einstellen des pH-Wertes mit KOH oder HCl hinzugegeben. Zur Sterilisation wurde der TB-Puffer sterilfiltriert.

SOB-Medium		TB-Puffer	
Komponente	Konzentration [mM] oder Anteil	Komponente	Konzentration [mM]
Hefeextrakt	0,5 %	PIPES oder HEPES	10
Trypton	2 %	CaCl ₂	15
KCl	2,5	KCl	250
NaCl	10	MnCl ₂ *	55
MgCl ₂	10		
MgSO ₄	10		
		pH	6,7

4.2.8 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Transformation wurden ~200 µL chemisch kompetenter Zellen mit ~50 ng Plasmid-DNA oder 10 µL Ligationslösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschritt bei 42 °C für 60 s wurden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt. 1 mL LB₀ wurde zugegeben und für 60 min bei 37 °C und 900 rpm inkubiert. Anschließend wurde entweder auf Selektionsplatten ausplattiert oder Flüssigkulturen mit Antibiotikum inokuliert.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Haltung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, Pyruvat und 10 % (v/v) fötalem Kälberserum in Zellkultur gehalten. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C bei ~95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Anteil in der Atmosphäre. Zur Kultivierung adhärenter Zellen wurden Zellkulturfläschchen mit 25 und 75 cm² und Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser eingesetzt. Zudem wurden Zellkulturplatten mit 6 bis 96 Wells benutzt. Alle Materialien für die Zellkultur waren steril verpackte Einmalartikel. Wenn die Zelldichte bestimmt wurde, geschah dies mit einer Neubauer-Zählkammer. Dabei erfolgte zudem eine Färbung perforierter, abgestorbener Zellen mit Trypanblau. Bei einer Konfluenz von ~80 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium verworfen und mit Dulbecco's-PBS (DPBS) gewaschen. Durch Zugabe von 1 bis 3 mL einer Trypsin-EDTA-Lösung, Inkubation für 1 min auf 37 °C und leichtes Klopfen wurden die Zellen abgelöst. Ein Überschuss an frischem Medium wurde zugegeben und durch mehrfaches Pipettieren wurden die Zellen vereinzelt. Typischerweise erfolgte eine 1:10 Verdünnung der Zellen. Das Passagieren erfolgte alle 3 bis 5 Tage.

Zur visuellen Erkennung von Kontaminationen durch Bakterien oder Pilze wurde ein Lichtmikroskop eingesetzt. Zudem wurden Tests auf Mykoplasmen durchgeführt. Dazu wurde 5 µL eines Mediums, das mindestens drei Tage zur Inkubation der Zellen verwendet wurde, in einer PCR mit Primern spezifisch für Mykoplasmen eingesetzt:

Fw-Primer: 5'-GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T-3'

Rv-Primer: 5'-TCC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3'

Eine kontaminierte Probe wurde als Positivkontrolle verwendet.

4.3.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden ~2,5x10⁶ adhärenter Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, abgelöst. Nach Stoppen der Trypsinreaktion mit einem Überschuss Medium wurde für 5 min bei 500 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 mL eiskaltem Gefriermedium (DMEM mit 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert und in ein Cryogefäß überführt. Das Einfrieren wurde mit dem CoolCell Gefrierbehälter erreicht, der auf -80 °C inkubiert wurde und damit eine

Kühlrate von $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ermöglichte. Anschließend wurde das Cryogefäß in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Um eukaryotische Zellen aufzutauen, wurden die Zellen direkt nach dem Herausnehmen aus dem flüssigen Stickstoff schnell in einem $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad erwärmt und in 8 mL Medium, das auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmt war, gegeben. Die Suspension wurde in eine Kulturflasche überführt und im CO_2 -Inkubator inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt.

4.3.3 Herstellung von Zelllysaten eukaryotischer Zellen

Lysate eukaryotischer Zellen wurden mit Zellen einer Dichte von $\sim 80\%$ hergestellt. Das Medium wurde verworfen und die Zellen zwei Mal mit eiskaltem DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden im Falle einer 75 cm^2 -Flasche entweder 1 mL von eiskaltem RIPA-Puffer (mit Protease-Inhibitor Mix M 1 % (v/v)) oder nicht-denaturierendem Lysepuffer (Tris 20 mM pH 7,5 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1 % (v/v), Protease-Inhibitor Mix M 1 % (v/v)) zugegeben und durch Schwenken verteilt. Nach ~ 2 min wurden die Zellen mittels Zellschaber vollständig abgelöst. Das Lysat wurde in ein 15 mL-Gefäß überführt und 3 mal je 5 s bei 10 % Intensität mit Ultraschall behandelt. Es wurde für mindestens 10 min bei $16900\text{ } \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde als lösliche Fraktion abgetrennt und die Konzentration entweder über einen Bradfordassay (Bradford 1976) (siehe 4.4.5) oder mittels BCA-Kit nach Herstellerangaben bestimmt. Lysate wurden direkt eingesetzt oder in Flüssigstickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.4 Proteinchemische Methoden

4.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine diskontinuierliche Elektrophoresemethode und wird zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität eingesetzt. Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) bindet dabei mit einigen Ausnahmen im Massenverhältnis $\sim 1,4\text{ g SDS zu }1\text{ g Protein}$ (Smith 1984). Dadurch und durch Erhitzen auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturieren die Proteine und werden vollständig zugänglich. Folglich wird durch die Sulfonsäuregruppe eine negative Ladung an die Proteine gebunden, die proportional zur Länge des Proteins ist. Wird ein elektrisches

Feld angelegt, findet eine Trennung nach der Größe des Moleküls durch das retardierende quervernetzte Gel statt. Für das Sammelgel wurde ein Anteil von 5 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid eingesetzt und für das Trenngel ein Anteil zwischen 10 und 18 % (v/v) (**Tabelle 19** und **Tabelle 20**).

Tabelle 19: Zusammensetzung der Acrylamidgele, die für die SDS-PAGE eingesetzt wurden.

Komponente	Sammelgel 5 % Trenngel x %	
	Volumen [mL]	
40 % (w/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lsg.	1,25	$10 \cdot \frac{x}{40}$
2x Sammelgelpuffer	5	0
4x Trenngelpuffer	0	2,5
Wasser	3,75	$7,5 - 10 \cdot \frac{x}{40}$
APS (0,1 g/mL)	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,01
Σ	~10	~10

Tabelle 20: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngelpuffers.

Komponente	2x Sammelgelpuffer	4x Trenngelpuffer
	Konzentration	
Tris	0,25 M	1,5 M
SDS	4 g/L	8 g/L
pH	6,8	8,8

Ammoniumpersulfat (APS) wurde als Radikalstarter neben TEMED eingesetzt. Als Ladepuffer wurde ein reduzierender 5x Lämmli-Puffer (**Tabelle 21**) eingesetzt.

Tabelle 21: Zusammensetzung des 5x Lämmli-Ladepuffers.

Komponente	Konzentration oder Anteil
Tris	0,3 M
SDS	100 g/L
Bromphenolblau	0,5 g/L
Glycerin	50 % (v/v)
2-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
pH	6,8

Vor dem Laden wurden die Proben 5 min auf 95 °C erhitzt, wodurch Proteine denaturiert und Zellen aufgeschlossen wurden. Die Elektrophorese wurde in einem PAGE-Laufpuffer (**Tabelle 20**) bei 20 bis 35 mA pro Gel bis zur gewünschten Laufweite auf Raumtemperatur oder bei 4 °C durchgeführt.

Tabelle 22: Zusammensetzung des 10x PAGE-Laufpuffers.

Komponente	Konzentration
Tris	0,25 M
SDS	10 g/L
Glycerin	2 M
pH	8,3

Die Coomassie-Färbung der Gele wurde anschließend über ein modifiziertes Protokoll nach Fairbanks *et al.* (Fairbanks *et al.* 1971) durchgeführt. Dazu wurden die Gele zum Färben in Fairbanks A erhitzt und darauf folgend zum Entfärben in Fairbanks D (**Tabelle 23**) erhitzt.

Tabelle 23: Zusammensetzung von Fairbanks A und D.

Komponente	Fairbanks A	Fairbanks D
	Konzentration oder Anteil	
Isopropanol	25 % (v/v)	0
Essigsäure	10 % (v/v)	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R 250	0,5 g/L	0

Alternativ wurde der Quick Coomassie Stain nach Herstellerangaben eingesetzt.

4.4.2 Westernblot

Der Westernblot wird eingesetzt, um bestimmte Proteine eines Proteingemisches spezifisch nachzuweisen. Dabei vereint er die Auftrennung von Proteinen nach ihrer elektrophoretischen Mobilität und die spezifische Detektion durch Antikörper. Dazu wird ein Transfer (*blotting*) der Proteine nach einer PAGE vom SDS-Gel in eine Nitrozellulose (NC)- oder Polyvinylidendifluorid (PVDF) -Membran durchgeführt. Sechs Filterpapiere (3 MM chromatography paper), das Gel der PAGE und NC- bzw. PVDF-Membran wurden 2 min im Westernblot-Transferpuffer (**Tabelle 24**) inkubiert. Falls eine PVDF-Membran benutzt wurde, wurde diese vorher für 2 min in Methanol aktiviert.

Tabelle 24: Zusammensetzung des Westernblot-Transferpuffers.

Komponente	Konzentration oder Anteil
Tris	0,05 M
Glycin	0,04 M
Methanol	20 % (v/v)
SDS	0,37 g/L
pH	8,3

Der Aufbau für einen Transfer war von Anode zu Kathode: Drei Filterpapiere, Nitrozellulose- oder PVDF-Membran, SDS-Gel und drei weitere Filterpapiere. Der Transfer wurde durch das Anlegen einer elektrischen Spannung für ~1 h senkrecht zur Laufrichtung des Gels mit einer Stromstärke von 1,5 mA/cm² pro Gel erreicht. Anschließend wurde die Membran kurz in PBS (*phosphate buffered saline*)-T oder TBS (*tris buffered saline*)-T (**Tabelle 25**) gewaschen.

Tabelle 25: Zusammensetzung von PBS-T und TBS-T.

	PBS-T	TBS-T
Komponente	Konzentration oder Anteil	
KH ₂ PO ₄	2 mM	0
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	10 mM	0
Tris	0	20
NaCl	137 mM	150 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
pH	7,4	7,6

Die Membran wurde zum Blocken unspezifischer Bindestellen mit einer Milchlösung aus 0,05 g/mL Milchpulver in PBS-T oder TBS-T unter leichtem Schütteln für mindestens 30 min inkubiert. Es folgte die Inkubation für 1 h auf Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit verdünntem Antikörper in der Milchlösung oder in 0,05 g/mL BSA in PBS-T oder TBS-T. Anschließend wurde drei Mal mit PBS-T oder TBS-T für je 10 min gewaschen. Auf Raumtemperatur wurde für 1 h mit einer Lösung des Sekundärantikörpers in der Milchlösung inkubiert. Dieser trug kovalent das Enzym Meerrettichperoxidase. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde eine Detektion mit Hilfe des WesternBright ECL Sprays, das Luminol als Substrat der Peroxidase enthielt, durchgeführt. Dies fand am ImageQuant LAS 4000 statt. Gegebenenfalls wurden die Westernblotbanden mit der 1D gel Analysefunktion von der ImageQuant TL Software quantifiziert.

4.4.3 Expressionstests

Die Expressionstests für die verschiedenen Konstrukte wurden eingesetzt, um die Expressionsgeschwindigkeit und Löslichkeit der Proteine bei unterschiedlichen Bedingungen einzuschätzen. 50 mL LB (*lysogeny broth*)- oder TB (*terrific broth*)-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit 3 mL verschiedener *E. coli*-Stämme (**Tabelle 8**) inokuliert. Die Kulturen wurden unter leichtem Schütteln bis zu einem E_{600} von ~0,6 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration

von 0,1 bis 1 mM induziert. Die weitere Inkubation fand bei 10 bis 37 °C statt. Es wurden jeweils 1 mL-Proben nach 0, 1, 2, 4, 16 und 40 h entnommen. Diese wurden bei 3100 xg und 8 °C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 µL zu testendem Lysepuffer resuspendiert, wovon 20 µL als Gesamtzellprobe (Gesamtproteom) entnommen, mit 5 µL 5x Lämmli versetzt und auf 95 °C erhitzt wurden. Zur restlichen Probe wurden Glaskugeln (Ø 0,25 - 0,5 mm) gegeben, bis sie die Hälfte des Volumens ausmachten. An der Kugelmühle wurden die Zellen aufgeschlossen. Es wurde vier Mal bei 30 Hz für je 2 min gerüttelt, wobei zwischen den Rüttelvorgängen für 1 min auf Eis abgekühlt wurde. Es wurde für 30 min bei 4 °C und 16900 xg zentrifugiert. 20 µL des Überstands wurden entnommen und mit 5x Lämmli versetzt und auf 95 °C erhitzt.

4.4.4 Proteinexpression und -reinigung

Sirt6 Isoform 1

Die Isoform 1 von Sirt6 wurde sowohl mit His-Tag als auch mit His-SUMO-Tag erfolgreich gereinigt. Ersteres wurde exprimiert, indem der entsprechende pET-28b-Vektor in BL21 cod+ (DE3) eingebracht wurde. Bei 37 °C wurden die Zellen bis $E_{600} \sim 0,6$ in TB-Medium kultiviert und dann mit 0,5 mM IPTG Endkonzentration induziert. Es wurde für 16 h bei Raumtemperatur exprimiert, anschließend geerntet, mit Puffer A (40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,4, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM DTT) gewaschen und resuspendiert. Die Zellen wurden an der Basic Z French-Press bei 2,3 kbar aufgeschlossen und das Lysat für 30 min bei 48000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde über Nickel-Chelatchromatographie (*immobilized metal affinity chromatography*, IMAC) mit einer 5 mL-HisTrap gereinigt. Dabei war die Säule in Puffer A voräquiliert und wurde nach Proteinauftrag mit Puffer A und B (40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,4, 500 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 1 mM DTT) gespült. Eluiert wurde mit Puffer C (40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,4, 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 1 mM DTT). Das Eluat wurde in NS-H-Puffer dialysiert (50 mM HEPES pH 8,0, 20 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTT). Ausgeflocktes Protein wurde abzentrifugiert und der lösliche Überstand über einen RESOURCE S Kationenaustauscher (Ionenaustauschchromatographie, IC) getrennt. Zur Elution wurde ein 15 Säulenvolumen (*column volume*, CV) langer Gradient zu HS-H-Puffer (50 mM HEPES pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTT) verwendet. Proteinenthaltende Fraktionen wurden vereint, in 20 mM Tris pH 7,0, 100 mM NaCl

dialysiert, aufkonzentriert und in Flüssigstickstoff weggefroren. Aus 4 L Kultur konnten etwa 2,7 mg Protein erhalten werden.

Die Expression mit pE-SUMOpro-Vektor wurde in ArcticExpress (DE3) durchgeführt. Nachdem die Zellen ein E_{600} von $\sim 0,6$ in TB-Medium erreichten, wurde die Kultur auf Eis heruntergekühlt und mit 0,1 mM IPTG Endkonzentration induziert und für ~ 64 h bei 13,5 °C weiter inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellen in 20 mM Tris pH 7,3, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol und 1 mM DTT gewaschen, resuspendiert und über Nickel-Chelatchromatographie gereinigt. Nach Proteinauftrag wurde mit Auftragspuffer und Auftragspuffer mit 30 mM Imidazol gewaschen. Eluiert wurde mit Auftragspuffer, der 300 mM Imidazol enthielt. Es wurde in 20 mM Tris pH 7,3, 50 mM NaCl, 1 mM DTT dialysiert und mit SUMO-Protease (Ulp1) behandelt. Anschließend wurde eine Trennung über Kationenaustauschchromatographie (RESOURCE S, 6 mL) durchgeführt und über 20 CV mit 20 mM Tris pH 7,3, 500 mM NaCl, 1 mM DTT eluiert. Proteinhaltende Proben wurden vereint und so mit imidazolhaltigem Puffer gemischt, dass eine Endkonzentration von 20 mM erreicht wurde. Es wurde erneut eine Nickel-Chelatchromatographie mit gleichen Puffern eingesetzt, wobei der das Zielprotein enthaltende Durchlauf aufkonzentriert und auf eine Superdex 75 pg Gelpermeationssäule (GPC-Säule) aufgetragen wurde. Eluiert wurde das Protein in 20 mM Tris pH 7,3, 100 mM NaCl, 1 mM DTT. Nach dem Aufkonzentrieren konnten ~ 4 mg Protein eingefroren werden.

Sirt6 Isoform 1 (1-296)

Die Expression und Reinigung der C-terminal verkürzten Variante von Sirt6 Isoform 1 entsprach der der Volllänge aus pE-SUMOpro, jedoch wurde die Reinigung an nur einem Tag durchgeführt und leicht unterschiedliche Puffer verwendet (**Tabelle 26**).

Tabelle 26: Zusammensetzung der für die Reinigung von Sirt6 Isoform 1 (1-296) verwendeten Puffer.

Komponente	HisTrap		RESOURCE S		Superdex	
	Konzentration					
HEPES	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	500 mM	500 mM	500 mM	-	500 mM	100 mM
Imidazol	20 mM	30 mM	300 mM	-	-	-
DTT	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
pH	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2

Ferner wurde das Eluat der HisTrap 4 h in Puffer ohne NaCl dialysiert und stündlich der Dialysepuffer getauscht. Gleichzeitig wurde SUMO-Protease eingesetzt. Das hier präzipitierte Protein wurde nach zusätzlichem Verdünnen mit Puffer ohne NaCl abzentrifugiert und über einen Spritzenvorsatzfilter filtriert. Das Eluat der Gelpermeationssäule wurde bis auf ~10 mg/mL aufkonzentriert. Es wurde eine Ausbeute von ~6,3 mg erhalten.

Sirt6 Isoform 2

Die Expression und Reinigung von Sirt6 Isoform 2 mit pET28b-SUMO war weitestgehend gleich zu Sirt6 Isoform 1 aus pE-SUMOpro. Der Zellaufschluss erfolgte hier jedoch über Ultraschall. Die Suspension wurde 2 mal 5 min bei 60 % Intensität (5 Zyklen) behandelt und zwischendurch auf Eis gekühlt. Die verwendeten Puffer unterschieden sich leicht (**Tabelle 27**).

Tabelle 27: Zusammensetzung der für die Reinigung von Sirt6 Isoform 2 verwendeten Puffer.

Komponente	HisTrap			RESOURCE S		Lagerpuffer
			Konzentration			
NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	40 mM
NaCl	500 mM	500 mM	500 mM	50 mM	500 mM	150 mM
Imidazol	20 mM	30 mM	300 mM	-	-	-
Glycerin	5 % (v/v)	5 % (v/v)	5 % (v/v)	5 % (v/v)	5 % (v/v)	5 % (v/v)
DTT	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
pH	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0

Der Pufferwechsel des HisTrap-Eluats wurde über eine HiPrep 26/10 erreicht. Die Behandlung mit SUMO-Protease fand erst nach dem Kationenaustauscher bei einer Dialyse in den 20 mM Imidazol-Puffer (**Tabelle 27**) statt. Der zielproteinhaltige Durchlauf der Nickel-Chelatchromatographie wurde in den Lagerpuffer dialysiert, konzentriert und in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Sirt6 Isoform 2 (1-269)

Die Expression und Reinigung der verkürzten Isoform 2 über pE-SUMOpro war analog zur Vollängen-Isoform 2, jedoch wurden andere Puffer eingesetzt (**Tabelle 28**).

Tabelle 28: Zusammensetzung der für die Reinigung von Sirt6 Isoform 2 (1-269) verwendeten Puffer.

Komponente	HisTrap			RESOURCE S		Lagerpuffer
	Konzentration					
NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM	50 mM	50 mM	-	-	-
Tris	-	-	-	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	500 mM	500 mM	500 mM	50	500 mM	100 mM
Imidazol	20 mM	30 mM	300 mM	-	-	-
DTT	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
pH	6,8	6,8	6,8	7,0	7,0	7,0

Es konnten ~6,5 mg bei 10,6 mg/mL eingefroren werden.

α A-Kristallin Isoform 1

Für die Expression von Isoform 1 wurde pE-SUMOpro als Vektor verwendet und in BL21 cod+ (DE3) eingebracht. Die Zellen wurden in LB-Medium bei 37 °C bis $E_{600} \sim 0,6$ kultiviert. Anschließend wurde mit 1 mM Endkonzentration IPTG induziert. Nach 4 h bei 37 °C wurden die Zellen geerntet und in Puffer A gewaschen und resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte an einer Basic Z French-Press bei 2,3 kbar. Nach Zentrifugation des Lysats für 30 min bei 48000 xg wurde Harnstoff auf eine Konzentration von 3,5 M zum Überstand hinzugegeben. Die Proteinreinigung erfolgte über Nickel-Chelatchromatographie. Die Säule wurde äquilibriert in Puffer A_{Harnstoff} (40 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7,4, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 3,5 M Harnstoff, 1 mM DTT). Nach dem Proteinauftrag wurde mit Puffer A_{Harnstoff} und Puffer B_{Harnstoff} (40 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7,4, 500 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 3,5 M Harnstoff, 1 mM DTT) gewaschen. Proteinelution wurde mit Puffer C_{Harnstoff} (40 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7,4, 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 3,5 M Harnstoff, 1 mM DTT) erreicht. Proteinenthaltende Fraktionen wurden vermengt und in NS_{Harnstoff}-Puffer (50 mM MES pH 6, 3,5 M Harnstoff, 2 mM EDTA, 1 mM DTT) dialysiert. Die Proteinlösung wurde auf eine RESOURCE S Kationenaustauschsäule geladen und mit einem 20 säulenvolumen-langen Gradienten zu HS_{Harnstoff}-Puffer (50 mM MES pH 6, 500 mM NaCl, 3,5 M Harnstoff, 2 mM EDTA, 1 mM DTT) eluiert. Das Protein wurde in Puffer A dialysiert und der His-SUMO-Tag mittels SUMO-Protease, die ebenfalls einen His-Tag trug, abgeschnitten (Bepperling *et al.* 2012). Es wurde erneut eine Nickel-Chelatchromatographie durchgeführt, um die SUMO-Protease und den Tag abzutrennen. Der nicht gebundene Durchfluss enthielt das Zielprotein und wurde in PBS mit 2 mM EDTA und 1 mM DTT dialysiert und nach Konzentration auf eine

Superdex 200 pg Gelpermeationssäule (GPC-Säule) geladen. Proteinenthaltende Fraktionen wurden vereint, konzentriert und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

α A-Kristallin Isoform 2

Die hier eingesetzte Isoform 2 wurde über den pET-28b-SUMO-Vektor (Bepperling *et al.* 2012), der in BL21 cod+ (DE3) eingebracht wurde, exprimiert. Die Zellen wurden bei 37 °C bis $E_{600} \sim 0,6$ kultiviert. Die Expression wurde induziert, indem IPTG bis 0,1 mM Endkonzentration zugegeben wurde. Es wurde bei 30 °C für 16 h inkubiert. Die folgenden Reinigungsschritte entsprechen denen von Isoform 1, jedoch wurde hier kein Harnstoff eingesetzt. Nach der ersten Nickel-Chelatchromatographie wurde das Protein in Puffer A mit pH 7,2 dialysiert und der His-SUMO-Tag abgeschnitten. Tag und Protease wurden über erneute Nickel-Chelatchromatographie entfernt und der Durchfluss in 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 6,8, 40 mM NaCl, 1 mM DTT dialysiert, über eine RESOURCE S aufgetrennt und mit einem 20 Säulenvolumen langen Gradienten zu 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 6,8, 500 mM NaCl, 1 mM DTT eluiert. Das eluierte Protein wurde in PBS mit 2 mM EDTA und 1 mM DTT dialysiert, konzentriert, in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

α A-Kristallin SV153

Expression und anfängliche Reinigung von SV153 glichen denen von α A-Kristallin Isoform 1, jedoch wurde hier nach Induktion auf 0,1 mM IPTG in TB-Medium bei 12 °C für ~64 h exprimiert. Zudem wurde kein Harnstoff eingesetzt. Der Durchfluss der ersten Nickel-Chelatchromatographie wurde in einen 20 mM-Imidazol-Puffer dialysiert und mit SUMO-Protease geschnitten. Der proteinenthaltende Durchfluss der folgenden Nickel-Chelatchromatographie wurde in einen Puffer ohne NaCl dialysiert und über die RESOURCE S aufgetrennt. Die Dialyse in einen Puffer ohne NaCl und Auftrennung am Kationenaustauscher wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, da die Bindung des Proteins an die Säule nicht vollständig war. Zielproteinhaltige Proben wurden vereint.

Tabelle 29: Zusammensetzung der für die Reinigung von α A-Kristallin SV153 verwendeten Puffer.

Komponente	HisTrap			RESOURCE S	
	Konzentration				
NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM
NaCl	500 mM	500 mM	500 mM	-	500 mM
Imidazol	20 mM	30 mM	300 mM	-	-
EDTA	-	-	-	2 mM	2 mM
DTT	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
pH	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4

Anschließend wurde in 2 mM EDTA- und 1 mM DTT-haltigen PBS-Puffer dialysiert, aufkonzentriert und in Flüssigstickstoff eingefroren.

4.4.5 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Proteinkonzentration lässt sich spektrophotometrisch bestimmen, da aromatische Aminosäurereste wie die von Tyrosin und besonders Tryptophan einen π - π^* -Übergang bei 280 nm zeigen. Über die Lambert-Beer-Gleichung konnte damit die Proteinkonzentration bestimmt werden:

$$A = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Mit A – dekadische Absorbanz

I_0 – Intensität des eingestrahnten Lichts [W/m²]

I – Intensität des transmittierten Lichts [W/m²]

ε – molarer, dekadischer Absorptionskoeffizient [m²/mol]

c – Konzentration der absorbierenden Substanz [mol/L]

d – optische Weglänge [m]

Der Absorptionskoeffizient wurde dabei über ProtParam von Expasy (Artimo *et al.* 2012) bestimmt.

Waren keine Tryptophane vorhanden und somit die Absorption bei 280 nm gering oder wurden Konzentrationen von Lysaten bestimmt, so wurde der Bradford-Assay eingesetzt. Dies ist ein kolorimetrisches Verfahren, bei dem der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine bindet. Dies führt in saurer Lösung dazu, dass die blaue anionische Form des Farbstoffs erhalten bleibt. Ungebundener Farbstoff hingegen wird protoniert und erscheint rötlich. Die proteingebundene Form des Farbstoffs hat ein

Absorptionsmaximum bei 595 nm und hat einen höheren Extinktionskoeffizienten als der ungebundene Farbstoff. Zur Konzentrationsbestimmung wurden Eichkurven mit BSA als Eichprotein bekannter Konzentration erstellt.

Bei hohen Konzentrationen an Detergenz wurde alternativ ein BCA-Kit nach Herstellerangaben eingesetzt.

4.5 Spektroskopische Methoden

4.5.1 UV/VIS-Spektroskopie

Bei der UV/VIS-Spektroskopie wird die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung aus dem ultravioletten (10-200 nm fernes UV, 200-400 nm nahes UV) und sichtbaren (400-800 nm) Bereich mit einer Probe untersucht. Im UV/VIS-Bereich finden Elektronenübergänge zwischen Orbitalen verschiedener Energien statt. Die Energie $h\nu$ der absorbierten oder emittierten Photonen kann durch die Bohr'sche Frequenzbedingungen wiedergegeben werden:

$$h\nu = |E_1 - E_2| \quad (2)$$

Proteine zeigen hauptsächlich π - π^* -Übergänge. Die Peptidbindung absorbiert bei ~205 nm, während aromatische Aminosäuren Tryptophan ($\epsilon_{280} = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Tyrosin ($\epsilon_{280} = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und zu geringerem Teil auch Disulfidbrücken ($\epsilon_{280} = 125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bei 280 nm absorbieren (Pace *et al.* 1995). Dies wurde sowohl zur Konzentrationsbestimmung als auch zur Detektion von Proteinen und Peptiden z. B. bei der analytischen Ultrazentrifugation oder Größenausschlusschromatographie eingesetzt.

4.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Absorption eines Photons der Energie $h\nu$ durch ein Fluorophor versetzt das Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand. Durch intermolekulare Stöße mit umgebenden Molekülen findet eine Energieabgabe statt, die das Molekül vom elektronisch- und schwingungsangeregten Zustand in den elektronisch angeregten Schwingungsgrundzustand bringt (strahlungslose Desaktivierung) (Peter W. Atkins, Julio de Paula 2006). Die Fluoreszenz ist als Teil der Lumineszenz die spontane Emission von Strahlung von einem elektronisch angeregten Zustand. Aus dem elektronisch angeregten Grundzustand findet die Fluoreszenzemission statt, die im Vergleich zur Anregungswelle meist in den längerwelligen

Bereich verschoben ist (Bathochrome Verschiebung, Stokes-Regel). Die Energie wird dabei innerhalb von 10^{-10} bis 10^{-7} s nach Anregung abgegeben (Jochen Mattay 2008). Nicht alle Moleküle die angeregt wurden, müssen über Fluoreszenz wieder in den Grundzustand gelangen. Weitere Prozesse wie Interne Konversion (gleiche Multiplizität), *intersystem crossing* (ISC, verschiedene Multiplizität) oder die Abgabe der Energie des angeregten Donors (Sensibilisator) an einen Akzeptor, der als Quencher bezeichnet wird, sofern er die Energie durch strahlungslose Desaktivierung unwirksam macht, können den Singulett-Zustand depopulieren (Jochen Mattay 2008). Ausgedrückt wird dies durch das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen, der Fluoreszenz-Quantenausbeute (Jochen Mattay 2008; Peter W. Atkins, Julio de Paula 2006). Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sind dabei intrinsische Fluorophore von Proteinen, wobei Tryptophan und Tyrosin eine hohe und Phenylalanin eine niedrige Quantenausbeute bei 280 nm aufweisen (Lakowicz 2006).

Die Fluoreszenzmessungen wurden in Quarzküvetten bei 0,25 mg/mL (Sirt6) oder 0,3 mg/mL (α A-Kristallin Isoform 2) unter nativen oder denaturierenden Pufferbedingungen durchgeführt.

4.5.3 Circular dichroismusspektroskopie

Der Circular dichroismus (CD) tritt auf, wenn ein chirales Molekül die beiden zirkular polarisierten Komponenten einer linear polarisierten Welle unterschiedlich stark absorbiert. Linear polarisiertes Licht besteht aus zwei zirkular polarisierten Komponenten, deren Feldvektoren um die Ausbreitungsrichtung des Strahls rotieren. Die zirkular polarisierten Komponenten können beim Durchgang durch eine optisch aktive Verbindung verschiedene Absorptionskoeffizienten ϵ_L (links) und ϵ_R (rechts) aufweisen und damit unterschiedlich stark absorbiert werden. Bei dem aus der Probe austretenden Licht sind die beiden verbliebenen zirkularen Anteile überlagert. Damit ist es nicht mehr linear, sondern elliptisch polarisiert (Jochen Mattay 2008). Definitionsgemäß ist das CD die Differenz der molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten (Jochen Mattay 2008):

$$\Delta\epsilon \equiv \epsilon_L - \epsilon_R \quad (3)$$

Bei Proteinen verursachen insbesondere die Peptidbindung (Absorption unter 240 nm), aromatische Aminosäureseitenketten (Absorption zwischen 260 und 320 nm) und Disulfidbrücken (schwache und breite Absorption bei \sim 260 nm) ein CD-Signal (Kelly *et al.* 2005). Durch die Peptidbindung ist ein schwacher, aber breiter $n-\pi^*$ -Übergang um 220 nm

und ein stärkerer π - π^* -Übergang bei 190 nm gegeben. Beeinflusst wird dies durch Sekundärstruktur eines Proteins, die ein charakteristisches CD-Spektrum im fernen UV-Bereich erzeugt (Kelly *et al.* 2005).

Fern-UV-CD-Spektren wurden aufgezeichnet, um die Sekundärstrukturanteile der Proteine zu untersuchen. Die Messungen der Spektren erfolgten in einer Quartzküvette ($d = 0,2$ mm) von ~ 195 bis 260 nm bei 0,25 mg/mL (Sirt6) und 0,5 mg/mL (α -Kristalline) an einem Chirascan-plus CD-Spektrometer. Die gemessenen Daten wurden pufferkorrigiert und die Werte zwischen 250 und 260 nm nulllinienkorrigiert. Die gemessenen Elliptizitäten wurden in molare Elliptizitäten umgerechnet:

$$\Theta_{MRW}(\lambda) = \frac{\Theta(\lambda) \cdot 100 \cdot MRW}{\beta \cdot d} = \frac{\Theta(\lambda) \cdot 100 \cdot M}{\beta \cdot d \cdot n} \quad (4)$$

Mit Θ_{MRW} – molare Elliptizität [$\text{Grad cm}^2 \text{dmol}^{-1}$]

Θ – gemessene Elliptizität [Grad]

MRW – Mittlere Molmasse einer Aminosäure

β – Proteinkonzentration [mg/L]

d – optische Weglänge [cm]

M – Molmasse des Proteins [g/mol]

n – Anzahl der Peptidbindungen

Eine Savitsky–Golay-Glättung wurde bei den Spektren der α -Kristalline mit einer polynomialen Ordnung von 3 und einem Glättungsfenster von 10 Punkten durchgeführt. Die Spektren wurden mittels CDNN 2.1 dekonvolviert.

Zudem wurden CD-Messungen durchgeführt, um die Thermoübergänge der Proteine zu bestimmen. Dazu wurden Spektren zwischen 200 und 260 nm von 0,4 mg/mL Sirt6 in einer Quarzglas-Küvette ($d = 1$ mm) zwischen 10 und 94 °C in 1 °C-Schritten gemessen.

4.6 Quartärstrukturanalysen

4.6.1 Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC)

Bei der Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) oder Gelpermeationschromatographie (GPC) werden Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Größe bzw. ihres hydrodynamischen Volumens voneinander getrennt. Die stationäre Phase besteht hier aus einem porösen Gel. Kleine Moleküle sind in der Lage in die Poren einzudringen.

Große Moleküle werden hingegen ausgeschlossen und fließen nur zwischen den Gelpartikeln entlang. Damit steht kleineren Molekülen ein größeres zurückzulegendes Diffusionsvolumen zur Verfügung, wodurch die Retentionszeit im Vergleich zu größeren Molekülen verlängert wird. Abhängig von der Porengröße des Materials können sehr große Moleküle in keine Poren eindringen und damit nicht voneinander getrennt werden. Sie eluieren gemeinsam im Ausschlussvolumen. Desgleichen können auch sehr kleine Teilchen nicht voneinander getrennt werden, da sie in jedes freie Volumen eindringen können und dadurch gemeinsam mit dem Laufmittel eluieren.

Die apparente Molmasse der Proteine wurde bestimmt, indem eine Kalibriergerade mittels Gel Filtration Standard, der fünf Proteine bekannter Größe enthält, erstellt wurde. Gemessen wurde an einer Superdex 200 10/300 GL bei einem Fluss von 0,5 mL/min bei 20 °C. Die Säule wurde in PBS mit 2 mM EDTA und 1 mM DTT voräquilibriert. Die Proteine wurden in gleichem Puffer für mindestens 1 h bei 37 °C vorinkubiert. Für Messungen von α A-Kristallin Isoform 2 wurden 5,2 nmol Protein eingesetzt und für die Messungen der α -Kristallin-Mischungen wurden 2,3 nmol von jedem Protein aufgetragen. Da α A-Kristallin Isoform 2 keine Tryptophane besitzt, wurde die Tyrosinfluoreszenz detektiert ($\lambda_{\text{Anregung}} = 273 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 303 \text{ nm}$) und gegebenenfalls auf eins normiert. Eluierende Proteine wurden fraktioniert und präzipitiert. Dazu wurden im Verhältnis 1:1000 einer Natriumdesoxycholatlösung (NaDOC, 0,1 g/mL) zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Trichloressigsäure (*trichloroacetic acid*, TCA) wurde bis zu einer Konzentration von 0,1 g/mL zugegeben und die Lösung ~16 h bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 16900 $\times g$ für 20 min wurde das Pellet in 2x Lämmli-Puffer resuspendiert und mit 1 M Tris-Lösung neutralisiert. Die Proben wurden nach Erhitzen auf 95 °C über SDS-PAGE aufgetrennt und entweder eine Coomassiefärbung oder ein Westernblot durchgeführt. Zur Immunodetektion wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Pineda Antikörper-Service, 1:10000), der gegen α A-Kristallin Isoform 1 erstellt wurde, eingesetzt. Die Signalintensität der Banden wurde quantifiziert und auf eins normiert.

4.6.2 *Multi angle light scattering* (MALS)

An die GPC wurde gegebenenfalls die Messung der *multi angle light scattering* (MALS) angeschlossen. Dabei trifft der Lichtstrahl eines Lasers auf das Probenmolekül, welches eine Streuung verursacht. Detektoren in verschiedenen Winkeln zur Lichtquelle messen das

gestreute Licht. Dadurch kann ohne Kalibrierung unter anderem die absolute Molmassenverteilung errechnet werden.

Die Proteine wurden nach Inkubation wie in 4.6.1 an einer Superdex 200 5/150 GL, die in PBS mit 2 mM EDTA, 1 mM DTT und 0,1 g/L Natriumazid voräquiliert wurde, aufgetrennt. Die Flussrate betrug 0,5 mL/min bei 20 °C. Zusätzlich zum MALS-Signal wurde das UV- und Brechungsindex-Signal gemessen. Die Konzentrationsbestimmung der Proteinpeaks erfolgte über den Brechungsindex. Es wurden jeweils 30 µL Probe mit einer Gesamtproteinkonzentration von 50 µM eingesetzt. Abgebildete Brechungsindexpeaks wurden auf eins normiert.

4.6.3 Analytische Ultrazentrifugation

In einem Gravitationsfeld konzentrieren sich schwere Teilchen am Fuße einer Lösungssäule (Sedimentation). Dieser Prozess kann durch die Stärke des Gravitationsfeldes beeinflusst werden und hängt zudem von Masse und Form der Makromoleküle und der Viskosität der Lösung ab. Kompakte Moleküle sedimentieren schneller als ausgedehnte (Peter W. Atkins, Julio de Paula 2006). Es entsteht ein Konzentrationsgradient, durch den die Diffusion der Sedimentation entgegenwirkt. Es wird unterschieden zwischen Sedimentations-Gleichgewichts-Messungen, bei denen die Geschwindigkeit der Sedimentation gleich der Diffusion ist, und Sedimentationsgeschwindigkeitsmessungen bei hohen Zentrifugalfeldern. Bei den hier eingesetzten Sedimentationsgeschwindigkeitsmessungen ist die Zentrifugalkraft so hoch, dass die Probenmoleküle auf den Boden der Messzelle sedimentieren. Die Teilchen sind der Zentrifugalkraft und der entgegen gerichteten Auftriebskraft und der Reibungskraft ausgesetzt. Daraus erhält man für den Sedimentationskoeffizienten s :

$$s = \frac{m(1 - \bar{V}\rho)}{f} = \frac{dx}{dt} \frac{1}{x\omega^2} \quad (5)$$

Mit m – Masse des gelösten Partikels

\bar{V} - spezifisches Volumen des gelösten Stoffes

ρ – Dichte des Lösungsmittels

f – Reibungskoeffizient

x – Abstand von der Rotationsachse

ω - Winkelgeschwindigkeit

Dieser gibt das Verhältnis von Sedimentationsgeschwindigkeit zu Zentrifugalbeschleunigung in Svedberg-Einheiten ($1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$) an.

Die Sediementationsgeschwindigkeitsmessungen wurden an einem ProteomLab XL-I durchgeführt. Die Zentrifugation erfolgte bei 42000 rpm und 20 °C in einem An-50 Ti-Rotor. Es wurden Quartzfenster mit einer Weglänge von 12 mm verwendet. α A-Kristallin Isoform 2 wurde in PBS mit 1 mM TCEP bei 37 °C für mindestens 1 h vorinkubiert. Es wurde das Signal bei 230 nm aufgezeichnet. Die Dichte und Viskosität des Lösungsmittels sowie das spezifische Volumen der Proteine wurde über SEDNTERP bestimmt. Die Datenanalyse fand mit SEDFIT (Schuck 2003, 2000) statt. Für jede Konzentration wurde ein Best-Fit *frictional ratio* bestimmt und der Mittelwert für alle Berechnungen der $c(s)$ Verteilung eingesetzt. Die Fläche unter jeder Kurve wurde auf eins normiert.

4.7 Massenspektrometrie

4.7.1 Native Massenspektrometrie

Die nativen MS-Messungen wurden an einem *quadrupole/ion mobility/time-of-flight*-Instrument (Synapt G2S HDMS, Waters, Milford, USA) (Pringle *et al.* 2007) im positiven Ionenmodus durchgeführt. Die Datenaufzeichnung und Prozessierung wurde mit MassLynx (Version 4.1) und externer Kalibrierung von 100 bis 8000 m/z mit CsI-Lösung durchgeführt. Dekonvoliert wurde mit MaxEnt mit den Grenzen 13000 bis 80000 Da mit einer Auflösung von 1 Da/Kanal. Die gleichmäßige Breite der Gaußkurve auf halber Höhe war bei 1,2 Da und die minimalen Intensitätsverhältnisse bei jeweils 33 %. 20 Iterationen wurden eingesetzt. Die Proteine wurden vor dem Umpuffern gegebenenfalls mit 1 mM NAD⁺ für 30 min auf 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte der Pufferwechsel in 200 mM Ammoniumacetat pH 6,8. Es wurden sowohl Messungen mit 0,5 mM TCEP als auch ohne durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen betragen nach dem Pufferwechsel ~8 μ M für Sirt6 Isoform 1 und ~14 μ M für Sirt6 Isoform 2. Messungen und Auswertungen fanden zusammen mit Gina Feind (Lehrstuhl Biotechnologie TUM) statt.

4.7.2 HDX-Massenspektrometrie

Beim *Hydrogen-Deuterium-Exchange* (HDX) wird ein Protium (¹H) durch ein Deuterium (²H) ersetzt, wodurch die Molmasse um ~1 Da erhöht wurde. Dies kann Massenspektrometrisch gemessen werden. In Lösung findet der Austausch in flexiblen Regionen die eine hohe Lösungsmittelzugänglichkeit haben schneller statt, als in starren

unzugänglichen Bereichen. Zudem können u.a. Wasserstoffbrücken den Austausch beeinflussen.

Der Deuteriumaustausch wurde über einen 20fachen Überschuss an PBS-Puffer mit D₂O und 0,5 mM TCEP auf 20 °C erreicht. Die Austauschzeiten betragen 0, 10 s, 1 min, 10 min und 30 min. Der Austausch wurde durch 1:1 Versetzung der Proben mit 100 mM Phosphatpuffer pH 2,3 im *Quench-Tray* bei einer Temperatur von 1 °C gestoppt. Anschließend wurden die Proben online bei einer Flussrate von 100 µl/min über eine Waters Enzymate BEH Pepsinsäule verdaut, die Produkte auf einer C18-Trappingsäule gesammelt und im nächsten Arbeitsschritt mit einem Acetonitrilgradienten auf einer Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm)-Säule aufgetrennt. Die Messung der Peptide erfolgte mittels eines Synapt G2-S High Definition TOF-Massenspektrometers (mit 32k-Quadrupol und IMS-Zelle, Waters, Milford, USA) in MS, MS/MS und *Ion Mobility Mode*. Zur anschließenden Korrektur der m/z-Werte wurde Glu-Fibrinopeptidlösung als Lock-Masse verwendet. Die Proben wurden von einem LEAP *autosampler* pipettiert. Die Auswertung erfolgte mittels PLGs und DynamX (Version 3.0). Die anfängliche Proteinkonzentration betrug 17 µM. Gegebenenfalls wurde mit dem 30fachen molaren Überschuss (~500 µM) an H3K9Myr für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Die Messungen wurden zusammen mit Gina Feind (Lehrstuhl für Biotechnologie TUM) durchgeführt.

4.8 Bioinformatische Methoden

4.8.1 Sekundärstrukturvorhersagen

Die Vorhersagen der Sekundärstrukturelemente wurden durch die online Server I-TASSER und Phyre2 durchgeführt. Dazu wurden die kompletten Sequenzen eingesetzt. Bei Phyre2 wurden die Elemente dem finalen 3D-Model entnommen. Die Vorhersage beruht auf der Homologie-Modellierung bzw. auf dem *threading*.

4.8.2 Alignments

Die Alignments wurden mittels Clustal Omega erstellt. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit Jalview. Zusätzlich wurde für das Alignment der Sirtuine die Positionen der Sekundärstrukturelemente mit Pymol für Sirt1 (PDB: 4zzj), Sirt2 (PDB: 4y6l), Sirt3 (PDB:

5bwn), Sirt5 (PDB: 3riy) und Sirt6 (PDB: 3zg6) ausgelesen und an die entsprechenden Positionen händisch im Adobe Illustrator eingetragen.

3D-Strukturalignments wurden über die *align*-Funktion von Pymol erstellt.

4.9 Funktionsanalysen

4.9.1 Thermische Stabilitätsuntersuchungen

Analog zu Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2016) wurde ein thermischer Stabilitätstest für die Sirt6 Isoformen eingesetzt, um Bindungen zu Substratpeptiden und NAD⁺ zu überprüfen. Es wurden je 3 µg Sirt6 Isoform 1 und 2 in Tris 25 mM pH 8,0 (20 °C), NaCl 50 mM eingesetzt. Zugegeben wurde entweder Puffer als Kontrolle, H3K9- oder H3K9Myr-Peptid auf 100 µM Endkonzentration oder NAD⁺-Lösung auf 1 mM Endkonzentration. Das Gesamtvolumen betrug 20 µL. Die insgesamt acht Proben wurden jeweils für 3 min auf 37, 42, 45, 48, 52, 57, 62 oder 67 °C im Thermocycler inkubiert. Es wurde kurz auf Eis gekühlt und in 1,5 mL Gefäße überführt und bei 16900 xg für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und es wurde 5x Lämmli-Puffer zugegeben und auf 95 °C erhitzt. Anschließende SDS-PAGE mit Coomassiefärbung zeigt, unter welchen Bedingungen die Sirt6 Isoformen stabilisiert wurden und nicht präzipitierten.

4.9.2 Demyristoylierungsassay

Die Sirt6 Isoformen wurden eingesetzt, um *in vitro* die Deacylierungsaktivität (genauer Demyristoylierung) zu untersuchen (Jiang *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2016; Li *et al.* 2015a). Es wurden je 1 µM Sirt6 Isoform 1 und 2 einzeln oder bei der Mischung zusammen in 60 µL Tris 20 mM pH 8,0 (20 °C), NaCl 100 mM, DTT 1 mM mit 0,5 mM NAD⁺ als Cosubstrat eingesetzt. Es wurde in einem Glasgefäß mit 50 µM H3K9Myr als Substrat und gegebenenfalls als Kontrolle mit 50 mM Nikotinamid als Inhibitor bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde mit 60 µL 0,5 M HCl in Methanol abgestoppt. Die Proben wurden für 10 min bei 16900 xg und Raumtemperatur zentrifugiert und 100 µL des Überstands über *Reversed Phase* Chromatographie an einer Jupiter 300 C18-R Säule (300 Å, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm Phenomenex) aufgetrennt. Als Laufmittel wurden Wasser mit 0,065 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) (A) und 80 % (v/v) Acetonitril mit 0,05 % (v/v) TFA (B) eingesetzt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten zu hohem Anteil B. Das Substratpeptid hatte durch die Myristoylgruppe eine stärkere Bindung an die

hydrophobe stationäre Phase und eluierte später (~23,7 min) als das Reaktionsprodukt ohne Myristoylgruppe. Die Peaks des demyristoylierten Produkts (H3K9) wurden integriert, um die Aktivität zu bestimmen.

4.9.3 Aggregationsassays

α -Kristalline sind als Teil des Chaperonnetzwerks wichtig für die Unterdrückung der irreversiblen Aggregation von Substratproteinen. Chaperonassays wurden *in vitro* eingesetzt, um die Aktivitäten der verschiedenen α -Kristallinisoforamen miteinander zu vergleichen und potentielle Modulationen herauszustellen. Dazu wurden L-Malatdehydrogenase vom Schweineherzen (MDH, mitochondrial) und Rhodanase aus der Schweineleber als Substrate eingesetzt. Die Aggregation wurde thermisch bei 42 °C für MDH und 45 °C für Rhodanase induziert. Die Substratkonzentration betrug 2 μ M, wobei die Konzentration der Chaperone variiert wurde. Die Extinktion wurde als Maß für die Aggregation bei 360 nm in 105.201-QS-Küvetten in einem Ultrospec 3100 *pro* UV-Vis-Spektrometer gemessen. Als Messpuffer wurde PBS mit 2 mM EDTA und 1 mM DTT eingesetzt (Mymrikov *et al.* 2016). Die Chaperone wurden bei 37 °C für mindestens 1 h vorinkubiert. Das Extinktionssignal wurde auf das Signal von Substrat ohne Chaperon normalisiert, wobei der maximale E_{360} auf eins gesetzt wurde.

5 Ergebnisse

Das alternative Spleißen umfasst bei höheren Eukaryoten einen Großteil der Gene (Wang *et al.* 2008; Pan *et al.* 2008) und führt häufig zu mehr als einer Transkriptvariante. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden bioinformatische Untersuchungen für das humane Genom angestellt, um die Auswahl der möglichen alternativen und gegebenenfalls nicht-trivialen Spleißvarianten einzuschränken. Als Kriterium war in diesen Auswahlprozess wichtig, dass eine Kristallstruktur der Vollängen Isoform vorhanden sein muss. Zudem sollte die enzymatische Aktivität möglichst weitgehend untersucht sein und die nicht-triviale Spleißvariante soll *in vivo* auf mRNA-Level und so weit wie möglich auf Protein Level nachgewiesen sein. Ob diese alternativen Spleißvarianten im menschlichen Körper auf Transkript- oder Proteinebene vorhanden sind und eine Funktion haben, ist jedoch unsicher, da insbesondere für nicht-trivial gespleißte Varianten, denen konservierte und potentiell wichtige strukturelle Bereiche fehlen oder verändert sind, zu erwarten ist, dass sie weniger stabil sind. Einige dieser Proteine und ihre Spleißvarianten wurden von Patricia Schöppner untersucht (Schöppner 2016). In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus vor allem auf der Untersuchung des alternativen Spleißergebnis von Sirtuin 2 und alternative Spleißvarianten von Sirtuin 5 und Sirtuin 6. Außerdem wurden Spleißvarianten von α A- und α B-Kristallin untersucht.

5.1 Klonierungen

Bei der vorliegenden Arbeit wurden die kodierenden Sequenzen der untersuchten Spleißvarianten als Syntheseprodukte erhalten oder aus total-RNA-Isolaten in Expressionsvektoren kloniert. Diese Konstrukte (**Tabelle 30**) wurden anschließend in verschiedene *E. coli*-Stämme transformiert und zur rekombinanten Expression eingesetzt. Wenn die Abundanz in der cDNA zu gering war oder wie bei Sirt5 Isoform 3 und Sirt6 Isoform 2 die Termini dieselben Sequenzen besaßen und damit in PCRs neben der häufiger auftretenden Isoform 1 nicht sichtbar waren, wurden diese aus der Isoform 1 gewonnen (**4.2.6**).

Tabelle 30: Durchgeführte Klonierungen. Aufgelistet sind ausschließlich die in der beschriebenen Arbeit Anwendung findenden Klonierungen. Sirt2 wurde während der vorhergehenden Masterarbeit kloniert (Preis 2013).

Protein	Isoform	Ursprung der CDS	<i>E. coli</i> optimiert	Zielvektor	Eingesetzte Schnittstellen	
Sirtuin 2	1		Ja	pET-28b-SUMO	BamHI/XhoI	
	2					
	1 (34-356)					
	2 (34-271)					
α A-Kristallin	Isoform 2	Thermo Fischer Scientific		pET-21a	NdeI/EcoRI	
				pET-28b-SUMO	BamHI/XhoI	
				pE-SUMOpro	BsaI/XbaI	
	pET-21a			NdeI/EcoRI		
	pET-28b-SUMO			BamHI/XhoI		
	pE-SUMOpro			BsaI/XbaI		
α B-Kristallin	SV153			pET-21a	NdeI/EcoRI	
				pET-28b-SUMO	BamHI/XhoI	
				pE-SUMOpro	BsaI/XbaI	
Sirtuin 5	1		Nein	pET-28b-SUMO	BamHI/XhoI	
					Aus Isoform 1	
					BamHI/XhoI	
Sirtuin 6	1	Total-RNA-Isolat		pET-28b	NdeI/XhoI	
				pET-28b-SUMO	BamHI/XhoI	
				pE-SUMOpro	BsaI/XbaI	
	2			pET-28b	NdeI/XhoI	
				pET-28b-SUMO	Aus Isoform 1	
				pE-SUMOpro	BsaI/XbaI	
	1 (1-296)			pE-SUMOpro	BsaI/XbaI	
				pET-28b	NdeI/XhoI	
				2 (1-269)	pE-SUMOpro	BsaI/XbaI
					pET-28b	NdeI/XhoI

5.2 Spleißvarianten von Sirtuin 2 und 5

Für das humane Sirtuin 2 (Sirt2) sind unter der Datenbank UniProt fünf Spleißvarianten hinterlegt und mit der kanonischen Isoform 1 verknüpft. Untersucht und mit der kanonischen Isoform verglichen werden sollte insbesondere Isoform 4 (UniProt-Kennung: Q8IXJ6-4), welcher im Verhältnis zur Isoform 1 C-terminal die Aminosäuren 272-389 fehlen und bei der die Positionen 266-271 eine andere Sequenz aufweisen. Dies wurde bereits in der vorhergehenden Masterarbeit begonnen (Preis 2013). Um diese Spleißvariante auf mRNA-Ebene nachzuweisen, wurden total-RNA-Isolate aus verschiedenen humanen Geweben untersucht. Die RNA wurde mit Hilfe eines oligo-dT-Primers revers-transkribiert und mit Primer für verschiedene Positionen des gespleißten Transkripts in Polymerasekettenreaktionen (*polymerase chain reaction*, PCR) eingesetzt. Sirt2 Isoform 1 wurde als Kontrolle in allen getesteten Geweben nachgewiesen, jedoch konnte keine Bande gewonnen werden, die exakt der Größe einer erwarteten Bande für Isoform 4 entspricht. Dennoch wurde in verschiedenen Geweben, bei Verwendung eines die Spleißstelle überspannenden Primers, eine um ~100 bp kürzere Bande identifiziert (**Abbildung 13**). Zur genaueren Untersuchung wurden die Banden aus den Gelen präpariert und sequenziert.

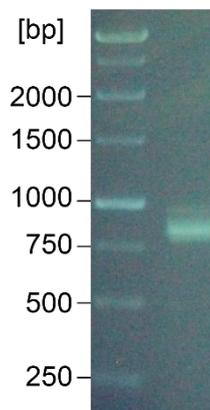


Abbildung 13 In humanen Geweben ist ausschließlich das Transkript vorhanden, das zur N-terminal gekürzten Isoform 2 von Sirt2 führt. Das beispielhafte Gel der RT-PCR aus humanem Plazenta total-RNA-Isolat mit Sirt2fw_Iso1-4UTR und Sirt2rv_Iso4SS2 (**Tabelle 7**) als Primer zeigt in der rechten Spur eine Bande, die der N-terminal verkürzten Isoform 2 entspricht.

Die fragliche Bande würde nach der Translation tatsächlich zu dem verkürzten und veränderten C-terminus der Isoform 4 führen, doch fehlt hier zusätzlich ein Abschnitt am Anfang des Transkripts, der zu einem vorzeitigen Stopcodon und zu einem neuen Start ab Methionin 38 führt. Dieser neue Start ist analog zu Isoform 2 von Sirt2. Die N-terminal gekürzte Variante von Isoform 4 entspricht einer Variante, die in den Datenbanken von Ensemble (Transkriptkennung: ENST00000358931.9) und NCBI (Kennung:

NP_001180215.1) hinterlegt ist. Anders als diese Transkriptvariante konnte die gesuchte Isoform 4 nicht in den Datenbanken von Ensemble oder NCBI gefunden werden. Sirt2 Isoform 1 und 4 sowie die terminal verkürzten Varianten Isoform 1 (34-356) und Isoform 2 (34-271) wurden rekombinant exprimiert und gereinigt. Sirt2 Isoform 2 hatte im Gegensatz zu Sirt2 Isoform 1 jedoch keine enzymatische Aktivität und war nicht vollständig löslich (siehe auch Preis 2013). Dies galt auch für die N-terminal verkürzte Variante (34-271), die für Kristallisationsansätze gedacht war und N-terminal nur drei Aminosäuren mehr als die Variante trägt, die in der cDNA nachgewiesen werden konnte. Deshalb wurde nach weiteren alternativ gespleißten Proteinen gesucht.

Nachdem alle Sirtuine ähnliche enzymatische Reaktionen katalysieren und viele Spleißvarianten für diese Proteinfamilie vorhergesagt sind, wurden diese weiter untersucht. Für Sirt5 sind in UniProt vier Isoformen annotiert, welche auch in Ensemble und NCBI hinterlegt sind. Zudem werden die Isoformen 1, 2 und 4 mit einem *Transcript support level 1* (TSL:1) bei Ensemble geführt, welcher für Transkripte angezeigt ist, die zumindest durch eine nicht fragwürdige mRNA unterstützt werden. Isoform 3 ist als TSL:2 geführt, was zeigt, dass das Transkript durch mehrere *expressed sequence tags* (EST) oder eine fragwürdige mRNA unterstützt wird. Das Gen SIRT5 besteht aus 11 Exons, von denen neun für die vier Isoformen kodierend sind (**Abbildung 14**). Der Isoform 2 fehlt im Verhältnis zur Isoform 1 das letzte Exon. Es erhält jedoch ein alternatives Exon am gleichen Terminus. Dadurch finden nur geringfügige Veränderungen des C-terminus bei Isoform 2 statt. Zudem wurde diese bereits untersucht und als größtenteils mitochondrial beschrieben, wohingegen Isoform 1 auch im Cytoplasma gefunden wurde (Matsushita *et al.* 2011). Deshalb wurde der Fokus auf Isoform 3, der das kodierende Exon 5 und damit die internen Aminosäuren 189-206 fehlen, und Isoform 4, dem die ersten zwei kodierenden Exons und damit die ersten 108 Aminosäuren fehlen, gelegt.

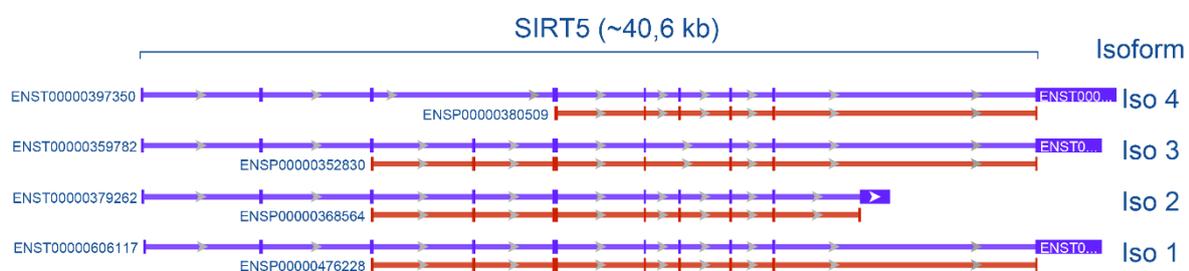


Abbildung 14: Aus dem humanen Gen SIRT5 resultieren vier proteinkodierende Transkriptvarianten. Das Alignment der Exons (Kästen) und der dazwischenliegenden Introns (Linien mit Pfeilen) zeigt die vier durch Ensemble vorhergesagten proteinkodierenden Varianten von Sirt5. Violett ist die dem Gen entsprechende mRNA-Struktur dargestellt und in rot ausschließlich die für die Isoformen kodierenden Abschnitte.

Hier wurde ebenfalls RT-PCRs mit RNA-Proben aus humanen Geweben durchgeführt. Dazu wurden für Isoform 3 und 4 Primer eingesetzt, die spleißstellenüberspannend sind, um eine unbeabsichtigte Amplifikation des Isoform 1 Transkripts auszuschließen. Für jede der drei Isoformen konnten Banden der erwarteten Größen in allen getesteten Gewebeproben erhalten werden (**Abbildung 15**). Diese wurden über Gelpräparation und anschließende Sequenzierung bestätigt. Die ubiquitäre Gewebsverteilung entspricht derjenigen, welche für Sirt5 Isoform 1 gefunden wurde (ProteinAtlas (Uhlen *et al.* 2015) und ProteomicsDB (Wilhelm *et al.* 2014)).

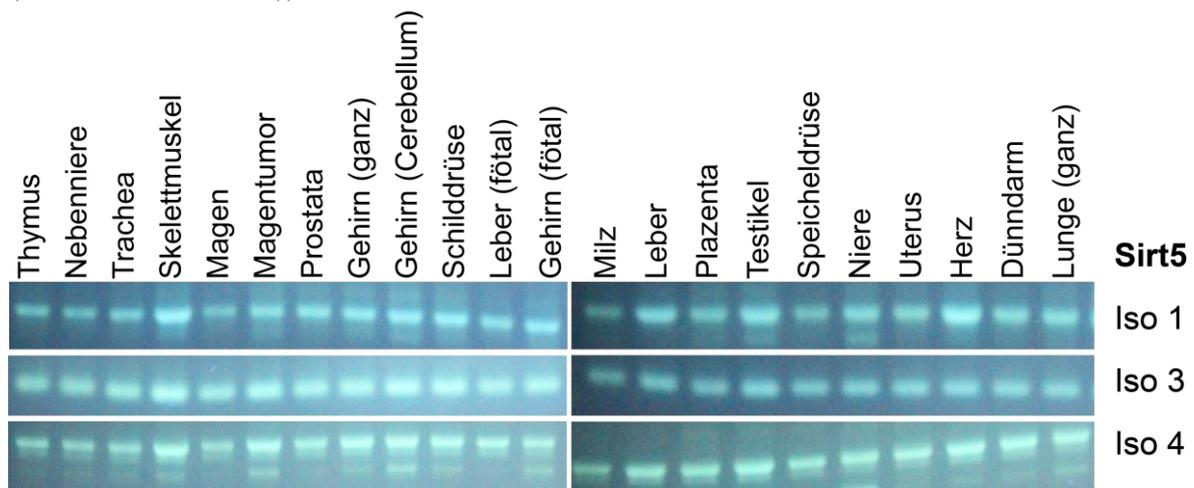


Abbildung 15: Die drei untersuchten Isoformen von Sirt5 sind in den total RNA-Isolaten aller getesteter Gewebe vorhanden. Humane total RNA Isolate wurden mit oligo-dT-Primern revers-transkribiert und die entstehende cDNA als Templat für PCRs mit Primern entsprechend **Tabelle 7** eingesetzt.

Die Gene von Sirt5 Isoform 1, 3 und 4 wurden aus den RNA-Proben in einen pET28a-Expressionsvektor mit N-terminalem 6xHis-SUMO-tag (Bepperling *et al.* 2012) kloniert. Nach anfänglichen Testexpressionen, bei denen festgestellt wurde, dass die Proteine in ausreichendem Maße überexprimiert werden, wurden sie in größerem Maßstab überexprimiert und gereinigt. Anders als Isoform 1, stellten sich Isoform 3 und 4 jedoch als wenig stabil heraus. Sie konnten nicht in ausreichenden Mengen gereinigt werden, was verdeutlicht, dass obwohl sie zumindest auf Transkriptebene nachgewiesen wurden, besonders alternativ gespleißte Proteine zur Instabilität neigen.

Um dennoch Einblick in den Effekt des alternativen Spleißens auf eine kanonische Sirtuin-Isoform zu erhalten, wurden weitere Untersuchungen mit Sirtuin 6 (Sirt6) durchgeführt.

5.3 Sirtuin 6

5.3.1 Die Genstruktur von Sirtuin 6

Für das humane SIRT6 sind unter NCBI neun Transkriptvarianten annotiert (**Abbildung 16**). Es besteht aus neun Exons, die ausnahmslos kodierend sind. Alle mit Ausnahme von Isoform 7, welches ein extrem kurzes und damit unwahrscheinlich ein Protein kodieren würde, sind auch in Ensemble vorhanden. Die Isoformen 1, 2 und 6 sind als TSL:1 markiert, was ihr Vorhandensein versichert, jedoch wird Isoform 6 vermutlich über den *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) abgebaut. Isoform 3, 5, 8 und 9 sind als TSL:3 eingestuft, was bedeutet, dass sie durch einen EST unterstützt werden. Bei Isoform 4 verhindert ein Abbruch der Transkriptsequenz an 5'- und/oder 3'-Ende die Vorhersage der vollständigen CDS mit Start und Stop.

Folglich wurde der Fokus auf die Isoformen 1 und 2 gelegt.



Abbildung 16: Aus dem humanen Gen SIRT6 resultieren neun unterschiedliche Transkriptvarianten. Das Alignment der Exons (Kästen) und der dazwischenliegenden Introns (Linien mit Pfeilen) zeigt, dass die NCBI Datenbank neun Varianten mit unterschiedlicher Exonzusammensetzung auf mRNA-Ebene (violett) und kodierender Sequenz (CDS; rot) vorhersagt.

5.3.2 Expressionsanalysen und Konservierung von Sirtuin 6

Der Isoform 2 fehlt Exon 7, was sie zu eine Spleißvariante mit einem intern deletierten Abschnitt macht, der nicht zu einer Rasterverschiebung führt und mit dem gleichen Stopcodon wie Isoform 1 endet. Deshalb wurden für die RT-PCR auch hier Primer verwendet, die über die Spleißstelle reichen. Beide Spleißvarianten von Sirt6 konnten in den humanen total-RNA-Isolaten nachgewiesen werden (**Abbildung 17**).

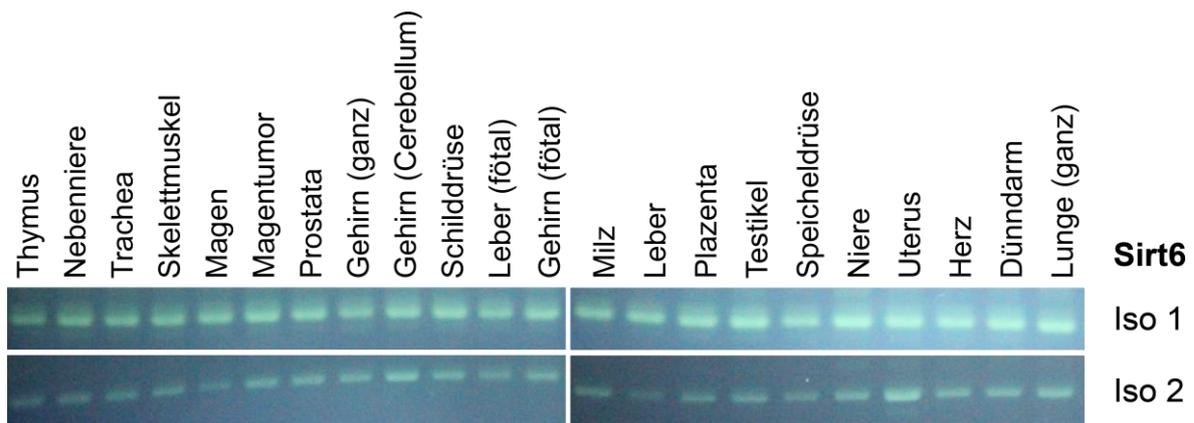


Abbildung 17: Beide Isoformen von Sirt6 sind in den total RNA-Isolaten aller getesteter Gewebe vorhanden. Humane total RNA Isolate wurden mit oligo-dT-Primern revers-transkribiert und die entstehende cDNA als Templat für PCRs mit Primern entsprechend **Tabelle 7** eingesetzt.

Damit ist das ubiquitäre Auftreten von Sirt6 Isoform 1, welches bereits in ProteinAtlas (Uhlen *et al.* 2015) und ProteomicsDB (Wilhelm *et al.* 2014) beschrieben wurde, in humanen Geweben bestätigt. Zudem wurde dieselbe Verteilung für die alternative Spleißvariante gefunden.

Ferner wurde untersucht, ob beide Varianten auch auf Proteinebene vorkommen. Dazu wurden Lysate von COS-7 Zellen, die aus der Niere der äthiopische Grünmeerkatze (*Chlorocebus aethiops*) stammen und HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) als humanes Pendant über SDS-PAGE aufgetrennt (**Abbildung 18**). Über einen Westernblot und Immunodetektion mit einem Antikörper gegen Sirt6 konnten mehrere eng beieinanderliegende Banden erhalten werden.

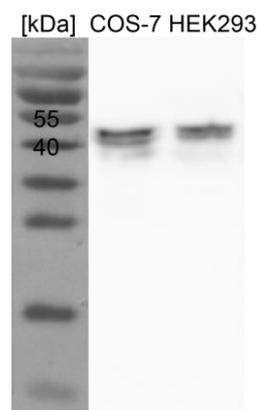


Abbildung 18: In Zellkulturlysaten sind verschiedene Spezies von Sirt6 nachweisbar. Lysate von COS-7 (NEB) und HEK293 (20 μ g) wurden über PAGE aufgetrennt und über einen Westernblot mit einem Sirt6-Antikörper (1:1000) untersucht. Eine Doppelbande deutet auf mindestens zwei voneinander unterscheidbare Sirt6-Spezies hin.

Zwei davon haben eine höhere Intensität als die Dritte und entsprechen den Molmassen, die für Isoform 1 und 2 erwarteten würden. Es kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen

werden, dass diese nicht durch z. B. PTM entstehen. Die Schwächere könnte zu einer weiteren Variante gehören die weniger stark exprimiert ist.

Des Weiteren wurden Datenbankrecherchen angestellt, um die Konservierung von Isoform 2 in anderen Spezies zu untersuchen. Insbesondere in den Datenbanken von NCBI und UniProt wurden Varianten gefunden, die eine hohe Konservierung zur humanen Spleißvarianten aufweisen (**Abbildung 19**). Sie unterscheiden sich nur in wenigen Mutationen und die nächste Region um die Spleißstelle, die die Isoform 2 ausmacht, ist identisch. Zu den Primaten, in denen diese Spleißvarianten in NCBI als vorhergesagt hinterlegt ist, zählen der Langschwanzmakake, Drill, Angola Stummelaffe und der Weißbüschelaffe. Zusätzlich entspricht ein Protein des Rhesusaffen aus UniProt der Sequenz. Die Tatsache, dass die Sequenz der Isoform 2 ausschließlich eine hohe Ähnlichkeit zu Proteinen aus Primaten aufweist, deutet darauf hin, dass die Spleißvariante nur in naher Verwandtschaft zum Menschen konserviert ist.

```

Sirt6_Iso2_H_sapiens
XP_005587605.1_M._fascicularis
XP_011822745.1_M._leucophaeus
XP_011798848.1_C._angolensis_palliatus
XP_002761637.1_C._jacchus
F7FW64_M._mulatta

MSVNYAAGLSFYADKKGKGLPEIFDPPPEELERKVVWELARLVWQSSSVVFHTGAGISTASG
MSVNYAAGLSFYADKKGKGLPEIFDPPPEELERKVVWELARLVWQSSSVVFHTGAGISTASG
MSVNYAAGLSFYADKKGKGLPEIFDPPPEELERKVVWELARLVWQSSSVVFHTGAGISTASG
MSVNYAAGLSFYADKKGKGLPEIFDPPPEELERKVVWELARLVWQSSSVVFHTGAGISTASG
MSVNYAAGLSFYADKKGKGLPEIFDPPPEELERKVVWELARLVWQSSSVVFHTGAGISTASG
MSVNYAAGLSFYADKKGKGLPEIFDPPPEELERKVVWELARLVWQSSSVVFHTGAGISTASG
*****

Sirt6_Iso2_H_sapiens
XP_005587605.1_M._fascicularis
XP_011822745.1_M._leucophaeus
XP_011798848.1_C._angolensis_palliatus
XP_002761637.1_C._jacchus
F7FW64_M._mulatta

IPDFRGPFGVWVMEERGLAPKFDITTFESARPTQTHMALVQLERVGLLRFLVSNQVNDGLHV
IPDFRGPFGVWVMEERGLAPKFDITTFESARPTQTHMALVQLERVGLLRFLVSNQVNDGLHV
IPDFRGPFGVWVMEERGLAPKFDITTFESARPTQTHMALVQLERVGLLRFLVSNQVNDGLHV
IPDFRGPFGVWVMEERGLAPKFDITTFESARPTQTHMALVQLERVGLLRFLVSNQVNDGLHV
IPDFRGPFGVWVMEERGLAPKFDITTFESARPTQTHMALVQLERVGLLRFLVSNQVNDGLHV
IPDFRGPFGVWVMEERGLAPKFDITTFESARPTQTHMALVQLERVGLLRFLVSNQVNDGLHV
*****
↓

Sirt6_Iso2_H_sapiens
XP_005587605.1_M._fascicularis
XP_011822745.1_M._leucophaeus
XP_011798848.1_C._angolensis_palliatus
XP_002761637.1_C._jacchus
F7FW64_M._mulatta

RSGFPRDKLAEHLGNMFVEECAKCKTQYVRDVTVVGTMGLKATGRCLTVAKARGLRACRNA
RSGFPRDKLAEHLGNMFVEECAKCKTQYVRDVTVVGTMGLKATGRCLTVAKARGLRACRNA
RSGFPRDKLAEHLGNMFVEECAKCKTQYVRDVTVVGTMGLKATGRCLTVAKARGLRACRNA
RSGFPRDKLAEHLGNMFVEECAKCKTQYVRDVTVVGTMGLKATGRCLTVAKARGLRACRNA
RSGFPRDKLAEHLGNMFVEECAKCKTQYVRDVTVVGSMGLKATGRCLTVAKARGLRACRNA
RSGFPRDKLAEHLGNMFVEECAKCKTQYVRDVTVVGTMGLKATGRCLTVAKARGLRACRNA
*****:*****

Sirt6_Iso2_H_sapiens
XP_005587605.1_M._fascicularis
XP_011822745.1_M._leucophaeus
XP_011798848.1_C._angolensis_palliatus
XP_002761637.1_C._jacchus
F7FW64_M._mulatta

DLSITLGTSLQIRPSGNLPLATKRRGGRLVIVNLQPTKHDRHADLRIHGYVDEVMTRLMK
DLSITLGTSLQIRPSGNLPLATKRRGGRLVIVNLQPTKHDRHADLRIHGYVDEVMTRLMK
DLSITLGTSLQIRPSGNLPLATKRRGGRLVIVNLQPTKHDRHADLRIHGYVDEVMTRLMK
DLSITLGTSLQIRPSGNLPLATKRRGGRLVIVNLQPTKHDRHADLRIHGYVDEVMTRLMK
DLSITLGTSLQIRPSGNLPLATKRRGGRLVIVNLQPTKHDRHADLRIHGYVDEVMTRLMK
DLSITLGTSLQIRPSGNLPLATKRRGGRLVIVNLQPTKHDRHADLRIHGYVDEVMTRLMK
*****

Sirt6_Iso2_H_sapiens
XP_005587605.1_M._fascicularis
XP_011822745.1_M._leucophaeus
XP_011798848.1_C._angolensis_palliatus
XP_002761637.1_C._jacchus
F7FW64_M._mulatta

HLGLEIPAWDGPVRLERLALPPLPRPPTPKLEPKESPTRINGSIPAGPKQEPQAHNGSE
HLGLEIPAWDGPVRLERLALPPLPRPPTPKLEPKESPTRINGSIPAGPKQEPQAHNGSE
HLGLEIPAWNGPRVLERLALPPLPRPPTPKLEPKESPTRINGSIPAGPKQEPQAHNGSE
HLGLEIPTWDGPRVLERLALPPLPRPPTPKLEPKESPTRINGSIPAGPKQEPQAHNGSE
HLGLEIPAWDGPVRLERLALPPLPRPPAPKLESKEESPTRINGSVPASPQEPQAHNGSE
HLGLEIPAWDGPVRLERLALPPLPRPPTPKLEPKESPTRINGSIPAGPKQEPQAHNGSE
*****:*.*.*.*****

Sirt6_Iso2_H_sapiens
XP_005587605.1_M._fascicularis
XP_011822745.1_M._leucophaeus
XP_011798848.1_C._angolensis_palliatus
XP_002761637.1_C._jacchus
F7FW64_M._mulatta

PASPKRERPTSPAPHRPPKRVKAEAVPS
PASPKRERPTSPAPNRPPKRVKAEAVPS
PASPKRERPTSPAPNRPPKRVKAEAVPS
PASPKRERPTSPAPNRPPKRVKAEAVPS
PDSPKREPPASAPHRPPKRVKAEAVPS
PASPKRERPTSPAPNRPPKRVKAEAVPS
* *****:*****:*****

```

Abbildung 19: Sirt6 Isoform 2 ist in einigen Primaten konserviert. Das Sequenzalignment zeigt, dass Isoformen mit hoher Sequenzhomologie zum humanen Sirt6 Isoform 2 für den Langschwanzmakake (*Macaca fascicularis*), Drill (*Mandrillus leucophaeus*), Angola Stummelaffe (*Colobus angolensis palliatus*), Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*), Rhesusaffe (*Macaca mulatta*) durch NCBI vorhergesagt (XP) werden oder in UniProt vorkommen. Die Spleißstelle, aus der Exon 7 auf Transkriptebene entfernt wird, was zur Isoform 2 führt, ist mit einem Pfeil markiert.

5.3.3 Sequenzvergleich, Expression und Reinigung von Sirt6

Der Isoform 2 fehlen durch das Entfernen eines internen Exons auch intern eine Sequenz von 27 AS (**Abbildung 20 oben**). Das Spleißen entfernt jedoch weder Cysteine noch Abschnitt mit auffällig vielen gleichartigen Seitenketten. Der C-Terminus, der weniger stark hydrophob ist und in dem das Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) vermutet wurde (Tennen *et al.* 2010), bleibt unverändert. Damit fehlt Isoform 2 der größte Teil der $\alpha 6$ -Helix, die zur konservierten Rossmann-Faltung-Domäne gehört und für die Bindung von NAD^+ verantwortlich ist (**Abbildung 20 unten**). Zudem fehlt der Isoform 2 der $\beta 6$ -Stang eines β -Faltblatts, das Teil des Zinkbindemotivs ist (Nummerierung nach Pan *et al.* Pan *et al.* 2011). Der fehlende Abschnitt befindet sich insbesondere in räumlicher Nähe

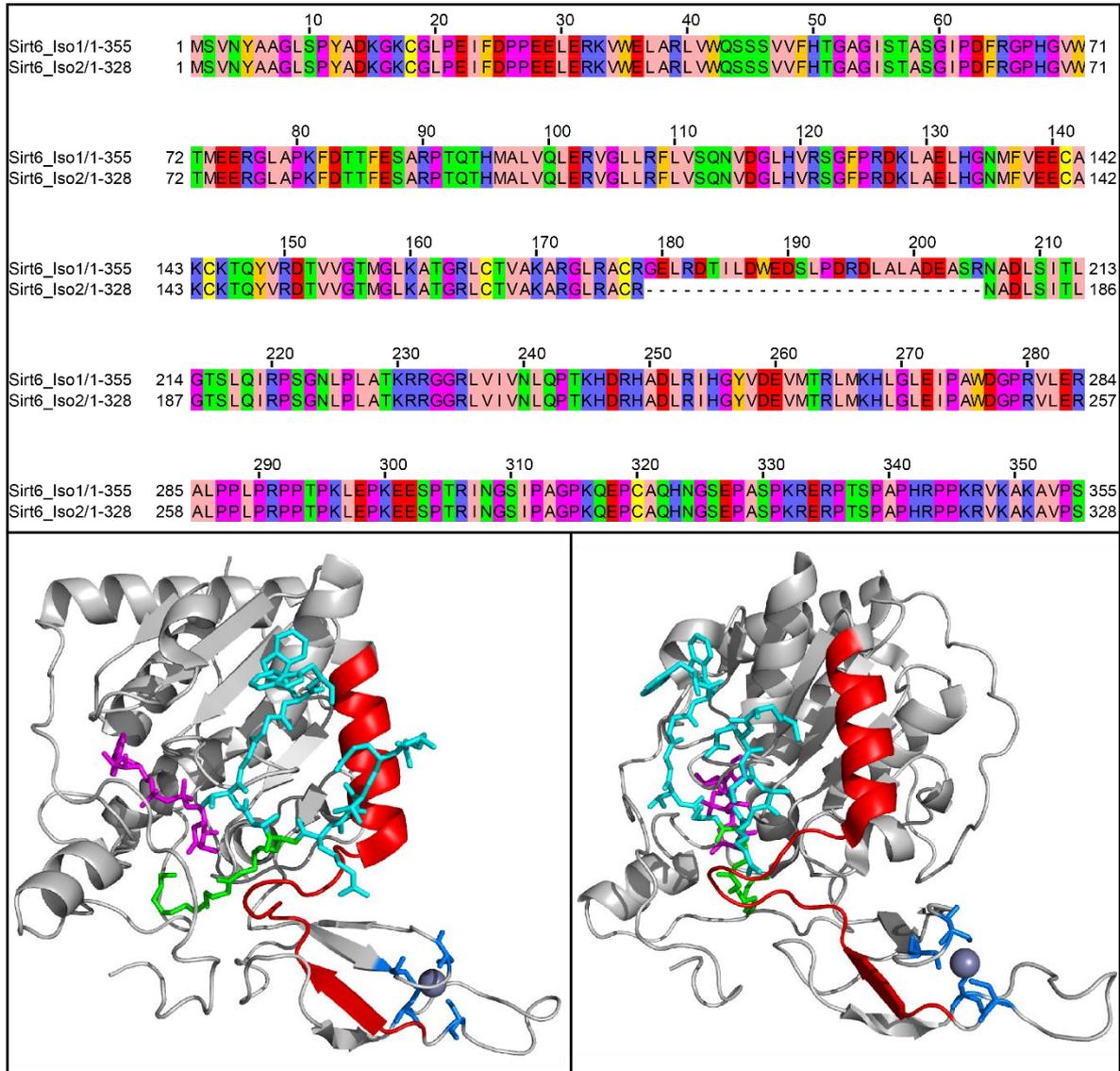


Abbildung 20: Bei Sirt6 Isoform 2 sind intern im Vergleich zur Isoform 1 27 Aminosäuren deletiert. Das Sequenzalignment (oben) wurde nach dem Zappo-Färbeschema (Waterhouse *et al.* 2009) mit aliphatischen AS in rosa, aromatischen in orange, positiv geladenen in blau, negative geladenen in rot, hydrophilen in grün, konformationell speziellen in pink und Cysteinen in gelb gefärbt und zeigt das Fehlen von Aminosäuren 179-205 von Isoform 1 in Isoform 2. Die Kristallstruktur von Sirt6 Isoform 1 (unten) nach Jiang *et al.* (Jiang *et al.* 2013) (PDB: 3zg6) zeigt in rot den Abschnitt, der in Isoform 2 fehlt. Die kokristallisierte ADP-Ribose ist in magenta und das Substratpeptid H3K9Myr in cyan abgebildet ist, wobei die Myristoylierung in grün dargestellt ist. Die vier Cysteine koordinieren das zweiwertige Zinkion als graue Kugel.

zur Substratbindestelle. Leu184, das Teil der hydrophoben Tasche zur Bindung der Myristoylgruppe ist (Jiang *et al.* 2013), fehlt. Insbesondere der Abschnitt mit der Sequenz WEDSL bindet das Substratpeptid (Pan *et al.* 2011) und ist in der Isoform 2 deletiert. Interessanterweise zeigt der in Sirt6 Isoform 2 fehlende Abschnitt auf Sequenzebene eine hohe Konservierung zu den anderen humanen kanonischen Sirtuin-Isoformen (Abbildung 21 A). Außerdem sind sowohl die deletierte Helix als auch der β -Strang in den humanen

Sirtuinen konserviert (**Abbildung 21 A und B**). Ferner müsste bei einer ansonsten erhalten bleibenden Struktur das kleinere Zinkbindemotiv näher an die Rossmanfaltung und die Substratbindestelle herangebracht werden.

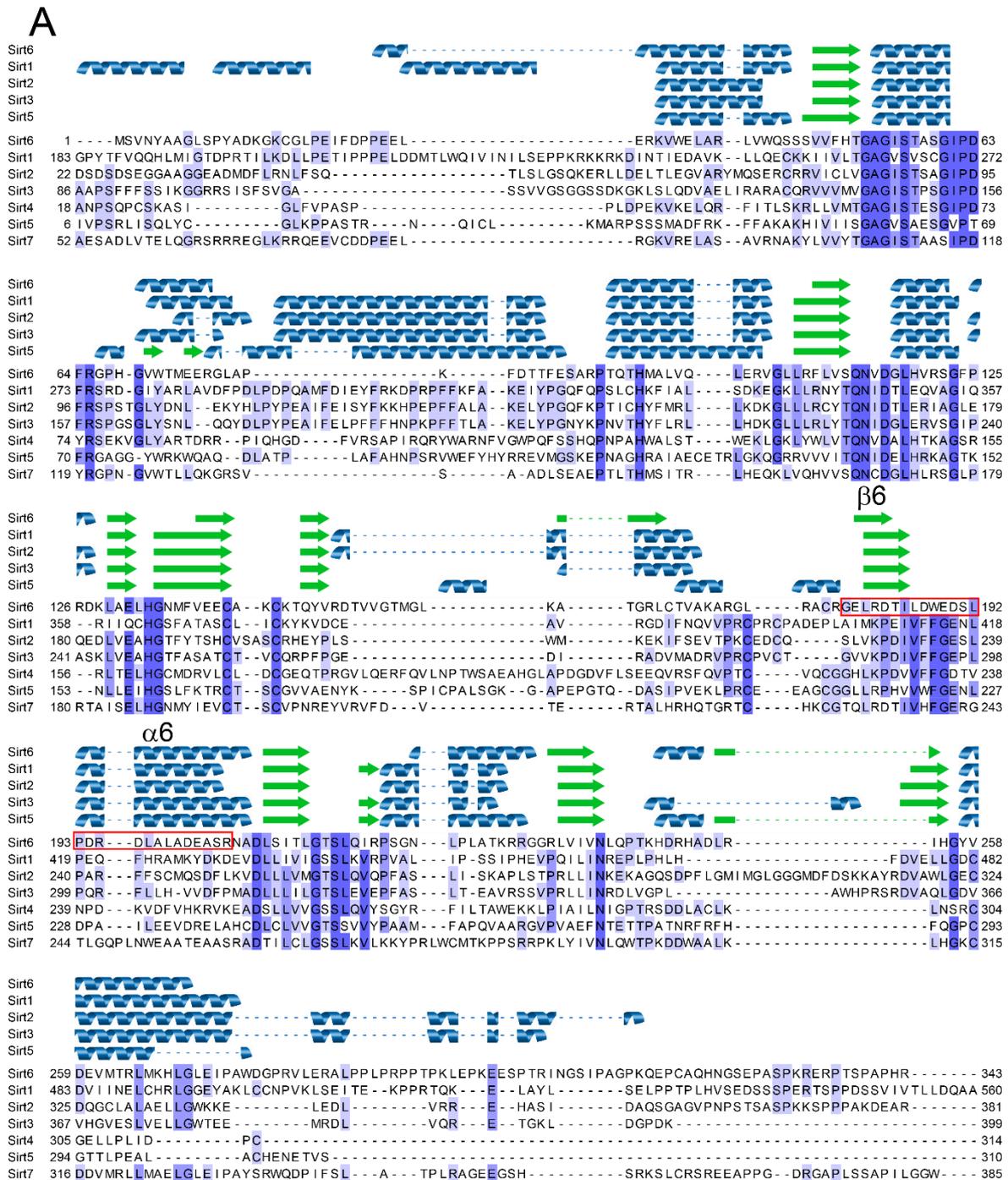
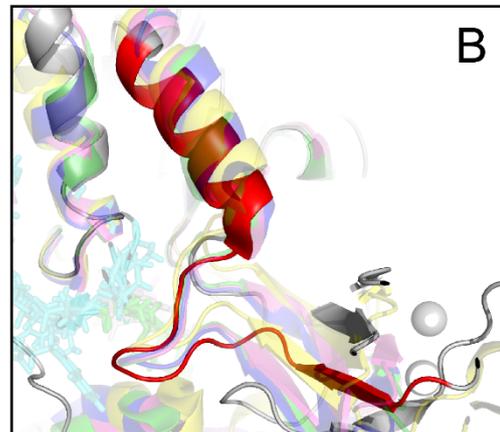


Abbildung 21: Die in Sirt6 Isoform 2 fehlenden Abschnitte sind in anderen humanen Sirtuinen konserviert. Das Sequenzalignment der humanen Sirtuine in **A** zeigt die Sekundärstrukturen und konservierte Bereiche in blau. Die Blaufärbung der Aminosäuren richtet sich nach dem Prozentsatz des Konsensus von <40 % (keine Farbe), >40 % (hellblau), >60 % (blau), und >80 % (dunkelblau). Rot umrahmt ist der Teil, der in der Isoform 2 fehlt. **B** zeigt das Strukturalignment der kanonischen Sirtuin-Isoformen Sirt6 (grau), Sirt1 (blau), Sirt2 (grün), Sirt3 (magenta) und Sirt5 (gelb). In Sirt6 Isoform 2 fehlende Abschnitte sind rot.



Die CDS von Sirt6 Isoform 1 und 2 wurden in Expressionsvektoren mit His-Tag oder His-SUMO-Tag kloniert. Zusätzlich wurden C-terminal verkürzte Varianten beider Isoformen kloniert, die zur Kristallisation gedacht waren. Für alle Varianten wurden Expressionstests durchgeführt, bei denen der *E. coli*-Stamm, das Expressionsmedium, die IPTG-Konzentration, die Expressionszeit und -temperatur sowie der Lysepuffer variiert wurden. Ziel war es möglichst viel lösliches und korrekt gefaltetes Protein zu erhalten. Anschließend wurden die besten Bedingungen für die jeweiligen Varianten für Expressionen im größeren Maßstab eingesetzt. Nach Zellaufschluss wurden die Zielproteine chromatographisch gereinigt. Dabei hatten Sirt6 Isoformen einen theoretischen pI von über 8,5 und konnten so gut über Kationenaustauscher von Verunreinigungen getrennt werden. Die Reinigungsvorschriften wurden kontinuierlich optimiert und an die Zielproteine angepasst (**Abbildung 22**). Als finaler Schritt wurde entweder in einen Lagerpuffer dialysiert oder der Pufferwechsel über eine GPC durchgeführt. Sirt6 Isoform 1 (1-296) und Isoform 2 (1-269) konnten überdies auf ~10 mg/mL konzentriert und für Kristallisationsversuche nach Jiang *et al.* (Jiang *et al.* 2013) mit H3K9Myr (NH₂-KQTARK[Myr]STGGWW-COOH) als

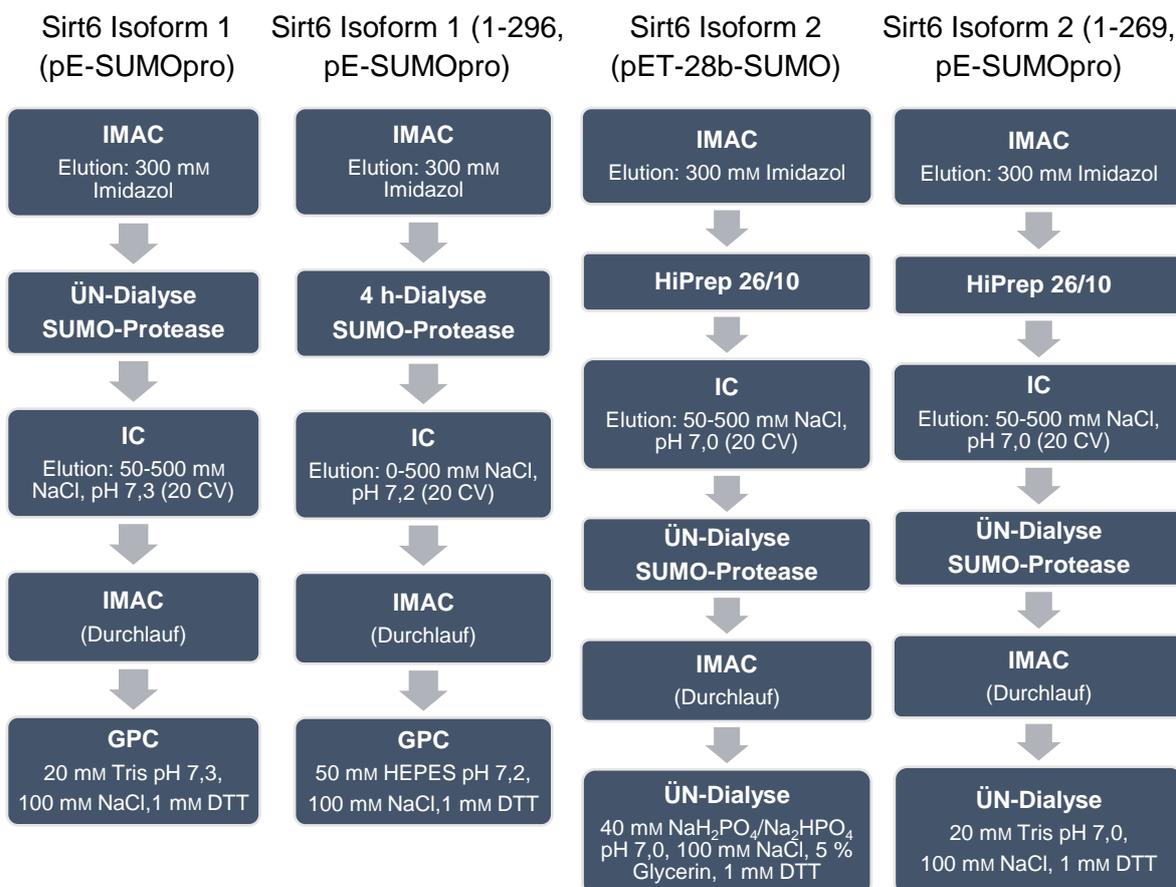


Abbildung 22: Schematische Reinigungsvorschriften für Sirt6 Isoformen.

Substratpeptid und ADP-Ribose (ADPR) eingesetzt werden. Es wurden jedoch keine Kristalle erhalten. Die Reinheit der Proteine wurde über PAGE überprüft und die Banden der Zielproteine sowie gegebenenfalls Verunreinigungen über MALDI-TOF/TOF-Peptid-Fingerprint-Untersuchungen identifiziert. Zudem wurden massenspektrometrische Vollängenmessungen der Sirt6 Isoformen durchgeführt, welche die korrekten Massen entsprechend der Primäsequenzen bestätigten (**Abbildung 23**).

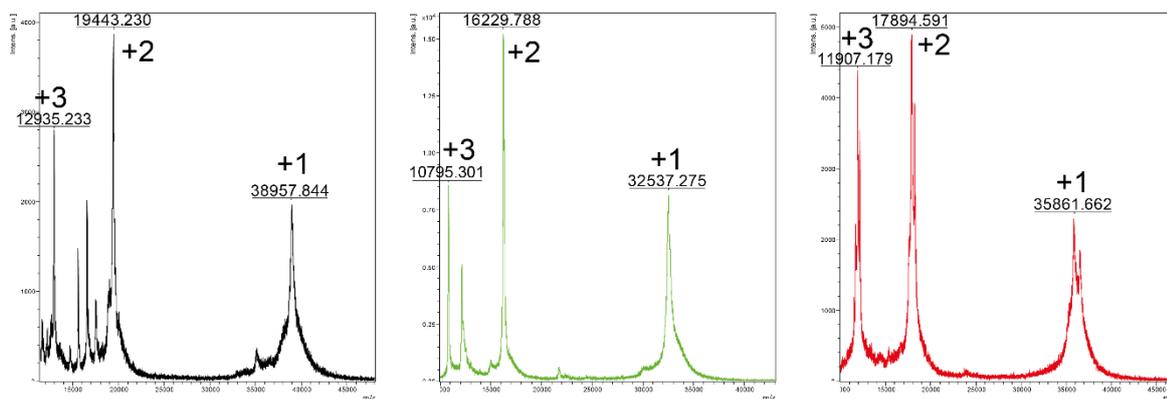


Abbildung 23: Die massenspektrometrischen Untersuchungen der Sirtuin 6 Isoformen zeigt die Masse-Ladungs-Verteilung. Für Sirt6 Isoform 1 (links, schwarz), Isoform 1 (1-296, Mitte, grün) und Isoform 2 (rechts, rot) wurden jeweils drei deutliche Signale für die Ladungsverteilung der Proteine erhalten.

5.3.4 Strukturelle Charakterisierung von Sirt6

5.3.4.1 Faltungszustand von Sirt6

Sirt6 Isoform 1 besitzt fünf Tryptophane. Die Isoform 2 dagegen enthält durch den Spleißvorgang nur vier Tryptophane. Um herauszufinden, ob die rekombinant exprimierten und gereinigten Proteine stabil gefaltet sind und ob strukturelle Unterschiede zwischen ihnen bestehen, wurde Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt. Für die Vollängenproteine von Isoform 1 und 2 sowie für beide C-terminal verkürzten Varianten wurde unter nativen Bedingungen ein Emissionsmaximum bei ~345 nm festgestellt (**Abbildung 24**). Dabei weisen die Varianten von Isoform 2 jeweils eine geringere Intensität gegenüber ihrem Isoform 1 Gegenstück auf. Dies liegt an dem einen Tryptophan, das Isoform 1 mehr besitzt. Auch durch die C-terminale Deletion geht kein Tryptophan verloren. Unter denaturierenden Bedingungen mit 5 M Guanidiniumchlorid tritt bei beiden Isoformen ein bathochromer Effekt auf, der das Emissionsmaximum um 10 nm auf ~355 nm verschiebt. Interessanterweise wird dabei die Emissionsintensität zwischen den Maxima für Isoform 1 auf 87 % verringert und die der Isoform 2 auf 158 % erhöht. Dies könnte durch das Tryptophan hervorgerufen werden, das in der Kristallstruktur der Isoform 1 nur zum Teil von außen zugänglich ist und

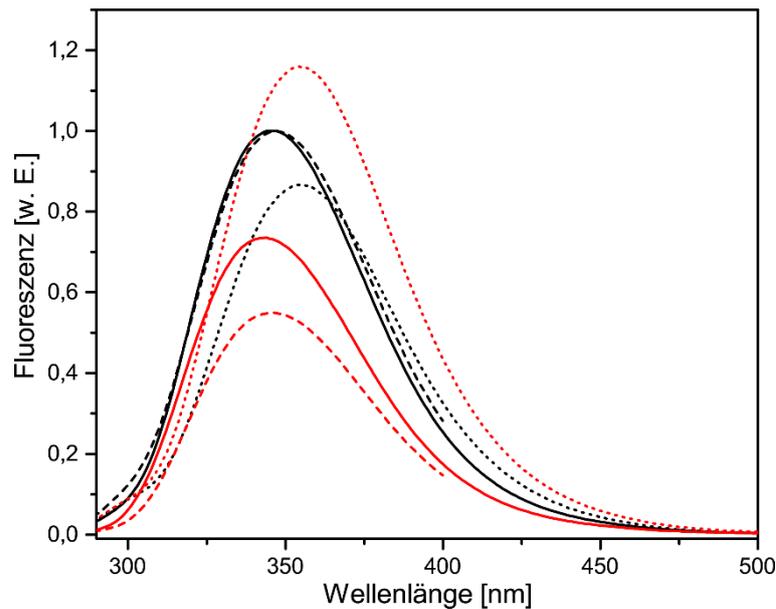


Abbildung 24: Die beiden Sirt6 Isoformen haben ähnliche Fluoreszenzemissionsspektren. Sirt6 Isoform 1 (schwarz) und Isoform 2 (rot) wurden unter nativen (durchgezogene Linie) und denaturierenden Pufferbedingungen (gepunktet) bei 280 nm angeregt und die Fluoreszenz detektiert. C-terminal gekürzte Varianten (1-296 für Isoform 1 und 1-269 für Isoform 2; gestrichelt) wurden ebenfalls unter nativen Bedingungen gemessen. Normiert wurde jeweils auf das Signal der nativen Sirt6 Isoform 1.

in Isoform 2 komplett fehlt. Es könnte jedoch auch ein Hinweis darauf sein, dass die Umgebung der Tryptophane im gefalteten Zustand isoformspezifisch ist.

Außerdem wurde die Sekundärstruktur beider Isoformen verglichen. Der Kristallstruktur der C-terminal verkürzten Variante von Isoform 1 ist zu entnehmen, dass diese sowohl aus Helices als auch parallelen und antiparallelen β -Faltblättern besteht (Pan *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2013). Um dies nachzuvollziehen, wurde Circular dichroismus (CD) eingesetzt und Spektren der Volllängenproteine und der verkürzten Varianten aufgenommen (**Abbildung 25**). Die Volllängenproteine von Isoform 1 und 2 zeigten beide ein deutliches Signalminimum bei ~ 208 nm und zusätzlich ein schwächer werdendes Signal bis ~ 230 nm. Dies deutet auf ein Protein mit gemischten Anteilen von Helix und Faltblatt hin. Unter denaturierenden Bedingungen ging das Signal der strukturierten Bereiche verloren. Zusätzlich ergaben die Messungen der CD-Spektren der C-terminal verkürzten Varianten nahezu identische Signale. Im Vergleich zu den Volllängenproteinen ist hier jedoch das Signal bei 222 nm deutlich stärker und das Minimum bei ~ 208 nm ist deutlich zu erkennen. Dies deutet auf einen erhöhten Anteil von α -helikalen Strukturen hin.

Die CD-Spektren wurden dekonvolviert, wodurch sich herausstellte, dass die Volllängenproteine und die verkürzten Varianten unter sich sehr ähnliche

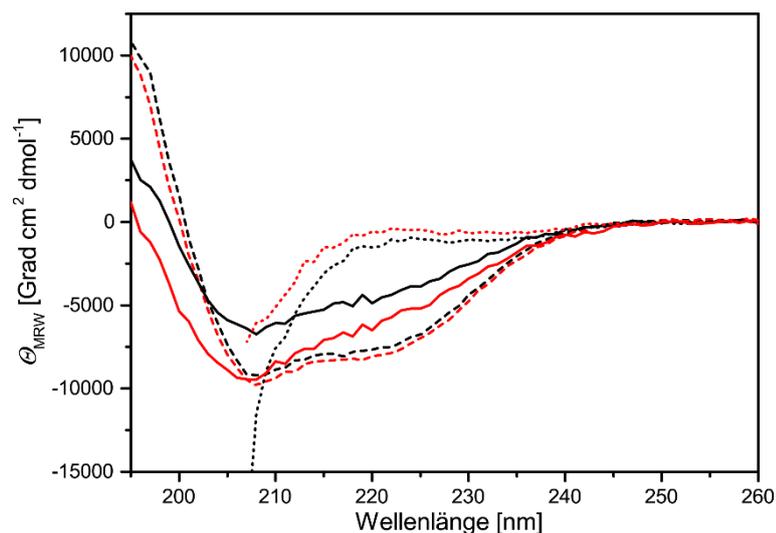


Abbildung 25: Die beiden Sirt6 Isoformen haben ähnliche Anteile von Sekundärstrukturelementen. CD Spektren von Sirt6 Isoform 1 (schwarz) und Isoform 2 (rot) wurden unter nativen (durchgezogene Linie) und denaturierenden Pufferbedingungen (gepunktet) aufgezeichnet. C-terminal gekürzte Varianten (1-296 für Isoform 1 und 1-269 für Isoform 2; gestrichelt) wurden ebenfalls unter nativen Bedingungen gemessen.

Sekundärstrukturanteile aufweisen (**Tabelle 31**). Lediglich die volllängen Isoform 2 hat einen geringfügig geringeren Anteil an antiparallelen β -Faltblattstrukturen.

Tabelle 31: Sirt6 Isoform 1 und 2 sowie die beiden C-terminal gekürzten Varianten haben ähnliche Sekundärstrukturen. Die Sekundärstrukturelemente, die durch die Dekonvolution der Fern-UV-CD-Spektren über CDNN erhalten wurde, werden verglichen.

Sekundärstruktur- element	Isoform 1	Isoform 2	Isoform 1 (1-296)	Isoform 2 (1-269)
Helix	12,5 %	13,4 %	20,1 %	20,0 %
Antiparalleles β -Faltblatt	28,5 %	22,6 %	20,6 %	19,4 %
Paralleles β -Faltblatt	5,4 %	4,9 %	6,1 %	5,9 %
β -Schleife	20,4 %	22,6 %	19,4 %	20,0 %
Random Coil	33,8 %	35,8 %	32,5 %	33,4 %

Dies lässt sich dadurch erklären, dass in der Isoform 2 der größte Teil einer Helix und auch ein zentrales Element eines antiparallelen β -Faltblatts herausgespleißt ist (**Abbildung 20**). Interessanterweise zeigten die verkürzten Varianten einen um etwa 7 % erhöhten Anteil helikaler Strukturen und geringere Anteile antiparalleler β -Faltblätter und β -Schleifen. Da Isoform 1 (1-296) dem in der Kristallstruktur (Pan *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2013) aufgelösten Bereich entspricht, lässt sich daraus schlussfolgern, dass die C-terminalen nicht aufgelösten Bereiche weitgehend β -Faltblatt-Charakter aufweisen und dass der Helix-Anteil in der Kristallstruktur im Vergleich zum Volllängenprotein leicht überrepräsentiert ist. Isoform 2

(1-269) verhält sich zur Vollängen-Isoform 2 auf gleiche Weise, was verdeutlicht, dass auch hier ähnliche Anteile von β -Faltblattelemente im C-Terminus vorliegen. Trotz Deletion eines internen strukturierten Bereiches durch das alternative Spleißen scheint der Anteil und die Position der verbleibenden Sekundärstrukturelemente erhalten zu bleiben.

5.3.4.2 Stabilitätsuntersuchung von Sirt6

Ferner wurden zur vergleichenden strukturellen Charakterisierung thermische Übergänge der beiden Isoformen gemessen (**Abbildung 26**). Da beide Isoformen während den Messungen Aggregate gebildet haben, war der Prozess nicht reversibel und es konnten keine genauen thermischen Übergänge bestimmt werden. Die durch CD-Spektren erfasste Sekundärstruktur nahm bei beiden Isoformen mit steigender Temperatur ab (**Abbildung 26 A und B**). Dabei nahm die Signalintensität für Isoform 1 um ~ 46 °C besonders stark ab. Für Isoform 2 ist kein derart abruptes Abnehmen des CD-Signals sichtbar. Ihr Verhalten scheint kontinuierlicher zu sein. Dies wird für Isoform 1 auch in der dreidimensionalen Darstellung sichtbar (**Abbildung 26 C**). Im Bereich von 200 bis 225 nm, in dem die Minima der Sekundärstrukturelemente deutlich werden, verändert sich das Signal um 46 °C stark ab. Dieser Effekt ist ebenfalls sichtbar, wenn ausschließlich die Wellenlängen 208, 218 und 222 nm betrachtet werden (**Abbildung 26 E**). Zwischen etwa 42 und 56 °C steigt vor Allem die normierte Elliptizität bei 208 nm an. Dagegen ist eine Erhöhung der normierten Elliptizität bei 218 und 222 nm bis ~ 70 °C mit einer geringeren Steigung zu verzeichnen. Dies deutet darauf hin, dass die α -helikalen Bereiche kurz vor den β -Faltblatt-Elementen ihre Struktur verlieren. Das Signal bei 218 nm, das charakteristisch ist für β -Faltblattstrukturen und nahe am Signal bei 222 nm liegt, verfälscht dabei dessen Verlauf. Ein weiterer weniger stark ausgeprägter Übergang ist durch eine Erhöhung der normierten Elliptizität aller drei Wellenlängen zwischen 76 und 87 °C zu verzeichnen. Isoform 2 zeigt dagegen auch in der dreidimensionalen Ansicht keinen schlagartigen Verlust des CD-Signals (**Abbildung 26 D**). Die Änderung hält bis etwa 87 °C an. Insbesondere der Verlauf der normierten Elliptizität bei 218 nm ist zwischen 20 und 87 °C nahezu geradlinig (**Abbildung 26 E**). Die Signale für 218 und 222 nm steigen bei Isoform 2 bis etwa 63 °C nur schwach an und steigen dann deutlich bis 87 °C an. Dies deutet ebenfalls für Isoform 2 darauf hin, dass helikale Bereiche vor den Faltblättern ihre Struktur verlieren. Der thermische Übergang scheint für Isoform 2 ein kontinuierlicherer Prozess zu sein, der zu gewissem Teil besonders bei hohen Temperaturen stattfindet.

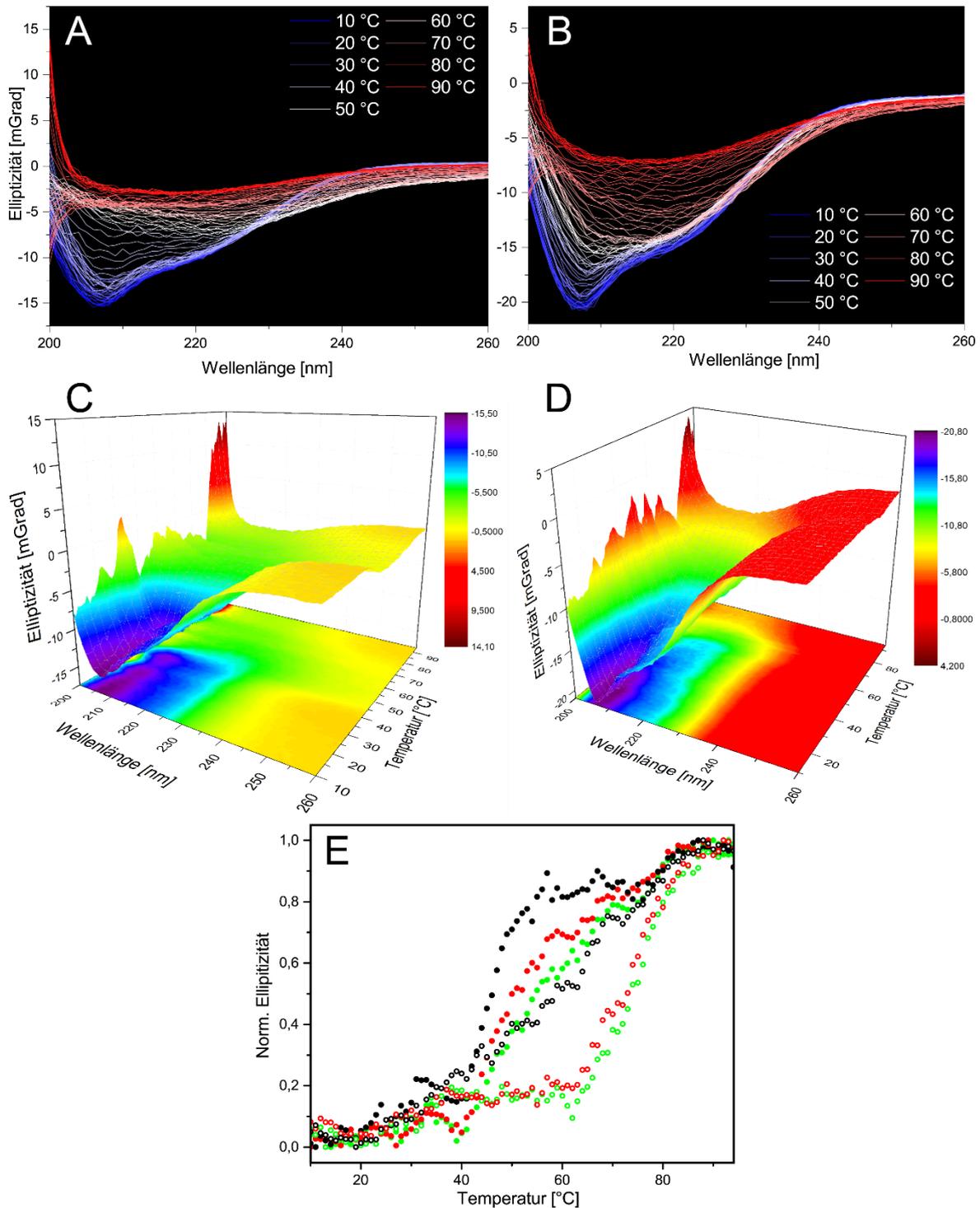


Abbildung 26: Sirt6 Isoform 1 und 2 unterscheiden sich in ihren Temperaturübergängen. CD Spektren zwischen 200 und 260 nm wurden bei Temperaturen zwischen 10 und 94 °C in 1 °C Abständen für Sirt6 Isoform 1 (A und C) und Isoform 2 (B und D) bei 0,4 mg/mL aufgezeichnet. A und B zeigen die Abhängigkeit der Elliptizität von der Wellenlänge bei Temperaturen von 10 °C (blau) bis 94 °C (rot). C und D zeigen drei dimensionale Übersichten über die Faltungslandschaft. E zeigt die zwei Temperaturübergänge von Isoform 1 (gefüllte Kreise) und den einen Übergang von Isoform 2 (leere Kreise) bei 208 nm (schwarz), 218 nm (rot) und 222 nm (grün).

5.3.4.3 Proteindynamik und Lösungsmittelzugänglichkeit

Zur weiteren Untersuchung der Dynamik in den Sirt6 Isoformen wurde *Hydrogen-Deuterium-Exchange* (HDX)-MS-Messungen durchgeführt. Es konnte eine hohe Sequenzabdeckung für beide Proteine erreicht werden (**Abbildung A1**). Es fehlten insbesondere einige Regionen des C-Terminus und bei Isoform 2 der durch das Spleißen entfernte Abschnitt 179-205. Die Aufnahme von Deuterium durch die verschiedenen Proteinbereiche war zwischen Sirt6 Isoform 1 und 2 sehr ähnlich (**Abbildung 27**). Dies spricht für eine hohe Vergleichbarkeit der Lösungsmittelzugänglichkeit beider Isoformen. Zudem deutet dies auch auf eine gleichartige konformationelle Dynamik hin. Interessanterweise wies 292-304 von Sirt6 Isoform 1 einen sehr schnellen und hohen Austausch auf. Da die Kristallstrukturen für Sirt6 nur bis Position 296 (Jiang *et al.* 2013) bzw. 297 (Pan *et al.* 2011) gelöst wurden, könnte dies auf eine hohe Flexibilität hindeuten. Darauf deuten auch die HDX-Messungen hin. Der HD-Austausch von Sirt6 Isoform 2 ist in diesem Bereich ebenfalls stark ausgeprägt.

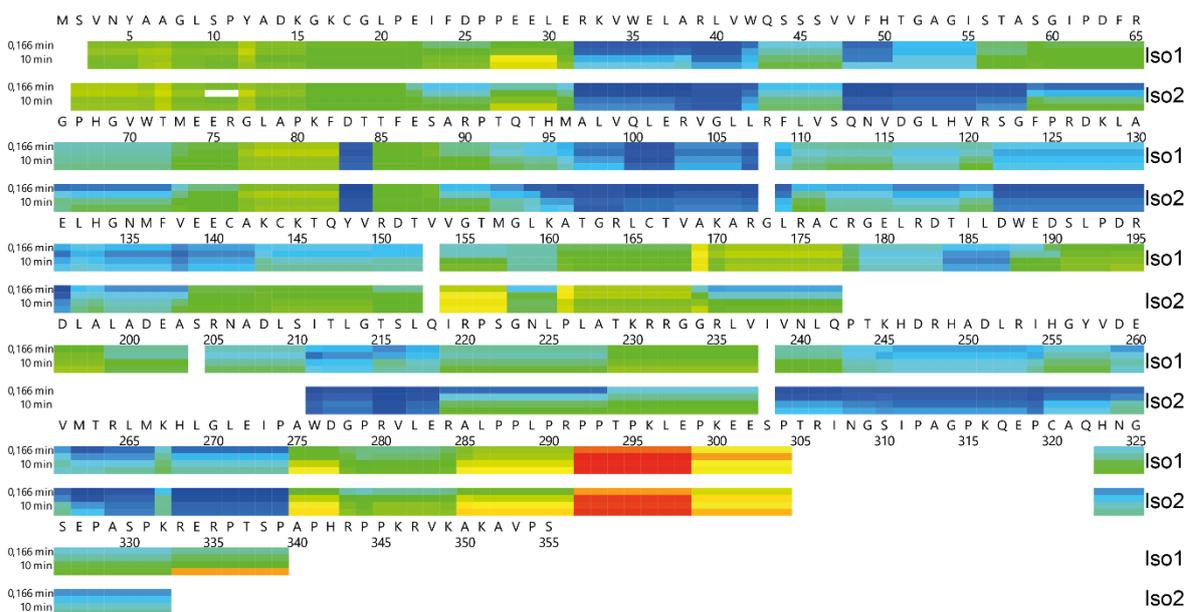


Abbildung 27: Die Heatmap des HDX-Vergleichs von Sirt6 Isoform 1 und 2 zeigt hohe Ähnlichkeiten. Der HD-Austausch ist im Regenbogenfarbschema für Isoform 1 jeweils oben und Isoform 2 jeweils unten an den gleichen Positionen für die Zeitpunkte 10 s (0,16 s), 1 min, 10 min, 30 min von oben nach unten gezeigt. Die Nummerierung der Aminosäuren richtet sich nach Isoform 1.

Dennoch konnten Unterschiede der Deuteriumaufnahme zwischen den Isoformen erkannt werden. Die Region 47-73 zeigte in Sirt6 Isoform 1 einen deutlich höheren Austausch als in Isoform 2 (**Abbildung 28 A und C**) Diese befindet sich räumlich nahe der in Isoform 2 deletierten Stelle und ist zentraler Teil der Rossmann-Faltungs-Domäne (**Abbildung 28 B**).

237-256 wiesen einen leicht schwächeren Austausch auf. Deutliche Unterschiede zwischen Isoform 1 und 2 sind zudem im Zinkbindemotiv zu sehen. Hier weist besonders Sirt6 Isoform 2 einen höheren Austausch auf (137-165). Dies könnte auf die Deletion des β -Strangs und umgebender Abschnitte in Isoform 2 zurückzuführen sein. Ferner könnte dies einerseits die Bindung des Zinkions beeinflussen, andererseits aber auch darauf hindeuten, dass kein Zinkion mehr koordiniert wird. Durch das Fehlen des Zentralteilchens dürften die umgebenden Regionen eine höhere Flexibilität aufweisen.

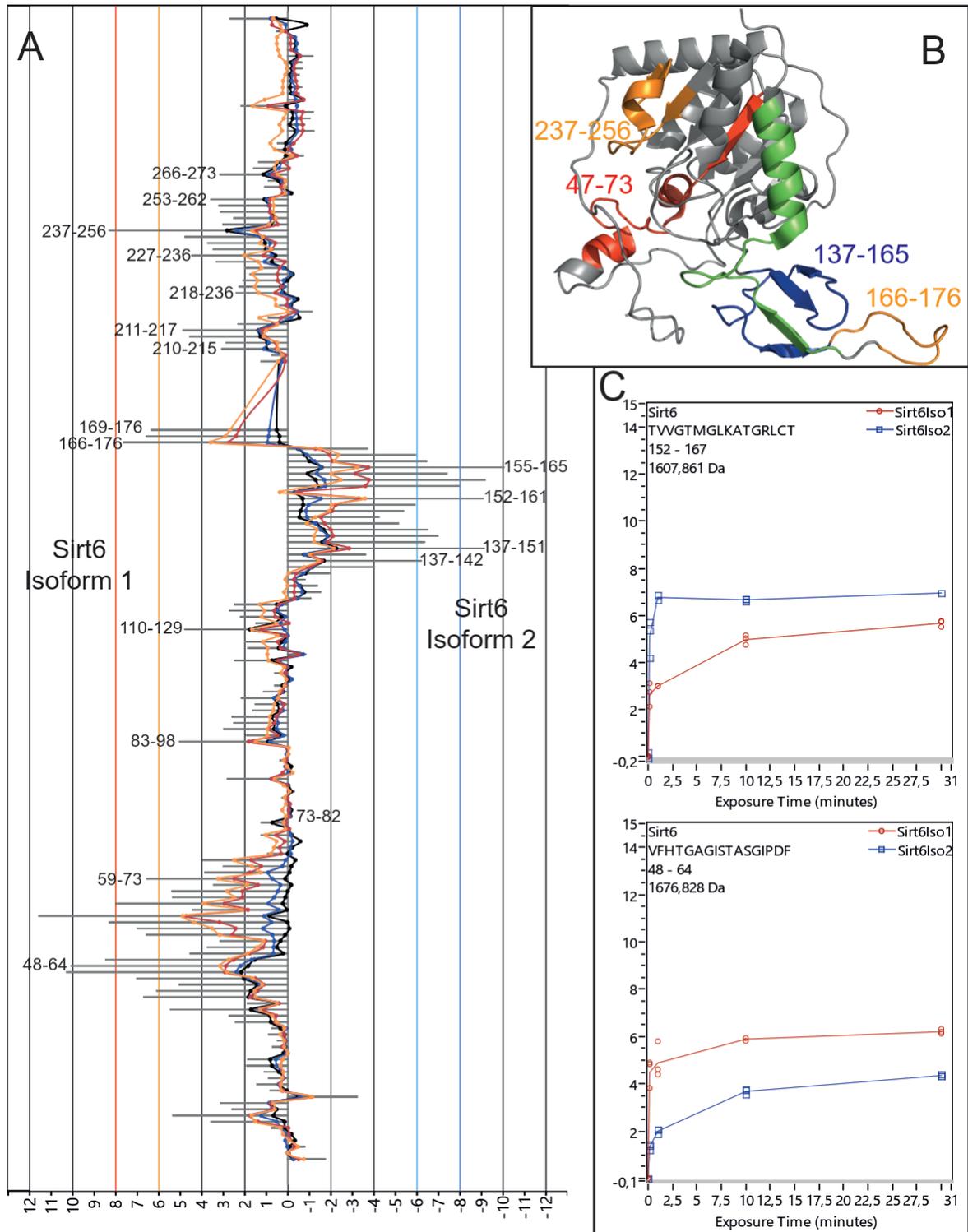


Abbildung 28: Sirt6 Isoform 1 und 2 unterscheiden sich im HD-Austausch besonders im Zinkbindemotiv und einigen Abschnitten der Rossmann-Faltung-Domäne. A zeigt den *Butterfly plot* bei dem die Differenzen zwischen beiden Isoformen dargestellt sind. Ausgewählte Peptidpositionen sind an den Peaks markiert. Die Grenzlinien sind farbig herausgestellt mit 8 Da rot, 6 Da orange, -8 Da dunkelblau und -6 Da hellblau. B stellt die Kristallstruktur von Sirt6 (PDB: 3zg6) dar, bei der die Positionen der Peptide, die im *Butterfly plot* über 8 rot, über 6 orange, unter -8 dunkelblau und unter -6 kamen, hellblau markiert sind. Der grüne Abschnitt fehlt in Isoform 2. Die Deuteriumaufnahmekurven sind in C für zwei Peptide beispielhaft gezeigt.

5.3.4.4 Bindung von Metallionen durch Sirt6

Sirt6 besitzt wie alle Sirtuine ein konserviertes Zinkbindemotiv, welches über die vier Cysteine ein Zinkkation koordiniert (Feldman *et al.* 2012; Bheda *et al.* 2016; Pan *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2013). Die Zinkbindedomäne ist durch den alternativen Spleißprozess direkt betroffen, jedoch wird keines der komplexierenden Cysteine entfernt (siehe **5.3.3**). Folglich stellt sich die Frage, ob die beiden gereinigten Sirt6 Isoformen Zinkkationen gebunden haben. Es wurden massenspektrometrische Untersuchungen unter schonenden Bedingungen durchgeführt bei denen die Proteine im nativen gefalteten Zustand erhalten werden konnten (Nativ-MS). Die Spektren der Sirt6 Isoformen zeigten eine hohe Ähnlichkeit, was auf ähnliche Ladungs- und Oligomerisierungszustände hindeutet (**Abbildung 29**). Sirt6 Isoform 1 besitzt ausschließlich von den Aminosäuren her eine theoretische Molmasse von 39118,87 Da und zeigte nach Dekonvolution einen Hauptpeak bei 39182 Da (**Abbildung 29 A**). Die Differenz kann mit der Molmasse eines gebundenen Zinkions von 65,38 g/mol (Meija *et al.* 2016) erklärt werden. Im Gegensatz dazu hat Sirt6 Isoform 2 eine theoretische Molmasse der Aminosäuren von 36064,59 Da. Der dekonvolierte Hauptpeak zeigte ein Signal bei 36074 Da, was darauf hindeutet, dass es kein Zink komplexiert (**Abbildung 29 B**). Das alternative Spleißen scheint die Zinkbindedomäne von Isoform 2 so sehr verändert zu haben, dass sie nicht mehr in der Lage ist das Metallion zu komplexieren.

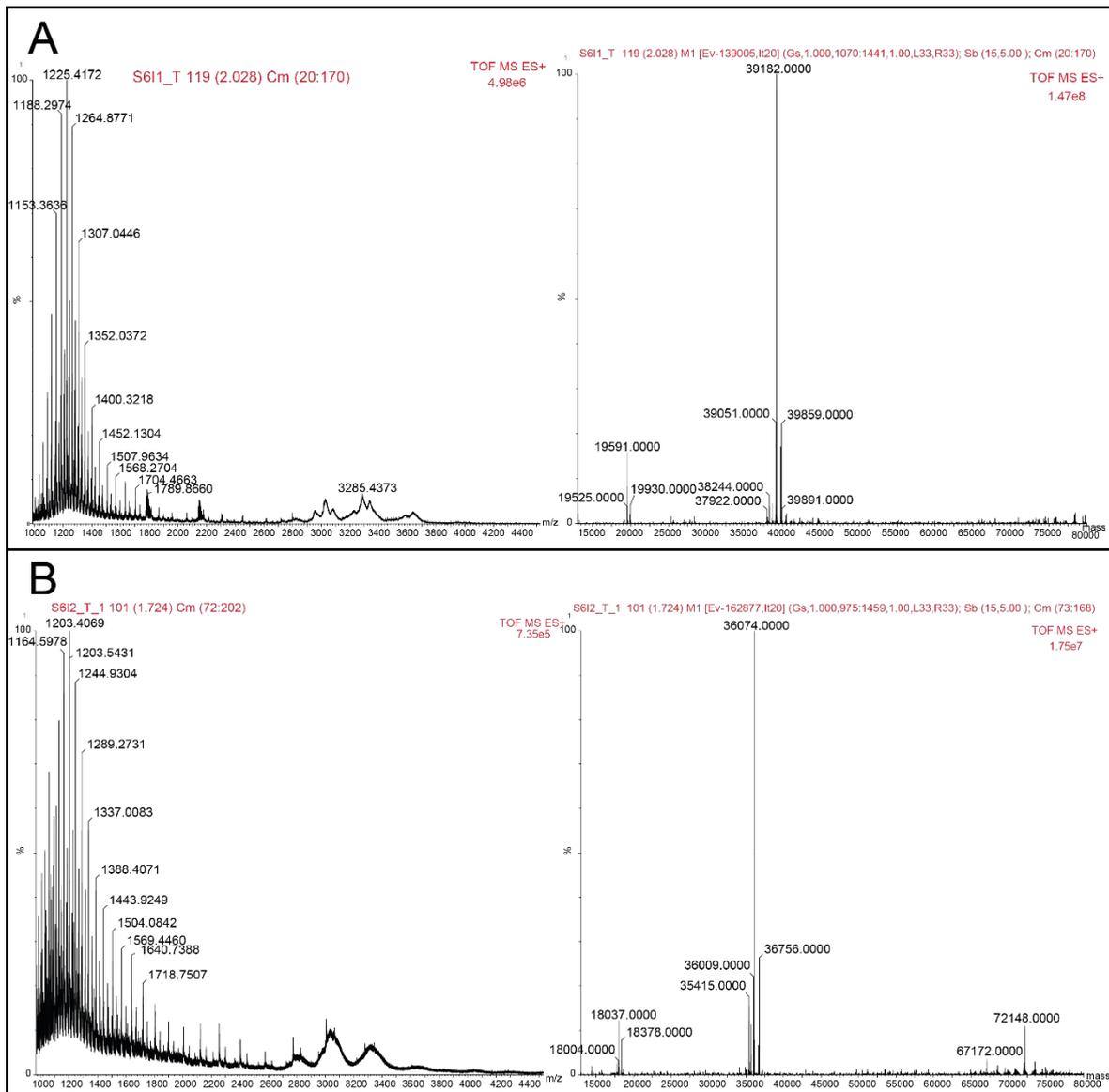


Abbildung 29: Sirt6 Isoform 1 komplexiert ein Zinkion, jedoch nicht Sirt6 Isoform 2. A (Sirt6 Isoform 1) und B (Sirt6 Isoform 2) zeigen links die nativ-MS-Messungen und rechts die dekonvolvierten Spektren mit Hauptsignalen bei 39182 Da und 36074 Da.

5.3.5 Funktionelle Analyse von Sirt6

Neben den strukturellen Gemeinsamkeiten und Änderungen wurde der Einfluss des alternativen Spleißens auf die Funktionalität der Spleißvariante untersucht. Sirt6 Isoform 1 katalysiert die enzymatische Spaltung der Amidbindung zwischen Lysinresten und einer vorzugsweise vergleichsweise langen Fettsäuregruppe wie Myristoyl (Jiang *et al.* 2013) (Abbildung 5). Dazu setzt es NAD^+ als Coenzym um. Sirt6 ist dabei das einzige Sirtuin, das die Fähigkeit besitzt, NAD^+ zu binden ohne ein acyliertes Substrat gebunden zu haben (Pan *et al.* 2011). Um zu überprüfen, ob beide Isoformen in der Lage sind NAD^+ , das Peptid H3K9

(NH₂-KQTARKSTGGWW-COOH) oder das am internen Lysin myristoylierte Peptid H3K9Myr zu binden, wurde eine thermische Stabilitätsuntersuchung nach Zahng *et al.* (Zhang *et al.* 2016) durchgeführt (**Abbildung 30**). Ohne Zugabe von NAD⁺ oder eines Peptids ist Sirt6 Isoform 1 bis 42 °C sehr stabil. Die Intensität der Bande nimmt jedoch bei 45 leicht und bei 48 °C sehr stark ab. Bei noch höheren Temperaturen war nahezu kein lösliches Protein im Überstand nachweisbar. Sirt6 Isoform 2 zeigte eine höhere Stabilität. Ohne Additiv war selbst bei 57 °C eine ähnlich intensive Bande wie bei niedrigen Temperaturen sichtbar. Durch Zugabe von NAD⁺ war für Isoform 1 selbst bei 67 °C und bei Isoform 2 auch bei 62 °C eine schwache Bande zu sehen. Dies deutet für beide Isoformen auf eine Bindung von NAD⁺ hin, die stabilisierend wirkt. Gleiches Verhalten war mit dem Peptid H3K9 zu beobachten. Dieser Effekt ist jedoch im Verhältnis zur Messreihe ohne Additiv insbesondere für Isoform 1 schwach. Eine deutlich stärkere protektive Wirkung hatte das Substratpeptid H3K9Myr auf beide Isoformen. Hier konnte mit steigender Temperatur keine Verringerung der Menge des löslichen Proteins im Überstand nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht, dass sowohl Sirt6 Isoform 1 als auch die alternative Spleißvariante in der Lage sind, das myristoylierte Substratpeptid zu binden und dadurch stabilisiert zu werden.

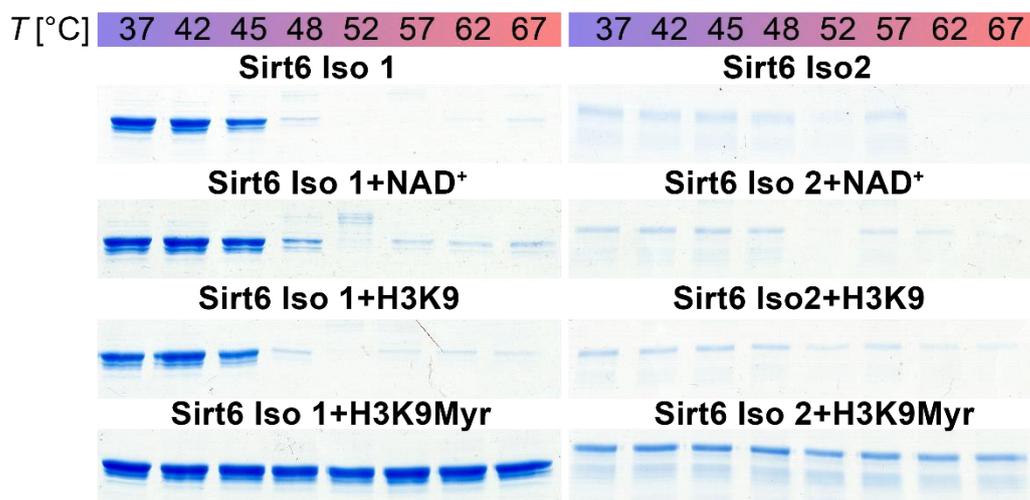


Abbildung 30: Beide Isoformen von Sirt6 sind in der Lage, das Substratpeptid H3K9Myr zu binden. Beim der thermische Stabilitätsuntersuchung wurden 3 µg Protein alleine, mit 1 mM NAD⁺, mit 100 µM H3K9 oder mit 100 µM H3K9Myr bei 37, 42, 45, 48, 52, 57, 62, und 67 °C für 3 min inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt und zentrifugiert.

Außerdem wurde mittel Nativ-MS die Bindung von NAD⁺ überprüft. Nach der Inkubation von Sirt6 Isoform 1 mit NAD⁺ konnten Spektren erhalten werden, die dekonvolviert zwei Hauptpeaks bei 39181 und 39726 Da zeigten (**Abbildung 31**). Mit einer Molmasse von NAD⁺ (oxidiert) in Lösung von 663,43 g/mol, ist ersichtlich, dass ein Großteil der

gemessenen Sirt6-Moleküle NAD^+ gebunden hatte. Gleiches wurde auch für Isoform 2 durchgeführt, jedoch konnten keine auswertbaren Spektren erhalten werden.

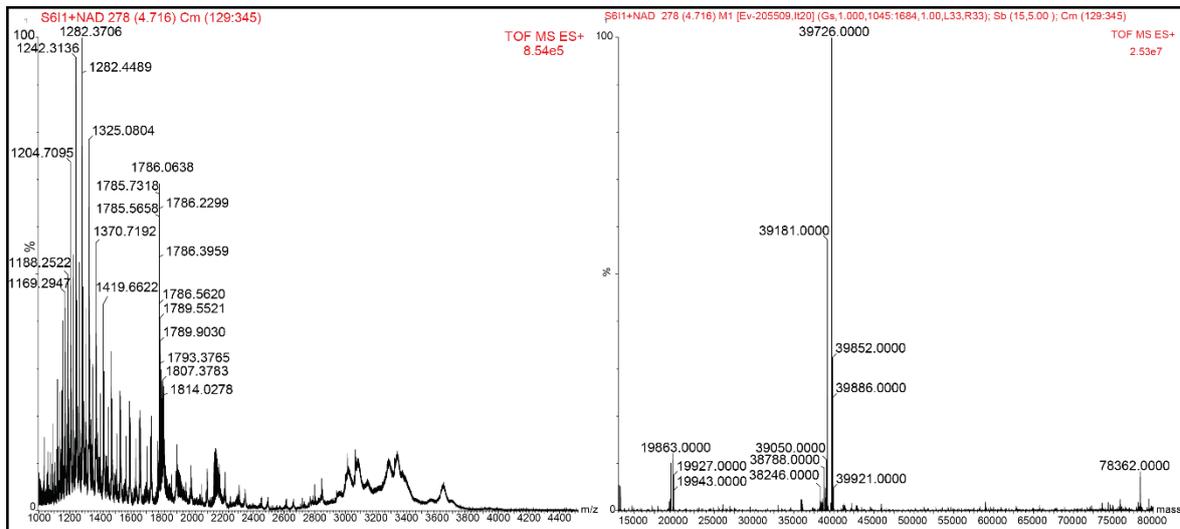


Abbildung 31: Sirt6 Isoform 1 ist in der Lage NAD^+ zu binden. Links ist die nativ-MS-Messung und rechts das dekonvolvierte Spektrum mit Hauptsignalen bei 39181 Da und 39726 Da abgebildet.

Ferner wurde untersucht, ob beide Spleißvarianten auch enzymatische Aktivität haben. Dazu wurden beide Isoformen mit H3K9Myr und NAD^+ bei 37 °C inkubiert, um eine potentielle Deacylierungsreaktion zu messen. Nach Abstoppen der Reaktion wurde die Lösung über eine *Reversed-phase*-Säule getrennt. Durch die Myristoylgruppe ist H3K9Myr hydrophober als die deacylierte Variante H3K9. Dadurch bindet es mit höherer Affinität an das Säulenmaterial und eluiert erst bei höheren Konzentrationen des organischen Lösungsmittels. Bei den Messungen mit Sirt6 Isoform 1 war neben dem Substratsignal bei ~23,7 min ein zusätzlicher Peak bei ~16 min sichtbar, welcher dem demyristoylierten H3K9 als Produkt entspricht (**Abbildung 32 oben**). Mit Nikotinamid als Sirtuininhibitor konnte die enzymatische Reaktion unterdrückt und die Bildung des Peaks bei ~16 min gehemmt werden. Mit Isoform 2 konnte unter keinen Bedingungen eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden (**Abbildung 32 unten**). Die Signalintensität war im Bereich der inhibierten Isoform 1. Eine äquimolare Mischung aus beiden Isoformen ergab eine Demyristoylierungsaktivität, die geringfügig niedriger als die der gleichen Mengen Isoform 1 alleine war. Dies zeigt, dass die Isoformen keine aktivierende oder kooperative und keine deutliche inhibitorische Wirkung aufeinander haben.

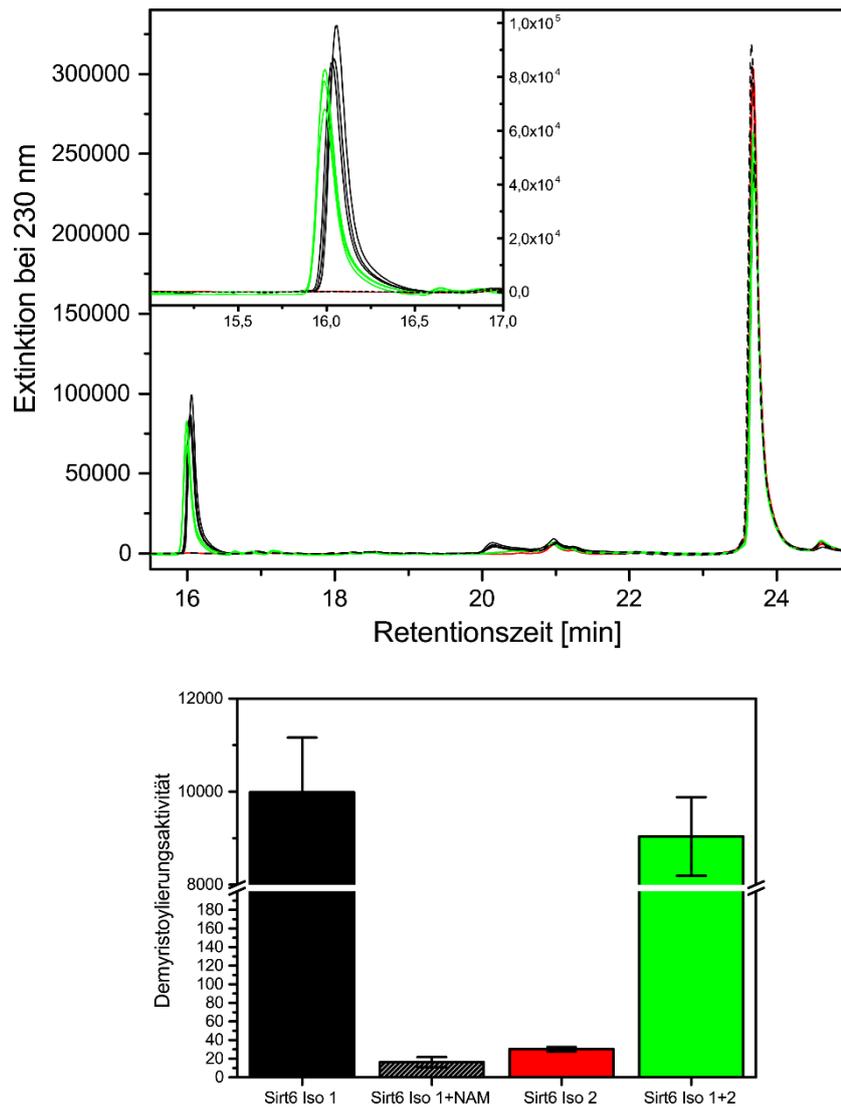


Abbildung 32: Sirt6 Isoform 2 hat im Gegensatz zu Isoform 1 keine Demyristoylierungsaktivität. Sirt6 Isoform 1 und 2 ($1 \mu\text{M}$) wurden mit $50 \mu\text{M}$ H3K9Myr und $0,5 \text{ mM}$ NAD^+ für 1 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und nach Stoppen der enzymatischen Reaktion wurde die Lösung über eine RP-Säule aufgetrennt. Das Chromatogramm (**oben**) von Isoform 1 (schwarze Linie), Isoform 2 (rote Linie), Isoform 1 mit 50 mM Nikotinamid (gestrichelte Linie) und einer äquimolaren Mischung von Isoform 1 und 2 mit je $1 \mu\text{M}$ (grüne Linie) wurde bei 230 nm in Triplikaten aufgezeichnet. Die Peaks zwischen $\sim 15,8$ und $16,3$ min wurden integriert und **unten** als Balkendiagramm aufgetragen.

5.4 α -Kristallin

5.4.1 Die Genstruktur von α A-Kristallin

Eine weitere Gruppe von Proteinen, für die der Effekt des alternativen Spleißens untersucht wurde, ist die der zu den kleinen Hitzeschockproteinen zählenden α -Kristalline. In Wirbeltieren besteht diese aus den zwei homologen α A- und α B-Kristallin, welche eine dreiteilige Domänenstruktur aus konservierter ACD und weniger konservierten NTS und CTS aufweisen. Da die beiden Gene CRYAA und CRYAB die Folge einer Genduplikation sind, weisen sie sowohl auf genomischer als auch auf Proteinebene große Ähnlichkeiten auf. Die kanonische Isoform 1 von α A- und α B-Kristallin wird durch drei Exons kodiert (Graw 2009). Das erste Exon entspricht der NTS und die letzten beiden der ACD und der CTS beider Proteine. Abgesehen von der α A^{ins}-Variante von α A-Kristallin, die in Nagetieren (Cohen *et al.* 1978a; Cohen *et al.* 1978b; Jong *et al.* 1980) und bestimmten weiteren Säugetieren (Hendriks *et al.* 1988) gefunden wurde, für welche das verantwortliche Exon im Menschen jedoch nur noch als Pseudoexon vorliegt (Jaworski und Piatigorsky 1989), sagt die Ensemble Datenbank für CRYAA fünf Transkriptvarianten voraus (**Abbildung 33**). Davon sind drei proteinkodierend. Die anderen besitzen entweder keinen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) oder enthalten zusätzlich ein Intron. Das Gen CRYAA besitzt fünf Exons, aus denen die drei proteinkodierenden Isoformen zusammengesetzt sind. Exon 4 codiert etwa die erste Hälfte der ACD, während Exon 5 der zweiten Hälfte und der CTS entspricht (**Abbildung 33**). Diese beiden Exons und damit die

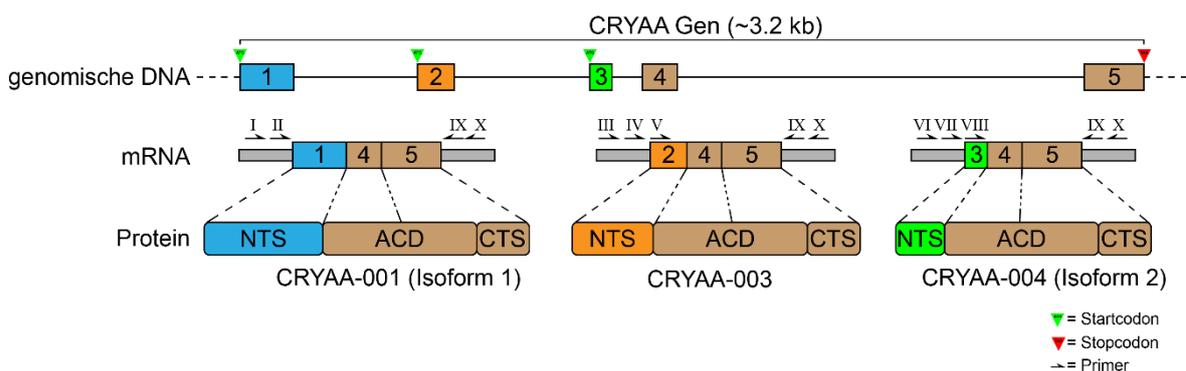


Abbildung 33: Das Gen CRYAA resultiert in drei Transkriptvarianten. Die Struktur des humanen CRYAA Gens mit den resultierenden Transkripten und potentieller Protein Segmentierung. Nummerierte Kästen repräsentieren Exons und die Linien dazwischen Introns. Schmale graue Kästen stellen untranslatierte Bereiche (*untranslated regions* UTR) dar. N-terminale Sequenzen (NTS) (blau, orange, grün). α -Kristallin Domäne (ACD) und C-terminale Sequenz (CTS) (braun). Grüne und rote Dreiecke markieren Start- und Stopcodons. Nummerierte Halbpfleile kennzeichnen Primerpositionen.

Proteinsequenzen für die ACD und CTS sind den drei Isoformen gemein. Interessanterweise variieren Exon 1 bis 3 jedoch und kodieren für drei unterschiedliche NTS. Die Verknüpfung von Exon 1, 4 und 5 führt zur kanonischen Isoform 1 (CRYAA-001, Transkriptkennung: ENST00000291554.6) von α A-Kristallin mit 173 Aminosäuren (AS) und einer TSL:1 Kennzeichnung bei Ensemble. Substitution von Exon 1 durch Exon 2 resultiert in der Bildung einer kürzeren Variante mit 153 AS, die mangels einer Isoformnomenklatur im Folgenden entsprechend ihrer Länge als α A-Kristallin SV153 (CRYAA-003, Transkriptkennung: ENST00000398133.5) bezeichnet wird. SV153 ist als TSL:3 in Ensemble markiert. Die Verbindung von Exon 3, 4 und 5 ergibt die kürzeste Isoform mit 136 AS (CRYAA-004, Transkriptkennung: ENST00000398132.1). Sie wird in der NCBI Datenbank als Isoform 2 (NP_001307648.1) geführt und ist als TSL:2 in Ensemble vermerkt.

5.4.2 Expressionsanalysen und Konservierung von α A-Kristallin

Diese wurde bereits in der menschlichen Retina eines Erwachsenen und im fötalen Augengewebe auf der Basis von EST identifiziert (Bonaldo *et al.* 1996; Wistow *et al.* 2002). Da α A-Kristallin Isoform 1 auch vornehmlich in der Augenlinse vorkommt (Robinson und Overbeek 1996), deutet dies darauf hin, dass beide Isoformen eine ähnliche Gewebsspezifität haben. Um zu überprüfen, welche Transkriptvariante in humanen Augenlinsen nachweisbar ist, wurden RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt. In kultivierten humanen Epithelzellen sinkt die Expression von α A-Kristallin jedoch in Abhängigkeit der Länge der Kultivierung (Fleming *et al.* 1998; Lenstra *et al.* 1982). Aus diesem Grunde wurde die Präsenz der alternativen Spleißvarianten anhand von primären Epithelzellen analysiert. Das Total-RNA-Isolat von HLEpiC-Zellen wurde revers-transkribiert und *nested*-PCRs mit variierenden Primern (**Abbildung 33**) durchgeführt (**Abbildung 34**). Mit Primern komplementär zu den untranslatierten Bereichen (*untranslated regions*, UTR) vor Exon 1 (I, II) und hinter Exon 5 (IX; X) ergab sich jeweils eine starke Bande bei ~600 bp, die der Isoform 1 von α A-Kristallin entsprach und durch Sequenzierung bestätigt wurde. Damit wurde die kanonische Isoform auf Transkriptebene bestätigt. Wurden Vorwärts-Primer entsprechend der Sequenzen nahe oder in Exon 2 eingesetzt (III, IV, V), wurde keine entsprechende Bande amplifiziert. Damit konnte die Präsenz von SV153 auf Transkriptebene nicht nachgewiesen werden. Dies kann zu einem an den Primer oder den Bedingungen der PCRs liegen. Zum anderen jedoch auch

daran, dass das SV153-Transkript zumindest in dem untersuchten RNA-Isolat nicht in ausreichenden Mengen vorhanden ist. Wurden Primer in der Nähe von Exon 3 (VI, VII) eingesetzt, bildeten sich mehrere Banden bei verschiedenen Höhen (**Abbildung 34 links**). Die DNA dieser Banden wurde isoliert und mit Primern die näher an Exon 3 (VII) oder an Exon 3 (VIII) binden re-amplifiziert (**Abbildung 34 rechts**). Dabei bildeten sich erneut zwei diesmal stärker ausgeprägte Banden. Isolation der DNA und Sequenzierung ergab, dass die obere Bande der Isoform 2 entspricht, jedoch zusätzlich das Intron zwischen Exon 3 und Exon 4 trägt. Dieses Fragment passt zum CRYAA-005 (ENST00000468016.1) von Ensemble, welches ein Intron beibehält. Dieses enthält zusätzlich mehrere vorzeitig Stopcodons, die vermutlich eine Synthese der entsprechenden α A-Kristallin Isoform verhindern. Die untere Bande bei ~400 bp entsteht durch die Verknüpfung von Exon 3, 4 und 5 und entspricht α A-Kristallin Isoform 2. Damit ist die Präsenz dieser alternativen

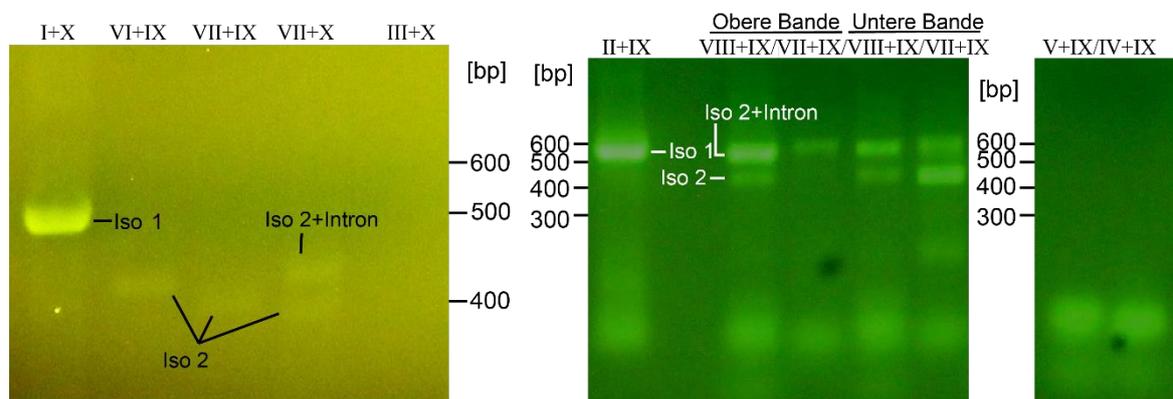


Abbildung 34: In primären humanen Linsenzellen sind mehrere Transkriptvarianten von α A-Kristallin vorhanden. Links ist das Agarosegel der primären PCR der *nested*-RT-PCR Analyse des HLEpiC RNA-Isolats. Rechts ist das Gel der sekundären PCR. Die römischen Nummern geben die verwendeten Primer aus **Tabelle 7** und **Abbildung 33** wieder.

Transkriptvariante von α A-Kristallin in humanen Linsenzellen bestätigt.

Ferner wurde die Konservierung von α A-Kristallin Isoform 2 und SV153 anhand der Datenbanken von UniProt und NCBI durchgeführt. Anhand der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden ähnliche Proteine in anderen Spezies gesucht. Dabei wurden insgesamt drei Varianten mit einer hohen Sequenzabdeckung zur Isoform 2 gefunden (**Abbildung 35 oben**). Auch die NTS, die bei dieser Spleißvariante im Vergleich zur kanonischen Isoform 1 verändert ist, zeigt hohe Ähnlichkeit.

Für SV153 konnte nur eine homologe Version des Drills (*Mandrillus leucophaeus*) gefunden werden, die eine hohe Ähnlichkeit der NTS zeigt, jedoch um fünf AS kürzer ist als die NTS von SV153 (**Abbildung 35 unten**).

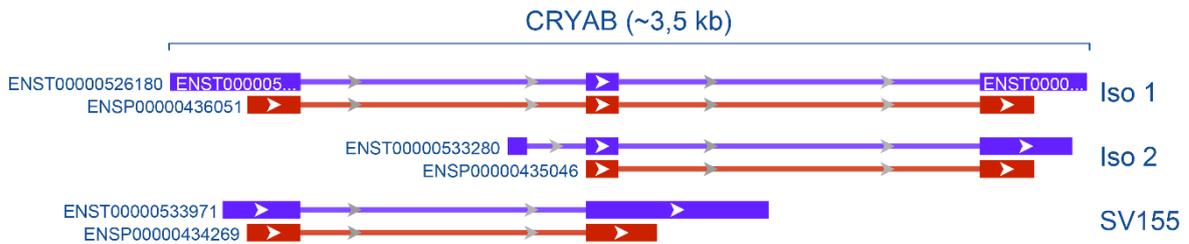


Abbildung 36: Das Gen CRYAB resultiert in mindestens drei Transkriptvarianten. Das Alignment der Exons (Kästen) und der dazwischenliegenden Introns (Linien mit Pfeilen) zeigt die drei Varianten, die durch die Ensemble Datenbank vorhergesagt werden, mit unterschiedlicher Exonzusammensetzung auf mRNA-Ebene (violett) und kodierender Sequenz (CDS; rot). Ausgenommen sind Varianten die zum gleichen Protein führen würden oder einen Transkriptabbruch an 5'- und/oder 3'-Ende aufweisen.

lediglich zu einem Protein mit ACD und CTS führen würde und dies bereits literaturbekannt ist (Peschek *et al.* 2013; Mainz *et al.* 2015), wird dieser nicht weiter untersucht. Wird das erste Exon an das zweite gehängt und die Spleißstelle nach dem zweiten überlesen, führt dies zu einer Verlängerung des zweiten Exons. Dieses Transkript endet bei der Translation an einem neuen Stopcodon, was im Vergleich zur Isoform 1 zu einer verkürzten Isoform mit 155 AS führt und im Folgenden als α B-Kristallin SV155 bezeichnet wird. Das Transkript hierzu wird bei Ensemble als TSL:2 geführt. SV155 hat neben der Verkürzung auch eine C-terminal veränderte Sequenz, die etwa in der Mitte der ACD beginnt.

5.4.4 Expressionsanalysen und Konservierung von α B-Kristallin

Zum Nachweis von α B-Kristallin Isoform 1 und SV155 wurden RT-PCRs mit humanen RNA-Proben verschiedenster Gewebe durchgeführt (**Abbildung 37**). Isoform 1 konnte in jeder der 22 Proben nachgewiesen werden. SV155 war in allen Proben ausgenommen der fötalen Leber präsent. Hier ist davon auszugehen, dass die Bande im Gel zu schwach war. Beide Isoformen wurden jeweils über Gelpräparation und Sequenzierung der DNA bestätigt. Interessanterweise wurden bei den PCR-Amplifikationen von SV155 zusätzliche Banden mit höheren Basenzahlen bei ~150 bp erhalten. Aus der intensivsten Bande hiervon konnte die DNA isoliert und sequenziert werden. Sie entspricht der Sequenz von Exon 1 und 2, einschließlich dem Intron zwischen den beiden Exons. Damit stellt sie vermutlich eine nicht fertig gespleißte Spezies dar. Da SV155 in allen Geweben nachgewiesen werden konnte, in denen auch α B-Kristallin Isoform 1 gefunden wurde, kann davon ausgegangen werden, dass beide Isoformen eine sehr breite Gewebsverteilung aufweisen. Dies entspricht dem

Expressionsmuster, welches für Isoform 1 gefunden wurde (Bhat und Nagineni 1989; Dubin *et al.* 1989; Iwaki *et al.* 1989; Iwaki *et al.* 1990; Kato *et al.* 1991b).

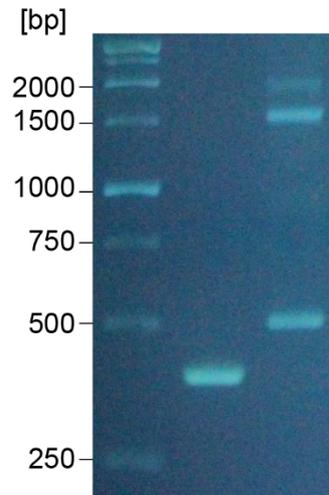


Abbildung 37: In verschiedenen humanen Geweben sind mehrere Transkriptvarianten von α B-Kristallin nachweisbar. Das beispielhafte Gel der RT-PCR aus humanem Testis total RNA-Isolat mit Primern entsprechend **Tabelle 7** zeigt in der mittleren Spur eine Bande die der Isoform 1 entspricht. In der rechten Spur gibt die unterste Bande SV155 wieder und die obere Bande bei ~1500 bp die SV155 einschließlich des ersten Introns.

Auch für α B-Kristallin SV55 wurde die Konservierung untersucht. Eine Spleißvariante die auch im C-terminal Bereich Ähnlichkeiten aufweist, stammt aus dem Rhesusaffen (**Abbildung 38**). Eine Weitere wird im Neunbinden-Gürteltier vorhergesagt, welches in entfernterer Verwandtschaft zum Menschen steht.

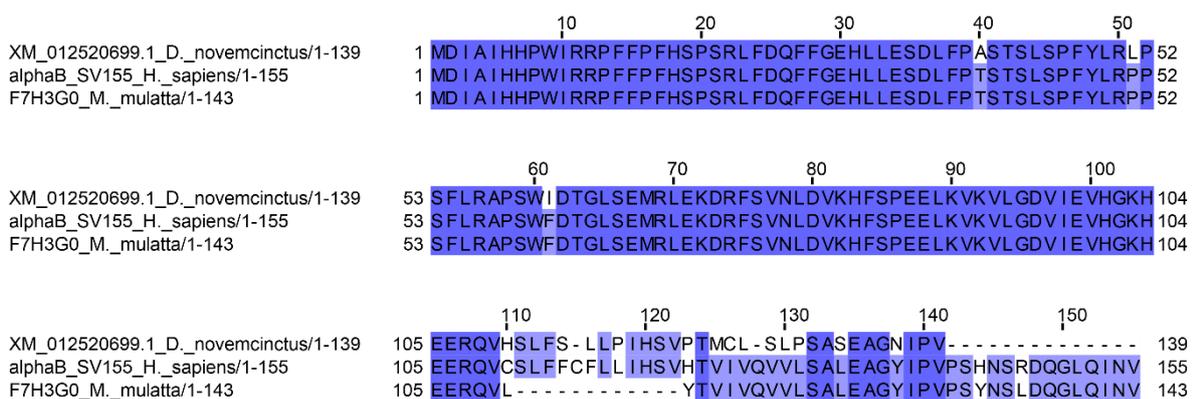


Abbildung 38: α B-Kristallin SV155 wird in verschiedenen Spezies vorhergesagt. Das Sequenzalignement zeigt, dass Isoformen mit ähnlicher Sequenz zur humanen SV155 für das Neunbinden-Gürteltier (*Dasyus novemcinctus*) und den Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) durch NCBI auf Transkriptebene vorhergesagt (XM) werden oder in UniProt vorkommen. Die Intensität der Blaufärbung der Aminosäuren gibt die Konservierung wieder.

5.4.5 Sequenzvergleich, Expression und Reinigung der α -Kristalline

Durch das Ersetzen des ersten Exons von α A-Kristallin Isoform 1 findet eine Substitution der gesamten NTS statt. Die resultierenden Proteinvarianten Isoform 2 und SV153 sind zudem kürzer als die kanonische Isoform. Auch die alternative Spleißvariante SV155 von α B-Kristallin ist kürzer als ihr kanonisches Pendant, doch ist hier im Gegensatz zu den anderen α -Kristallin-Spleißvarianten der C-terminus beeinflusst. Das verlängerte zweite Exon und die Deletion des Dritten führen auf Proteinebene zu einer Substitution der Sequenz von etwa der Hälfte der ACD und der CTS. Es wurden Vergleiche zwischen den alternativen Spleißvarianten von α A- und α B-Kristallin und weiteren humanen sHsps angestellt (**Abbildung 39**). Die NTS von α A-Kristallin Isoform 2 und SV153 sowie der veränderte C-terminus von α B-Kristallin SV155 zeigen keine hohe Konservierung zu vergleichbaren Bereichen in anderen humanen sHsps. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese sich auch strukturell anders verhalten oder andere Aufgaben einnehmen könnten.

Es wird angenommen, dass hydrophobe Seitenketten auch in der NTS wichtig für die Bindung von Substraten sind die durch partielle Entfaltung hydrophobe Bindestellen preisgeben (Raman und Rao 1994; Das und Surewicz 1995; Haslbeck *et al.* 2016; Haslbeck *et al.* 2005). Die substituierten NTS von α A-Kristallin Isoform 2 und SV153 zeigen dabei eine vergleichbare Verteilung der hydrophoben Seitenketten (**Abbildung 40**). Dennoch findet eine deutliche Verkürzung der NTS und auch hydrophober Abschnitte statt.

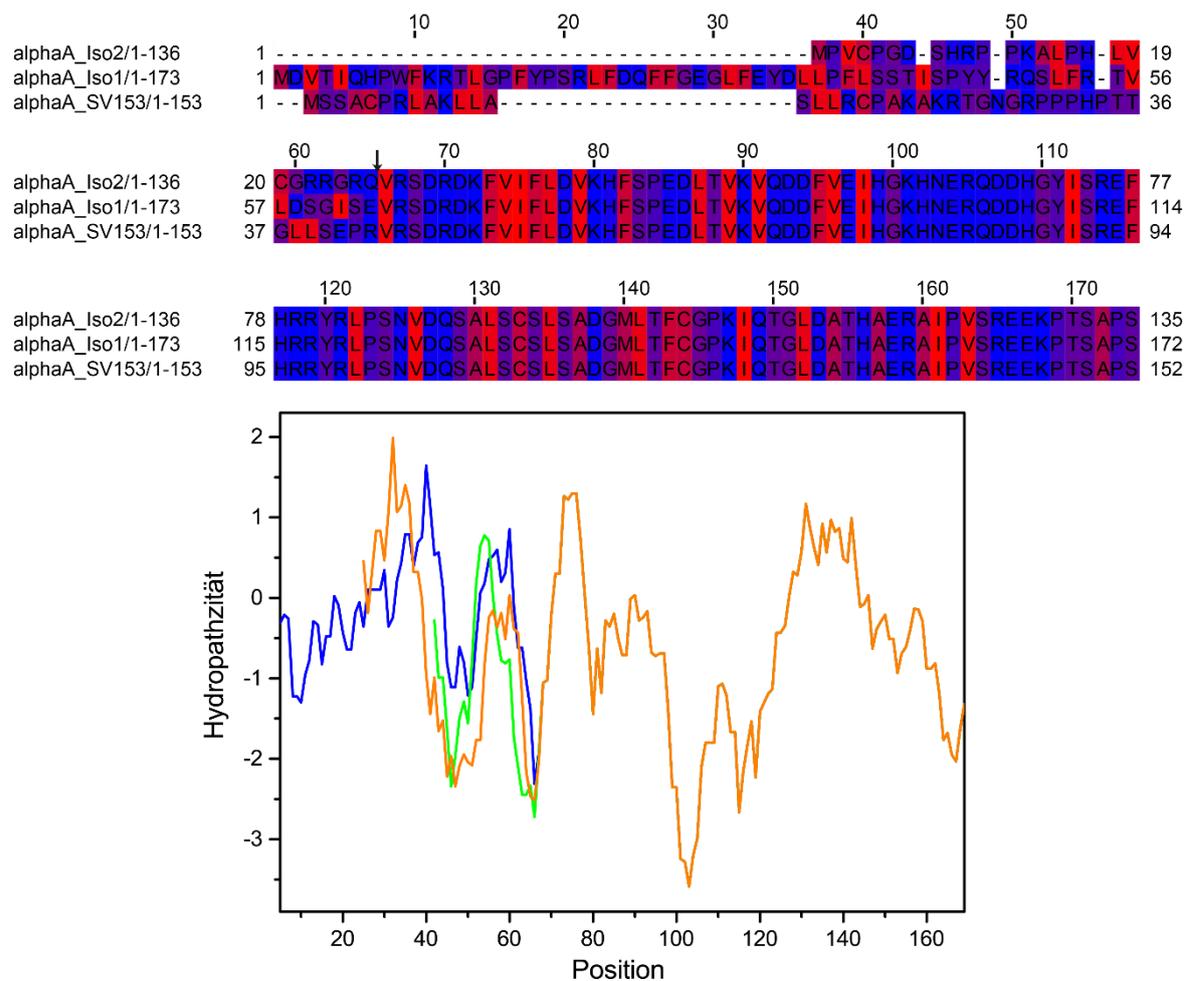


Abbildung 40: α A-Kristallin Isoform 1, 2 und SV153 haben ausgehend von der Sequenz eine ähnliche Hydropathizität. Oben ist ein Sequenzalignment der drei Isoformen dargestellt. Die Färbung entspricht der Hydropathizitätstabelle von Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle 1982) mit hydrophoben Aminosäuren in rot und hydrophilen in blau. Der Pfeil markiert den Start der ACD. Unten ist die entsprechende Hydropathizitätsauftragung mit α A-Kristallin Isoform 1 (blau), Isoform 2 (grün) und SV153 (orange).

Andererseits ändert sich die theoretische Ladung und der pI durch die Sequenzänderung sehr deutlich. α A-Kristallin Isoform 1, Isoform 2 und SV153 haben theoretische pIs von 5,77, 7,77 und 9,00. Wenn nur die NTS betrachtet wird, hat Isoform 1 ohne die potentiell positiv geladenen Histidine eine theoretische Gesamtladung von -2, während Isoform 2 eine

Gesamtladung von +4 und SV153 eine von +7 aufweist (**Abbildung 41**). Dies zeigt, dass sich die NTS hinsichtlich der Ladungen deutlich verändert.

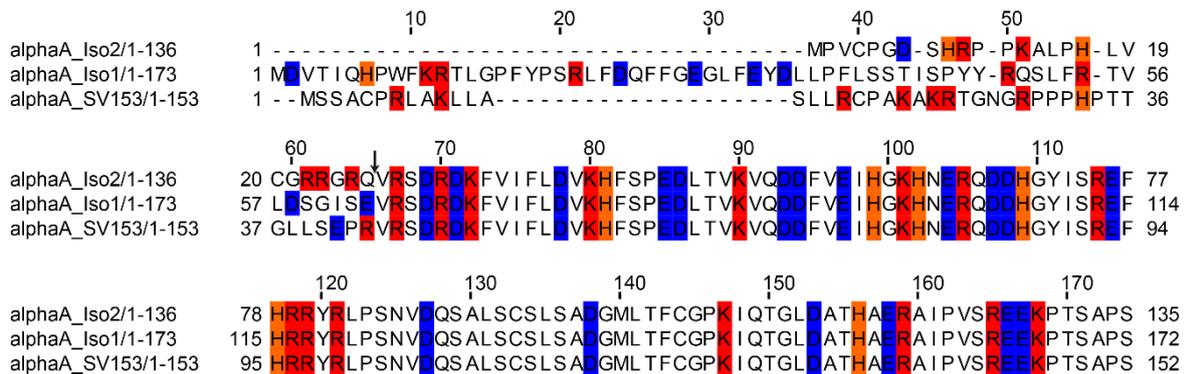


Abbildung 41: α A-Kristallin Isoform 1 hat in Summe eine höhere vorhergesagte negative Ladung als Isoform 2 und SV153. Im Sequenzalignment der drei Isoformen sind die potentiell Ladung tragenden Aminosäuren farblich markiert mit positiver Ladung (rot), potentieller positiver Ladung (orange) und negativer Ladung (blau). Der Pfeil markiert den Start der ACD.

Die CDS von α A-Kristallin Isoform 2 und SV153 sowie von α B-Kristallin SV155 wurden als synthetische Konstrukte erhalten und nach den Klonierungen in die Expressionsvektoren pET-21a (kein Tag), pET28b-SUMO (His-SUMO-Tag) und pE-SUMO (His-SUMO-Tag) in Expressionstests wie die Sirt6 Isoformen bei variierenden Bedingungen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die alternativen Spleißvarianten ohne stabilisierenden Tag nicht löslich exprimierbar waren. Von den drei nicht-kanonischen Isoformen war α A-Kristallin Isoform 2 mit His-SUMO-Tag die am stärksten exprimierbare Variante, während SV153 deutlich schwächer in löslicher Form exprimiert wurde und SV155 nur in sehr geringer Menge überexprimiert wurde und auch nicht gereinigt werden konnte. Die Bedingungen mit größtmöglicher Expression löslichen Proteins wurde eingesetzt, um α A-Kristallin Isoform 2 und SV153 zu exprimieren und zu reinigen. Zudem wurde für α A-Kristallin Isoform 1 ein neues Reinigungsprotokoll entwickelt (**Abbildung 42**). Durch den vergleichsweise hohen theoretischen pI von α A-Kristallin Isoform 2 und SV153 und den His-Tag konnten selbst geringe Mengen löslichen Proteins von SV153 gereinigt werden. Dabei band Isoform 2 quantitativ an die chromatographischen Säulen, während Isoform 1 und SV153 eine schlechte Bindung aufwiesen. Deshalb wurde gegebenenfalls mehrfach die gleiche Säule eingesetzt, um die Ausbeute zu erhöhen. Dieses unvollständige Bindeverhalten könnte auf die Bildung sehr großer Oligomere zurückzuführen sein für die Isoform 1 bekannt ist und die mögliche Bindestellen an das Säulenmaterial unzugänglich machen könnte. Für Isoform 1 wurde deshalb anfänglich 3,5 M Harnstoff in den Puffern eingesetzt, um die Bildung großer Oligomere zu verringern, jedoch keine vollständige Entfaltung auszulösen. Dies wurde bei

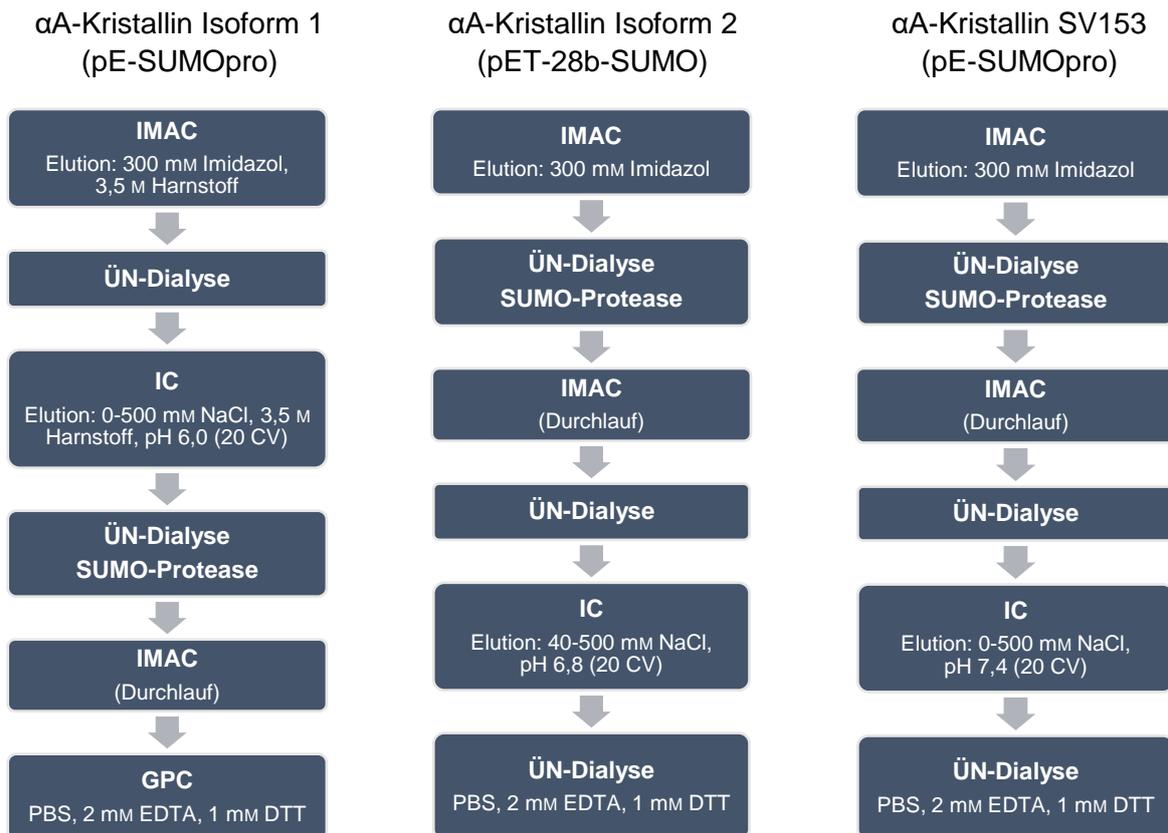


Abbildung 42: Schematische Reinigungsvorschriften für α A-Kristallin Isoformen.

SV153 vermieden, um einer möglichen Entfaltung vorzubeugen. Für α A-Kristallin Isoform 1 und 2 konnten größere Mengen reinen Proteins erhalten werden, jedoch wurden nur geringe Mengen von nicht ganz sauberem SV153 isoliert. Auch hier wurde die Reinheit der Proteine mittels PAGE überprüft und die Banden der Zielproteine und gegebenenfalls Verunreinigungen über MALDI-TOF/TOF-Peptid-Fingerprint-Untersuchungen identifiziert. Für keines der Proteine wurden Chaperonverunreinigungen in den durch die Coomassiefärbung sichtbaren Banden identifiziert. Zusätzlich wurden α A-Kristallin Isoform 1 und 2 als Vollängenproteine gemessen (**Abbildung 43**). Die gemessenen Massen passen zu den theoretischen Molmassen entsprechend der Primärsequenz.

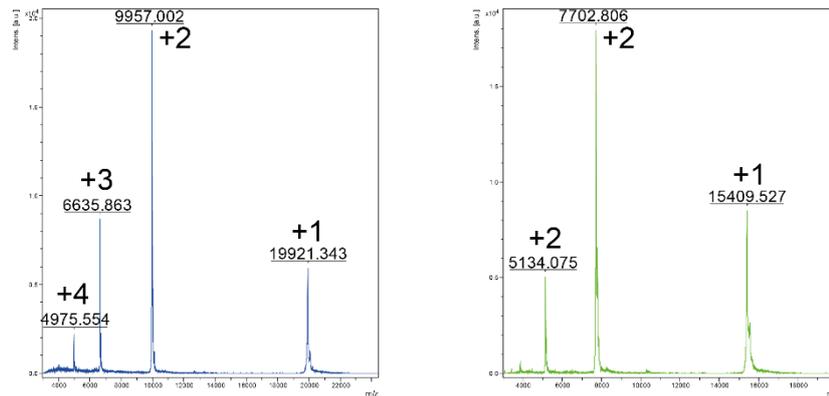


Abbildung 43: Die massenspektrometrischen Untersuchungen der α A-Kristalline zeigen die Masse-Ladungs-Verteilung. Für α A-Kristallin Isoform 1 (links, blau) wurden vier und für Isoform 2 (rechts, grün) drei deutliche Signale für die Ladungsverteilung der Proteine erhalten.

5.4.6 Strukturelle Charakterisierung von α A-Kristallin

5.4.6.1 Faltungszustand von α A-Kristallin

Kleine Hitzeschockproteine weisen strukturelle Besonderheiten auf die auch den α -Kristallinen gemein sind. Die konservierte ACD weist einen hohen Anteil an β -Faltblatt-Elementen auf und besitzt eine hohe Stabilität (Laganowsky *et al.* 2010; Laganowsky und Eisenberg 2010; Bagneris *et al.* 2009). Sie wird flankiert von der weniger gut konservierten NTS und der kürzeren CTS, welche in α B-Kristallin vornehmlich aus α -Helices zusammengesetzt sind und eine höhere Flexibilität als die ACD aufweisen (Braun *et al.* 2011; Jehle *et al.* 2011). α A-Kristallin Isoform 1 besitzt ein Tryptophan, das sich in der NTS befindet. Sowohl die alternative Spleißvarianten α A-Kristallin Isoform 2 als auch SV153 besitzen dieses Tryptophan nicht mehr und es wird nicht durch ein anderes ersetzt. Zudem verlieren beide die vier Tyrosine aus der NTS. Folglich kann das Fluoreszenzverhalten der alternativen Spleißvarianten nicht direkt mit dem der kanonischen Isoform 1 verglichen werden. Dennoch wurde die Fluoreszenz der Tyrosine in α A-Kristallin Isoform 2 untersucht (**Abbildung 44**) um Aufschluss über die Faltung zu erhalten. Detektiert wurden typische Tyrosinemissionen mit dem Emissionsmaximum bei 304 nm. In denaturierendem Puffer konnte nur eine marginale Änderung sowohl des Maximums als auch der Intensität verzeichnet werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Tyrosine bereits im gefalteten Zustand lösungsmittlexponiert sind und ihre Umgebung durch die Entfaltung nicht deutlich geändert wird, wodurch die Fluoreszenzquantenausbeute nicht verändert wird.

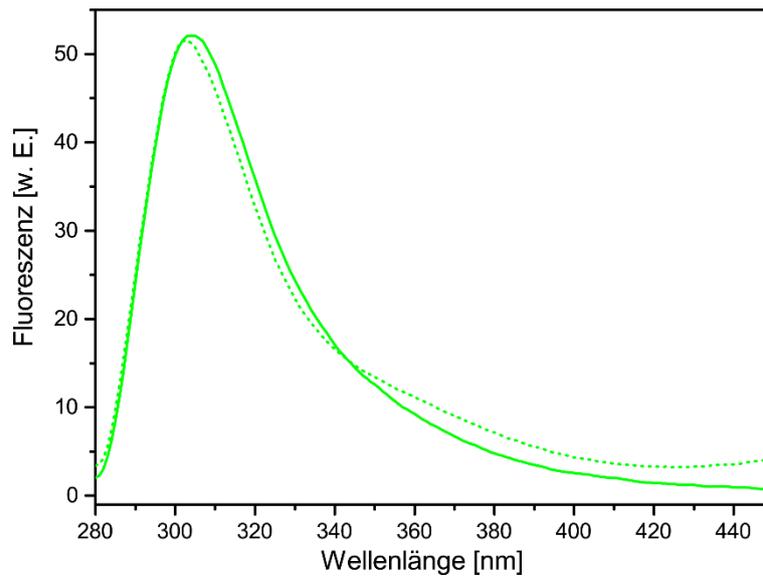


Abbildung 44: α A-Kristallin Isoform 2 zeigt eine typische Tyrosinfluoreszenzemission. α A-Kristallin Isoform 2 wurde unter nativen (durchgezogene Linie) und denaturierenden (gestrichelte Linie) Pufferbedingungen bei 274 nm angeregt und die Fluoreszenz detektiert.

Die Messungen von CD-Spektren bei 20 °C sollte zunächst zeigen, ob die gereinigten α A-Kristallin Isoformen gefaltet sind und ob Isoform 1 den typischen Immunoglobulin-ähnlichen β -Sandwich-Aufbau mit hohem Anteil an β -Faltblatt zeigt (**Abbildung 45**). α A-Kristallin Isoform 1 und 2 sowie α B-Kristallin Isoform 1 wiesen CD-Signale mit breiten Minima zwischen 210 und 219 nm auf. Dieses Signal ging unter denaturierenden Bedingungen bei Isoform 2 verloren. Dies zeigt, dass alle drei Proteine gefaltet sind und deutet auf einen hohen β -Faltblatt-Gehalt mit geringen Mengen an α -Helices hin.

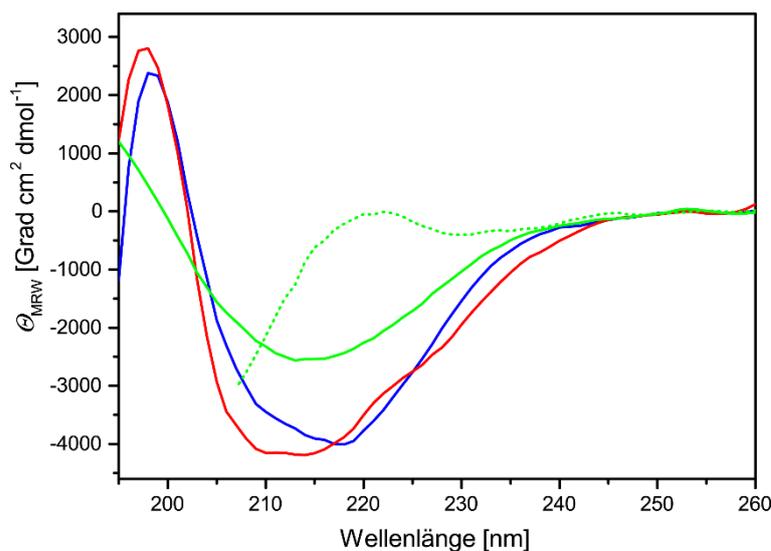


Abbildung 45: Die α -Kristalline haben eine ähnliche Sekundärstrukturzusammensetzung. Fern-UV CD-Spektren von α A-Kristallin Isoform 1 (blau), Isoform 2 (grün) und α B-Kristallin Isoform 1 (rot) wurden unter nativen Pufferbedingungen (durchgezogene Linien) und denaturierenden Bedingungen (gepunktete Linie) aufgezeichnet.

Um den jeweiligen Anteil der Sekundärstrukturelemente genauer einschätzen zu können, wurden die Spektren über CDNN dekonvolviert (**Tabelle 32**). Demnach haben die drei Varianten einen hohen Anteil an antiparallelem β -Faltblatt und β -Schleife. In den drei Fällen sind mehr als ein Drittel jedes Proteins ungefaltet. Zudem treten geringere Mengen an Helices und parallelem β -Faltblatt auf. Im direkten Vergleich von α A-Kristallin Isoform 1 und 2 zeigt sich, dass Isoform 1 mehr Helixanteil jedoch weniger Anteil an antiparallelem β -Faltblatt enthält. Da Isoform 2 eine deutliche kürzere NTS besitzt als α A- und α B-Kristallin Isoform 1, steht auch weniger Platz für die N-terminalen Helices zur Verfügung, was zu dem geringeren Anteil an Helices führen könnte. Damit würden die übrigen Strukturelemente, wie das am häufigsten vorkommende antiparallele β -Faltblatt, einen noch höheren Teil des Proteins ausmachen.

Tabelle 32: Der Anteil der Sekundärstrukturelemente ist bei den α -Kristallinen vergleichbar. Die Sekundärstrukturelemente, die durch die Dekonvolution der Fern-UV-CD-Spektren über CDNN erhalten wurden, werden verglichen.

Sekundärstrukturelement	αA Isoform 1	αA Isoform 2	αB Isoform 1
Helix	7,9 %	5,6 %	11,5 %
Antiparalleles β -Faltblatt	32,7 %	37,6 %	30,2 %
Paralleles β -Faltblatt	5,5 %	5,4 %	5,7 %
β -Schleife	19,2 %	19,3 %	18,7 %
Random Coil	35,0 %	35,0 %	34,8 %

Damit scheint die stabile ACD nicht durch die Veränderungen in der NTS in ihrer Sekundärstruktur beeinflusst zu werden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit α A-Kristallinspezies, bei denen die NTS deletiert ist. Es wurde gezeigt, dass das N-terminal gekürzte α A-Kristallin (64-173) der Ratte ein CD-Spektrum aufwies, das dem des Volllängenproteins sehr ähnlich war (Merck *et al.* 1993). Für das humane α A-Kristallin ist die Literatur uneins. Es wurde entdeckt, dass die Deletion der ersten 50 oder 62 Aminosäuren zu einer drastischen Verschiebung des Minimums von 217 auf 205 nm führt, was auf eine Abnahme des β -Faltblattanteils und eine Zunahme ungefalteter Strukturen hindeutet (Kundu *et al.* 2007). Andererseits führte die Deletion der ersten 10 oder 20 Aminosäuren zu keinem deutlichen Unterschied zum Volllängenprotein (Kundu *et al.* 2007). Andere berichteten, dass eine N-terminal gekürzte Variante von α A-Kristallin (56-173) im Hinblick auf die Sekundärstruktur hohe Ähnlichkeit mit dem Volllängenprotein aufweist (Bova *et al.* 2000).

Des Weiteren wurden für die NTS der drei α A-Kristallin Isoformen, von denen es noch keine detaillierte Struktur gibt, bioinformatische Vorhersagen der Sekundärstrukturen durchgeführt. Dazu wurden die Web-basierten Programme Phyre2 (*Protein Homology/AnalogY Recognition Engine*; ausgesprochen „fire“) und I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) als Homologie-Modelling bzw. *Threading*-Verfahren (Sequenz-Strukturalignment) eingesetzt. Es wurden jeweils die vollständigen Sequenzen der drei Isoformen eingespeist. Interessanterweise zeigten die bioinformatischen Analysen, dass in allen drei Isoformen in den NTS ausschließlich Helices vorhergesagt wurden (**Abbildung 46 A**). Dies stimmt mit der NTS von α B-Kristallin, bei dem ebenfalls hauptsächlich α -Helices gefunden wurden (Braun *et al.* 2011; Jehle *et al.* 2011), überein. Dabei traten zum Teil Unterschiede zwischen den Vorhersagen von Phyre2 und I-TASSER bezüglich der Position, der Anzahl und der Länge der helikalen Bereiche auf. Insbesondere die Vorhersagen für α A-Kristallin SV153 unterschieden sich deutlich. Andere Helices lagen an vergleichbaren Positionen, was ihre Sicherheit erhöht. Verglichen untereinander zeigten die kürzeren Isoformen 2 und SV153 in den meisten Fällen weniger Helices, bzw. kürzere helikale Abschnitte. Dies bestätigt für Isoform 2 die Schlussfolgerung aus den CD-Untersuchungen, dass in der NTS ein geringerer Anteil an α -Helices vorliegt. Dreidimensionale Strukturalignments der Vorhersagen von α A-Kristallin Isoform 1 und den

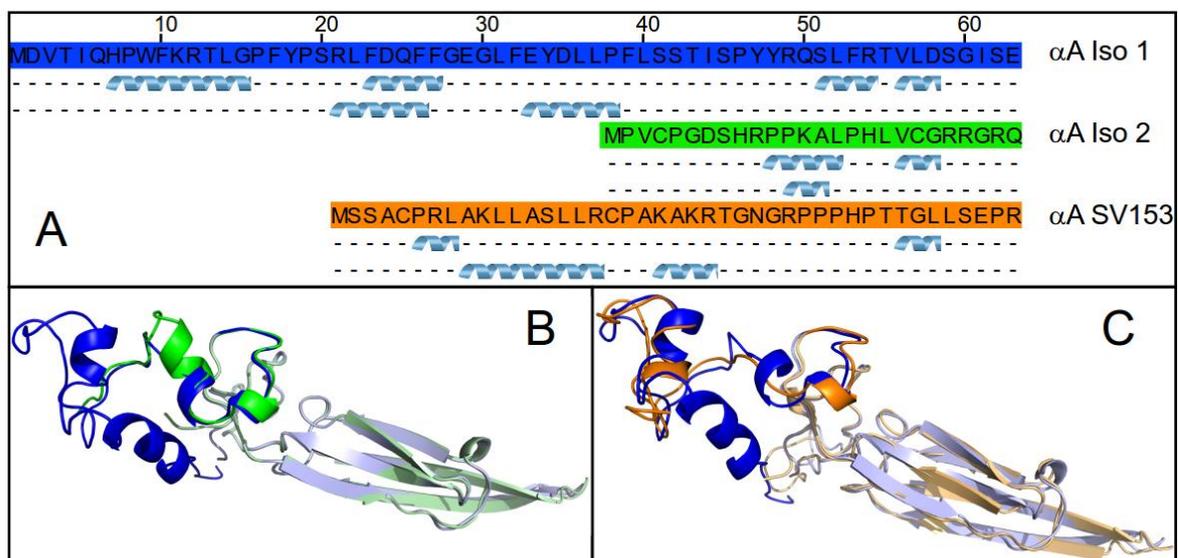


Abbildung 46: Die Sekundärstrukturvorhersagen der α A-Kristallin-Spleißvarianten zeigen helikale Strukturen in der NTS. **A** zeigt die N-terminalen Bereiche von α A-Kristallin Isoform 1 (blau), Isoform 2 (grün) und SV153 (orange). Die erste Zeile unter den Aminosäuresequenzen zeigt die Vorhersage von Phyre2 an und die darunter die von I-TASSER. **B** zeigt das Strukturalignment der Vorhersagen von Phyre2 von α A-Kristallin Isoform 1 (blau) mit Isoform 2 (grün). ACD und CTS sind blass dargestellt. **C** zeigt das Strukturalignment der Vorhersagen von Phyre2 von α A-Kristallin Isoform 1 (blau) mit SV153 (orange). ACD und CTS sind blass dargestellt.

alternativen Spleißvarianten zeigen, dass die Modellierungen ähnliche Ergebnisse ergaben (**Abbildung 46 B und C**). Die β -Faltblattstrukturen der ACD alignieren gut und die α -Helices in der NTS liegen auch an ähnlichen Positionen. Damit verdeutlichen die CD-Messungen und Vorhersagen, dass obwohl nur eine geringe Sequenzhomologie zwischen den Isoformen in der NTS vorliegt, insbesondere helikale Elemente in allen drei Isoformen in diesem Bereich vorliegen.

5.4.6.2 Die Quartärstruktur von α A-Kristallin

Eine zentrale Eigenschaft von α -Kristallinen ist es, sehr große Komplexe aus vielen Untereinheiten aufzubauen (Haslbeck *et al.* 2016). Neben diesen liegen in Lösung kleinere Mengen niedermolekularer Oligomere vor. Für α B-Kristallin wurde gezeigt, dass die großen Oligomere eine apparente Molmasse von \sim 480 kDa aufweisen, was einem Komplex aus 24 Monomeren entspricht (Braun *et al.* 2011; Peschek *et al.* 2009; Peschek *et al.* 2013; Jehle *et al.* 2010). Andere kleine Hitzeschockproteine wie HspB6 bilden dagegen vornehmlich kleinere Komplexe wie Dimere (Heirbaut *et al.* 2016; Weeks *et al.* 2014; Bukach *et al.* 2004). Es wird angenommen, dass bei α A- und α B-Kristallin zunächst die Bildung von Untereinheiten aus Dimeren über Wechselwirkungen zwischen den β 6-7 Strängen der beiden Protomere stattfindet. Größere Oligomere sollen dagegen durch NTS und CTS geformt werden, doch ist die genau Funktion der terminalen Abschnitte insbesondere für α A-Kristallin noch unklar (Laganowsky *et al.* 2010; Jehle *et al.* 2010; Jehle *et al.* 2009; Haslbeck *et al.* 2016). Deshalb stellt sich die Frage, ob sich durch die Substitution der NTS in den alternativen Spleißvarianten mit einer kürzeren Sequenz auch ihre Oligomerstruktur verändert. Zu diesem Zweck wurde die Größenausschlusschromatographie (*size-exclusion chromatography*, SEC) herangezogen. Da α A-Kristallin Isoform 2 kein Tryptophan besitzt, wurde die Elution von der Säule über die Tyrosinfluoreszenz bei 303 nm verfolgt. Um sicher zu gehen, dass es sich hierbei um die Spleißvarianten von α A-Kristallin handelt, wurde die Elution fraktioniert und zur Konzentration eine NaDOC/TCA-Fällung durchgeführt. Nach Auftrennung der gefällten Proteine über SDS-PAGE wurden Westernblots erstellt, das Signal der Banden quantifiziert und mit dem Fluoreszenzsignal verglichen (**Abbildung 47**). α A-Kristallin Isoform 2 eluierte unter nativen Bedingungen zu einem späten Zeitpunkt. Im Fluoreszenzkanal wurde bei \sim 15 min ein kleiner Peak detektiert, der im Ausschlussvolumen liegt und damit eine geringe Menge Aggregate anzeigt (**Abbildung 47 oben**). Daneben wurden bei \sim 32,4 min und \sim 35,9 min zwei Peaks gemessen, die von den Molmassen einem

Dimer und einem Monomer entsprechen. Jedoch eluierten geringere Mengen α A-Kristallin Isoform 2 bereits vor Minute 30, was an der Immunodetektion deutlich wird (**Abbildung 47 unten**). Dies deutet darauf hin, dass neben den Monomeren und Homodimeren auch ein geringer Anteil an größeren Oligomeren in Lösung vorliegt.

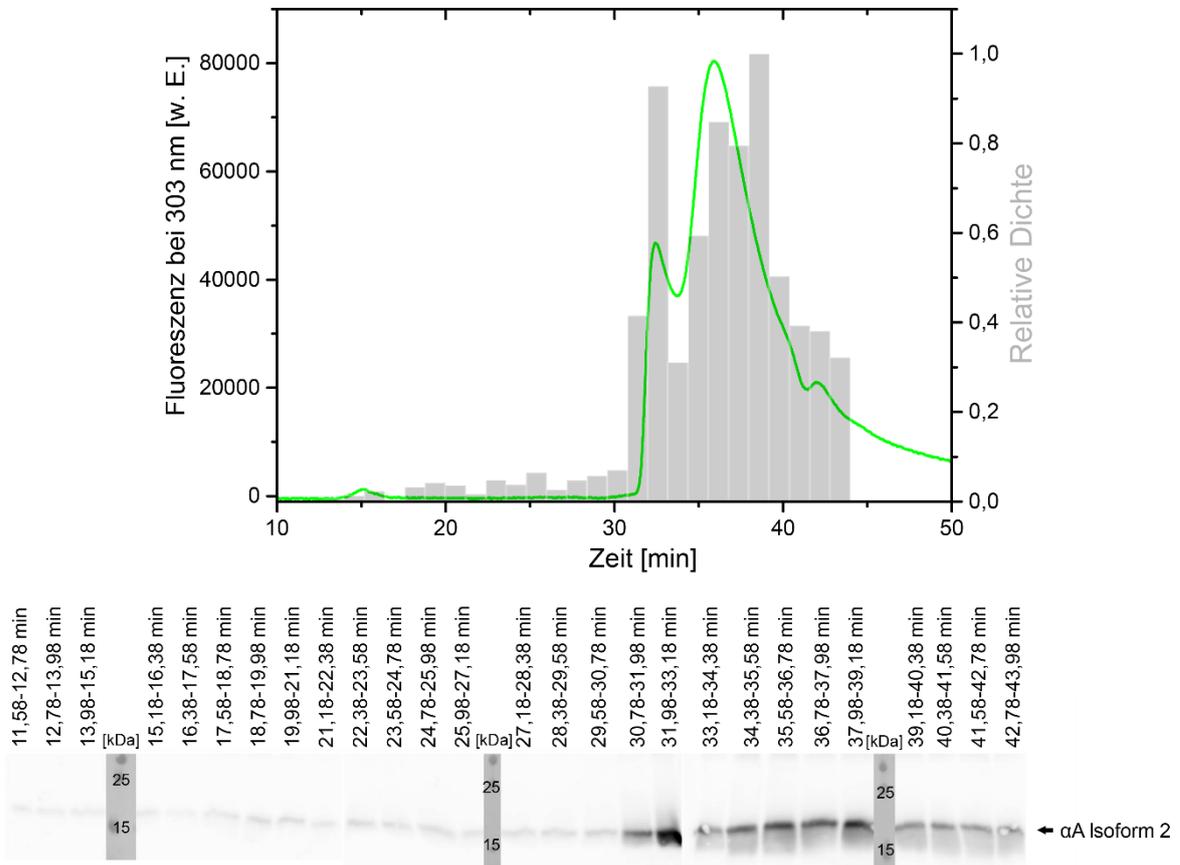


Abbildung 47: α A-Kristallin Isoform 2 bildet hauptsächlich Monomere und Homodimere. Oben zeigt das Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie anhand des Fluoreszenzsignals bei 303 nm (grün) zwei Hauptpeaks. Überlagert ist die relative Dichte (graue Balken) der quantifizierten Banden der Immunodetektion der präzipitierten Fraktionen unten.

Um diese Messungen zu verifizieren wurden analytische Sedimentationsgeschwindigkeitsmessungen durchgeführt. Dazu wurde α A-Kristallin Isoform 2 bei variierenden Konzentrationen gemessen (**Abbildung 48**). Bei niedrigen Konzentrationen wurde besonders eine Spezies mit einem $S_{20,w}$ von $\sim 1,5$ S gemessen. Dies entspricht einem Monomer. Wurde die Konzentration von $3 \mu\text{M}$ auf 5 und $7,7 \mu\text{M}$ erhöht sank das Signal bei $1,5$ S kontinuierlich und es konnte eine Verbreiterung hin zu höheren Svedberg verzeichnet werden. Bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ wurde ein deutlicher Peak bei $\sim 2,1$ S sichtbar der nur noch eine Schulter bei $1,5$ S zeigte. Weitere Steigerung der Konzentration verringerte das Signal bei kleinen Svedberg weiter und es bildete sich bei $20 \mu\text{M}$ ein Peak bei $\sim 2,3$ S, was einem Dimer entspricht. Bei allen untersuchten

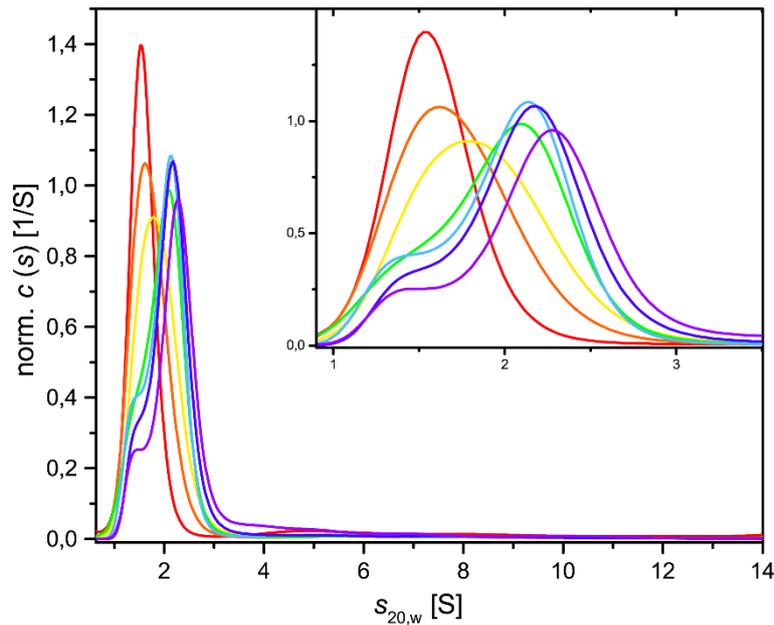


Abbildung 48: α A-Kristallin Isoform 2 bildet ein konzentrationsabhängiges Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren. Die Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse von Isoform 2 wurde bei $3 \mu\text{M}$ (rot), $5 \mu\text{M}$ (orange), $7,5 \mu\text{M}$ (gelb), $10 \mu\text{M}$ (grün), $12,5 \mu\text{M}$ (hellblau), $15 \mu\text{M}$ (dunkelblau) und $20 \mu\text{M}$ (violett) bei 42000 Upm durchgeführt. Die Fläche unter den Kurven ist jeweils auf 1 normiert.

Konzentrationen konnte auch hier ein geringer Anteil an Protein mit höherem $S_{20,w}$ beobachtet werden, was auf Spezies mit höheren Molmassen hindeutet. Folglich liegt α A-Kristallin Isoform 2 in einem konzentrationsabhängigen Monomer-Dimer-Gleichgewicht. Daneben existieren in deutlich geringerem Ausmaß auch Oligomere mit einer höheren Anzahl an Untereinheiten. Der Trend zur Bildung von kleineren Oligomeren durch den Austausch der NTS durch eine kürzere, alternative Version korreliert mit früheren Berichten von α A-Kristallinmutanten, denen die NTS fehlte. Für das α A-Kristallin (64-173) der Ratte wurden vornehmlich Dimere und Tetramere gefunden (Merck *et al.* 1992). Ferner wiesen N-terminal gekürzte Versionen des bovinen α A-Kristallins vorwiegend Tetramere und in geringerem Ausmaß Dimere auf (Eifert *et al.* 2005; Salerno *et al.* 2003). Es wurde gezeigt, dass die Bildung höherer Oligomere sowohl für das bovine Vollängen- α A-Kristallin als auch für die terminal gekürzte Variante (59-163) konzentrationsabhängig ist (Laganowsky *et al.* 2010). Außerdem führt das Entfernen von mehr als 20 Aminosäuren der NTS zu einer drastischen Reduktion der Oligomergröße des humanen α A-Kristallins und eine vollständige Deletion zur Bildung von Tetrameren (Kundu *et al.* 2007). Im Falle von α A-Kristallins Isoform 2 könnte eine weitergehende Reduktion der Komplexgröße durch die bereits erwähnte deutliche Veränderung des Ladungszustands der NTS ausgelöst werden. Der Ladungsunterschied in Kombination mit dem Verlust an N-terminalen α -Helices könnte α A-

Kristallin Isoform 2 daran hindern aus Dimeren Tetramere zu bilden und so die Bildung größerer Komplexe energetisch ungünstig machen.

Auch für α A-Kristallin SV153 wurde versucht über die analytische Größenausschlusschromatographie die apparente Molmasse zu bestimmen. Bereits bei der Reinigung des Proteins wurde deutlich, dass es sich viel eher verhält wie die Isoform 1, bei der nur ein Teil des Proteins an die chromatographischen Säulen gebunden hat. Dies trat bei α A-Kristallin Isoform 2 nicht auf und könnte mit der Oligomergröße zusammenhängen. α A-Kristallin SV153 eluierte mit $\sim 15,5$ min besonders früh von der Säule, was mittels NaDOC/TCA-Fällung und SDS-PAGE bestätigt wurde (**Abbildung 49**). Dies ist im Ausschlussvolumen der Säule, was auf ein sehr großes Oligomer bzw. Aggregat hindeutet. Damit scheint α A-Kristallin SV153 eine grundlegend andere Quartärstruktur zu besitzen als Isoform 2.

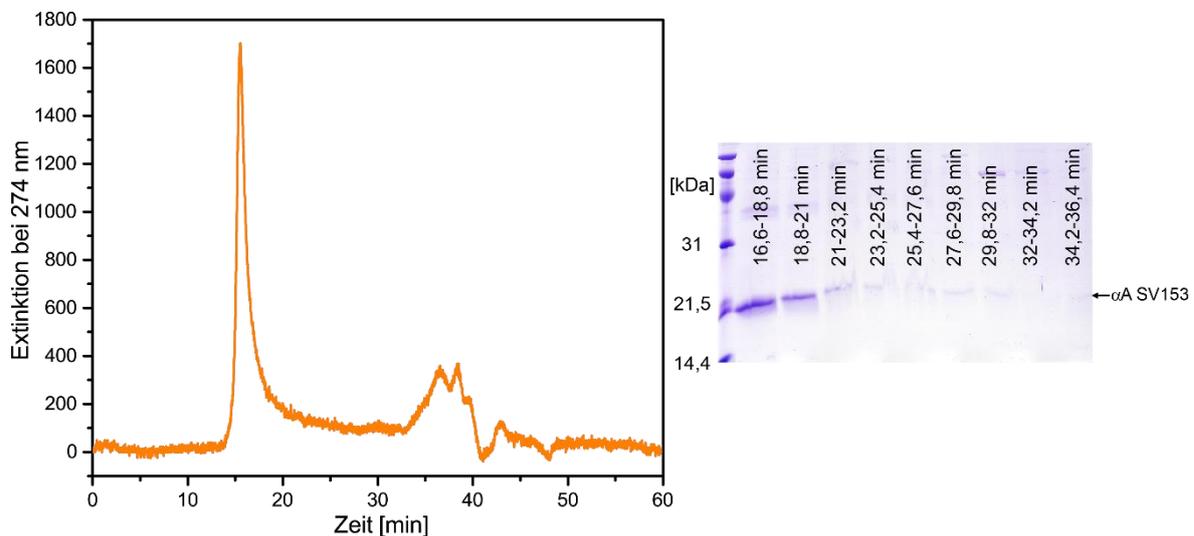


Abbildung 49: α A-Kristallin SV153 bildet sehr große Oligomere. Links ist das Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie anhand der Extinktion bei 274 nm (orange) gezeigt. Rechts ist das SDS-Gel der präzipitierten Elutionsfraktionen aufgezeigt.

5.4.7 Funktionelle Analyse von α A-Kristallin

5.4.7.1 Die Chaperonaktivität von α A-Kristallin Isoform 2

Eine Hauptaufgabe von α -Kristallinen in der Linse ist es die stabile Faltung der hochkonzentrierten Proteine zu bewahren. Diese wird u. a. durch Alterungsprozesse, die zu Modifikationen führen oder Einflüsse von außen, wie energiereiche UV-Strahlung, gefährdet. Homo- und Heterooligomere aus α A- und α B-Kristallin sind in der Lage aggregationsanfällige Proteine zu binden und deren Faltung unabhängig von Cofaktoren zu bewahren. Sie sind *in vitro* im Stande die Aggregation von Modellsubstraten, ausgelöst

durch Reduktionsmittel, hochenergetische Strahlung wie UV-Strahlung und hohe Temperaturen, zu unterbinden (Horwitz 1992, 1993; Jakob *et al.* 1993; Bhattacharyya und Das 1998; Raman *et al.* 1995; Raman und Rao 1994; Reddy *et al.* 2001). Dabei spielt die Größe des Komplexes eine entscheidende Rolle (Haslbeck *et al.* 2016). Folglich stellt sich die Frage, ob α A-Kristallin Isoform 2, das im Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren steht, Chaperonaktivität besitzt. Um dies zu überprüfen wurden Chaperonassays mit Malatdehydrogenase (MDH) und Rhodanase als Modellsubstrate durchgeführt. Bei substöchiometrischen Konzentrationen von Chaperon:Substrat konnte keine Inhibition der Aggregation von MDH (**Abbildung 50 A**) und Rhodanase (**Abbildung 50 B**) verzeichnet werden. Erst bei deutlich höheren Konzentrationen an Chaperon wurde eine Verringerung der Extinktion des Lichts sichtbar (**Abbildung 50 C**), was auf Chaperonaktivität hindeutet. Damit zeigt α A-Kristallin Isoform 2 nur eine äußerst schwache Chaperonaktivität, denn für

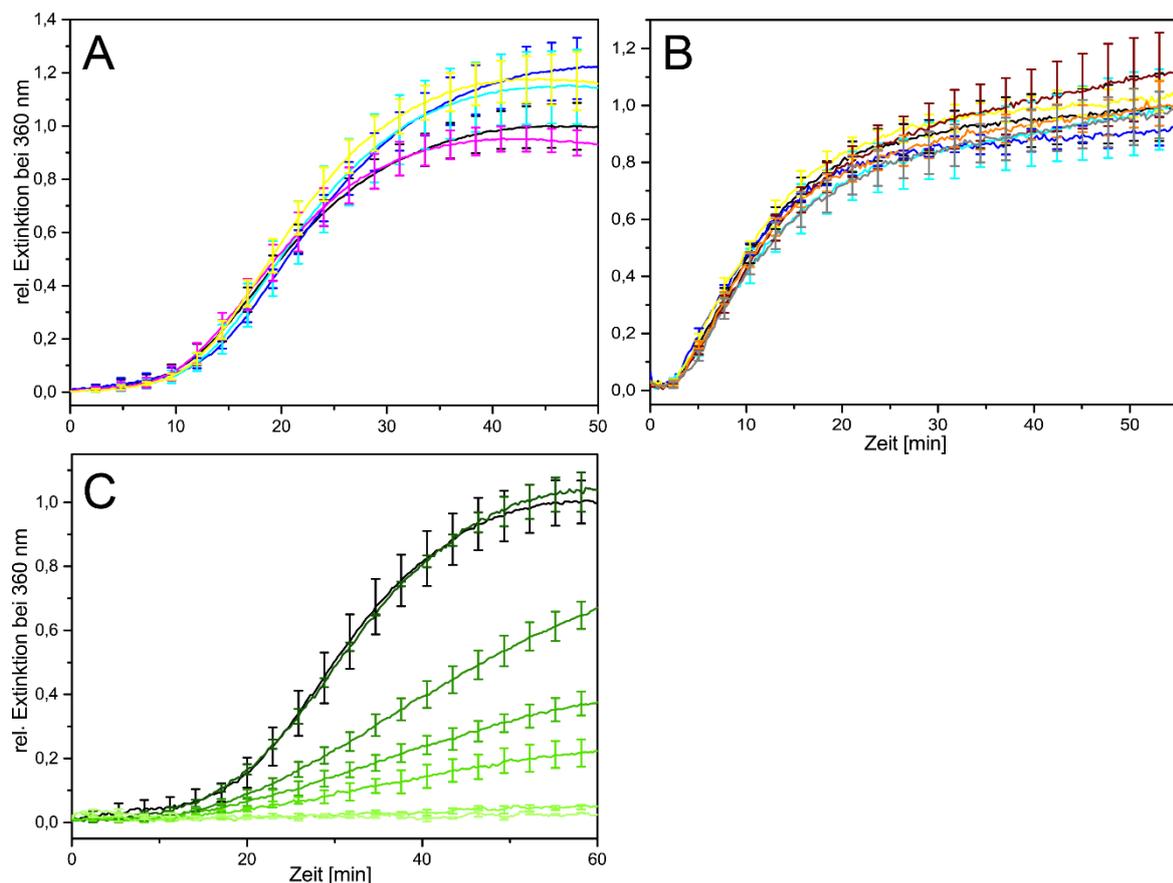


Abbildung 50: α A-Kristallin Isoform 2 hat eine schwache Chaperonaktivität gegenüber thermisch denaturiertem MDH und keine Aktivität gegenüber Rhodanase bei niedrigen Konzentrationen. **A** zeigt MDH-Aggregationsassays mit α A-Kristallin Isoform 2 bei 0 μ M (schwarz), 0,125 μ M (blau), 0,25 μ M (cyan), 0,375 μ M (magenta), 0,5 μ M (gelb). **B** zeigt Rhodanase-Aggregationsassays mit α A-Kristallin Isoform 2 bei 0,125 μ M (blau), 0,25 μ M (cyan), 0,5 μ M (gelb), 0,75 μ M (braun), 1 μ M (orange) und 2 μ M (grau). **C** zeigt MDH-Aggregationsassays mit α A-Kristallin Isoform 2 bei 0, 2, 5, 8, 10, 20 und 40 μ M von schwarz bis hellgrün.

α A- und α B-Kristallin Isoform 1 wurde gezeigt, dass deren protektive Wirkung bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen eine höhere Wirkung hat (Mymrikov *et al.* 2016).

5.4.7.2 Heterooligomerbildung mit den kanonischen Isoformen

Innerhalb der Zelle kommen α -Kristalline als ein heterogenes, polydisperses Ensemble vor (Haslbeck *et al.* 2016). Wie die Bildung von Heterooligomeren im Detail abläuft, ist noch nicht geklärt, doch kann davon ausgegangen werden, dass die Termini eine entscheidende Rolle spielen, da diese auch an der Bildung der hochmolekularen Homooligomeren beteiligt sind (Jehle *et al.* 2011; Delbecq und Klevit 2013; Haslbeck *et al.* 2016). Deshalb wurde untersucht, ob die Veränderungen in der NTS von α A-Kristallin Isoform 2 Auswirkungen auf die Bildung von Heterooligomeren haben. Es wurden äquimolare Mischungen von α A- oder α B-Kristallin Isoform 1 oder beiden Proteinen zusammen mit und ohne α A-Kristallin Isoform 2 bei 37 °C inkubiert, um die Heterooligomerbildung zu ermöglichen. Die Lösungen wurden über die Größenausschlusschromatographie separiert, wobei sich herausstellte, dass α A-Kristallin Isoform 2 tatsächlich eine Wirkung auf die hochmolekularen Komplexe hat (**Abbildung 51 oben**). Die Zugaben der Isoform 2 führte zu einer Verschiebung der Elution der hochmolekularen Oligomere hin zu späteren Zeitpunkten. Dies trat sowohl bei α A-Kristallin Isoform 1 als auch bei α B-Kristallin Isoform 1 und der äquimolaren Mischung beider Kristalline auf. Damit dies möglich ist, muss α A-Kristallin Isoform 2 mit den kanonischen Isoformen interagieren. Die fraktionierten Elutionen wurden über PAGE aufgetrennt und die α -Kristalline durch Färbung sichtbar gemacht (**Abbildung 51 unten**). Dabei wurde deutlich, dass α A-Kristallin Isoform 2, welches alleine hauptsächlich kleine Oligomere bildet und spät eluiert (siehe **5.4.6.2**), nun auch mit einem hohen Anteil zusammen mit den großen Komplexen der kanonischen Isoformen zwischen 18 und 23 min eluiert. Dies deutet auf eine stabile Wechselwirkung zwischen den Spleißvarianten hin. α A-Kristallin Isoform 1, das alleine hauptsächlich in einem Peak entsprechend ~516 kDa eluierte, wurde zusammen mit Isoform 2 in einem Peak, der ~386 kDa entspricht, detektiert. Der gleiche Trend der apparenten Molmassen ist für α B-Kristallin Isoform 1 und die Mischung aus beiden α -Kristallinen sichtbar (**Tabelle 33**). Den größten Einfluss bezüglich Molmassenverschiebung hatte Isoform 2 auf α A-Kristallin Isoform 1 und den schwächsten auf die Mischung beider kanonischer Isoformen. Erstaunlicherweise kann die durch die Peakverschiebung angezeigte Verringerung der apparenten Molmasse jedoch nicht alleine durch die Substitution von Untereinheiten aus α A- und α B-Kristallin Isoform 1 durch die

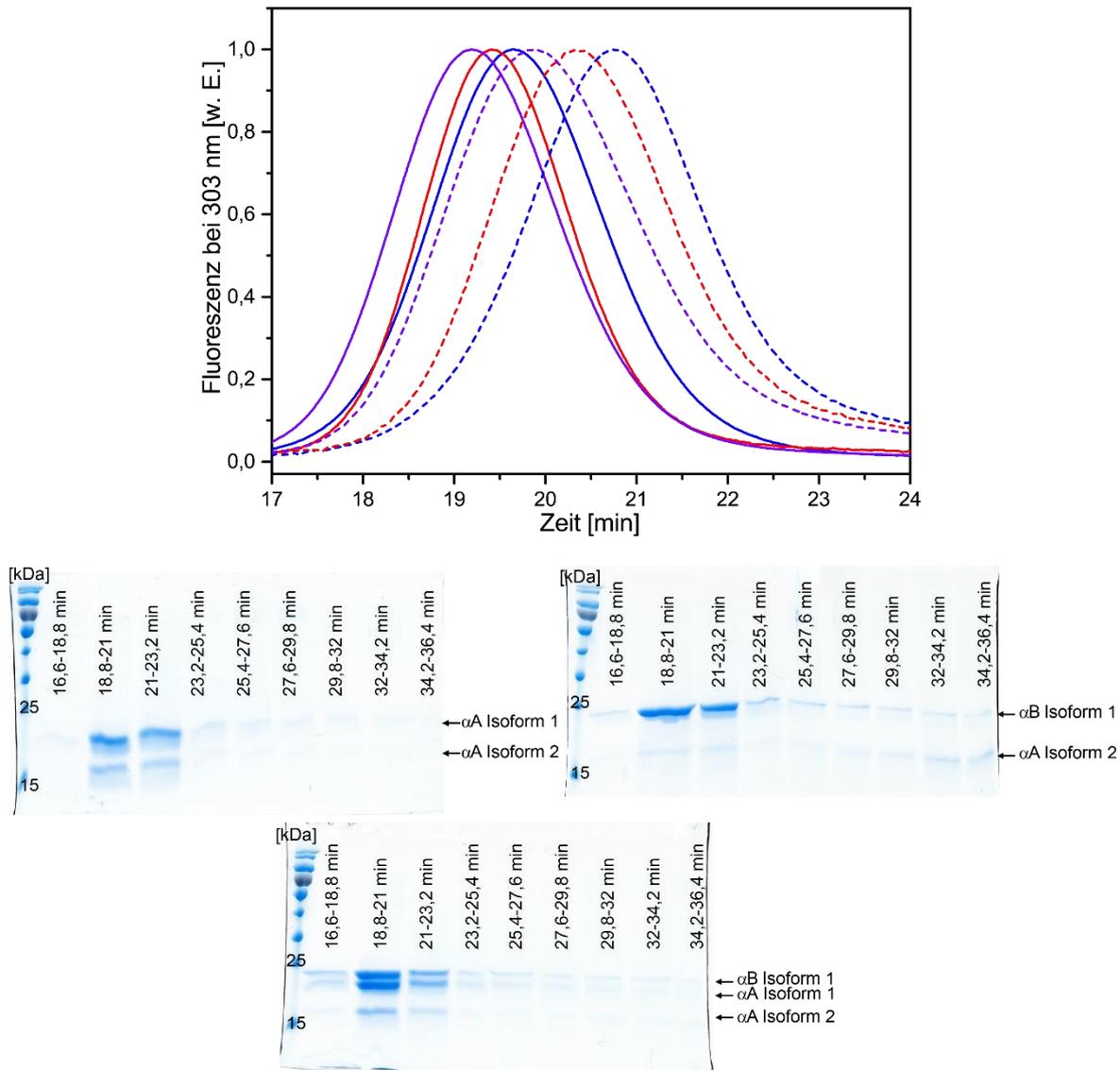


Abbildung 51: α A- und α B-Kristallin Isoform 1 bilden große Heterokomplexe mit α A-Kristallin Isoform 2. Oben ist das Chromatogramm des früh eluierenden Peaks aus der analytischen Größenasusschlusschromatographie von α A-Kristallin Isoform 1 (blaue), α B-Kristallin Isoform 1 (rot) und der äquimolaren Mischung aus α A- und α B-Kristallin Isoform 1 (violett) gezeigt. Die entsprechenden äquimolaren Mischungen mit α A-Kristallin Isoform 2 sind gestrichelt. Unten sind die dazugehörigen SDS-Gele der präzipitierten Elutionsfraktionen dargestellt.

kürzere α A-Kristallin Isoform 2 erklärt werden. Der Anteil an Isoform 2 in den Heterooligomerpeaks zwischen 18 und 23 min ist nämlich verhältnismäßig gering. Bei stabil bleibender Zahl an Untereinheiten im großen Komplex von etwa 24 müsste Isoform 2, die eine um ~23 % zu α A- und ~24 % zu α B-Kristallin Isoform 1 geringere Monomer-Molmasse besitzt, einen Großteil des Komplexes ausmachen, um rechnerisch die Verschiebung der apparenten Molmasse zu verursachen. Dies ist in den Gelen nicht ersichtlich. Folglich führt die Bindung von α A-Kristallin Isoform 2 zu einer Verringerung der Zahl an Untereinheiten im hochmolekularen Komplex.

Der Effekt der Verringerung der apparenten Molmasse durch α A-Kristallin Isoform 2 sollte mittels SEC-MALS (*multianlgel light scattering*) überprüft werden. Mischungen mit und ohne Isoform 2 wurden über die Größenausschlusschromatographie aufgetrennt und die Elution über die Änderung des Brechungsindex und über das MALS-Signal beobachtet. Daraus konnten die Molmassen der eluierenden Komplexe errechnet werden (**Abbildung 52**). Auch hier führt die Zugabe von α A-Kristallin Isoform 2 zu den kanonischen Isoformen zu einer späteren Elution von der Säule. Dies ist besonders ausgeprägt für α A-Kristallin Isoform 1 (**Abbildung 52 A**). Eine geringere Peakverschiebung ist bei α B-Kristallin Isoform 1 gegeben. Die Mischung beider kanonischer Isoformen zeigt die kleinste Verschiebung (**Abbildung 52 B und C**). Dies ist ebenfalls an den aufgetragenen Molmassen (**Abbildung 52**) und dem gewichteten Durchschnitt der Molmassen M_w (**Tabelle 33**) zu erkennen. Die Molmassen, die sich aus SEC und MALS ergeben, unterscheiden sich, was möglicherweise

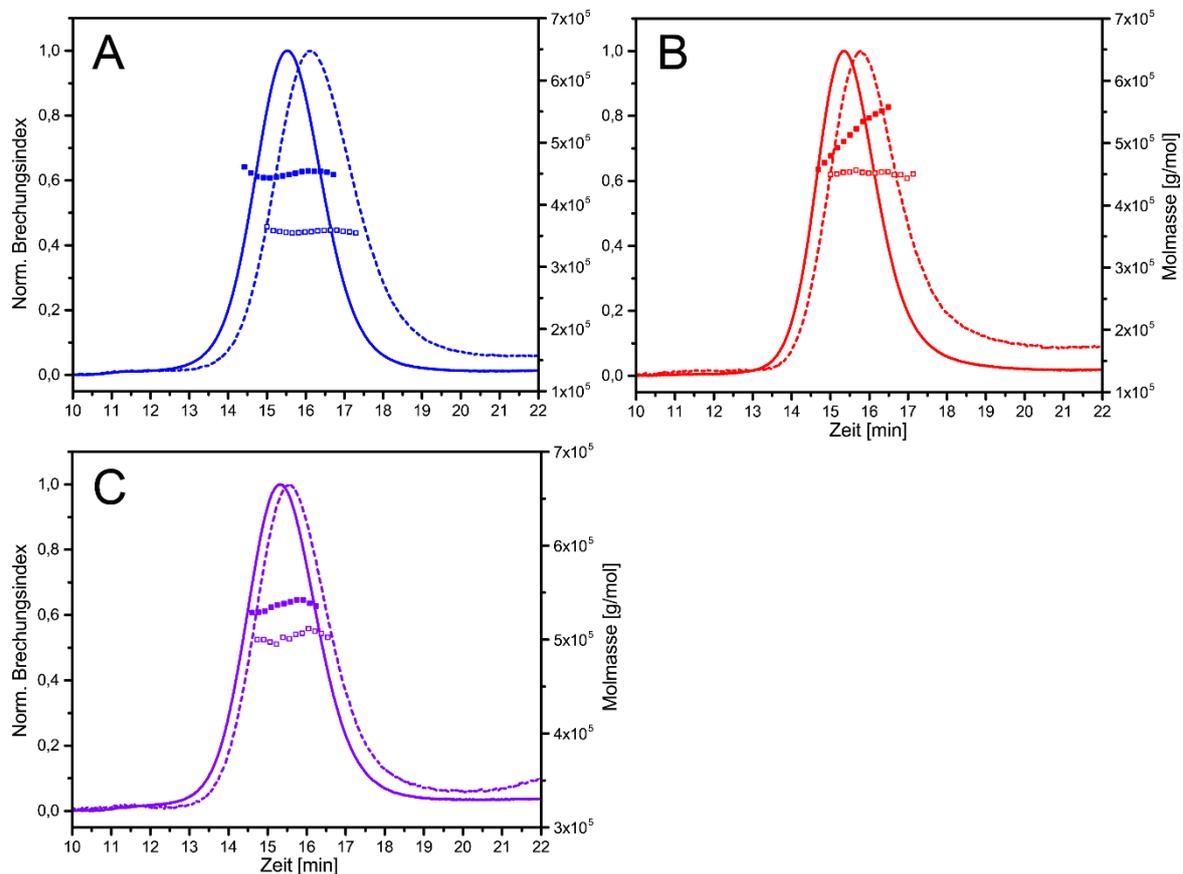


Abbildung 52: α A-Kristallin Isoform 2 bindet an die großen Oligomerkomplexe der α -Kristalline und verringert dabei ihre Molmasse. Gezeigt sind die SEC-MALS Messungen von α A-Kristallin Isoform 1 (A, blau), α B-Kristallin Isoform 1 (B, rot) und einer äquimolaren Mischung von α A- und α B-Kristallin Isoform 1 (C, violett) ohne (durchgezogene Linie) und mit (gestrichelte Linie) α A-Kristallin Isoform 2 anhand des normalisierten differentiellen Brechungsindex (dRI). Die entsprechenden äquimolaren Mischungen mit α A-Kristallin Isoform 2 sind gestrichelt. Die durch MALS berechnete apparente Molmasse ist angezeigt durch gefüllte (ohne α A-Kristallin Isoform 2) und leere (mit α A-Kristallin Isoform 2) Quadrate.

auf variierende Inkubationen bzw. Lauflängen zwischen den verschiedenen SEC- und MALS-Säulen oder auf die sehr unterschiedlichen Arten der Molmassenbestimmung zurückzuführen ist. Dennoch wurde über beide Methoden eine deutliche Verschiebung der Molmassen der kanonischen Isoformen gezeigt.

Tabelle 33: α A-Kristallin Isoform 2 verringert die Oligomergröße der α -Kristalline. Angegeben ist die berechnete apparente Molmasse und Anzahl der Untereinheiten in einem Komplex gemäß der analytischen Größenausschlusschromatographie und den MALS-Berechnungen.

Proteine	Apparente Molmasse (Anzahl Untereinheiten)	Apparente Molmasse M_w (Anzahl Untereinheiten)
	nach SEC	nach SEC-MALS
α A Iso 1	516 kDa (~26)	458 kDa (~23)
α A Iso 1 + 2	386 kDa	365 kDa
α B Iso 1	547 kDa (~27)	512 kDa (~25)
α B Iso 1 + α A Iso 2	431 kDa	461 kDa
α A Iso 1 + α B Iso 1	579 kDa	545 kDa
α A Iso 1 + α B Iso 1 + α A Iso 2	489 kDa	523 kDa

5.4.7.3 Einfluss auf die Chaperonaktivität der kanonischen Isoformen

Die Chaperonaktivität der α -Kristalline ist abhängig von der Oligomergröße, die u. a. abhängig ist von PTM (Peschek *et al.* 2013; Haslbeck *et al.* 2016). Möglich ist, dass insbesondere kleinere Untereinheiten aus Dimeren für die Bindung der Substrate verantwortlich sind, doch ist eine exakte Aussage über die aktive Spezies gegenwärtig nicht möglich (Smirnova *et al.* 2013; Haslbeck *et al.* 2016). α A-Kristallin Isoform 2 hat selbst kaum Chaperonaktivität, bindet jedoch an Oligomere aus α A- und α B-Kristallin Isoform 1. Es führt zu Komplexen mit sowohl kleinerer Molmasse als auch geringerer Zahl an Untereinheiten. Demzufolge musste geklärt werden, ob α A-Kristallin Isoform 2 ebenfalls eine modulierende Wirkung auf die Chaperonaktivität der kanonischen Isoformen zeigt. Ansätze bestehend aus α A-Kristallin Isoform 1 oder α B-Kristallin Isoform 1 oder beiden α -Kristallinen in einer äquimolaren Mischung wurden mit und ohne äquimolaren Mengen α A-Kristallin Isoform 2 bei 37 °C vorinkubiert und anschließend in Aggregationsassays mit MDH und Rhodanase eingesetzt. Dabei wurde immer bei Konzentrationen von α A-Kristallin Isoform 2 gemessen, bei denen es alleine keine messbare Aktivität zeigte. Aus diesem Grund kann ein gemessener Effekt auf die Chaperonaktivität direkt auf eine modulierende Wirkung auf die kanonischen Isoformen zurückgeführt werden und resultiert nicht aus der inhärenten Aktivität der Isoform 2. Die Zugabe von α A-Kristallin Isoform 2 führte zu meist

signifikanten Verbesserung der Chaperonaktivität von α A- und α B-Kristallin Isoform 1 auf MDH (**Abbildung 53 A und B**). Auch die aggregationsinhibierende Wirkung der Mischung aus den kanonischen α -Kristallin Isoformen konnte durch die Spleißvariante gesteigert werden (**Abbildung 53 C**). Dieses Verhalten konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wenn Rhodanase als Modellsubstrat eingesetzt wurde (**Abbildung 53 D**). Die Chaperonaktivität der kanonischen Isoformen alleine ist hierbei sehr ähnlich zu Messungen von Mymrikov *et al.* (Mymrikov *et al.* 2016). α A-Kristallin Isoform 2 hat also nicht nur Einfluss auf die Komplexgröße der kanonischen Isoformen, sondern auch einen verstärkenden Einfluss auf die Chaperonaktivität.

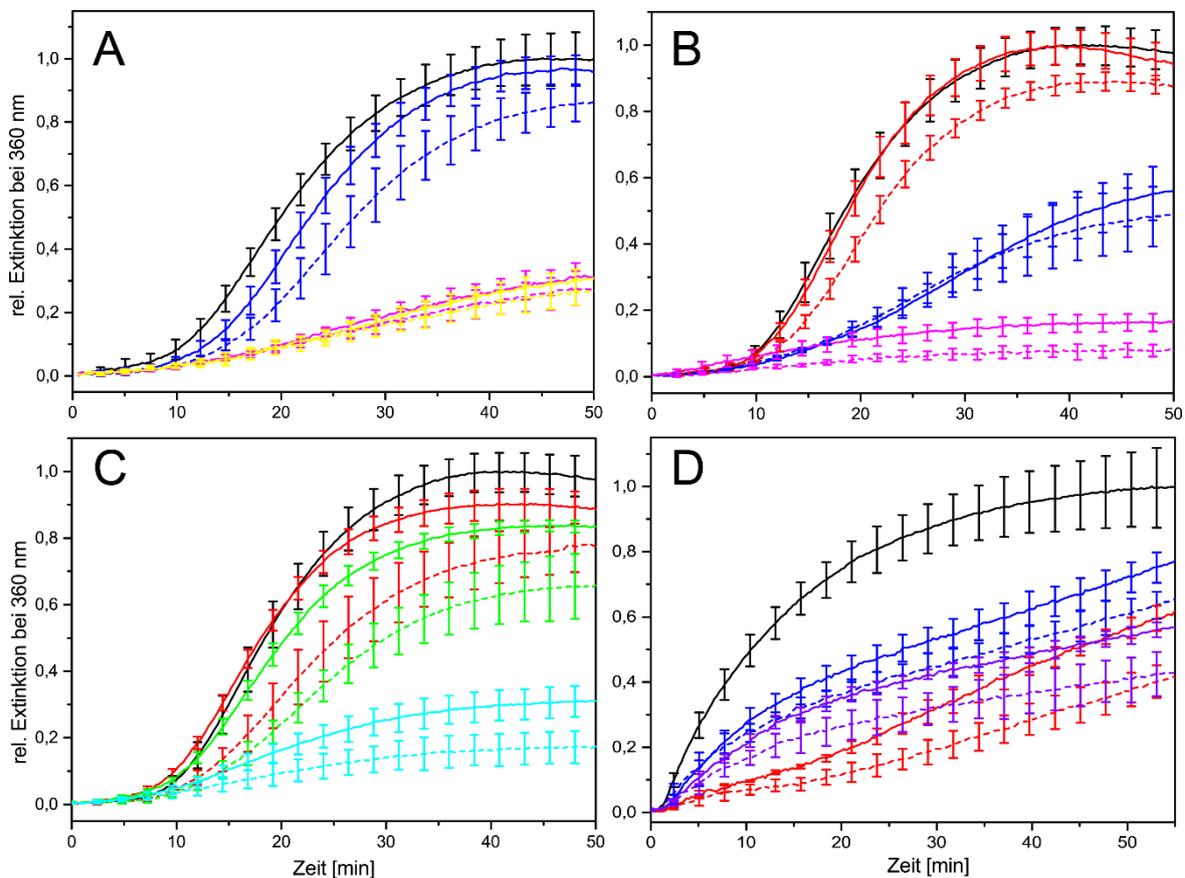


Abbildung 53: α A-Kristallin Isoform 2 hat einen modulierenden Einfluss auf die Chaperonaktivität der kanonischen α -Kristalline. Die Unterdrückung der Aggregation von MDH (**A-C**) und Rhodanase (**D**) als Substrate in der An- (gestrichelte Linie) und Abwesenheit (durchgezogene Linie) von α A-Kristallin Isoform 2 wurde über die relative Extinktion bei 360 nm untersucht. **A** α A-Kristallin Isoform 1 alleine und in äquimolaren Mischungen mit α A-Kristallin Isoform 2 bei 0 μ M (schwarz), 0,125 μ M (blau), 0,375 μ M (magenta) und 0,5 μ M (gelb). **B** α B-Kristallin Isoform 1 und in äquimolaren Mischungen mit α A-Kristallin Isoform 2 bei 0 μ M (schwarz), 0,05 μ M (rot), 0,125 μ M (blau) und 0,375 μ M (magenta). **C** Äquimolare Mischungen von α A- und α B-Kristallin Isoform 1 mit und ohne äquimolaren Zugabe von α A-Kristallin Isoform 2 bei 0 μ M (schwarz), 0,05 μ M (rot), 0,0625 μ M (grün), 0,25 μ M (cyan). **D** α A-Kristallin Isoform 1 (blau), α B-Kristallin (rot) und die äquimolare Mischung von α A- und α B-Kristallin Isoform 1 (violett) bei 0 μ M (schwarz) und jeweils bei 0,25 μ M (blau, rot, violett).

6 Diskussion

Das alternative prä-mRNA-Spleißen ist bei höheren Eukaryoten wie dem Menschen sehr weit verbreitet. Nahezu alle Gene sind davon betroffen (Wang *et al.* 2008; Pan *et al.* 2008). Es kommt jedoch auch in niederen Metazoen, sowie in Fungi (Okazaki 2000; Yatzkan und Yarden 1999; Ebbola *et al.* 2004; Loftus *et al.* 2005) und Protozoen wie *Dictyostelium discoideum* (Escalante *et al.* 2003) vor. Jedoch ist hier der Anteil der alternativ gespleißten Gentranskripte in höheren Eukaryoten höher als z. B. in *D. melanogaster* (Graveley *et al.* 2010) oder *C. elegans* (Gerstein *et al.* 2010; Ramani *et al.* 2011). Auch Wirbeltiere besitzen einen höheren Anteil alternativ gespleißter Proteine als Wirbellose (Artamonova und Gelfand 2007; Alekseyenko *et al.* 2007). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass das alternative Spleißen einen starken Einfluss auf die Diversität des Proteoms und auf die Ausprägung im Phänotyp hat (Nilsen und Graveley 2010). Der Mechanismus und die Regulation des Spleißosoms als protein- und RNA-reiche Maschine, die sich immer von neuem auf einem frisch transkribierten Templat zusammensetzt und es bearbeitet, ist hochkomplex und bedarf weiterer Untersuchung. Um die Auswirkungen des Spleißens nachzuvollziehen, müssen jedoch auch die resultierenden reifen mRNA- und Protein-Isoformen untersucht werden, denn selbst die mRNA könnte dadurch eine neue Funktion, wie z. B. eine Regulation einnehmen. Auf Proteinebene können sowohl interne als auch terminale Deletionen oder Substitutionen auftreten. Dies wurde selbst für konservierte und strukturierte Bereiche gezeigt (Birzele *et al.* 2007).

In dieser Arbeit wurden mehrere alternativ gespleißte Proteine untersucht, wovon sich einige rekombinant als lösliche Proteine exprimieren und reinigen ließen. Die beiden untersuchten Proteinfamilien waren sowohl strukturell als auch funktionell sehr unterschiedlich. Die Sirtuine katalysieren die Abspaltung von Acylgruppen indem so NAD^+ als Cofaktor einsetzen und beeinflussen damit die PTM der verschiedensten Substrate. Hierzu zählen neben Histonen auch viele weitere in den verschiedensten intrazellulären Kompartimenten (**Tabelle 1**). Auf der anderen Seite vermitteln α -Kristalline nicht von selbst die Bildung oder die Spaltung von kovalenten Bindungen. Sie sind Teil eines gewaltigen Netzwerks aus ~1400 Proteinen in der menschlichen Zelle zum Erhalt der Homöostase des Proteoms, der Proteostase (Hartl 2016). Dabei bilden sie gewaltige Komplexe aus, die sehr variabel sind

und untereinander Untereinheiten austauschen. Dies ist zudem abhängig von PTM, wie Phosphorylierungen (Peschek *et al.* 2013). Zudem wird durch Veränderungen der Oligomerisierung und des Ensembles auch die Aktivität der α -Kristalline reguliert (Haslbeck *et al.* 2016).

Von den Sirtuinen wurden verschiedene Isoformen der humanen Proteine Sirt2, Sirt5 und Sirt6 untersucht. Sirt2 besitzt mehrere in UniProt hinterlegte Isoformen. Zur Überprüfung des Vorkommens der Isoformen 1 und 4 (UniProt-Kennung: Q8IXJ6-1 und -4) auf Transkriptebene, wurden RT-PCR-Untersuchungen eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, dass in mehreren Geweben zwar eine Transkriptvariante vorhanden ist, die zu dem veränderten C-terminus von Sirt2 führt, doch hätte dieses Protein auch einen verkürzten N-terminus, analog zu Sirt2 Isoform 2. Die Expression, Reinigung und Charakterisierung, die in der Masterarbeit begonnen wurde (Preis 2013), zeigte, dass Isoform 1 ein lösliches und aktives Protein ist. Isoform 4 hingegen war nicht vollständig löslich und inaktiv.

Gleiches wurde für Sirt5 durchgeführt. Die RT-PCRs von RNA-Isolaten verschiedenster humaner Gewebe zeigten, dass die drei untersuchten Isoformen Isoform 1, 3 und 4 (UniProt-Kennung: Q9NXA8-1, -3 und -4) in allen Geweben vorhanden waren. Wenn man die bereits bekannte Isoform 2 (Matsushita *et al.* 2011) hinzuzählt, sind alle vier in den Datenbanken UniProt, Ensemble und NCBI hinterlegten Transkripte in voller Länge nachweisbar. Die ubiquitäre Verteilung in den hier untersuchten Proben, entspricht dabei anderen Untersuchungen (ProteinAtlas (Uhlen *et al.* 2015) und ProteomicsDB (Wilhelm *et al.* 2014). Die anschließende Expression und Reinigung ergab, dass Isoform 1 ein stabiles Protein ergibt, die beiden anderen Isoformen jedoch instabil sind, wenn sie aus *E. coli* gereinigt werden. Damit zeigte sich, dass obwohl ein Nachweis zumindest auf Transkriptebene möglich ist, alternativ gespleißte Isoformen zur Instabilität und Aggregation neigen.

Desweiteren wurden zwei der neun in der NCBI-Datenbank annotierten Isoformen des humanen Sirt6 untersucht. Das Gen von Sirt6 enthält neun Exons, die in unterschiedlichen Kombinationen zu der Vielfalt an Isoformen führen. Die Expressionsuntersuchungen über RT-PCRs waren vergleichbar Sirt5. In allen Geweben konnten die kanonische Isoform 1 und auch die alternative Isoform 2 (UniProt-Kennung: Q8N6T7-1 und -2) nachgewiesen werden, was auch in anderen Untersuchungen gezeigt wurde (ProteinAtlas (Uhlen *et al.* 2015) und ProteomicsDB Wilhelm *et al.* 2014). Außerdem wurden Analysen der Proteinexpression in COS-7- und HEK293-Zellen über Immunodetektion durchgeführt, die eine Doppelbande andeuteten. Da der Molmassenunterschied der beiden Isoformen nur gering ist (~ 3 kDa), kann dies sowohl durch posttranslationale als auch auf posttranskriptionelle Modifikationen

ausgelöst werden. Datenbankrecherchen erbrachten hochkonservierte Proteine zu Sirt6 Isoform 2 aus fünf unterschiedlichen Primaten, was darauf hindeutet, dass diese insbesondere in den nächsten Verwandten zum Menschen auftreten könnte.

Der Isoform 2 fehlt der größte Teil der α 6-Helix, welche zu der innerhalb der Sirtuine hochkonservierten Rossmann-Faltungs-Domäne gehört. Sie bindet den Cofaktor NAD⁺. Außerdem ist in der Isoform 2 der β 6-Stang, welcher zur zum kleinen Zinkbindemotiv gehört (Pan *et al.* 2011), deletiert. Hier wurde gezeigt, dass, die in der Isoform 2 fehlenden Abschnitte, Strukturen darstellen, die auch in allen anderen humanen Sirtuinen, von denen Strukturinformationen bekannt sind, vorkommen. Die CDS wurden aus den RNA-Isolaten in Expressionsvektoren kloniert und nach Optimierung der Expressions- und Reinigungsbedingungen konnten beide Isoformen als lösliche Proteine erhalten werden. Dazu wurden C-terminal verkürzte Varianten exprimiert und gereinigt, welche zur Kristallisation gedacht waren. Diese war jedoch erfolglos, was daran liegen könnte, dass beide Isoformen zur Aggregation neigen und ideale Bedingungen bei pH, Temperatur und Konzentration von Bindepartnern benötigen. Über massenspektrometrische Peptid-Fingerprint- und Vollängen-Messungen wurde bestätigt, dass es sich um die korrekten Proteine handelte.

Messungen der Proteinfluoreszenz zeigten gleiche Emissionsmaxima aber unterschiedliche Intensitäten, was auf ein deletiertes Tryptophan zurückgeführt werden kann. Interessanterweise sinkt unter denaturierenden Bedingungen das Signal von Isoform 1 ab, während das von Isoform 2 ansteigt. Dies könnte auch durch das fehlende Tryptophan ausgelöst werden, könnte jedoch auch darauf hinweisen, dass Lösungsmittelzugänglichkeit oder allgemein die Umgebung um Tryptophane und Tyrosine sich unterscheiden.

Die Messung der CD-Spektren von Sirt6 Isoform 1 und 2 zuzüglich der verkürzten Varianten, zeigten eine Mischung aus α -helikalen und β -Faltblattstrukturen. Dies ist vergleichbar mit den Kristallstrukturen (Pan *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2013). Da verhältnismäßig nur ein geringer Anteil der Sequenz fehlt, wurden auch nur geringe Änderungen in den Anteilen der Sekundärstrukturelemente verzeichnet. Isoform 2 hat demnach geringfügig weniger antiparallele β -Faltblätter, was durch die Deletionen erklärt werden kann. Dadurch, dass der C-terminus in den Kristallstrukturen jedoch nicht aufgelöst ist, kann keine exakte Aussage über die Änderungen der Sekundärstrukturverhältnisse getroffen werden. Erstaunlicherweise besitzen die verkürzten Varianten im Verhältnis zu den Vollängenproteinen einen um ~7 % erhöhten helikalen und einen geringeren Anteil an antiparallelen β -Faltblätter und β - Schleifen. Daraus lässt sich über die bekannten Strukturen

hinaus schlussfolgern, dass der C-Terminus beider Isoformen insbesondere β -Faltblatt-Charakter aufweist. Im Verhältnis zum Volllängenprotein ist damit der Helix-Anteil in den Kristallstrukturen überrepräsentiert. Damit wurde gezeigt, dass trotz entfernen einer hochkonservierten Region innerhalb von Sirt6, der Anteil der Sekundärstrukturelemente sehr ähnlich ist. Zudem scheint auch die Position der C-terminalen β -Faltblätter erhalten zu bleiben.

Dennoch zeigten Stabilitätsuntersuchungen Unterschiede auf. Dabei wurde für Sirt6 Isoform 1 ein deutlicher thermischer Übergang bei ~ 46 °C gemessen. Isoform 2 hingegen zeigte keinen so ausgeprägten Übergang. Dieser war vielmehr, speziell für das Signal bei 208 nm, ein kontinuierlicher. Besonders die normierten Elliptizitäten bei 218 und 222 nm stiegen erst ab 63 °C an, was zeigt, dass Sirt6 Isoform 2 zum Teil eine höhere Toleranz gegenüber hohen Temperaturen besitzt.

Über HDX-Messungen konnte festgestellt werden, dass die beiden Sirt6 Isoformen in den unterschiedlichen Proteinabschnitten einen generell sehr ähnlichen HD-Austausch aufweisen. Im Abschnitt 292-304 des C-Terminus von Isoform 1 wurde ein sehr hoher Austausch festgestellt. Dieser deutet auf eine hochdynamische Region hin die möglicherweise dafür verantwortlich ist, dass in bekannten Kristallstrukturen von Pan et al. und Jiang et al. das Protein nur bis Position 296 (Jiang *et al.* 2013) bzw. 297 (Pan *et al.* 2011) aufgelöst ist. Zudem weisen auch die C-terminalen 26 Aminosäuren keine Sekundärstruktur auf und weisen nach außen. Dadurch, dass auch Isoform 2 in dem Bereich eine nahezu identische Deuteriumaufnahme zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass auch hier die konformationelle Dynamik und auch die Lösungsmittelzugänglichkeit hoch ist. Deutliche Unterschiede traten in den Regionen 47-73 und 237-256, wobei erstere benachbart ist, zu dem Abschnitt der in Isoform 2 fehlt. Beide Regionen gehören zur Rossmann-Faltungsdomäne und wiesen in Isoform 1 eine höhere Deuteriumaufnahme auf. Dies spricht für eine durch das Spleißen veränderte Zugänglichkeit bzw. Dynamik der Rossmann-Faltungs-Domäne. Praktisch das gesamte Zinkbindemotiv wies in Isoform 2 einen anderen HD-Austausch auf als in Isoform 1. Begründen lässt sich dies mit dem Fehlen eines Teils dieses Motivs. Zudem müsste durch das Spleißen das Zinkbindemotiv eine stark veränderte Position zur größeren Rossmann-Faltungs-Domäne einnehmen, wodurch zusätzlich die Bindung des Zentralteilchens beeinflusst werden würde. Außerdem könnte der erhöhte HD-Austausch von Sirt6 Isoform 2 in diesem Bereich andeuten, dass dieses kein Zinkion mehr komplexiert und deshalb eine höhere Flexibilität aufweist.

Das in Sirtuinen konservierte Zinkbindemotiv komplexiert über die vier Cysteine in Sirt6 ein zweiwertiges Zinkion (Feldman *et al.* 2012; Bheda *et al.* 2016; Pan *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2013). Über Nativ MS-Messungen wurden die genauen Molmassen von Sirt6 Isoform 1 und 2 bestimmt. Für Isoform 1 wurden 39182 Da gemessen. Die Differenz zur theoretischen Molmasse 39118,87 Da kann gut durch die Bindung von Zn^{2+} (65,38 g/mol Meija *et al.* 2016) erklärt werden. Für Isoform 2 war keine derartige Differenz messbar, was darauf schließen lässt, dass es kein Zink mehr gebunden hatte. Dies kann durch das Fehlen des β 6-Stangs erklärt werden, der Teil der Zinkbindedomäne ist. Zudem müsste durch die restliche Deletion, die kleine Zinkbindedomäne ihre Position relativ zur Rossmann-Faltung-Domäne deutlich ändern, was die koordinieren Cysteine räumlich voneinander trennen und so die Komplexierung verhindert könnte. Um zu überprüfen, ob die Sirt6-Isoformen noch in der Lage sind Peptid (mit und ohne myristoyliertem Lysin) oder NAD^+ zu binden, wurden Stabilitätsmessungen nach Zahng *et al.* (Zhang *et al.* 2016) durchgeführt. Dadurch konnte eindeutig gezeigt werden, dass sowohl Isoform 1 als auch Isoform 2 durch H3K9Myr stabilisiert werden und folglich das Substratpeptid binden. Dies ist erstaunlich, denn die Substratbindestelle befindet sich in Nachbarschaft zu dem Abschnitt, der in Isoform 2 deletiert ist. Leucin 184 ist Teil der hydrophoben Tasche, die zur Bindung von langen hydrophoben Acylresten wie Myristoyl eingesetzt wird, fehlt jedoch in Isoform 2 (Jiang *et al.* 2013). Auch die Sequenz WEDSL fehlt hier, ist jedoch an der Substratbindung beteiligt (Pan *et al.* 2011). Da jedoch die meisten dafür notwendigen Bindestellen vorhanden sind, scheint Isoform 2 weiterhin H3K9Myr binden zu können und von der nicht-myristoylierten Variante unterscheiden zu können. Zusätzlich wurde die Bindung von NAD^+ an Sirt6 Isoform 1 über Nativ-MS gezeigt. Damit wurde auch bestätigt, dass Sirt6 als einziges humanes Sirtuin in der Lage ist seinen Cofaktor ohne Substratpeptid oder -Protein zu binden (Pan *et al.* 2011). Für Isoform 2 konnten keine auswertbaren Spektren erhalten werden.

Durch die Demyristoylierungsaktivität von Sirt6 werden an den Lysinen 19 und 20 von $TNF-\alpha$ die Myristoylgruppen entfernt, was es dem Zytokin ermöglicht, sekretiert zu werden (Jiang *et al.* 2013). Auch weitere Studien zeigen mit myristoylierten, aber auch anders modifizierten Substraten (Feldman *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2016). Es wurden *in vitro* Messungen der Demyristoylierungsaktivität angestellt. Dabei trat eine inhibierbare Aktivität für Sirt6 Isoform 1, jedoch nicht Isoform 2, auf. Isoform 2 zeigte unter keinen Bedingungen eine enzymatische Aktivität. Das Zinkion das Sirtuine koordinieren ist zwar nicht wie bei Klasse I, II und IV HDAC an der Reaktion beteiligt (Sauve und Youn 2012), könnte jedoch wichtige strukturelle Eigenschaften vermitteln. Fehlt das Zink wie bei Isoform 2, könnte das

Protein nicht mehr in der Lage sein, die Übertragung der Acylgruppe auf die Ribose des NAD^+ zu katalysieren, obwohl es das Substratpeptid noch binden kann. Eine mögliche Rolle für Sirt6 Isoform 2 könnte innerhalb der Zelle sein, die Aktivität der Isoform 1 zu regulieren, indem es acylierte Gruppen durch Bindung abschirmt. Die Messung der Mischung von beiden Isoformen zeigte zwar nur eine leichte Verringerung der Aktivität, doch war hier das Substrat im Überschuss, sodass Isoform 1 genügend freie Angriffsstellen hatte und Isoform 2 dessen Aktivität nicht inhibieren konnte.

Alternative Isoformen von sHsps finden bereits früh Erwähnung (Kappé *et al.* 2002a), doch wurden diese bis heute nicht ausreichend untersucht. Im Gegensatz zu Sirt6 setzen sich die humanen α -Kristalline jeweils nur aus drei Exons zusammen. In Nagetieren und einigen weiteren Säugetieren wurde gezeigt, dass auch eine Variante mit zusätzlichem Exon zwischen Exon 1 und 2 vorkommt. Sie wird $\alpha\text{A}^{\text{ins}}$ -Variante von αA -Kristallin genannt (Cohen *et al.* 1978a; Cohen *et al.* 1978b; Jong *et al.* 1980; Hendriks *et al.* 1988). Dieses Exon scheint für den Menschen evolutionär gesehen nicht vorteilhaft gewesen zu sein, weshalb es nur noch als Pseudoexon gefunden wurde (Jaworski und Piatigorsky 1989). Exon 1 von αA - bzw. αB -Kristallin entspringt interessanterweise exakt der NTS von der ersten 63 bzw. 65 Aminosäuren. Exon 4 und etwa die Hälfte von Exon 5 bilden die ACD. Die CTS wird durch den Rest von Exon 5 gebildet. Es wurden drei Transkriptvarianten für CRYAA gefunden, die sich erstaunlicherweise nur im ersten Exon unterscheiden. Exon 1 kann nämlich durch Exon 2 oder Exon 3 substituiert werden. Daraus resultieren die Isoformen SV153 und Isoform 2 mit verschiedenen NTS, die bereits angeführt, jedoch nicht untersucht wurden (Graw 2009). Durch RT-PCR konnte das Transkript das αA -Kristallin Isoform 2 entspricht nachgewiesen werden, während SV153 unter den getesteten Bedingungen keine detektierbare Bande aufwies. Dennoch konnten in einigen Primaten für beide Isoformen sehr ähnliche vorhergesagte Proteine identifiziert werden. Auch für αB -Kristallin wurden drei Transkriptvarianten als kodierend vorhergesagt. αB -Kristallin Isoform 2 stellt dabei jedoch eine einfache Deletion der NTS dar und diese ist bereits beschrieben (Peschek *et al.* 2013). SV155 hingegen ist kürzer als die kanonische Isoform und variiert in der Aminosäuresequenz ab etwa der Mitte der ACD. Sowohl Isoform 1, als auch SV155, konnten in nahezu allen Gewebeproben nachgewiesen werden, was breiten Expression von αB -Kristallin entspricht (Bhat und Nagineni 1989; Dubin *et al.* 1989; Iwaki *et al.* 1989; Iwaki *et al.* 1990; Kato *et al.* 1991b). Im Rhesusaffen, sowie im Neunbinden-Gürteltier sind ähnliche Proteine wie SV155 vorhergesagt. Sowohl die beiden αA -Kristallin Isoformen

Isoform 2 und SV153, als auch SV155, zeigen keine hohe Konservierung in den substituierten Bereichen zu den anderen humanen sHsps. Dies könnte darauf hindeuten, dass sie evolutionär gesehen, aussortiert wurden, da kein vorteilhafter Effekt entstand. Andererseits ist es auch möglich, dass sie dadurch andere Strukturen oder Funktionen als die kanonische Isoformen einnehmen können. Interessanterweise haben Kriehuber *et al.* herausgefunden, dass bei den sHsps die konservierte ACD und die variablen NTS und CTS evolutionär gesehen, unabhängig voneinander entwickelt haben (Kriehuber *et al.* 2010). Es könnte sein, dass auch das alternative Spleißen zur Entwicklung der NTS und CTS beigetragen haben indem mehrere Varianten ausprobiert wurden und weniger förderliche wieder verworfen wurden.

Die Hydrophobizität in der NTS, von der angenommen wird, dass sie wichtig ist für die Bindung von Substraten (Haslbeck *et al.* 2016; Haslbeck *et al.* 2005), ändert sich in den Spleißvarianten von α A-Kristallin nicht deutlich. Lediglich durch die Verkürzung werden Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten entfernt. Andererseits ändern sich die Ladungen deutlich. α A-Kristallin Isoform 2 und noch stärker SV153, haben verhältnismäßig deutlich mehr positive als negative Ladungen und das obwohl die NTS kürzer sind. Dadurch besitzen beide Spleißvarianten auch deutlich höhere theoretische pIs als Isoform 1.

α A-Kristallin Isoform 1 und 2 konnten in größeren Mengen löslich aufgereinigt und per MS-Untersuchungen bestätigt werden, während SV153 in geringeren Mengen und schlechterer Reinheit erhalten wurde. Da α A-Kristallin Isoform 2 das einzige Tryptophan, das die Isoform 1 in der NTS besitzt, fehlt, konnte nur die Tyrosinfluoreszenz gemessen werden, welche keinen direkten Vergleich zur Isoform 1 erlaubt. Ausgehend von den CD-Spektren besitzen α A-Kristallin Isoform 1 und 2, sowie α B-Kristallin Isoform 1 sehr ähnliche Anteile an Sekundärstrukturelementen. Ein hoher Anteil an β -Faltblattstrukturen wurde bereits für α A- (Merck *et al.* 1993; Kundu *et al.* 2007; Bova *et al.* 2000; Laganowsky und Eisenberg 2010) und α B-Kristallin (Bagneris *et al.* 2009; Braun *et al.* 2011; Jehle *et al.* 2011) gezeigt (Laganowsky *et al.* 2010). Dies verdeutlicht, dass auch diese Spleißvariante eine mit der kanonischen Isoform vergleichbare Struktur aufweist. Hier könnte der Grund die extrem hohe Stabilität der ACD sein, die den größten Teil des Proteins ausmacht. Isoform 2 zeichnete sich durch einen höheren Anteil an antiparallelem β -Faltblatt und geringfügig weniger Helixanteil im Vergleich zu beiden kanonischen Isoformen aus. Es ist noch unklar, welche Strukturen die NTS von α A-Kristallin Isoform 1 aufweist, doch wurden für das homologe α B-Kristallin Isoform 1, mehrere helikale und nur wenige β -Faltblatt-Strukturen beschrieben (Braun *et al.* 2011; Jehle *et al.* 2011). Sollte α A-Kristallin sich gleich verhalten,

wäre in der Isoform 2 durch die kürzere Länge der NTS auch weniger Platz für insbesondere helikale Strukturen. Dadurch wären die β -Faltblatt-Anteile, die vornehmlich aus der ACD stammen, wie in den CD-Messungen bei der Isoform 2, höher als bei Isoform 1. Die Sekundärstrukturvorhersagen, die für alle drei α A-Isoformen erstellt wurden, zeigen ausschließlich Helices in der NTS und das obwohl die Sequenzen keinerlei Ähnlichkeit aufzeigen. Dies könnte durch die Vorhersagemethoden, anhand von Homologien bzw. *threading* entstehen, da die kompletten Sequenzen zur Vorhersage eingesetzt wurden. Diese sind also kritisch zu sehen. Dennoch bestätigt dies die Annahme aus den CD-Spektren, dass in der NTS von Isoform 1 und auch wenn auch in schwächerem Ausmaß, in Isoform 2 besonders Helices vorherrschen. Zudem wurden Phyre und I-TASSER auch zu Modellierung von α B-Kristallin eingesetzt (Braun *et al.* 2011).

Die Quartärstruktur von α A-Kristallin Isoform 2 und SV153 wurde über Größenausschlusschromatographie und von Isoform 2 zusätzlich über analytische Ultrazentrifugation untersucht. Sie zeigen ein grundverschiedenes Verhalten. Isoform 2 ist in einem konzentrationsabhängigen Gleichgewicht zwischen Monomeren und Homodimeren. SV153 dagegen war extrem groß, da es im Ausschlussvolumen der Säule war, könnte jedoch auch während des Laufes aggregiert sein. Jedoch wurde Protein von der Säule eluiert, was gegen eine Aggregation in zu große Komplexe spricht. α A-Kristallin bildet große polydisperse Oligomere mit etwa 24 Untereinheiten und nur geringe Mengen kleinere Spezies (Peschek *et al.* 2009). Dies ist jedoch temperaturabhängig (Skouri-Panet *et al.* 2012). Damit unterscheidet sich besonders α A-Kristallin Isoform 2 von der kanonischen Isoform. Die NTS ist jedoch entscheidend für die Bildung der höheren Oligomere verantwortlich (Eifert *et al.* 2005). Wird die NTS deletiert, entstehen Dimere und Tetramere im α A-Kristallin der Ratte (Merck *et al.* 1992). Rinder- α A-Kristallin ohne NTS wurde vornehmlich als Tetramer mit geringem Anteil an Dimeren gefunden (Eifert *et al.* 2005; Salerno *et al.* 2003). Hinzu kommt, dass die Bildung höherer Oligomere sowohl für das Volllängenprotein, als auch für einige gekürzte Varianten, konzentrationsabhängig ist (Laganowsky *et al.* 2010). Entfernen von mehr als 20 Aminosäuren der NTS reduziert die Oligomergroße von humanem α A-Kristallin drastisch und vollständige Deletion der NTS führt zu Tetrameren (Kundu *et al.* 2007). Im Falle von α A-Kristallin Isoform 2, könnte die weitere Reduktion der Oligomergroße durch die deutliche Ladungsänderung im N-Terminus erklärt werden. Möglicherweise führt dies zu intermolekularen Abstoßungen, sodass sich das zunächst durch Interaktionen der β 6-7 Stränge von zwei Protomeren auszubildende Dimer weniger gut bildet (Laganowsky *et al.* 2010; Jehle *et al.* 2010; Jehle *et al.* 2009).

Dagegen spricht jedoch, dass SV153 extrem große Komplexe bzw. Aggregate zu bilden scheint und noch mehr positive Ladungen in der NTS trägt. Möglicherweise sind die Positionen der Ladungen ausschlaggebend oder die Sekundär- und Tertiärstrukturen beider alternativer Isoformen unterscheiden sich und beeinflussen die Komplexgröße. Dennoch zeigten die Messungen, dass Isoform 2 Komplexe mit den beiden kanonischen α -Kristallin-Isoformen eingehen kann und diese sogar verkleinert. Damit hat Isoform 2 eine modulierende Funktion. Wie dies genau abläuft bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Fest steht jedoch, dass dies die Komplexität und Polydispersität von Mischungen verschiedener α -Kristallin-Isoformen oder sogar weiterer sHsps, erhöht (**Abbildung 54**). Zu den PTM, die die Oligomergröße beeinflussen (Peschek *et al.* 2013), kommen somit auch co- und posttranskriptionelle Modifikationen hinzu.

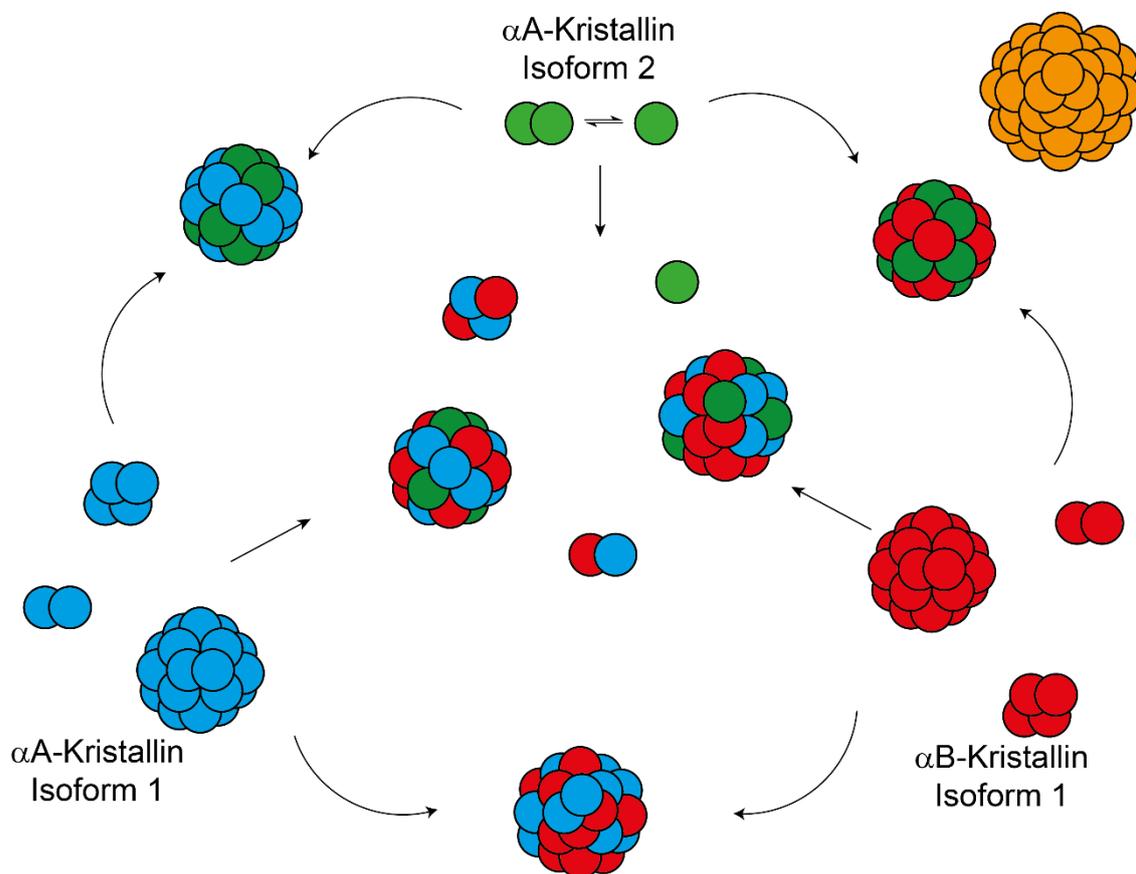


Abbildung 54: Die zwei Isoformen α A-Kristallin Isoform 1 und 2 bilden zusammen mit α B-Kristallin Isoform 1 ein komplexes polydisperses Gemisch aus oligomeren Zuständen. α A-Kristallin Isoform 2 (grün) ist in einem konzentrationsabhängigen Gleichgewicht zwischen Mono- und Dimeren. Es verringert die durchschnittliche Komplexgröße von α A- (blau) und α B- (rot) Kristallin Isoform 1, welche zusammen einen größeren Komplex als alleine bilden. Die Mischung der drei Kristalline (mitte) zeigt eine heterogene Komplexverteilung, in der Untereinheiten ausgetauscht werden können. α A-Kristallin SV153 (orange) bildet extrem große Oligomere bzw. Aggregate.

Bezüglich der Chaperonaktivität zeigte Isoform 2 eine deutlich schlechtere Aktivität als α A- und α B-Kristallin Isoform 1. Dies war sowohl mit MDH als auch mit Rhodanase deutlich und war mit MDH erst bei einem molaren Überschuss an Chaperon erkennbar. Auch N- und C-terminal gekürzte Varianten (59-163) von bovinem α A-Kristallin zeigten einen Verlust der Aggregationsinhibition gegenüber Verschiedenen Substraten (Laganowsky *et al.* 2010). Gleiches gilt für humanes α A-Kristallin, dem die ersten 50 Aminosäuren deletiert wurden (Kundu *et al.* 2007). Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass der N-terminus neben anderen Bereichen auch an der Erkennung und Bindung von Substraten beteiligt sein kann (Haslbeck *et al.* 2016). Beispielsweise wurde über die Bindung des hydrophoben Fluorophors bis-ANS, die Sequenz QSLFR als Substratbindestelle vorgeschlagen. Die Bindung findet nämlich weniger stark in Anwesenheit von denaturierter Alkoholdehydrogenase (ADH) statt (Sharma 1998). Auch weitere potentielle Bindestellen, die teils nahe an der NTS liegen, wie z. B. die Sequenz HFSPEDLTVK (79-88) und die Positionen 70-88, wurden postuliert (Sharma 1998; Santhoshkumar *et al.* 2016). Diese sind entweder in Isoform 2 nicht mehr vorhanden oder weisen möglicherweise durch eine anderen NTS eine Umgebung auf, die die Bindung verschlechtert. Neben der Modulation der Oligomergröße, zeigte Isoform 2 auch einen aktivierenden Einfluss auf die Chaperonaktivität beider kanonischer α -Kristalline und deren äquimolarer Mischung. Diese Aussage kann getroffen werden, da α A-Kristallin Isoform 2, bei den in Mischungen gemessenen Konzentrationen, keine eigene Inhibition der Substrataggregation zeigt. Trotzdem war ein schwacher aber verstärkender Effekt zu messen. Dies könnte mit der geringeren Oligomergröße zusammenhängen. Ein ähnlicher modulierender Effekt ist für HSPB1 und HSPB6 bekannt (Heirbaut *et al.* 2016). Möglich ist zudem, dass besonders kleinere Oligomere die Substrate binden und so wichtig für die Chaperonaktivität sind (Haslbeck *et al.* 2016). Durch ein Verschieben des Ensembles, hin zu kleinere Komplexen könnte eine effektivere Substratbindung ermöglicht werden. Auch könnte durch α A-Kristallin Isoform 2, das selbst nur bei höheren Konzentrationen Dimere bildet, der Zusammenhalt der großen Oligomere verringert werden, wodurch die Abspaltung und der Austausch von Untereinheiten erleichtert wird und Substrate gebunden werden können.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACD	α -Kristallin-Domäne
AceCS	Acetyl-CoA Synthase
ADPR	Adenosindiphosphatbose
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure(n)
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BPS	<i>branch point sequence</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
<i>c</i>	Stoffmengenonzentration
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CD	Circulardichroismus
CDS	kodierende Sequenz
CPS1	Carbamoylphosphat-Synthetase I
CtBP	<i>C-terminal binding protein</i>
CTE	<i>C-terminal extension</i>
CTS	C-terminale Sequenz
CV	<i>column volume</i>
Cys	Cystein
<i>d</i>	Optische Weglänge
<i>D.</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>melanogaster</i>	
DLAT	Dihydrolipoyllysinacetyltransferase
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSB	Doppelstrangbrüchen
<i>Dscam</i>	<i>down syndrome cell adhesion molecule</i>
DTT	1,4-Dithiothreit
<i>E</i>	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ESE	<i>exonic splicing enhancers</i>

Fox	<i>Forkhead-Box-Protein</i>
g	Erdschleunigung
GCN5	<i>general control non-repressed protein 5</i>
GDH	Glutamatdehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glutaminsäure
GPC	Gelpermeationschromatographie
<i>h</i>	Plancksche Wirkungsquantum
H3	Histon H3
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1α</i>
His	Histidin
Hsp100	<i>Heat shock protein 100</i>
Hsp40	<i>Heat shock protein 40</i>
Hsp70	<i>Heat shock protein 70</i>
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
HspB	<i>Heat shock protein beta</i>
HS-Puffer	Hochsalzpuffer
<i>I</i>	Intensität
IC	Ionenaustauschchromatographie
ICDH2	Isocitrat-Dehydrogenase 2
Ile	Isoleucin
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
Iso	Isoform
KAP1	<i>KRAB-associated protein 1</i>
KOH	Kaliumhydroxid
LB-Medium	<i>Lysogeny broth-Medium</i>
Leu	Leucin
Lsg.	Lösung
LXR	<i>liver X receptor</i>
$M_{(w)}$	Molmasse
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MALS	<i>Multi angle light scattering</i>
MDH	Malatdehydrogenase
MEF2	<i>myocyte enhancer factor-2</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein particle</i>
<i>MRW</i>	Mittlere Molmasse einer Aminosäure
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
Myr	Myristoyl

<i>n</i>	Anzahl der Peptidbindungen
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamadenindinukleotid (oxidiert)
NaDOC	Natriumdesoxycholol
NC	Nitrozellulose
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Ni	Nickel
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
NPM1	Nucleophosmin
NS-Puffer	Niedrigsalzpuffer
NTE	<i>N-terminal extension</i>
NTS	N-terminale Sequenz
PA	Polyacrylamid
PAF53	<i>polymerase-associated factor 53</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>Pcsk9</i>	Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9
PEPCK1	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1</i>
PGC-1α	<i>peroxysome proliferator-activated receptor-α coactivator 1α</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
PKM2	Pyruvatkinase M2
Pro	Prolin
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RELA	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SG	Stress-Granula
Sirt	Sirtuin
SNF2H	<i>SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin</i>
snRNA	<i>small nuclear ribonucleic acid</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoproteins</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SR-Protein	Ser/Arg-reiches Protein
SS	Spleißstelle
SV	Spleißvariante
<i>t</i>	Zeit
TB-Medium	<i>Terrific broth-Medium</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>

TEMED	<i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoroacetic acid
TNF- α	Tumornektrosefaktor α
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T_{Schmelz}	Schmelztemperatur
U2AF	U2 <i>auxiliary factor</i>
Ulp1	<i>Ubl-specific protease 1</i>
ÜN	über Nacht
UOX	Uricase (Uratoxidase)
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
\bar{V}	spezifisches Volumen
v/v	<i>volume/volume</i>
w. E.	willkürliche Einheiten
w/v	<i>weight/volume</i>
Zn	Zink
β	Massenkonzentration
ε	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
Θ	Elliptizität
λ	Wellenlänge
ν	Frequenz
ρ	Dichte
ω	Winkelgeschwindigkeit

8 Literaturverzeichnis

Adams, M. D.; Celniker, S. E.; Holt, R. A.; Evans, C. A.; Gocayne, J. D.; Amanatides, P. G. *et al.* (2000): The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. In: *Science (New York, N.Y.)* 287 (5461), S. 2185–2195.

Alekseyenko, Alexander V.; Kim, Namshin; Lee, Christopher J. (2007): Global analysis of exon creation versus loss and the role of alternative splicing in 17 vertebrate genomes. In: *RNA* 13 (5), S. 661–670. DOI: 10.1261/rna.325107.

Artamonova, Irena I.; Gelfand, Mikhail S. (2007): Comparative Genomics and Evolution of Alternative Splicing: The Pessimists' Science. In: *Chem. Rev.* 107 (8), S. 3407–3430. DOI: 10.1021/cr068304c.

Artimo, Panu; Jonnalagedda, Manohar; Arnold, Konstantin; Baratin, Delphine; Csardi, Gabor; Castro, Edouard de *et al.* (2012): ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. In: *Nucleic Acids Research* 40 (Web Server issue), S. 603. DOI: 10.1093/nar/gks400.

Ast, Gil (2004): How did alternative splicing evolve? In: *Nat. Rev. Genet.* 5 (10), S. 773–782. DOI: 10.1038/nrg1451.

Avalos, Jose L.; Celic, Ivana; Muhammad, Shabazz; Cosgrove, Michael S.; Boeke, Jef D.; Wolberger, Cynthia (2002): Structure of a Sir2 Enzyme Bound to an Acetylated p53 Peptide. In: *Molecular cell* 10 (3), S. 523–535. DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00628-7.

Bagneris, C.; Bateman, O. A.; Naylor, C. E.; Cronin, N.; Boelens, W. C.; Keep, N. H.; Slingsby, C. (2009): Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20. In: *Journal of molecular biology* 392 (5), S. 1242–1252. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.07.069.

Bepperling, A.; Alte, F.; Kriehuber, T.; Braun, N.; Weinkauff, S.; Groll, M. *et al.* (2012): Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (50), S. 20407–20412. DOI: 10.1073/pnas.1209565109.

Berg, Jeremy M.; Stryer, Lubert; Tymoczko, John L. (2007): *Biochemie*. 6. Aufl. Heidelberg [u.a.]: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.

Berget, S. M. (1995): Exon recognition in vertebrate splicing. In: *J. Biol. Chem.* 270 (6), S. 2411–2414.

Berget, S. M.; Moore, C.; Sharp, P. A. (1977): Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (8), S. 3171–3175.

Bhat, Suraj P.; Nagineni, Chandrasekharam N. (1989): α B subunit of lens-specific protein α -crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 158 (1), S. 319–325. DOI: 10.1016/S0006-291X(89)80215-3.

- Bhattacharyya, Jaya; Das, Kali P. (1998): α -Crystallin does not require temperature activation for its chaperone-like activity. In: *IUBMB Life* 46 (2), S. 249–258. DOI: 10.1080/15216549800203762.
- Bheda, Poonam; Jing, Hui; Wolberger, Cynthia; Lin, Hening (2016): The Substrate Specificity of Sirtuins. In: *Annual review of biochemistry* 85, S. 405–429. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014537.
- Birzele, F.; Csaba, G.; Zimmer, R. (2007): Alternative splicing and protein structure evolution. In: *Nucleic Acids Research* 36 (2), S. 550–558. DOI: 10.1093/nar/gkm1054.
- Black, Douglas L. (2003): Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. In: *Annu. Rev. Biochem.* 72, S. 291–336. DOI: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720.
- Blakeley, Paul; Siepen, Jennifer A.; Lawless, Craig; Hubbard, Simon J. (2010): Investigating protein isoforms via proteomics: a feasibility study. In: *Proteomics* 10 (6), S. 1127–1140. DOI: 10.1002/pmic.200900445.
- Bloemendal, Hans; Jong, Wilfried de; Jaenicke, Rainer; Lubsen, Nicolette H.; Slingsby, Christine; Tardieu, Annette (2004): Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 86 (3), S. 407–485. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.11.012.
- Bohm, G.; Muhr, R.; Jaenicke, R. (1992): Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. In: *Protein Eng* 5 (3), S. 191–195. DOI: 10.1093/protein/5.3.191.
- Bonaldo, M. F.; Lennon, G.; Soares, M. B. (1996): Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. In: *Genome Res* 6 (9), S. 791–806. DOI: 10.1101/gr.6.9.791.
- Bonen, Linda; Vogel, Jörg (2001): The ins and outs of group II introns. In: *Trends in Genetics* 17 (6), S. 322–331. DOI: 10.1016/S0168-9525(01)02324-1.
- Boutz, Paul L.; Bhutkar, Arjun; Sharp, Phillip A. (2015): Detained introns are a novel, widespread class of post-transcriptionally spliced introns. In: *Genes & Development* 29 (1), S. 63–80. DOI: 10.1101/gad.247361.114.
- Bova, M. P.; Ding, L. L.; Horwitz, J.; Fung, B. K. (1997): Subunit exchange of alphaA-crystallin. In: *J Biol Chem* 272 (47), S. 29511–29517. DOI: 10.1074/jbc.272.47.29511.
- Bova, M. P.; McHaourab, H. S.; Han, Y.; Fung, B. K. (2000): Subunit exchange of small heat shock proteins. Analysis of oligomer formation of alphaA-crystallin and Hsp27 by fluorescence resonance energy transfer and site-directed truncations. In: *J Biol Chem* 275 (2), S. 1035–1042. DOI: 10.1074/jbc.275.2.1035.
- Brack, C.; Tonegawa, S. (1977): Variable and constant parts of the immunoglobulin light chain gene of a mouse myeloma cell are 1250 nontranslated bases apart. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12), S. 5652–5656.

- Bradford, Marion M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1), S. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Braun, N.; Zacharias, M.; Peschek, J.; Kastenmuller, A.; Zou, J.; Hanzlik, M. *et al.* (2011): Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone alphaB-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (51), S. 20491–20496. DOI: 10.1073/pnas.1111014108.
- Braunschweig, Ulrich; Barbosa-Morais, Nuno L.; Pan, Qun; Nachman, Emil N.; Alipanahi, Babak; Gonatopoulos-Pournatzis, Thomas *et al.* (2014): Widespread intron retention in mammals functionally tunes transcriptomes. In: *Genome Research* 24 (11), S. 1774–1786. DOI: 10.1101/gr.177790.114.
- Breathnach, R.; Mandel, J. L.; Chambon, P. (1977): Ovalbumin gene is split in chicken DNA. In: *Nature* 270 (5635), S. 314–319. DOI: 10.1038/270314a0.
- Brehme, Marc; Voisine, Cindy; Rolland, Thomas; Wachi, Shinichiro; Soper, James H.; Zhu, Yitan *et al.* (2014): A chaperome subnetwork safeguards proteostasis in aging and neurodegenerative disease. In: *Cell reports* 9 (3), S. 1135–1150. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.09.042.
- Bukach, Olesya V.; Seit-Nebi, Alim S.; Marston, Steven B.; Gusev, Nikolai B. (2004): Some properties of human small heat shock protein Hsp20 (HspB6). In: *Eur J Biochem* 271 (2), S. 291–302. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03928.x.
- Buler, Marcin; Andersson, Ulf; Hakkola, Jukka (2016): Who watches the watchmen? Regulation of the expression and activity of sirtuins. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30 (12), S. 3942–3960. DOI: 10.1096/fj.201600410RR.
- Carver, J. A.; Aquilina, J. A.; Truscott, R. J.; Ralston, G. B. (1992): Identification by ¹H NMR spectroscopy of flexible C-terminal extensions in bovine lens alpha-crystallin. In: *FEBS Lett* 311 (2), S. 143–149. DOI: 10.1016/0014-5793(92)81386-Z.
- Carver, John A.; Lindner, Robyn A. (1998): NMR spectroscopy of α -crystallin. Insights into the structure, interactions and chaperone action of small heat-shock proteins. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 22 (3-4), S. 197–209. DOI: 10.1016/S0141-8130(98)00017-8.
- Chen, Ling-Ling (2016): The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 17 (4), S. 205–211. DOI: 10.1038/nrm.2015.32.
- Chen, Lishan; Huang, Shurong; Lee, Lin; Davalos, Albert; Schiestl, Robert H.; Campisi, Judith; Oshima, Junko (2003): WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair. In: *Aging Cell* 2 (4), S. 191–199. DOI: 10.1046/j.1474-9728.2003.00052.x.
- Chen, Sifan; Seiler, Jeanette; Santiago-Reichert, Magaly; Felbel, Kerstin; Grummt, Ingrid; Voit, Renate (2013): Repression of RNA polymerase I upon stress is caused by inhibition of

- RNA-dependent deacetylation of PAF53 by SIRT7. In: *Molecular cell* 52 (3), S. 303–313. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.10.010.
- Chen, Yue; Sprung, Robert; Tang, Yi; Ball, Haydn; Sangras, Bhavani; Kim, Sung Chan *et al.* (2007): Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6 (5), S. 812–819. DOI: 10.1074/mcp.M700021-MCP200.
- Cheng, Zhongyi; Tang, Yi; Chen, Yue; Kim, Sungchan; Liu, Huadong; Li, Shawn S. C. *et al.* (2009): Molecular characterization of propionyllysines in non-histone proteins. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8 (1), S. 45–52. DOI: 10.1074/mcp.M800224-MCP200.
- Chow, L. T.; Gelinis, R. E.; Broker, T. R.; Roberts, R. J. (1977): An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. In: *Cell* 12 (1), S. 1–8.
- Clancy, S. (2008): RNA splicing: introns, exons and spliceosome. In: *Nature Education* (1 (1)).
- Clark, A. R.; Lubsen, N. H.; Slingsby, C. (2012): sHSP in the eye lens: crystallin mutations, cataract and proteostasis. In: *Int J Biochem Cell Biol* 44 (10), S. 1687–1697. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.02.015.
- Cohen, L. H.; Westerhuis, L. W.; Jong, W. W. de; Bloemendal, H. (1978a): Rat alpha-crystallin A chain with an insertion of 22 residues. In: *Eur J Biochem* 89 (1), S. 259–266. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1978.tb20921.x.
- Cohen, L. H.; Westerhuis, L. W.; Smits, D. P.; Bloemendal, H. (1978b): Two structurally closely related polypeptides encoded by 14-S mRNA isolated from rat lens. In: *Eur J Biochem* 89 (1), S. 251–258. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1978.tb20920.x.
- Danan, Miri; Schwartz, Schraga; Edelheit, Sarit; Sorek, Rotem (2012): Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea. In: *Nucleic Acids Research* 40 (7), S. 3131–3142. DOI: 10.1093/nar/gkr1009.
- Darnell, J. E. (1978): Implications of RNA-RNA splicing in evolution of eukaryotic cells. In: *Science* 202 (4374), S. 1257–1260.
- Das, K. P.; Surewicz, W. K. (1995): Temperature-induced exposure of hydrophobic surfaces and its effect on the chaperone activity of alpha-crystallin. In: *FEBS Lett* 369 (2-3), S. 321–325. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00775-5.
- Delaye, M.; Tardieu, A. (1983): Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. In: *Nature* 302 (5907), S. 415–417. DOI: 10.1038/302415a0.
- Delbecq, S. P.; Klevit, R. E. (2013): One size does not fit all: the oligomeric states of alphaB crystallin. In: *FEBS Lett* 587 (8), S. 1073–1080. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.021.
- Dominy, John E., JR; Lee, Yoonjin; Jedrychowski, Mark P.; Chim, Helen; Jurczak, Michael J.; Camporez, Joao Paulo *et al.* (2012): The deacetylase Sirt6 activates the acetyltransferase GCN5 and suppresses hepatic gluconeogenesis. In: *Molecular cell* 48 (6), S. 900–913. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.09.030.

- Dubin, R. A.; Wawrousek, E. F.; Piatigorsky, J. (1989): Expression of the murine alpha B-crystallin gene is not restricted to the lens. In: *Molecular and cellular biology* 9 (3), S. 1083–1091. DOI: 10.1128/MCB.9.3.1083.
- Duff, Michael O.; Olson, Sara; Wei, Xintao; Garrett, Sandra C.; Osman, Ahmad; Bolisetty, Mohan *et al.* (2015): Genome-wide identification of zero nucleotide recursive splicing in *Drosophila*. In: *Nature* 521 (7552), S. 376–379. DOI: 10.1038/nature14475.
- Ebbole, Daniel J.; Jin, Yuan; Thon, Michael; Pan, Huaqin; Bhattarai, Eric; Thomas, Terry; Dean, Ralph (2004): Gene discovery and gene expression in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*: analysis of expressed sequence tags. In: *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 17 (12), S. 1337–1347. DOI: 10.1094/MPMI.2004.17.12.1337.
- Eifert, C.; Burgio, M. R.; Bennett, P. M.; Salerno, J. C.; Koretz, J. F. (2005): N-terminal control of small heat shock protein oligomerization: changes in aggregate size and chaperone-like function. In: *Biochim Biophys Acta* 1748 (2), S. 146–156. DOI: 10.1016/j.bbapap.2004.12.015.
- Elhanati, Sivan; Kanfi, Yariv; Varvak, Alexander; Roichman, Asael; Carmel-Gross, Ilana; Barth, Shaul *et al.* (2013): Multiple regulatory layers of SREBP1/2 by SIRT6. In: *Cell reports* 4 (5), S. 905–912. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.08.006.
- Eom, Taesun; Zhang, Chaolin; Wang, Huidong; Lay, Kenneth; Fak, John; Noebels, Jeffrey L.; Darnell, Robert B. (2013): NOVA-dependent regulation of cryptic NMD exons controls synaptic protein levels after seizure. In: *eLife* 2, S. e00178. DOI: 10.7554/eLife.00178.
- Escalante, R.; Moreno, N.; Sastre, L. (2003): Dictyostelium discoideum Developmentally Regulated Genes Whose Expression Is Dependent on MADS Box Transcription Factor SrfA. In: *Eukaryotic Cell* 2 (6), S. 1327–1335. DOI: 10.1128/EC.2.6.1327-1335.2003.
- Fagerholm, Per P.; Philipson, Bo T.; Lindström, Bo (1981): Normal human lens—the distribution of protein. In: *Experimental Eye Research* 33 (6), S. 615–620. DOI: 10.1016/S0014-4835(81)80101-7.
- Fahie, Kamau; Hu, Po; Swatkoski, Stephen; Cotter, Robert J.; Zhang, Yingkai; Wolberger, Cynthia (2009): Side chain specificity of ADP-ribosylation by a sirtuin. In: *The FEBS journal* 276 (23), S. 7159–7176. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07427.x.
- Fairbanks, G.; Steck, Theodore L.; Wallach, D. F. H. (1971): Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. In: *Biochemistry* 10 (13), S. 2606–2617. DOI: 10.1021/bi00789a030.
- Feldman, Jessica L.; Baeza, Josue; Denu, John M. (2013): Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by mammalian sirtuins. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (43), S. 31350–31356. DOI: 10.1074/jbc.C113.511261.
- Feldman, Jessica L.; Dittenhafer-Reed, Kristin E.; Denu, John M. (2012): Sirtuin catalysis and regulation. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (51), S. 42419–42427. DOI: 10.1074/jbc.R112.378877.

- Feldman, Jessica L.; Dittenhafer-Reed, Kristin E.; Kudo, Norio; Thelen, Julie N.; Ito, Akihiro; Yoshida, Minoru; Denu, John M. (2015): Kinetic and Structural Basis for Acyl-Group Selectivity and NAD(+) Dependence in Sirtuin-Catalyzed Deacylation. In: *Biochemistry* 54 (19), S. 3037–3050. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00150.
- Finkel, Toren; Deng, Chu-Xia; Mostoslavsky, Raul (2009): Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. In: *Nature* 460 (7255), S. 587–591. DOI: 10.1038/nature08197.
- Fleming, T. P.; Song, Z.; Andley, U. P. (1998): Expression of growth control and differentiation genes in human lens epithelial cells with extended life span. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 (8), S. 1387–1398. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660487>.
- Flick, Franziska; Luscher, Bernhard (2012): Regulation of sirtuin function by posttranslational modifications. In: *Frontiers in pharmacology* 3, S. 29. DOI: 10.3389/fphar.2012.00029.
- Fontaine, Jean-Marc; Rest, Joshua S.; Welsh, Michael J.; Benndorf, Rainer (2003): The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins. In: *Cell Stress Chaper* 8 (1), S. 62. DOI: 10.1379/1466-1268(2003)8<62:TSODFP>2.0.CO;2.
- Ford, Ethan; Voit, Renate; Liszt, Gregory; Magin, Cornelia; Grummt, Ingrid; Guarente, Leonard (2006): Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. In: *Genes & Development* 20 (9), S. 1075–1080. DOI: 10.1101/gad.1399706.
- 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. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260 (1), S. 273–279. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0897.
- Garrity, Jane; Gardner, Jeffrey G.; Hawse, William; Wolberger, Cynthia; Escalante-Semerena, Jorge C. (2007): N-lysine propionylation controls the activity of propionyl-CoA synthetase. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (41), S. 30239–30245. DOI: 10.1074/jbc.M704409200.
- Gerstein, Mark B.; Lu, Zhi John; van Nostrand, Eric L.; Cheng, Chao; Arshinoff, Bradley I.; Liu, Tao *et al.* (2010): Integrative analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome by the modENCODE project. In: *Science* 330 (6012), S. 1775–1787. DOI: 10.1126/science.1196914.
- Ghosh, Joy G.; Shenoy, Ananth K., JR; Clark, John I. (2006): N- and C-Terminal motifs in human alphaB crystallin play an important role in the recognition, selection, and solubilization of substrates. In: *Biochemistry* 45 (46), S. 13847–13854. DOI: 10.1021/bi061471m.
- Gilbert, Walter (1978): Why genes in pieces? In: *Nature* 271 (5645), S. 501. DOI: 10.1038/271501a0.

- Gilmore-Hebert, M.; Wall, R. (1978): Immunoglobulin light chain mRNA is processed from large nuclear RNA. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (1), S. 342–345.
- Giorno, R.; Sauerbier, W. (1978): Units of transcription for cytoplasmic RNA in mouse myeloma cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (9), S. 4374–4378.
- Goldberg, S.; Schwartz, H.; Darnell, J. E. (1977): Evidence from UV transcription mapping in HeLa cells that heterogeneous nuclear RNA is the messenger RNA precursor. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (10), S. 4520–4523.
- Graveley, Brenton R.; Brooks, Angela N.; Carlson, Joseph W.; Duff, Michael O.; Landolin, Jane M.; Yang, Li *et al.* (2010): The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. In: *Nature* 471 (7339), S. 473–479. DOI: 10.1038/nature09715.
- Graw, J. (2009): Genetics of crystallins: cataract and beyond. In: *Exp Eye Res* 88 (2), S. 173–189. DOI: 10.1016/j.exer.2008.10.011.
- Greiss, Sebastian; Gartner, Anton (2009): Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation. In: *Molecules and cells* 28 (5), S. 407–415. DOI: 10.1007/s10059-009-0169-x.
- Grunstein, M. (1997): Histone acetylation in chromatin structure and transcription. In: *Nature* 389 (6649), S. 349–352. DOI: 10.1038/38664.
- Guo, Shaogui; Zheng, Yi; Joung, Je-Gun; Liu, Shiqiang; Zhang, Zhonghua; Crasta, Oswald R. *et al.* (2010): Transcriptome sequencing and comparative analysis of cucumber flowers with different sex types. In: *BMC genomics* 11, S. 384. DOI: 10.1186/1471-2164-11-384.
- Haigis, Marcia C.; Mostoslavsky, Raul; Haigis, Kevin M.; Fahie, Kamau; Christodoulou, Danos C.; Murphy, Andrew J. *et al.* (2006): SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. In: *Cell* 126 (5), S. 941–954. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.057.
- Hansen, Thomas B.; Jensen, Trine I.; Clausen, Bettina H.; Bramsen, Jesper B.; Finsen, Bente; Damgaard, Christian K.; Kjems, Jorgen (2013): Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. In: *Nature* 495 (7441), S. 384–388. DOI: 10.1038/nature11993.
- Hao, Yanqi; Colak, Recep; Teyra, Joan; Corbi-Verge, Carles; Ignatchenko, Alexander; Hahne, Hannes *et al.* (2015): Semi-supervised Learning Predicts Approximately One Third of the Alternative Splicing Isoforms as Functional Proteins. In: *Cell reports* 12 (2), S. 183–189. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.06.031.
- Harrow, Jennifer; Frankish, Adam; Gonzalez, Jose M.; Tapanari, Electra; Diekhans, Mark; Kokocinski, Felix *et al.* (2012): GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. In: *Genome Research* 22 (9), S. 1760–1774. DOI: 10.1101/gr.135350.111.
- Hartl, F. U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. In: *Nature* 381 (6583), S. 571–579. DOI: 10.1038/381571a0.

- Hartl, F. Ulrich (2016): Cellular Homeostasis and Aging. In: *Annual review of biochemistry* 85, S. 1–4. DOI: 10.1146/annurev-biochem-011116-110806.
- Hartl, F. Ulrich; Bracher, Andreas; Hayer-Hartl, Manajit (2011): Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. In: *Nature* 475 (7356), S. 324–332. DOI: 10.1038/nature10317.
- Haslbeck, M.; Franzmann, T.; Weinfurthner, D.; Buchner, J. (2005): Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. In: *Nat Struct Mol Biol* 12 (10), S. 842–846. DOI: 10.1038/nsmb993.
- Haslbeck, M.; Peschek, J.; Buchner, J.; Weinkauff, S. (2016): Structure and function of alpha-crystallins: Traversing from in vitro to in vivo. In: *Biochim Biophys Acta* 1860 (1 Pt B), S. 149–166. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.06.008.
- Hegyí, Hedi; Kalmar, Lajos; Horvath, Tamas; Tompa, Peter (2011): Verification of alternative splicing variants based on domain integrity, truncation length and intrinsic protein disorder. In: *Nucleic Acids Research* 39 (4), S. 1208–1219. DOI: 10.1093/nar/gkq843.
- Heirbaut, Michelle; Lermyte, Frederik; Martin, Esther M.; Beelen, Steven; Verschueren, Tim; Sobott, Frank *et al.* (2016): The preferential heterodimerization of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6 is dictated by the N-terminal domain. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 610, S. 41–50. DOI: 10.1016/j.abb.2016.10.002.
- Hendriks, W.; Sanders, J.; Leij, L. de; Ramaekers, F.; Bloemendal, H.; Jong, W. W. de (1988): Monoclonal antibodies reveal evolutionary conservation of alternative splicing of the alpha A-crystallin primary transcript. In: *Eur J Biochem* 174 (1), S. 133–137. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb14072.x.
- Herbst, R.; Schafer, U.; Seckler, R. (1997): Equilibrium Intermediates in the Reversible Unfolding of Firefly (*Photinus pyralis*) Luciferase. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (11), S. 7099–7105. DOI: 10.1074/jbc.272.11.7099.
- Hoehenwarter, W.; Klose, J.; Jungblut, P. R. (2006): Eye lens proteomics. In: *Amino Acids* 30 (4), S. 369–389. DOI: 10.1007/s00726-005-0283-9.
- Horwitz, J. (1992): Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (21), S. 10449–10453. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC50356/>.
- Horwitz, J. (1993): Proctor Lecture. The function of alpha-crystallin. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 34 (1), S. 10–22. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/>.
- Hu, Zhiqiang; Scott, Hamish S.; Qin, Guangrong; Zheng, Guangyong; Chu, Xixia; Xie, Lu *et al.* (2015): Revealing Missing Human Protein Isoforms Based on Ab Initio Prediction, RNA-seq and Proteomics. In: *Scientific reports* 5, S. 10940. DOI: 10.1038/srep10940.
- Iida, Kei; Seki, Motoaki; Sakurai, Tetsuya; Satou, Masakazu; Akiyama, Kenji; Toyoda, Tetsuro *et al.* (2004): Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing in

Arabidopsis thaliana based on full-length cDNA sequences. In: *Nucleic Acids Research* 32 (17), S. 5096–5103. DOI: 10.1093/nar/gkh845.

Imai, S.; Armstrong, C. M.; Kaeberlein, M.; Guarente, L. (2000): Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. In: *Nature* 403 (6771), S. 795–800. DOI: 10.1038/35001622.

Inoue, Hiroaki; Nojima, Hiroshi; Okayama, Hiroto (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Gene* 96 (1), S. 23–28. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90336-P.

Irimia, Manuel; Weatheritt, Robert J.; Ellis, Jonathan D.; Parikshak, Neelroop N.; Gonatopoulos-Pournatzis, Thomas; Babor, Mariana *et al.* (2014): A highly conserved program of neuronal microexons is misregulated in autistic brains. In: *Cell* 159 (7), S. 1511–1523. DOI: 10.1016/j.cell.2014.11.035.

Iwaki, T.; Kume-Iwaki, A.; Goldman, J. E. (1990): Cellular distribution of alpha B-crystallin in non-lenticular tissues. In: *J Histochem Cytochem* 38 (1), S. 31–39. DOI: 10.1177/38.1.2294148.

Iwaki, Toru; Kume-Iwaki, Akiko; Liem, Ronald K. H.; Goldman, James E. (1989): α B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. In: *Cell* 57 (1), S. 71–78. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90173-6.

Jakob, U.; Gaestel, M.; Engel, K.; Buchner, J. (1993): Small heat shock proteins are molecular chaperones. In: *Journal of Biological Chemistry* 268 (3), S. 1517–1520. Online verfügbar unter <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0027391629&partnerID=40&md5=537a694776825af581460557d996b9aa>.

Jangi, Mohini; Boutz, Paul L.; Paul, Prakriti; Sharp, Phillip A. (2014): Rbfox2 controls autoregulation in RNA-binding protein networks. In: *Genes & Development* 28 (6), S. 637–651. DOI: 10.1101/gad.235770.113.

Jankevicius, Gytis; Hassler, Markus; Golia, Barbara; Rybin, Vladimir; Zacharias, Martin; Timinszky, Gyula; Ladurner, Andreas G. (2013): A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation. In: *Nature structural & molecular biology* 20 (4), S. 508–514. DOI: 10.1038/nsmb.2523.

Jaworski, C. J.; Piatigorsky, J. (1989): A pseudo-exon in the functional human alpha A-crystallin gene. In: *Nature* 337 (6209), S. 752–754. DOI: 10.1038/337752a0.

Jedrusik-Bode, Monika; Studencka, Maja; Smolka, Christian; Baumann, Tobias; Schmidt, Henning; Kampf, Jan *et al.* (2013): The sirtuin SIRT6 regulates stress granule formation in *C. elegans* and mammals. In: *Journal of cell science* 126 (Pt 22), S. 5166–5177. DOI: 10.1242/jcs.130708.

Jeffreys, A. J.; Flavell, R. A. (1977): The rabbit β -globin gene contains a large insert in the coding sequence. In: *Cell* 12 (4), S. 1097–1108. DOI: 10.1016/0092-8674(77)90172-6.

Jehle, S.; Vollmar, B. S.; Bardiaux, B.; Dove, K. K.; Rajagopal, P.; Gonen, T. *et al.* (2011): N-terminal domain of alphaB-crystallin provides a conformational switch for

- multimerization and structural heterogeneity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (16), S. 6409–6414. DOI: 10.1073/pnas.1014656108.
- Jehle, Stefan; Rajagopal, Ponni; Bardiaux, Benjamin; Markovic, Stefan; Kuhne, Ronald; Stout, Joseph R. *et al.* (2010): Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of [alpha]B-crystallin oligomers. In: *Nat Struct Mol Biol* 17 (99), S. 1037–1042. DOI: 10.1038/nsmb.1891.
- Jehle, Stefan; van Rossum, Barth; Stout, Joseph R.; Noguchi, Satoshi M.; Falber, Katja; Rehbein, Kristina *et al.* (2009): alphaB-crystallin: a hybrid solid-state/solution-state NMR investigation reveals structural aspects of the heterogeneous oligomer. In: *Journal of molecular biology* 385 (5), S. 1481–1497. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.10.097.
- Jiang, H.; Khan, S.; Wang, Y.; Charron, G.; He, B.; Sebastian, C. *et al.* (2013): SIRT6 regulates TNF-alpha secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. In: *Nature* 496 (7443), S. 110–113. DOI: 10.1038/nature12038.
- Jin, Lei; Wei, Wentao; Jiang, Yaobin; Peng, Hao; Cai, Jianhua; Mao, Chen *et al.* (2009): Crystal structures of human SIRT3 displaying substrate-induced conformational changes. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (36), S. 24394–24405. DOI: 10.1074/jbc.M109.014928.
- Jochen Mattay (2008): Römpp Enzyklopädie Online. Fluoreszenz. Hg. v. Georg Thieme Verlag. Online verfügbar unter <https://roempp-thieme-de.eaccess.ub.tum.de/roempp4.0/do/data/RD-06-01376>, zuletzt aktualisiert am 2008, zuletzt geprüft am 19.01.17.
- Johnson, Jason M.; Castle, John; Garrett-Engele, Philip; Kan, Zhengyan; Loerch, Patrick M.; Armour, Christopher D. *et al.* (2003): Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. In: *Science* 302 (5653), S. 2141–2144. DOI: 10.1126/science.1090100.
- Jong, W. W. de; Leunissen, J. A.; Voorter, C. E. (1993): Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. In: *Molecular biology and evolution* 10 (1), S. 103–126. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a039992.
- Jong, Wilfried W. de; Caspers, Gert-Jan; Leunissen, Jack A.M. (1998): Genealogy of the α -crystallin—small heat-shock protein superfamily. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 22 (3-4), S. 151–162. DOI: 10.1016/S0141-8130(98)00013-0.
- Jong, Wilfried W. de; Cohen, Louis H.; Leunissen, Jack A. M.; Zweers, Anneke (1980): Internally elongated rodent α -crystallin A chain: Resulting from incomplete RNA splicing? In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 96 (2), S. 648–655. DOI: 10.1016/0006-291X(80)91404-7.
- Juntawong, Piyada; Girke, Thomas; Bazin, Jeremie; Bailey-Serres, Julia (2014): Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in Arabidopsis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (1), S. 12. DOI: 10.1073/pnas.1317811111.

- Kaidi, Abderrahmane; Weinert, Brian T.; Choudhary, Chunaram; Jackson, Stephen P. (2010): Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. In: *Science (New York, N.Y.)* 329 (5997), S. 1348–1353. DOI: 10.1126/science.1192049.
- Kanfi, Yariv; Naiman, Shoshana; Amir, Gail; Peshti, Victoria; Zinman, Guy; Nahum, Liat *et al.* (2012): The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. In: *Nature* 483 (7388), S. 218–221. DOI: 10.1038/nature10815.
- Kappe, Guido; Boelens, Wilbert C.; Jong, Wilfried W. de (2010): Why proteins without an alpha-crystallin domain should not be included in the human small heat shock protein family HSPB. In: *Cell Stress & Chaperones* 15 (4), S. 457–461. DOI: 10.1007/s12192-009-0155-4.
- Kappé, Guido; Franck, Erik; Verschuure, Pauline; Boelens, Wilbert C.; Leunissen, Jack A. M.; Jong, Wilfried W. de (2002a): The human genome encodes 10 α -crystallin-related small heat shock proteins: HspB1–10. In: *Cell Stress & Chaperones* 8 (1), S. 53–61.
- Kappé, Guido; Leunissen, Jack A. M.; Jong, Wilfried W. de (2002b): Evolution and Diversity of Prokaryotic Small Heat Shock Proteins. In: W. E. G. Müller, Ph Jeanteur, I. Kostovic, Y. Kuchino, A. Macieira-Coelho, R. E. Rhoads und André-Patrick Arrigo (Hg.): *Small Stress Proteins*, Bd. 28. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Progress in Molecular and Subcellular Biology), S. 1–17.
- Kato, Kanefusa; Shinohara, Haruo; Kurobe, Naomi; Goto, Sachiyo; Inaguma, Yutaka; Ohshima, Kunihiro (1991a): Immunoreactive α A crystallin in rat non-lenticular tissues detected with a sensitive immunoassay method. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1080 (2), S. 173–180. DOI: 10.1016/0167-4838(91)90146-Q.
- Kato, Kanefusa; Shinohara, Haruo; Kurobe, Naomi; Inaguma, Yutaka; Shimizu, Kikuo; Ohshima, Kunihiro (1991b): Tissue distribution and developmental profiles of immunoreactive α B crystallin in the rat determined with a sensitive immunoassay system. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1074 (1), S. 201–208. DOI: 10.1016/0304-4165(91)90062-L.
- Kawahara, Tiara L. A.; Michishita, Eriko; Adler, Adam S.; Damian, Mara; Berber, Elisabeth; Lin, Meihong *et al.* (2009): SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF- κ B-dependent gene expression and organismal life span. In: *Cell* 136 (1), S. 62–74. DOI: 10.1016/j.cell.2008.10.052.
- Kelemen, Olga; Convertini, Paolo; Zhang, Zhaiyi; Wen, Yuan; Shen, Manli; Falaleeva, Marina; Stamm, Stefan (2013): Function of alternative splicing. In: *Gene* 514 (1), S. 1–30. DOI: 10.1016/j.gene.2012.07.083.
- Kelley, L. A.; Mezulis, S.; Yates, C. M.; Wass, M. N.; Sternberg, M. J. (2015): The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. In: *Nat Protoc* 10 (6), S. 845–858. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.

- Kelly, Sharon M.; Jess, Thomas J.; Price, Nicholas C. (2005): How to study proteins by circular dichroism. In: *Biochimica et biophysica acta* 1751 (2), S. 119–139. DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
- Keren, Hadas; Lev-Maor, Galit; Ast, Gil (2010): Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. In: *Nat Rev Genet* 11 (5), S. 345–355. DOI: 10.1038/nrg2776.
- Kim, Eddo; Goren, Amir; Ast, Gil (2008): Alternative splicing: current perspectives. In: *Bioessays* 30 (1), S. 38–47. DOI: 10.1002/bies.20692.
- Kim, Eddo; Magen, Alon; Ast, Gil (2007): Different levels of alternative splicing among eukaryotes. In: *Nucleic Acids Res.* 35 (1), S. 125–131. DOI: 10.1093/nar/gkl924.
- Konarska, Maria M.; Vilardell, Josep; Query, Charles C. (2006): Repositioning of the Reaction Intermediate within the Catalytic Center of the Spliceosome. In: *Molecular cell* 21 (4), S. 543–553. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.01.017.
- Koren, Eli; Lev-Maor, Galit; Ast, Gil (2007): The emergence of alternative 3' and 5' splice site exons from constitutive exons. In: *PLoS computational biology* 3 (5), S. e95. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0030095.
- Kriehuber, Thomas; Rattei, Thomas; Weinmaier, Thomas; Bepperling, Alexander; Haslbeck, Martin; Buchner, Johannes (2010): Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (10), S. 3633–3642. DOI: 10.1096/fj.10-156992.
- Kubelka, Jan; Hofrichter, James; Eaton, William A. (2004): The protein folding 'speed limit'. In: *Current opinion in structural biology* 14 (1), S. 76–88. DOI: 10.1016/j.sbi.2004.01.013.
- Kugel, Sita; Mostoslavsky, Raul (2014): Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6. In: *Trends in biochemical sciences* 39 (2), S. 72–81. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.12.002.
- Kundu, M.; Sen, P. C.; Das, K. P. (2007): Structure, stability, and chaperone function of alphaA-crystallin: role of N-terminal region. In: *Biopolymers* 86 (3), S. 177–192. DOI: 10.1002/bip.20716.
- Kyte, Jack; Doolittle, Russell F. (1982): A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. In: *Journal of molecular biology* 157 (1), S. 105–132. DOI: 10.1016/0022-2836(82)90515-0.
- Laganowsky, A.; Benesch, J. L.; Landau, M.; Ding, L.; Sawaya, M. R.; Cascio, D. *et al.* (2010): Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. In: *Protein Sci* 19 (5), S. 1031–1043. DOI: 10.1002/pro.380.
- Laganowsky, A.; Eisenberg, D. (2010): Non-3D domain swapped crystal structure of truncated zebrafish alphaA crystallin. In: *Protein Sci* 19 (10), S. 1978–1984. DOI: 10.1002/pro.471.

- Lakowicz, Joseph R. (2006): Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer.
- Laksanalamai, Pongpan; Robb, Frank T. (2004): Small heat shock proteins from extremophiles: a review. In: *Extremophiles : life under extreme conditions* 8 (1), S. 1–11. DOI: 10.1007/s00792-003-0362-3.
- Lambert, Gilles; Sjouke, Barbara; Choque, Benjamin; Kastelein, John J. P.; Hovingh, G. Kees (2012): The PCSK9 decade. In: *Journal of lipid research* 53 (12), S. 2515–2524. DOI: 10.1194/jlr.R026658.
- Lander, Eric S.; Linton, Lauren M.; Birren, Bruce; Nusbaum, Chad; Zody, Michael C.; Baldwin, Jennifer *et al.* (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. In: *Nature* 409 (6822), S. 860–921. DOI: 10.1038/35057062.
- Lehmann, Karola; Schmidt, Udo (2003): Group II introns: structure and catalytic versatility of large natural ribozymes. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 38 (3), S. 249–303. DOI: 10.1080/713609236.
- Lenstra, Johannes A.; Hukkelhoven, Math W. A. C.; Grøneveld, Ap A.; Smits, Rob A. M. M.; Weterings, Peter J. J. M.; Bloemendal, Hans (1982): Gene expression of transformed lens cells. In: *Experimental Eye Research* 35 (6), S. 549–554. DOI: 10.1016/S0014-4835(82)80069-9.
- Li, Yan; Liu, Ting; Liao, Shangao; Li, Yongjun; Lan, Yanyu; Wang, Aimin *et al.* (2015a): A mini-review on Sirtuin activity assays. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467 (3), S. 459–466. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.172.
- Li, Yang I.; Sanchez-Pulido, Luis; Haerty, Wilfried; Ponting, Chris P. (2015b): RBFOX and PTBP1 proteins regulate the alternative splicing of micro-exons in human brain transcripts. In: *Genome Research* 25 (1), S. 1–13. DOI: 10.1101/gr.181990.114.
- Ling, Jonathan P.; Pletnikova, Olga; Troncoso, Juan C.; Wong, Philip C. (2015): TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. In: *Science (New York, N.Y.)* 349 (6248), S. 650–655. DOI: 10.1126/science.aab0983.
- Liu, Bo; Lin, Yihui; Darwanto, Agus; Song, Xuehui; Xu, Guoliang; Zhang, Kangling (2009): Identification and characterization of propionylation at histone H3 lysine 23 in mammalian cells. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (47), S. 32288–32295. DOI: 10.1074/jbc.M109.045856.
- Loftus, Brendan J.; Fung, Eula; Roncaglia, Paola; Rowley, Don; Amedeo, Paolo; Bruno, Dan *et al.* (2005): The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. In: *Science (New York, N.Y.)* 307 (5713), S. 1321–1324. DOI: 10.1126/science.1103773.
- Mainz, A.; Peschek, J.; Stavropoulou, M.; Back, K. C.; Bardiaux, B.; Asami, S. *et al.* (2015): The chaperone alphaB-crystallin uses different interfaces to capture an amorphous and an amyloid client. In: *Nat Struct Mol Biol* 22 (11), S. 898–905. DOI: 10.1038/nsmb.3108.

- Mao, Zhiyong; Hine, Christopher; Tian, Xiao; van Meter, Michael; Au, Matthew; Vaidya, Amita *et al.* (2011): SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. In: *Science (New York, N.Y.)* 332 (6036), S. 1443–1446. DOI: 10.1126/science.1202723.
- Marquez, Yamile; Brown, John W. S.; Simpson, Craig; Barta, Andrea; Kalyna, Maria (2012): Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. In: *Genome Res.* 22 (6), S. 1184–1195. DOI: 10.1101/gr.134106.111.
- Marquez, Yamile; Hopfler, Markus; Ayatollahi, Zahra; Barta, Andrea; Kalyna, Maria (2015): Unmasking alternative splicing inside protein-coding exons defines exitrons and their role in proteome plasticity. In: *Genome Research* 25 (7), S. 995–1007. DOI: 10.1101/gr.186585.114.
- Matera, A. Gregory; Wang, Zefeng (2014): A day in the life of the spliceosome. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (2), S. 108–121. DOI: 10.1038/nrm3742.
- Matsushita, N.; Yonashiro, R.; Ogata, Y.; Sugiura, A.; Nagashima, S.; Fukuda, T. *et al.* (2011): Distinct regulation of mitochondrial localization and stability of two human Sirt5 isoforms. In: *Genes Cells* 16 (2), S. 190–202. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01475.x.
- Meija, Juris; Coplen, Tyler B.; Berglund, Michael; Brand, Willi A.; Bièvre, Paul de; Gröning, Manfred *et al.* (2016): Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). In: *Pure and Applied Chemistry* 88 (3). DOI: 10.1515/pac-2015-0305.
- Memczak, Sebastian; Jens, Marvin; Elefsinioti, Antigoni; Torti, Francesca; Krueger, Janna; Rybak, Agnieszka *et al.* (2013): Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. In: *Nature* 495 (7441), S. 333–338. DOI: 10.1038/nature11928.
- Merck, K. B.; Horwitz, J.; Kersten, M.; Overkamp, P.; Gaestel, M.; Bloemendal, H.; Jong, W. W. de (1993): Comparison of the homologous carboxy-terminal domain and tail of alpha-crystallin and small heat shock protein. In: *Mol Biol Rep* 18 (3), S. 209–215. DOI: 10.1007/BF01674432.
- Merck, Karin B.; Haard-Hoekman, Willeke A. de; Oude Essink, Belinda B.; Bloemendal, Hans; Jong, Wilfried W. de (1992): Expression and aggregation of recombinant α A-crystallin and its two domains. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1130 (3), S. 267–276. DOI: 10.1016/0167-4781(92)90439-7.
- Michishita, Eriko; McCord, Ronald A.; Berber, Elisabeth; Kioi, Mitomu; Padilla-Nash, Hesus; Damian, Mara *et al.* (2008): SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. In: *Nature* 452 (7186), S. 492–496. DOI: 10.1038/nature06736.
- Michishita, Eriko; McCord, Ronald A.; Boxer, Lisa D.; Barber, Matthew F.; Hong, Tao; Gozani, Or; Chua, Katrin F. (2009): Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6. In: *Cell Cycle* 8 (16), S. 2664–2666. DOI: 10.4161/cc.8.16.9367.

Michishita, Eriko; Park, Jean Y.; Burneskis, Jenna M.; Barrett, J. Carl; Horikawa, Izumi (2005): Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. In: *Molecular biology of the cell* 16 (10), S. 4623–4635. DOI: 10.1091/mbc.E05-01-0033.

Min, Lihua; Ji, Yuan; Bakiri, Latifa; Qiu, Zhixin; Cen, Jin; Chen, Xiaotao *et al.* (2012): Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin. In: *Nature cell biology* 14 (11), S. 1203–1211. DOI: 10.1038/ncb2590.

Müller, W. E. G.; Jeanteur, Ph; Kostovic, I.; Kuchino, Y.; Macieira-Coelho, A.; Rhoads, R. E.; Arrigo, André-Patrick (Hg.) (2002): Small Stress Proteins. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Progress in Molecular and Subcellular Biology).

Mymrikov, E. V.; Daake, M.; Richter, B.; Haslbeck, M.; Buchner, J. (2016): The Chaperone Activity and Substrate Spectrum of Human Small Heat Shock Proteins. In: *J Biol Chem*. DOI: 10.1074/jbc.M116.760413.

Najafi-Shoushtari, S. Hani; Kristo, Fjoralba; Li, Yingxia; Shioda, Toshi; Cohen, David E.; Gerszten, Robert E.; Naar, Anders M. (2010): MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. In: *Science (New York, N.Y.)* 328 (5985), S. 1566–1569. DOI: 10.1126/science.1189123.

Narberhaus, F. (2002): -Crystallin-Type Heat Shock Proteins. Socializing Minichaperones in the Context of a Multichaperone Network. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (1), S. 64–93. DOI: 10.1128/MMBR.66.1.64-93.2002.

Ner-Gaon, Hadas; Halachmi, Ronit; Savaldi-Goldstein, Sigal; Rubin, Eitan; Ophir, Ron; Fluhr, Robert (2004): Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in Arabidopsis. In: *Plant J.* 39 (6), S. 877–885. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02172.x.

Nielsen, Henrik; Johansen, Steinar D. (2014): Group I introns. Moving in new directions. In: *RNA biology* 6 (4), S. 375–383. DOI: 10.4161/rna.6.4.9334.

Nilsen, Timothy W.; Graveley, Brenton R. (2010): Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. In: *Nature* 463 (7280), S. 457–463. DOI: 10.1038/nature08909.

North, Brian J.; Verdin, Eric (2007): Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. In: *PLoS One* 2 (8), S. e784. DOI: 10.1371/journal.pone.0000784.

Okazaki, K. (2000): mRNAs Encoding Zinc Finger Protein Isoforms are Expressed by Alternative Splicing of an In-frame Intron in Fission Yeast. In: *DNA Research* 7 (1), S. 27–30. DOI: 10.1093/dnares/7.1.27.

Onyango, Patrick; Celic, Ivana; McCaffery, J. Michael; Boeke, Jef D.; Feinberg, Andrew P. (2002): SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (21), S. 13653–13658. DOI: 10.1073/pnas.222538099.

- Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. (1995): How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 4 (11), S. 2411–2423. DOI: 10.1002/pro.5560041120.
- Pan, Patricia W.; Feldman, Jessica L.; Devries, Mark K.; Dong, Aiping; Edwards, Aled M.; Denu, John M. (2011): Structure and biochemical functions of SIRT6. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (16), S. 14575–14587. DOI: 10.1074/jbc.M111.218990.
- Pan, Qun; Shai, Ofer; Lee, Leo J.; Frey, Brendan J.; Blencowe, Benjamin J. (2008): Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. In: *Nat Genet* 40 (12), S. 1413–1415. DOI: 10.1038/ng.259.
- Peschek, J.; Braun, N.; Franzmann, T. M.; Georgalis, Y.; Haslbeck, M.; Weinkauff, S.; Buchner, J. (2009): The eye lens chaperone alpha-crystallin forms defined globular assemblies. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (32), S. 13272–13277. DOI: 10.1073/pnas.0902651106.
- Peschek, J.; Braun, N.; Rohrberg, J.; Back, K. C.; Kriehuber, T.; Kastenmuller, A. *et al.* (2013): Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of alphaB-crystallin. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (40), S. 9. DOI: 10.1073/pnas.1308898110.
- Peter W. Atkins, Julio de Paula (2006): *Physikalische Chemie*. 4., vollst. überarb. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- PHILIPSON, B. O. (1969): Distribution of Protein within the Normal Rat Lens. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 8 (3), S. 258–270.
- Piatigorsky, Joram (1981): *Lens research: More than meets the eye: Molecular and Cellular Biology of the Eye Lens*. Edited by H. Bloemendal. New York: John Wiley and Sons. (1981). 469 pp. \$68.50. In: *Cell* 27 (1, Part 2), S. 233–234. DOI: 10.1016/0092-8674(81)90377-9.
- Poulain, Pierre; Gelly, Jean-Christophe; Flatters, Delphine (2010): Detection and architecture of small heat shock protein monomers. In: *PLoS One* 5 (4), S. e9990. DOI: 10.1371/journal.pone.0009990.
- Preis, Waldemar (2013): *Herstellung und Charakterisierung von nicht-trivialen Spleißvarianten humaner Proteine*. Masterarbeit. Technische Universität München.
- Pringle, Steven D.; Giles, Kevin; Wildgoose, Jason L.; Williams, Jonathan P.; Slade, Susan E.; Thalassinou, Konstantinos *et al.* (2007): An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument. In: *International Journal of Mass Spectrometry* 261 (1), S. 1–12. DOI: 10.1016/j.ijms.2006.07.021.
- Pruitt, Kim D.; Brown, Garth R.; Hiatt, Susan M.; Thibaud-Nissen, Françoise; Astashyn, Alexander; Ermolaeva, Olga *et al.* (2014): RefSeq: an update on mammalian reference sequences. In: *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue), S. 63. DOI: 10.1093/nar/gkt1114.

- Puigserver, Pere; Rhee, James; Donovan, Jerry; Walkey, Christopher J.; Yoon, J. Cliff; Oriente, Francesco *et al.* (2003): Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1[alpha] interaction. In: *Nature* 423 (6939), S. 550–555.
- Rack, Johannes Gregor Matthias; Morra, Rosa; Barkauskaite, Eva; Kraehenbuehl, Rolf; Ariza, Antonio; Qu, Yue *et al.* (2015): Identification of a Class of Protein ADP-Ribosylating Sirtuins in Microbial Pathogens. In: *Molecular cell* 59 (2), S. 309–320. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.06.013.
- Raman, B.; Ramakrishna, T.; Rao, C. M. (1995): Temperature dependent chaperone-like activity of alpha-crystallin. In: *FEBS Lett* 365 (2-3), S. 133–136. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00440-K.
- Raman, B.; Rao, Ch M. (1994): Chaperone-like activity and quaternary structure of α -crystallin. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (44), S. 27264–27268. Online verfügbar unter <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0027973129&partnerID=40&md5=456a16526ea656d0b292aaff1b15b7df>.
- Ramani, A. K.; Calarco, J. A.; Pan, Q.; Mavandadi, S.; Wang, Y.; Nelson, A. C. *et al.* (2011): Genome-wide analysis of alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*. In: *Genome Research* 21 (2), S. 342–348. DOI: 10.1101/gr.114645.110.
- Reddy, G. Bhanuprakash; Reddy, P. Yadagiri; Suryanarayana, P. (2001): α A- and α B-Crystallins Protect Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase against UVB Irradiation-Induced Inactivation. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282 (3), S. 712–716. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4642.
- Rine, Jasper; Strathern, Jeffrey N.; Hicks, James B.; Herskowitz, Ira (1979): A suppressor of mating-type locus mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for and identification of cryptic mating-type loci. In: *Genetics* 93 (4), S. 877–901. Online verfügbar unter <http://www.genetics.org/content/93/4/877>.
- Robinson, M. L.; Overbeek, P. A. (1996): Differential expression of alpha A- and alpha B-crystallin during murine ocular development. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 37 (11), S. 2276–2284. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/>.
- Rosenthal, Florian; Feijs, Karla L. H.; Frugier, Emilie; Bonalli, Mario; Forst, Alexandra H.; Imhof, Ralph *et al.* (2013): Macrod domain-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases. In: *Nature structural & molecular biology* 20 (4), S. 502–507. DOI: 10.1038/nsmb.2521.
- Roy, Ambrish; Kucukural, Alper; Zhang, Yang (2010): I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. In: *Nat. Protocols* 5 (4), S. 725–738. DOI: 10.1038/nprot.2010.5.
- Roy A. Frye (2000): Phylogenetic Classification of Prokaryotic and Eukaryotic Sir2-like Proteins. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273 (2), S. 793–798. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3000.

- Salerno, J. C.; Eifert, C. L.; Salerno, K. M.; Koretz, J. F. (2003): Structural diversity in the small heat shock protein superfamily: control of aggregation by the N-terminal region. In: *Protein Eng* 16 (11), S. 847–851. DOI: 10.1093/protein/gzg102.
- Salzman, Julia; Gawad, Charles; Wang, Peter Lincoln; Lacayo, Norman; Brown, Patrick O. (2012): Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. In: *PLoS One* 7 (2), S. e30733. DOI: 10.1371/journal.pone.0030733.
- Sanchez-Pla, Alex; Reverter, Ferran; Ruiz de Villa, M Carme; Comabella, Manuel (2012): Transcriptomics: mRNA and alternative splicing. In: *Journal of neuroimmunology* 248 (1-2), S. 23–31. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.04.008.
- Sanders, Brandi D.; Jackson, Brittany; Marmorstein, Ronen (2010): Structural basis for sirtuin function: What we know and what we don't. In: *Sirtuins* 1804 (8), S. 1604–1616. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.09.009.
- Santhoshkumar, P.; Karmakar, S.; Sharma, K. K. (2016): Structural and functional consequences of chaperone site deletion in alphaA-crystallin. In: *Biochim Biophys Acta* 1864 (11), S. 1529–1538. DOI: 10.1016/j.bbapap.2016.08.006.
- Sauve, Anthony A.; Youn, Dou Yeon (2012): Sirtuins: NAD(+)-dependent deacetylase mechanism and regulation. In: *Current opinion in chemical biology* 16 (5-6), S. 535–543. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.10.003.
- Schmucker, D.; Clemens, J. C.; Shu, H.; Worby, C. A.; Xiao, J.; Muda, M. *et al.* (2000): Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. In: *Cell* 101 (6), S. 671–684.
- Schöppner, Patricia (2016): Regulatory implications of non-trivial splicing of human proteins. Monographie. München. Online verfügbar unter <https://opac.ub.tum.de/search?bvnr=BV043594243>.
- Schuck, P. (2000): Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. In: *Biophys J* 78 (3), S. 1606–1619. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76713-0.
- Schuck, P. (2003): On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. In: *Anal Biochem* 320 (1), S. 104–124. DOI: 10.1016/S0003-2697(03)00289-6.
- Schwer, Bjorn; North, Brian J.; Frye, Roy A.; Ott, Melanie; Verdin, Eric (2002): The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. In: *The Journal of Cell Biology* 158 (4), S. 647–657. DOI: 10.1083/jcb.200205057.
- Sebastian, Carlos; Zwaans, Bernadette M. M.; Silberman, Dafne M.; Gymrek, Melissa; Goren, Alon; Zhong, Lei *et al.* (2012): The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. In: *Cell* 151 (6), S. 1185–1199. DOI: 10.1016/j.cell.2012.10.047.

- Sharma, K. K. (1998): Identification of 1,1'-Bi(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonic Acid Binding Sequences in alpha -Crystallin. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (25), S. 15474–15478. DOI: 10.1074/jbc.273.25.15474.
- Shore, D.; Squire, M.; Nasmyth, K. A. (1984): Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. In: *The EMBO Journal* 3 (12), S. 2817–2823.
- Sibley, Christopher R.; Blazquez, Lorea; Ule, Jernej (2016): Lessons from non-canonical splicing. In: *Nature reviews. Genetics* 17 (7), S. 407–421. DOI: 10.1038/nrg.2016.46.
- Sibley, Christopher R.; Emmett, Warren; Blazquez, Lorea; Faro, Ana; Haberman, Nejc; Briese, Michael *et al.* (2015): Recursive splicing in long vertebrate genes. In: *Nature* 521 (7552), S. 371–375. DOI: 10.1038/nature14466.
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W. *et al.* (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. In: *Mol Syst Biol* 7, S. 539. DOI: 10.1038/msb.2011.75.
- Skouri-Panet, Ferial; Michiel, Magalie; Ferard, Celine; Duprat, Elodie; Finet, Stephanie (2012): Structural and functional specificity of small heat shock protein HspB1 and HspB4, two cellular partners of HspB5: role of the in vitro hetero-complex formation in chaperone activity. In: *Biochimie* 94 (4), S. 975–984. DOI: 10.1016/j.biochi.2011.12.018.
- Smirnova, Ekaterina; Chebotareva, Natalia; Gurvits, Bella (2013): Transient transformation of oligomeric structure of alpha-crystallin during its chaperone action. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 55, S. 62–68. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.12.013.
- Smith, B. J. (1984): SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1, S. 41–55. DOI: 10.1385/0-89603-062-8:41.
- Smith, Brian C.; Denu, John M. (2007): Acetyl-lysine analog peptides as mechanistic probes of protein deacetylases. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (51), S. 37256–37265. DOI: 10.1074/jbc.M707878200.
- Smulders, R. H.P.H.; Carver, J. A.; Lindner, R. A.; van Boekel, M. A.M.; Bloemendal, H.; Jong, W. W. de (1996): Immobilization of the C-terminal Extension of Bovine alpha A-Crystallin Reduces Chaperone-like Activity. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (46), S. 29060–29066. DOI: 10.1074/jbc.271.46.29060.
- Srinivasan, A. N.; Nagineni, C. N.; Bhat, S. P. (1992): alpha A-crystallin is expressed in non-ocular tissues. In: *J Biol Chem* 267 (32), S. 23337–23341. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1429679>.
- Stamm, Stefan; Smith, Christopher W. J.; Lührmann, Reinhard (Hg.) (2012): Alternative pre-mRNA Splicing. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Sugnet, C. W.; Kent, W. J.; Ares, M.; Haussler, D. (2004): Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice. In: *Pac Symp Biocomput*, S. 66–77.

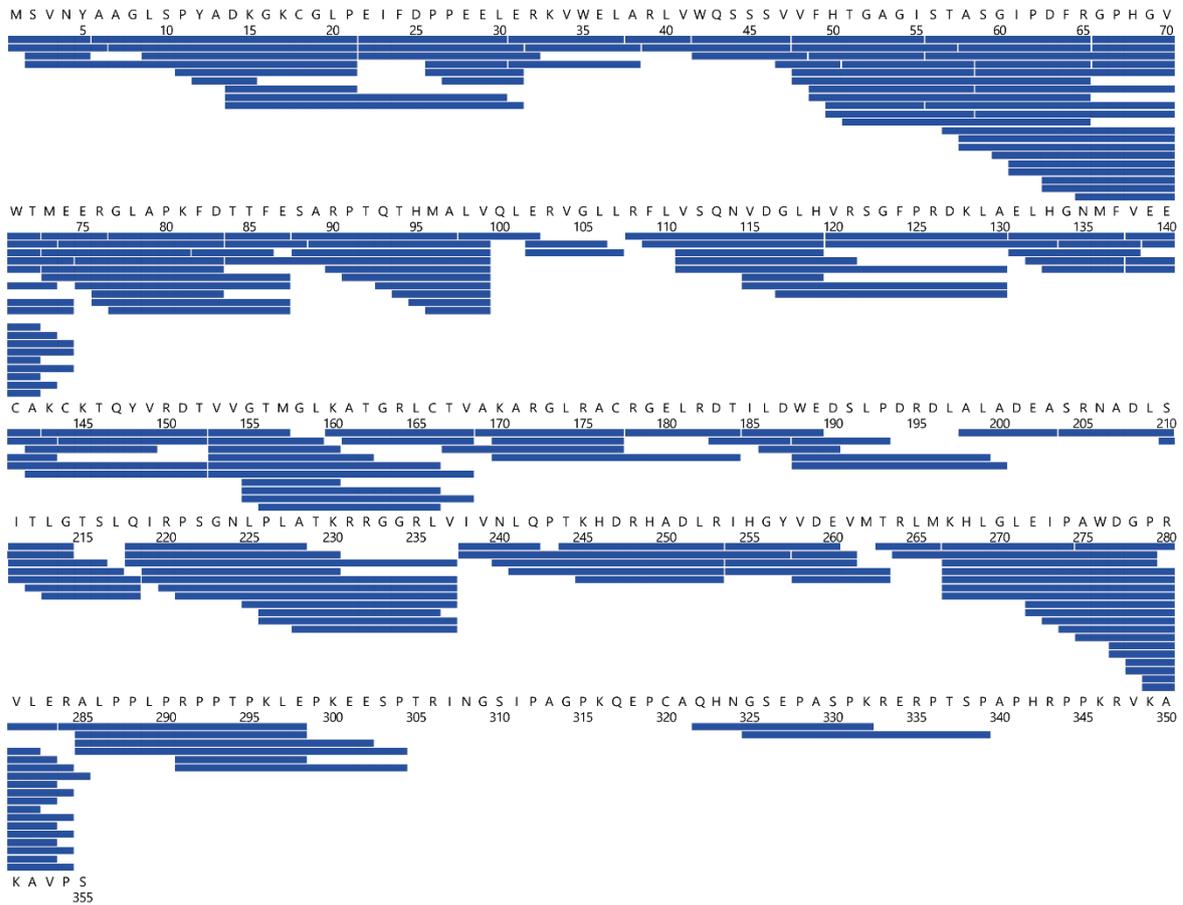
- Sundaresan, Nagalingam R.; Vasudevan, Prabhakaran; Zhong, Lei; Kim, Gene; Samant, Sadhana; Parekh, Vishwas *et al.* (2012): The sirtuin SIRT6 blocks IGF-Akt signaling and development of cardiac hypertrophy by targeting c-Jun. In: *Nature medicine* 18 (11), S. 1643–1650. DOI: 10.1038/nm.2961.
- Tanguay, Robert M.; Hightower, Lawrence E. (Hg.) (2015): *The Big Book on Small Heat Shock Proteins*. Cham: Springer International Publishing (Heat Shock Proteins).
- Tanno, Masaya; Sakamoto, Jun; Miura, Tetsuji; Shimamoto, Kazuaki; Horio, Yoshiyuki (2007): Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (9), S. 6823–6832. DOI: 10.1074/jbc.M609554200.
- Tao, Rongya; Xiong, Xiwen; DePinho, Ronald A.; Deng, Chu-Xia; Dong, X. Charlie (2013a): FoxO3 transcription factor and Sirt6 deacetylase regulate low density lipoprotein (LDL)-cholesterol homeostasis via control of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (Pcsk9) gene expression. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (41), S. 29252–29259. DOI: 10.1074/jbc.M113.481473.
- Tao, Rongya; Xiong, Xiwen; DePinho, Ronald A.; Deng, Chu-Xia; Dong, X. Charlie (2013b): Hepatic SREBP-2 and cholesterol biosynthesis are regulated by FoxO3 and Sirt6. In: *Journal of lipid research* 54 (10), S. 2745–2753. DOI: 10.1194/jlr.M039339.
- Tardieu, A. (1988): Eye lens proteins and transparency: from light transmission theory to solution X-ray structural analysis. In: *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 17, S. 47–70. DOI: 10.1146/annurev.bb.17.060188.000403.
- Tasselli, Luisa; Xi, Yuanxin; Zheng, Wei; Tennen, Ruth I.; Odrowaz, Zaneta; Simeoni, Federica *et al.* (2016a): SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence. In: *Nat Struct Mol Biol* 23 (5), S. 434–440.
- Tasselli, Luisa; Zheng, Wei; Chua, Katrin F. (2016b): SIRT6: Novel Mechanisms and Links to Aging and Disease. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. DOI: 10.1016/j.tem.2016.10.002.
- Tennen, Ruth I.; Berber, Elisabeth; Chua, Katrin F. (2010): Functional dissection of SIRT6: identification of domains that regulate histone deacetylase activity and chromatin localization. In: *Mechanisms of ageing and development* 131 (3), S. 185–192. DOI: 10.1016/j.mad.2010.01.006.
- Tilghman, S. M.; Tiemeier, D. C.; Seidman, J. G.; Peterlin, B. M.; Sullivan, M.; Maizel, J. V.; Leder, P. (1978): Intervening sequence of DNA identified in the structural portion of a mouse beta-globin gene. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (2), S. 725–729.
- Toiber, Debra; Erdel, Fabian; Bouazoune, Karim; Silberman, Dafne M.; Zhong, Lei; Mulligan, Peter *et al.* (2013): SIRT6 recruits SNF2H to DNA break sites, preventing genomic instability through chromatin remodeling. In: *Molecular cell* 51 (4), S. 454–468. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.06.018.

- Tonegawa, S.; Maxam, A. M.; Tizard, R.; Bernard, O.; Gilbert, W. (1978): Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (3), S. 1485–1489.
- Tong, Zhen; Wang, Miao; Wang, Yi; Kim, David D.; Grenier, Jennifer K.; Cao, Ji *et al.* (2017): SIRT7 Is an RNA-Activated Protein Lysine Deacetylase. In: *ACS chemical biology* 12 (1), S. 300–310. DOI: 10.1021/acscchembio.6b00954.
- Tong, Zhen; Wang, Yi; Zhang, Xiaoyu; Kim, David D.; Sadhukhan, Sushabhan; Hao, Quan; Lin, Hening (2016): SIRT7 Is Activated by DNA and Deacetylates Histone H3 in the Chromatin Context. In: *ACS chemical biology* 11 (3), S. 742–747. DOI: 10.1021/acscchembio.5b01084.
- Tress, Michael L.; Abascal, Federico; Valencia, Alfonso (2017): Alternative Splicing May Not Be the Key to Proteome Complexity. In: *Trends in biochemical sciences* 42 (2), S. 98–110. DOI: 10.1016/j.tibs.2016.08.008.
- TROKEL, STEPHEN (1962): The Physical Basis for Transparency of the Crystalline Lens. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1 (4), S. 493–501.
- Uhlen, Mathias; Fagerberg, Linn; Hallstrom, Bjorn M.; Lindskog, Cecilia; Oksvold, Per; Mardinoglu, Adil *et al.* (2015): Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. In: *Science (New York, N.Y.)* 347 (6220), S. 1260419. DOI: 10.1126/science.1260419. www.proteinatlas.org.
- Vaquero, Alejandro; Scher, Michael B.; Lee, Dong Hoon; Sutton, Ann; Cheng, Hwei-Ling; Alt, Frederick W. *et al.* (2006): SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. In: *Genes & Development* 20 (10), S. 1256–1261. DOI: 10.1101/gad.1412706.
- Vos, Michel J.; Kanon, Bart; Kampinga, Harm H. (2009): HSPB7 is a SC35 speckle resident small heat shock protein. In: *Biochimica et biophysica acta* 1793 (8), S. 1343–1353. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.05.005.
- Wahl, Markus C.; Will, Cindy L.; Lührmann, Reinhard (2009): The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. In: *Cell* 136 (4), S. 701–718. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.009.
- Wang, Eric T.; Sandberg, Rickard; Luo, Shujun; Khrebtkova, Irina; Zhang, Lu; Mayr, Christine *et al.* (2008): Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. In: *Nature* 456 (7221), S. 470–476. DOI: 10.1038/nature07509.
- Wang, Wesley Wei; Zeng, Yu; Wu, Bo; Deiters, Alexander; Liu, Wenshe R. (2016): A Chemical Biology Approach to Reveal Sirt6-targeted Histone H3 Sites in Nucleosomes. In: *ACS chemical biology* 11 (7), S. 1973–1981. DOI: 10.1021/acscchembio.6b00243.
- Warburg, O. (1927): THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. In: *The Journal of General Physiology* 8 (6), S. 519–530. DOI: 10.1085/jgp.8.6.519.

- Waters, Elizabeth R.; Lee, Garrett J.; Vierling, Elizabeth (1996): Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. In: *J Exp Bot* 47 (3), S. 325–338. DOI: 10.1093/jxb/47.3.325.
- Weeks, Stephen D.; Baranova, Ekaterina V.; Heirbaut, Michelle; Beelen, Steven; Shkumatov, Alexander V.; Gusev, Nikolai B.; Strelkov, Sergei V. (2014): Molecular structure and dynamics of the dimeric human small heat shock protein HSPB6. In: *Journal of structural biology* 185 (3), S. 342–354. DOI: 10.1016/j.jsb.2013.12.009.
- Weinstock, R.; Sweet, R.; Weiss, M.; Cedar, H.; Axel, R. (1978): Intragenic DNA spacers interrupt the ovalbumin gene. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (3), S. 1299–1303.
- Wilhelm, Mathias; Schlegl, Judith; Hahne, Hannes; Gholami, Amin Moghaddas; Lieberenz, Marcus; Savitski, Mikhail M. *et al.* (2014): Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. In: *Nature* 509 (7502), S. 582–587. DOI: 10.1038/nature13319. <https://www.proteomicsdb.org/proteomicsdb/#overview>.
- Wistow, G.; Bernstein, S. L.; Wyatt, M. K.; Ray, S.; Behal, A.; Touchman, J. W. *et al.* (2002): Expressed sequence tag analysis of human retina for the NEIBank Project: retbindin, an abundant, novel retinal cDNA and alternative splicing of other retina-preferred gene transcripts. In: *Mol Vis* 8, S. 196–204. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12107411>.
- Wistow, G. J.; Piatigorsky, J. (1988): Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. In: *Annu Rev Biochem* 57, S. 479–504. DOI: 10.1146/annurev.bi.57.070188.002403.
- Wong, Justin J-L; Ritchie, William; Ebner, Olivia A.; Selbach, Matthias; Wong, Jason W. H.; Huang, Yizhou *et al.* (2013): Orchestrated intron retention regulates normal granulocyte differentiation. In: *Cell* 154 (3), S. 583–595. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.052.
- Wu, Jie; Anczukow, Olga; Krainer, Adrian R.; Zhang, Michael Q.; Zhang, Chaolin (2013): OLego: fast and sensitive mapping of spliced mRNA-Seq reads using small seeds. In: *Nucleic Acids Research* 41 (10), S. 5149–5163. DOI: 10.1093/nar/gkt216.
- Xiao, Cuiying; Wang, Rui-Hong; Lahusen, Tyler J.; Park, Ogyi; Bertola, Adeline; Maruyama, Takashi *et al.* (2012): Progression of chronic liver inflammation and fibrosis driven by activation of c-JUN signaling in Sirt6 mutant mice. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (50), S. 41903–41913. DOI: 10.1074/jbc.M112.415182.
- Xiong, Xiwen; Tao, Rongya; DePinho, Ronald A.; Dong, X. Charlie (2013): Deletion of hepatic FoxO1/3/4 genes in mice significantly impacts on glucose metabolism through downregulation of gluconeogenesis and upregulation of glycolysis. In: *PLoS One* 8 (8), S. e74340. DOI: 10.1371/journal.pone.0074340.
- Yan, Qinghong; Weyn-Vanhentenryck, Sebastien M.; Wu, Jie; Sloan, Steven A.; Zhang, Ye; Chen, Kenian *et al.* (2015): Systematic discovery of regulated and conserved alternative exons in the mammalian brain reveals NMD modulating chromatin regulators. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (11), S. 3445–3450. DOI: 10.1073/pnas.1502849112.

- Yang, Bo; Zwaans, Bernadette M. M.; Eckersdorff, Mark; Lombard, David B. (2009): The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac in vivo to promote genomic stability. In: *Cell Cycle* 8 (16), S. 2662–2663. DOI: 10.4161/cc.8.16.9329.
- Yang, Jianyi; Yan, Renxiang; Roy, Ambrish; Xu, Dong; Poisson, Jonathan; Zhang, Yang (2015): The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. In: *Nat Meth* 12 (1), S. 7–8.
- Yap, Karen; Lim, Zhao Qin; Khandelia, Piyush; Friedman, Brad; Makeyev, Eugene V. (2012): Coordinated regulation of neuronal mRNA steady-state levels through developmentally controlled intron retention. In: *Genes & Development* 26 (11), S. 1209–1223. DOI: 10.1101/gad.188037.112.
- Yatzkan, Einat; Yarden, Oded (1999): The B regulatory subunit of protein phosphatase 2A is required for completion of macroconidiation and other developmental processes in *Neurospora crassa*. In: *Mol Microbiol* 31 (1), S. 197–209. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01161.x.
- Zarnack, Kathi; Konig, Julian; Tajnik, Mojca; Martincorena, Inigo; Eustermann, Sebastian; Stevant, Isabelle *et al.* (2013): Direct competition between hnRNP C and U2AF65 protects the transcriptome from the exonization of Alu elements. In: *Cell* 152 (3), S. 453–466. DOI: 10.1016/j.cell.2012.12.023.
- Zenoni, Sara; Ferrarini, Alberto; Giacomelli, Enrico; Xumerle, Luciano; Fasoli, Marianna; Malerba, Giovanni *et al.* (2010): Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-Seq. In: *Plant physiology* 152 (4), S. 1787–1795. DOI: 10.1104/pp.109.149716.
- Zhang, Guojie; Guo, Guangwu; Hu, Xueda; Zhang, Yong; Li, Qiye; Li, Ruiqiang *et al.* (2010): Deep RNA sequencing at single base-pair resolution reveals high complexity of the rice transcriptome. In: *Genome Research* 20 (5), S. 646–654. DOI: 10.1101/gr.100677.109.
- Zhang, Kai; Chen, Yue; Zhang, Zhihong; Zhao, Yingming (2009): Identification and verification of lysine propionylation and butyrylation in yeast core histones using PTMap software. In: *Journal of proteome research* 8 (2), S. 900–906. DOI: 10.1021/pr8005155.
- Zhang, Xiaoyu; Khan, Saba; Jiang, Hong; Antonyak, Marc A.; Chen, Xiao; Spiegelman, Nicole A. *et al.* (2016): Identifying the functional contribution of the defatty-acylase activity of SIRT6. In: *Nature chemical biology* 12 (8), S. 614–620. DOI: 10.1038/nCHEMBIO.2106.
- Zhang, Yang (2008): I-TASSER server for protein 3D structure prediction. In: *BMC bioinformatics* 9, S. 40. DOI: 10.1186/1471-2105-9-40.
- Zhong, Lei; D'Urso, Agustina; Toiber, Debra; Sebastian, Carlos; Henry, Ryan E.; Vadysirisack, Douangsoone D. *et al.* (2010): The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. In: *Cell* 140 (2), S. 280–293. DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.041.

9 Anhang



Total: 189 Peptides, 90,7% Coverage, 5,96 Redundancy

Abbildung A1: Coverage map der HDX-Messungen mit Sirt6 Isoform 1 und 2.

10 Veröffentlichungen

Preis, Waldemar; Bestehorn, Annika; Buchner, Johannes; Haslbeck, Martin (2017): An alternative splice variant of human α A-crystallin modulates the oligomer ensemble and the chaperone activity of α -crystallins. In: *Cell Stress and Chaperones*. DOI: 10.1007/s12192-017-0772-2.

11 Danksagungen

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Johannes für vielen Möglichkeiten und wissenschaftlichen Freiheiten meine Doktorarbeit gestalten zu können.

Martin möchte ich danken für all die fachlichen Diskussionen die wir geführt haben. Insbesondere in der Anfangszeit hast du mir sehr vieles beigebracht und all meine Fragen versucht zu beantworten.

Ich möchte mich bei dem gesamten Lehrstuhl für die tolle Zeit bedanken. Auch wenn ihr mit eurem eigenen Kram beschäftigt wart, habt ihr euch doch die Zeit genommen mit bei akuten Fragen und Problemen zu helfen.

Den Büronachbarn in beiden Büros die ich bewohnte danke ich für die lockeren und freundlichen Gespräche die den Laboralltag maßgeblich aufgelockert haben. Hier muss ich besonders Chrissie für die recht kurze Zeit, gefüllt mit intensiven freundschaftlichen Gespräche danken.

Gina und Mareike danke ich vielmals für eure Freundschaft und die tolle Zeit auch über die Arbeitszeit hinaus. Auch wenn du immer dazu unwillig warst, möchte ich dir Gina auch für viele Unterstützung im Labor danken.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für die viele ununterbrochene Unterstützung über all die Jahre. Ohne euch hätte ich es nicht bis hierher geschafft. Ihr seid die besten. Auch Corinna gebührt an dieser Stelle danke für all die schöne Zeit die wir zusammen hatten und die mich auch nach einem harten Tag wieder aufgebaut hat.

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Waldemar Preis, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde bisher keiner Prüfungskommission vorgelegt. Teile dieser Arbeit wurden in einem wissenschaftlichen Journal veröffentlicht.

München, 19.02.17

Waldemar Preis

