

Aus dem
Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

***Charakterisierung der subzellulären Kolokalisation
und Interaktion von SIRT4 mit RAF-Kinasen***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Patrick Verhülsdonk
2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Reza Ahmadian

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Björn Stork

Widmung

Ich widme diese Dissertation
meiner geliebten Frau Jessica und meinen vier Söhnen
Bennett, Julius, Janne Aris und Lias.
Ihr seid mein ganzes Leben!

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Laura Bergmann, Alexander Lang , Christoph Bross, Simone Altinoluk-Hambüchen, Iris Fey , Nina Overbeck, Anja Stefanski, Constanze Wiek, Andreas Kefalas, **Patrick Verhülsdonk**, Christian Mielke, Dennis Sohn, Kai Stühler, Helmut Hanenberg, Reiner U. Jänicke, Jürgen Scheller, Andreas S. Reichert , Mohammad Reza Ahmadian und Roland P. Piekorz, veröffentlicht am 24.08.2020, „*Subcellular Localization and Mitotic Interactome Analyses Identify SIRT4 as a Centrosomally Localized and Microtubule Associated Protein*“ in Cells

Mehrnaz Mehrabipour, Saeideh Nakhaei-Rad, Radovan Dvorsky, Alexander Lang, **Patrick Verhülsdonk**, Mohammad R. Ahmadian, Roland P. Piekorz, veröffentlicht am 18.03.2024, „*SIRT4 as a novel interactor and candidate suppressor of C-RAF kinase in MAPK signaling*“ in Life Science Alliance

Zusammenfassung (deutsch)

Sirtuine (1-7) charakterisieren eine Familie multifunktionaler, NAD⁺-abhängiger Enzyme mit vorwiegend Deacetylase-Aktivität. Die mitochondrialen Sirtuine (SIRT3-5) sind an der Regulation der mitochondrialen Dynamik, d.h. des mitochondrialen *fusion-/ fission cycle*, und der mitochondrialen Qualitätskontrolle, d.h. der selektiven mitochondrialen Autophagie (Mitophagie), beteiligt. Mechanistisch führt die ektopische Expression von SIRT4 zu einer Hemmung der mitochondrialen *fission* über eine Inhibition der MAPK (MAP- Kinase) -vermittelten Phosphorylierung des *fission* Faktors DRP1. Massenspektrometrische Analysen identifizierten ARAF und CRAF, Mitglieder der RAF Serin/Threonin Kinase Familie im Ras-RAF-MEK-ERK (MAPK) Signalweg, als Interaktionspartner von SIRT4. Basierend auf der Hypothese, dass SIRT4 über die Interaktion mit RAF-Kinasen zu einer Inhibition des MAPK-DRP1-Signalweges und somit zu einer verminderten mitochondrialen *fission* führt, sollte in dieser Arbeit die mitochondriale Kolokalisation der RAF-Paraloge sowie die SIRT4-RAF-Kinase-Interaktion näher untersucht werden. Mit Hilfe der konfokalen *Laserscanning* Mikroskopie wurde die subzelluläre Lokalisation von ektopisch exprimierten RAF-Paralogen, die über einen FLAG-Tag detektiert wurden, analysiert. Es zeigte sich, dass ARAF und CRAF im Vergleich zum dritten RAF-Kinase-Mitglied BRAF mit MTC02, einem mitochondrialen Marker, kolokalisieren. Zusätzlich konnte eine Kolokalisation von endogenem ARAF mit MTC02 bestätigt werden. In subzellulären Fraktionierungen waren auf Proteinebene ARAF und CRAF im Vergleich zu BRAF deutlich geringer im Zytosol vorhanden, während in der angereicherten mitochondrialen/ membranären Proteinfraction höhere Mengen an ARAF/CRAF im Vergleich zu BRAF gefunden wurden. Die massenspektrometrischen Ergebnisse konnten erstmals durch Koimmunopräzipitationsexperimente mit der anti-GFP *Nanobody* Methode und stabil SIRT4-eGFP exprimierenden HEK293 Zelllinien bestätigt werden. Erste funktionelle Experimente konnten zeigen, dass ein shRNA-vermitteltes Herunterregulieren von ARAF in HEK293-Zellen sowie ein mit der CRISPR-Methode generierter Gen-*knockout* von CRAF in SKBR3-Zellen jeweils zu einer verminderten Phosphorylierung von pDRP1 (Ser616) führt. Zukünftig bleibt der Einfluss einer erhöhten Expression von SIRT4 (im Vergleich zu dessen zellulären Depletion) auf den Phosphorylierungsgrad von pDRP1 (Ser616) und das mitochondriale Netzwerk/*fission* genauer zu klären.

Zusammenfassung (englisch)

Sirtuins (1-7) characterise a family of multifunctional, NAD⁺-dependent enzymes with predominantly deacetylase activity. The mitochondrial sirtuins (SIRT3-5) are involved in the regulation of mitochondrial dynamics, i. e. the mitochondrial fusion/fission cycle, and mitochondrial quality control, i. e. selective mitochondrial autophagy (mitophagy). Mechanistically, the ectopic expression of SIRT4 leads to an inhibition of mitochondrial fission via an inhibition of MAPK (MAP kinase)-mediated phosphorylation of the pro-fission factor DRP1. Mass spectrometric analyses identified ARAF and CRAF, members of the RAF serine/threonine kinase family in the Ras-RAF-MEK-ERK (MAPK) signalling pathway, as interaction partners of SIRT4. Based on the hypothesis that SIRT4 leads to an inhibition of the MAPK-DRP1 signalling pathway and thus to reduced mitochondrial fission via the interaction with RAF kinases, the mitochondrial colocalisation of the RAF paralogues and the SIRT4-RAF kinase interaction should be investigated in more detail in this study. Confocal Laserscanning microscopy was used to analyse the subcellular localisation of ectopically expressed RAF paralogues that were detected using a FLAG tag. It was shown that ARAF and CRAF colocalise with MTC02, a mitochondrial marker, in comparison to the third RAF kinase member BRAF. In addition, colocalisation of endogenous ARAF with MTC02 was confirmed. In subcellular fractionations, ARAF and CRAF were significantly less present in the cytosol at the protein level compared to BRAF, while higher amounts of ARAF/CRAF were found in the enriched mitochondrial/membrane protein fraction compared to BRAF. The mass spectrometric results were confirmed for the first time by co-immunoprecipitation experiments using the anti-GFP nanobody method and stably SIRT4-eGFP expressing HEK293 cell lines. Initial functional experiments showed that shRNA-mediated downregulation of ARAF in HEK293 cells and CRISPR-induced gene knockout of CRAF in SKBR3 cells both lead to reduced phosphorylation of pDRP1 (Ser616). In the future, the influence of an increased expression of SIRT4 (compared to its cellular depletion) on the phosphorylation level of pDRP1 (Ser616) and the mitochondrial network/fission remains to be clarified in more detail.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANT	<i>adenin nucleotide translocator</i>
AS	Aminosäure
Atg	<i>autophagy related gene</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bisacrylamid
BBS	<i>borate buffered saline</i>
BER	Basen-Exisions-Reparatur
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMKIα	<i>calmodulin-dependet protein Kinase Iα</i>
CaCl₂	Calciumchlorid
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio- 1-Propansulfonat
cLSM	Konfokale <i>Laserscanning</i> Mikroskopie
CoA	Koenzym A
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CRD	<i>cystein-rich-domain</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbeccos's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRP1	<i>dynammin-related protein 1</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>

FOXO3a	<i>forkhead-box-protein O3</i>
g	Gramm
G418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDH	Glutamatdehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
H3K18	Histon H3 Lysin 18
HDAC6	Histon-Deacetylase 6
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	N-2-Hydroxypiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
TIM	<i>Translocase of the Inner Membran</i>
TOM	<i>Translocase of the Outer Membran</i>
IDH2	<i>Isocitrate-Dehydrogenase 2</i>
IP	Immunpräzipitation
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC3	<i>light chain 3</i>
LSM	<i>Laserscanning</i> Mikroskop
MAP1S	Mikrotubuli-assoziierte Protein
MAPK	<i>mitogen-aktivated protein kinase</i>
MEK	<i>mitogen-aktivated protein kinase kinase</i>
Mfn	Mitofusin
µg	Mikrogramm
Min.	Minute
Mito	Mitochondrium
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
MTC02	<i>mitochondrial cytochrome c oxidase 2</i>
NAD⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH/H⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NP40	<i>Nonyl phenoxypolyethoxylethanol 40</i>

OPA	<i>optic atrophy</i>
ORF	Offener Leserahmen (<i>open-reading frame</i>)
PBS	phosphatgepufferter Salzlösung
PDC	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
pDRP1	<i>phospho-dynamin-related protein 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
ph	<i>pondus Hydrogenii</i>
PINK1	<i>PTEN-induced kinase 1</i>
PKA	Protein Kinase A
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RBD	<i>RAS-binding domain</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
shRNA	<i>smallhairpin ribonucleic acid</i>
Ser	Serin
Sek.	Sekunden
SIR2	<i>silent information regulator 2</i>
SIRT	Sirtuin
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
Std.	Stunden
SZF	Subzelluläre Fraktionierung
TAE	<i>TRIS-acetat-EDTA</i>
TBST	Tris-buffered saline with Tween
U/ Min.	Umdrehung pro Minute
UV	ultraviolett
wt	<i>Wildtype</i>
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung (deutsch)	I
Zusammenfassung (englisch)	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Mitochondriale Dynamik und Mitophagie	1
1.2 Sirtuine	3
1.3 Mitochondriale und extramitochondriale Funktionen von SIRT4.....	5
1.4 Rolle von SIRT4 in der mitochondrialen Dynamik und Qualitätskontrolle	6
1.5 RAF-Kinase Paraloge und deren Rolle in der mitochondrialen Dynamik und Qualitätskontrolle.....	8
1.6 Identifikation von ARAF und CRAF/ RAF-1 als SIRT4-Interaktoren mittels massenspektrometrischer Proteomanalyse	10
1.7 Ziele der Arbeit.....	11
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Material	12
2.1.1 Chemikalien und Lösungen	12
2.1.2 Enzyme	13
2.1.3 Puffer und Medien	14
2.1.4 Antikörper.....	15
2.1.4.1 Primärantikörper	15
2.1.4.2 Sekundärantikörper	16
2.1.5 Vektoren und Plasmide	16
2.1.6 Bakterienstämme	16
2.1.7 Laborgeräte	16
2.1.8 Verbrauchsmaterial	17
2.1.9 Zelllinien	18
2.1.10 Kits	18

2.2 Methoden	19
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	19
2.2.1.1 Bakterielle Transformation	19
2.2.1.2 Bakterielle Kultivierung zwecks Plasmidisolierung	19
2.2.1.3 Glycerolkonservierung von Bakterienstämmen	19
2.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Maxi-Präp)	20
2.2.1.5 Restriktionsverdauanalyse	20
2.2.1.6 DNA-Gelelektrophorese	21
2.2.1.7 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	21
2.2.1.8 Transfektion von Plasmid-DNA	21
2.2.1.9 Generierung stabil transfizierter Zelllinien.....	22
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	24
2.2.2.1 Zelllyse und Gewinnung von Proteinlysaten	24
2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	24
2.2.2.3 Anti-eGFP <i>Nanobody</i> -vermittelte Kolimmunopräzipitation	24
2.2.2.4 Subzelluläre Fraktionierung	25
2.2.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>SDS-PAGE</i>)	26
2.2.2.6 <i>Western Blot</i> / Immuno Blot-Analyse.....	26
2.2.3 Zellbiologische Methoden	27
2.2.3.1 Kultivierung humaner Zelllinien	27
2.2.3.2 Kryokonservierung von Zelllinien	27
2.2.3.3 Zellzählung (Neubauer Zählkammer)	28
2.2.4 Konfokale <i>Laserscanning</i> Mikroskopie.....	28
2.2.5 Durchflusszytometrie	29
3 Ergebnisse	31
3.1 Subzelluläre Lokalisation von RAF-Kinase Paralogen	31
3.1.1 Biochemische Analyse der RAF-Kinase Paralogen mittels subzellulärer Fraktionierung	31
3.1.2 Analyse der subzellulären Verteilung der RAF-Kinase Paraloge mittels konfokaler <i>Laserscanning</i> Mikroskopie	33
3.2 Interaktion von SIRT4 mit RAF-Kinase Paraloge	35
3.2.1 Analyse der SIRT4 – RAF-Kinase Interaktion mittels Koimmunopräzipitation.....	35
3.2.2 Analyse der SIRT4 - RAF-Kinase Kolo­kalisation mittels konfokaler <i>Laserscanning</i> Mikroskopie	40

3.3 Funktionelle Interaktion von ARAF und CRAF mit DRP1	42
3.3.1 <i>Small hairpin</i> (shRNA)-vermittelte zelluläre Depletion von ARAF in HEK293-Zellen	42
3.3.2 Einfluss der zellulären Depletion von ARAF und <i>knockout</i> von CRAF auf die Phosphorylierung des Pro- <i>fission</i> Regulators DRP1.....	45
4 Diskussion	48
5 Abbildungsverzeichnis	56
6 Tabellenverzeichnis	57
7 Literatur- und Quellenverzeichnis	58

1 Einleitung

1.1 Mitochondriale Dynamik und Mitophagie

Mitochondrien sind Organellen, die aus einer Matrix bestehen, die durch eine Doppelmembran vom Zytoplasma getrennt ist. Die innere Membran enthält einen für die Zelle essentiellen Proteinkomplex, der die Bereitstellung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) gewährleistet. Darüber hinaus spielen die Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Nährstoffoxidation, dem Stickstoffmetabolismus und der Apoptose [1, 2]. Die herausragende Rolle der Mitochondrien erfordert eine komplexe Qualitätskontrolle. Eine Dysfunktion dieser Regulation führt zu einem gehäuferten Auftreten von altersassoziierten, häufig metabolischen Erkrankungen wie Diabetes, Alzheimer, Parkinson, Herzinsuffizienz, Adipositas und Krebs [1, 3]. Die Qualitätskontrolle unterliegt der mitochondrialen Dynamik, einem sich ständig wiederholenden Zyklus von *fusion* und *fission* (Teilung). Dieser gegenläufige Prozess wird streng kontrolliert, um den Anforderungen des sich ständig ändernden Energie- und Stoffwechselbedarfs der Zelle gerecht zu werden. Dieser Zyklus bestimmt daher die gesamte Architektur der Mitochondrien und damit jeden Aspekt der mitochondrialen Funktion [1, 3]. Der Prozess der mitochondrialen *fission* wird durchlaufen, um neue Mitochondrien zu bilden oder wenn Mitochondrien aus dem tubulären Netzwerk entfernt werden sollen [4]. Die Vereinzelnung von Mitochondrien ist von besonderer Bedeutung bei der Zellteilung [5] oder bei der Abtrennung dysfunktionaler Mitochondrien, die anschließend der Mitophagie zugeführt werden, einem weiteren wichtigen Aspekt der Qualitätskontrolle [6].

Die Mitophagie ist eine spezialisierte Form der Autophagie, bei der defekte Mitochondrien erkannt und abgebaut werden. Defekte Mitochondrien sind solche, die nicht mehr in der Lage sind, die oxidative Phosphorylierung effizient durchzuführen. Ursache hierfür ist insbesondere der Verlust des Membranpotentials, z.B. als Folge der Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [7]. Als spezifisch relevantes *Target* für oxidativen Stress gilt die mitochondriale *DNA*, da sie durch ihre besondere Nähe zur Atmungskette relativ hohen Konzentrationen von Sauerstoffradikalen ausgesetzt ist, gleichzeitig aber im Vergleich zur *DNA* im Zellkern nur über geringe Reparaturmechanismen verfügt [8]. Der gesamte Prozess der mitochondrialen *fusion*,

fission und Mitophagie wird durch Proteine reguliert, deren Fehlfunktion mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht wird. Die mitochondriale *fusion* beruht unter anderem auf der Aktivierung von Mitofusin1/Mitofusin2 (Mfn1/Mfn2) und OPA1 [9]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von Mfn2 bei Adipositas und Diabetes zu einer mitochondrialen Fragmentierung führt; insbesondere bei neurodegenerativen Erkrankungen zeigt sich dagegen eine Dysbalance, bei der es zu einer vermehrten mitochondrialen Fusion kommt, unter anderem durch Inhibition des Pro-*fission* Faktors DRP1 [10, 11]. Als Folge wird die Kinase PINK1 an der äußeren mitochondrialen Membran stabilisiert, was wiederum zur Rekrutierung der E3-Ubiquitin-Ligase Parkin und der daraus resultierenden Autophagie führt. Unabhängig von der PINK/Parkin-Achse kann die Mitophagie auch über Bcl2 und LC3 initiiert werden [3].

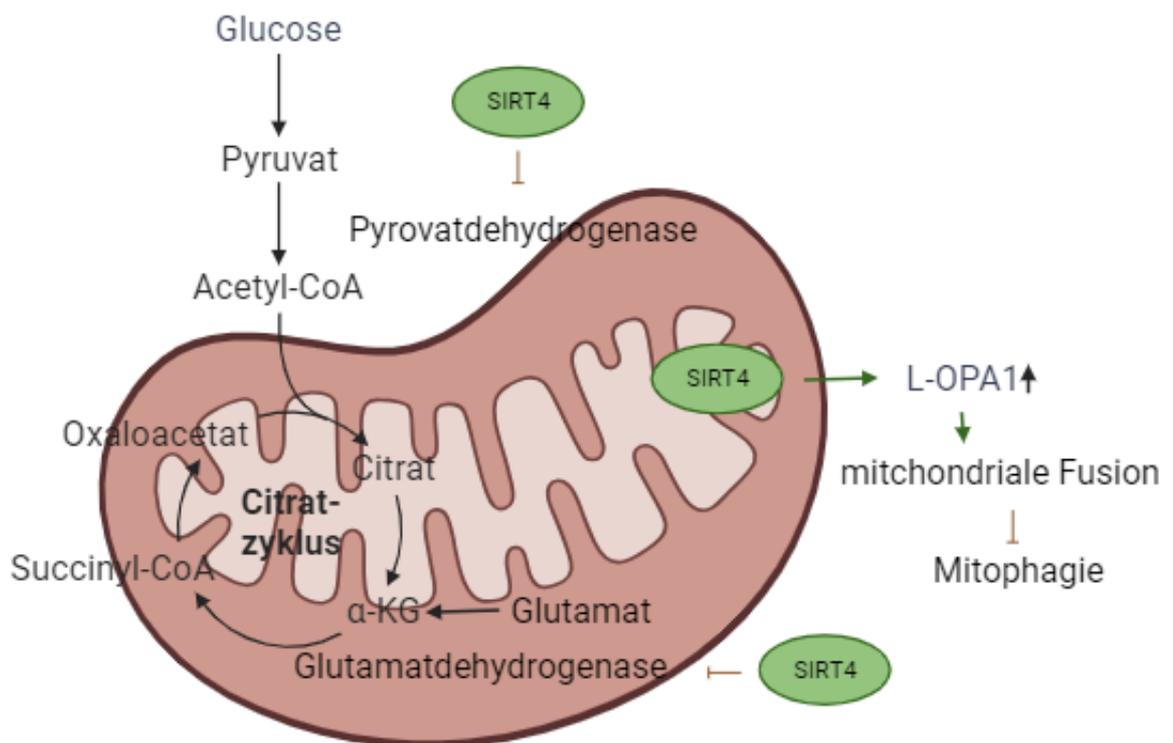


Abb. 1: Mitochondriale Lokalisation von SIRT4.

In früheren Studien konnte SIRT4 als mitochondriales Protein identifiziert werden [12]. Die schematische Darstellung zeigt die Hemmung der Glutamatdehydrogenase (GDH) und der Pyruvatdehydrogenase (PDH) durch SIRT4. SIRT4 beeinflusst somit den mitochondrialen Stoffwechsel. Zusätzlich wird die Mitophagie durch die Stabilisierung von L-OPA1 und damit eine erhöhte mitochondriale *fusion* gehemmt. Erstellt mit Biorender.com.

1.2 Sirtuine

Sirtuine sind evolutionär konserviert und wurden erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben; sie sind Homologe des *Sir2*-Gens [13-17]. Die Proteinfamilie der Sirtuine bei Säugetieren umfasst sieben Mitglieder (SIRT1 bis SIRT7), die an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt sind. So ist bekannt, dass Sirtuine an der Regulation des Zellzyklus und des Zellstoffwechsels beteiligt sind, epigenetische Mechanismen bei der Genexpression regulieren, den Apoptosesignalweg beeinflussen und in den Zellalterungsprozess eingreifen [18, 19]. Sirtuine benötigen NAD^+ als Cofaktor und deacetylieren ein breites Spektrum von Substraten, wobei sie ihre enzymatische Aktivität hauptsächlich als Deacetylasen, Deacyclasen oder ADP-Ribosyltransferasen ausüben [20-23]. Die katalytische Domäne aller sieben Mitglieder der Sirtuin-Familie ist hoch konserviert. Sirtuine unterscheiden sich jedoch durch unterschiedliche Aminosäuresequenzen im Bereich des N- und C-Termini, wobei der N-Terminus die subzelluläre Lokalisation [24] und der C-Terminus unter anderem die Proteinstabilität [12] reguliert. Die Domänenstruktur und die unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten erklären das breite Substrat- und Funktionsspektrum der Sirtuine [24]. Die Verteilung der Sirtuine in der Zelle ist unterschiedlich:

SIRT1 ist hauptsächlich im Zellkern zu finden, gelangt aber während der Zellteilung auch ins Zytosol. SIRT6 und SIRT7 kommen ebenfalls im Zellkern vor und sind an der Transkriptionsregulation beteiligt ([25], [26]). SIRT2 kommt hauptsächlich im Zytosol vor, ist aber auch ein Mikrotubuli-bindendes Sirtuin [27]. SIRT3, SIRT4 und SIRT5 schließlich sind genuin mitochondrial lokalisierte Proteine [12], wobei insbesondere für SIRT4 und SIRT5 zusätzliche extramitochondriale Lokalisationen und Funktionen nachgewiesen wurden [28]. Durch Deacetylierung ist SIRT1 an der Differenzierung verschiedener Gewebe in verschiedenen Säugerzellen beteiligt. Außerdem trägt SIRT1 durch Deacetylierung des Tumorsuppressors p53 zur Hemmung der Apoptose bei. Es ist mitunter an der Regulation der Glykolyse bzw. Gluconeogenese und des Lipidstoffwechsels beteiligt [25]. Auch bei der Mitophagie spielt SIRT1 eine entscheidende Rolle. Unter Energiedepression verändert sich das Verhältnis von NAD^+ zu NADH/H^+ . Daraufhin deacetyliert SIRT1 LC3, Atg5 und Atg7 und induziert so die Mitophagie [29, 30].

SIRT2 kolokalisiert mit Mikrotubuli und HDAC6, wobei SIRT2 wie HDAC6 Mikrotubuli am Lysin K40 deacetylieren kann und somit den Acetylierungsgrad und die

Stabilität der Mikrotubuli beeinflusst. Außerdem wird vermutet, dass SIRT2 den Zellzyklus mitkontrolliert, da die Expression von SIRT2 während der Mitose ansteigt und nach der Teilung rapide abfällt [31].

SIRT3 ist im Mitochondrium lokalisiert, wo es unter anderem die Glutamatdehydrogenase (GDH) deacetyliert und aktiviert und somit den Zellstoffwechsel positiv reguliert [32]. Es konnte gezeigt werden, dass die Deacetylierungsaktivität von SIRT3 durch Kalorienrestriktion gesteigert werden kann [33]. Im Gegensatz dazu führt ein Mangel an SIRT3 zu einer Hyperacetylierung im Mitochondrium, die mit der Entstehung von Tumoren assoziiert ist [18, 34]. Darüber hinaus fördert SIRT3 die mitochondriale *fusion*, indem es OPA1 deacetyliert und dadurch dessen GTPase-Aktivität erhöht [30].

SIRT4 gehört ebenfalls zur Gruppe der mitochondrialen Proteine. Das katalytische Zentrum ist jedoch nicht als Deacetylase aktiv, sondern bewirkt eine NAD⁺-abhängige ADP-Ribosylierung verschiedener Substrate oder ist als Lipoamidase aktiv [13, 15, 18]. SIRT4 hemmt die anaplerotische Reaktion des Citratzyklus durch Inhibition der Pyruvat- und Glutamatdehydrogenase (PDH und GDH) (Abb. 1 und [35]). SIRT4 wirkt somit als metabolischer Tumorsuppressor, dessen Expression in verschiedenen Tumorarten herunterreguliert ist [36, 37]. SIRT5 ist eine Demalonylase und eine Desuccinylase [15]. Es reguliert verschiedene Stoffwechselprozesse, unter anderem die Fettoxidation und den Harnstoffzyklus.

SIRT5-Reduktion erhöht die mitochondriale NADH/H⁺-Menge und unterdrückt die ATP-Produktion [38]. SIRT5 deacetyliert und aktiviert die Carbamoylphosphat-Synthase I (CPS1). CPS1 katalysiert den initialen Schritt des Harnstoffzyklus und spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Harnstoffentsorgung und Detoxifikation [39]. Obwohl vor allem SIRT1, aber auch SIRT4 als Tumorsuppressoren beschrieben werden, zeigt SIRT5 eine Hochregulation in transformierten Zellen. SIRT5 unterstützt die Proliferation und Tumorigenese unter anderem durch die Stabilisierung der Glutaminase in Tumorzellen [40].

SIRT6 wirkt als Histondeacetylase und beeinflusst die Expression vieler Gene, die an der Glykolyse beteiligt sind [26]. So manifestieren sich schwere metabolische *imbalance* durch Defekte in der SIRT6-Funktion, die zum Auftreten einer akuten Hyperglykämie und in Mausmodellen zum vorzeitigen Tod führen [26]. Darüber hinaus schützt SIRT6 die DNA durch Basenexzisionsreparatur (BER) vor Schäden und oxidativem Stress [41].

Das im Zellkern vorkommende SIRT7 ist eine wesentliche Komponente bei der Regulation des Tumorsuppressors p53. Bei zellulärem Stress trägt SIRT7 zur Stabilisierung von p53 bei und ermöglicht so den Zellzyklusarrest und die DNA-Reparatur [42]. SIRT7 ist auch in der Lage, selektiv die Acetylgruppe von H3K18 zu entfernen [43]. Als weiteres Substrat wurde unter anderem die RNA-Polymerase I beschrieben [44].

Molekulare Funktion		N-Terminus	Katalytische Domäne	C-Terminus	gesamte Länge (AS)	Primäre Lokalisation
Deacetylase, Decrotonylase	SIRT1				747	Zellkern
Deacetylase, ADP-Ribosyltransferase, Decrotonylase, Demyristoylase	SIRT2				389	Zytoplasma
Deacetylase, Decrotonylase	SIRT3				399	Mitochondrium
Deacetylase, ADP-Ribosyltransferase, Decrotonylase, Lipoamidase	SIRT4				314	Mitochondrium
Deacetylase, Desuccinylase, Deflutarylase, Demalonylase	SIRT5				310	Mitochondrium
Deacetylase, ADP-Ribosyltransferase, Demyristoylase	SIRT6				355	Zellkern
Deacetylase	SIRT7				400	Zellkern

Abb. 2: Schematische Struktur der humanen Sirtuin-Familie.

Die katalytische Domäne des Proteins (blau) beinhaltet im Kern ein Histidin (rot), das als Elektro-neneakzeptor agiert und die NAD⁺-abhängige Enzymaktivität ermöglicht. Die zentrale Domäne wird von paralogspezifischen N- und C-Termini (weiß) umrahmt.

1.3 Mitochondriale und extramitochondriale Funktionen von SIRT4

SIRT4 ist ein Protein, das hauptsächlich in den Mitochondrien vorkommt. Dort reguliert es unter anderem die ATP-Homöostase. SIRT4 beeinflusst die mitochondriale Entkopplung durch ANT2, dieser wiederum transportiert ADP und ATP über die innere Mitochondrienmembran [13]. Das Fehlen von SIRT4 führt daher zu niedrigen zellulären ATP-Spiegeln, während die Überexpression von SIRT4 mit erhöhten ATP-Spiegeln assoziiert ist [45]. SIRT4 ist ein Modulator der Alterung in der mitochondrialen Qualitätskontrolle. Die Zunahme von SIRT4 wurde in verschiedenen Alterungsmodellen gezeigt, z.B. in humanen dermalen Fibroblasten lichtgealterter Haut [37]. Dabei wurde miR-15b als regulatorische microRNA identifiziert, die die Expression von SIRT4 auf mRNA- und Proteinebene herunterreguliert [37].

Die Überexpression von SIRT4 fördert die Zunahme der langen aktiven Form der GTPase *optic atrophy 1* (L-OPA1) (Abb. 1), die für die *fusion* der Mitochondrien

verantwortlich ist [46]. Zusätzlich erhöht die Überexpression von SIRT4 die H₂O₂-Mengen und senkt das mitochondriale Membranpotential [47]. SIRT4 hat auch einen entscheidenden Einfluss auf den Energiestoffwechsel der Zelle [48]. Es konnte gezeigt werden, dass SIRT4 die Insulinsekretion in den Mitochondrien von Betazellen als Reaktion auf Glucose- und Aminosäurestimulation unterdrückt. Die Insulinsekretion wird durch ADP-Ribosylierung der Glutamatdehydrogenase (GDH) reduziert [13, 35]. Darüber hinaus wird SIRT4 als Tumorsuppressor beschrieben, da es in verschiedenen Tumoren herunterreguliert ist [13, 35]. Es wird vermutet, dass die Reduktion der Glutaminaufnahme durch ADP-Ribosylierung der Glutamatdehydrogenase durch SIRT4 eine entscheidende Rolle spielt, wodurch die Proliferation der Tumorzellen gehemmt wird [49]. SIRT4 hemmt auch andere anaplerotische Reaktionen im Citratzyklus. Über die Lipoamidase-Funktion hemmt SIRT4 die Pyruvatdehydrogenase, was wiederum die Produktion von Acetyl-Coenzym A reduziert [50].

SIRT4 enthält eine N-terminale *mitochondrial targeting sequence*, die es dem Enzym ermöglicht, in das Lumen der Mitochondrien zu translozieren [51]. Aufgrund dieser Translokationssequenz wurde angenommen, dass SIRT4 ausschließlich in Mitochondrien vorkommt. Dieses Bild wurde in den letzten Jahren durch mehrere Arbeiten relativiert. Erste Befunde zeigten, dass SIRT4 während der Meiose [52] und Mitose [28] am Spindelapparat zu finden ist. Eine weitere Arbeit beschreibt einen durch mitochondrialen Stress induzierten Transport von SIRT4 in den Zellkern [53]. SIRT4 spielt auch eine Rolle in der extra-mitochondrialen Dynamik der Mikrotubuli, da SIRT4 mit dem Leucine-rich Protein 130 (LRP130) interagiert [54-56], einem Multidomänen- und Dualfunktions-Protein, das an das Mikrotubuli-assoziierte Protein MAP1S bindet. Letztere Proteininteraktion koordiniert somit den mitochondrialen Transport und das Mikrotubuli-Zytoskelett in der Interphase [55].

1.4 Rolle von SIRT4 in der mitochondrialen Dynamik und Qualitätskontrolle

SIRT3, SIRT4 und SIRT5 gelten als klassische Vertreter der Sirtuine, die vorwiegend in Mitochondrien vorkommen. Die subzelluläre Lokalisation dieser Sirtuine konnte durch hochauflösende mikroskopische Aufnahmen verifiziert werden [51, 53, 57]. Darüber hinaus gibt auch das mitochondriale Translokationssignal Aufschluss über die subzelluläre Lokalisation der oben genannten Sirtuine, da es für den Import

in das Mitochondrium kodiert. Dort sind SIRT3, SIRT4 und SIRT5 an vielen biologischen Regulationen beteiligt, unter anderem an der mitochondrialen Dynamik und Qualitätskontrolle [58]. Trotz einer gewissen funktionellen Redundanz unterscheiden sich die mitochondrialen Sirtuine relativ stark voneinander, was sich auch in den unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten der einzelnen Sirtuine widerspiegelt. Auch das Interaktom ist unterschiedlich, so interagiert SIRT3 mit deutlich mehr Proteinen als SIRT4 und SIRT5 [54]. SIRT5 weist im Vergleich der mitochondrialen Sirtuine untereinander die wenigsten Interaktionspartner auf. Allerdings überlappen sich die mitochondrialen *Targets* von SIRT3 und SIRT4, was für eine wechselseitige Regulation des mitochondrialen Stoffwechsels spricht [54]. Die Deacetylaseaktivität der drei mitochondrialen Sirtuine ist unterschiedlich stark und nimmt von SIRT3 über SIRT4 zu SIRT5 stetig ab [59].

SIRT3 wird vor allem in metabolischen Geweben wie braunem Fett, Muskel, Leber, Niere, Herz und Gehirn vermehrt exprimiert, kommt aber auch in allen anderen Geweben in geringen Konzentrationen vor. SIRT3 ist die wichtigste mitochondriale Deacetylase, die als primäre Determinante des Acetylproteoms angesehen wird [60-66]. Die mitochondrialen Sirtuine treten als Gegenspieler und Mitspieler im mitochondrialen Stoffwechsel auf. Durch die ADP-Ribosylierung der GDH, welche die Umwandlung von 2-Glutamat zu alpha-Ketoglutarat katalysiert, wirkt SIRT4 als direkter Regulator der anaplerotischen Reaktion des Citratzyklus [35]. Im Gegensatz dazu deacetyliert SIRT3 die GDH, wodurch die enzymatische Aktivität der GDH erhöht wird [67]. Auch der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) wird von den drei mitochondrialen Sirtuinen wechselseitig beeinflusst. SIRT3 deacetyliert die Pyruvat-Dehydrogenase-Untereinheit E1a, wodurch die Pyruvat-Dehydrogenase aktiviert wird, was zur Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-Coenzym A führt [68, 69]. SIRT4 hingegen hydrolysiert den Lipoamidrest der E2-Untereinheit des PDC, was zu dessen Hemmung führt. Zusätzlich hemmt SIRT5 die Aktivität der PDC über eine SIRT5-vermittelte Desuccinylierung von Lysin [70].

Mitochondriale Sirtuine spielen auch eine entscheidende Rolle in der mitochondrialen Qualitätskontrolle im Rahmen der ROS-vermittelten Signalgebung und Entgiftung. SIRT3 reduziert oxidativen Stress durch indirekte Interaktion mit FOXO3a, welches nach Deacetylierung in den Zellkern transloziert und dort die Expression von Mangan-Superoxiddismutase und Katalase erhöht. Dadurch wird vermehrt Su-

peroxid zu H₂O₂ umgesetzt [54, 71-73]. In den Mitochondrien wird die Mangan-Superoxiddismutase auch direkt durch Sauerstoffradikale reduziert [72, 73]. SIRT5 hat einen synergistischen Effekt, indem es den zellulären ROS-Spiegel durch Desuccinylierung und Aktivierung der Kupfer-Zink-abhängigen Superoxiddismutase senkt [74]. Außerdem desuccinyliert SIRT5 die Isocitratdehydrogenase 2 und deglutaryliert die Glucose-6-phosphatdehydrogenase, wodurch die Isocitratdehydrogenase 2 und die Glucose-6-phosphatdehydrogenase aktiviert werden, was die Produktion von NADPH/H⁺ fördert, was wiederum zur Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase beiträgt [10]. SIRT4 hat einen entgegengesetzten Effekt, da es die Deacetylierung der Mangan-Superoxiddismutase hemmt [75]. Ein synergistischer Einfluss besteht in Bezug auf die *fusion* der Mitochondrien. Hier fördert SIRT3 die *fusion*, indem es OPA1 deacetyliert und dadurch dessen GTPase-Aktivität erhöht [22]. SIRT4 ist ebenfalls ein Regulator von OPA1 und stabilisiert hier die *fusion*-fördernde OPA1-L-Form. Somit sind beide Sirtuine an der Regulation der mitochondrialen *fusion* und Dynamik beteiligt [46].

1.5 RAF-Kinase Paraloge und deren Rolle in der mitochondrialen Dynamik und Qualitätskontrolle

RAF-Paraloge sind Proteine, die zur Gruppe der Serin/ Threonin-Proteinkinasen gehören. Sie umfassen die Paraloge ARAF, BRAF und CRAF, wobei letzteres auch als RAF-1 bezeichnet wird. Nach der Entdeckung des viralen Onkogens v-RAF, das 1983 aus einem murinen Retrovirus isoliert wurde, folgte 1985 die Entdeckung des zellulären Homologs CRAF und in der Folge die Erstbeschreibung von BRAF und ARAF [76, 77]. Die drei humanen RAF-Paraloge regulieren eine Vielzahl biochemischer Prozesse, darunter Proliferation, Zelldifferenzierung, Stressantwort und Apoptose [78-83]. Da die RAF-Kinasen entscheidende Prozesse in der Zellentwicklung steuern, ist es nicht verwunderlich, dass eine Fehlfunktion immense Auswirkungen auf die Gesundheit haben kann. Dazu gehören Herz-Kreislauf-Erkrankungen, genetische Erkrankungen und Krebs [84-89]. Innerhalb der RAF-Proteine gibt es drei konservierte Regionen (CR), die für ihre jeweiligen regulatorischen Funktionen (CR1 und CR2) und Kinaseaktivitäten (CR3) wichtig sind [90]. CR1 enthält eine *RAS binding domain* (RBD), die die RAS-Bindung vermittelt, und eine *cystein rich domain* (CRD), die an die Membran bindet und die RAS/ RBD-Affinität an der Membran erhöht [91-93]. CR2 ist mit verschiedenen Ser/ Thr-Resten angereichert,

darunter Serin 259 (S259), das für die inhibitorische Phosphorylierung und 14-3-3-Bindung wichtig ist, die wiederum die RAF-Kinaseaktivität reguliert [94]. CR3 fungiert als katalytische C-terminale Region und stellt ein mögliches Phosphorylierungssegment für die Aktivierung der Kinase dar [95]. Insbesondere RAS und 14-3-3 sind wichtige Regulatoren für die Aktivierung von RAF, Membranrekrutierung und Stabilisierung [96, 97].

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass RAF-Kinasen ein integraler Bestandteil des RAS-MAPK-Signalwegs sind, der mit verschiedenen Signaltransduktionskaskaden interagiert [49, 98-101]. Nach rezeptorvermittelter Aktivierung dieses Signalwegs durch extrazelluläre Signale kommt es zur Aktivierung von RAS-Proteinen [101, 102], wobei der RAF-MEK-ERK-Signalweg als nachgeschalteter intrazellulärer Signalweg fungiert. Mitglieder der RAS-Familie sind häufig mutierte Onkogene bei menschlichen Krebserkrankungen. Säugerzellen besitzen vier gut charakterisierte und weitgehend erforschte MAPK-Signalwege. Diese Kaskaden umfassen drei Proteinkinasen, die durch Phosphorylierung aktiviert werden und ihrerseits weitere Proteine phosphorylieren können. Dazu gehören die MAPK-Kinase-Kinase, eine MAPK-Kinase und eine MAPK. Die terminalen Serin/Threonin Kinasen (MAPKs) sind ERK1/2, c Jun N-terminale Kinase (JNK1/2/3, auch SAPKs genannt), p38 Kinase (p38 alpha/ beta/ gamma/ delta) und ERK5. Die MAPK-Kaskade fungiert als nachgeschaltete Einheit, die über Zelloberflächenrezeptoren und zytoplasmatische Signalproteine gesteuert wird. Im Allgemeinen wird der ERK1/2-Signalweg durch Wachstumsfaktor-stimulierte Oberflächenrezeptoren aktiviert, während JNK, p38 und ERK5-Signalwege durch Stress und Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Viele Substrate der MAPKs sind nukleäre Transkriptionsfaktoren. Aktivierte ERKs phosphorylieren über 160 Substrate, überwiegend nukleäre Proteine, wobei weitere Substrate auch im Zytoplasma oder anderen Organellen gefunden wurden [103-105].

Im Rahmen dieser Dissertation ist der Einfluss der verschiedenen RAF-Kinasen auf die Mitochondrien von besonderer Bedeutung, so zeigen Galliche et. al., dass CRAF in oder an den Mitochondrien lokalisiert ist. Durch die funktionelle Bindung an MEK reguliert CRAF die Verteilung und Form der Mitochondrien [106]. Auch ARAF wurde in den Mitochondrien gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass ARAF mit *hTom* und *hTom* interagiert, die wiederum Teil des mitochondrialen Proteintransportsystems sind. Dieses Ergebnis dient als Grundlage für ein Modell, das

ARAF als Teil einer koordinierten zellulären Kontrolle der mitochondrialen Funktion betrachtet [107].

1.6 Identifikation von ARAF und CRAF/ RAF-1 als SIRT4-Interaktoren mittels massenspektrometrischer Proteomanalyse

Im Rahmen einer massenspektrometrischen Proteomanalyse von SIRT4-interagierenden Proteinen konnten verschiedene neue potentielle Bindungspartner von SIRT4 identifiziert werden [57]. Unter diesen Interaktionspartnern befanden sich überraschenderweise auch ARAF und CRAF als *bona fide* extramitochondriale Proteine und zentrale Regulatoren des MAPK-Signalweges. Vor Beginn der Arbeit war bekannt, dass die Aktivierung von ERK2 zur Phosphorylierung (S616) und damit zur Aktivierung des pro-*fi*sson Faktors DRP1 führt [108], was wiederum die Mitophagie fördert. Interessanterweise hemmt SIRT4 diese ERK-vermittelte Phosphorylierung von DRP1 und damit die mitochondriale *fi*ssion [109].

An welcher Stelle des RAF-MAPK-Signalwegs SIRT4 hemmend eingreift, war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

1.7 Ziele der Arbeit

Aus den Vorarbeiten im Labor und der Literatur ergeben sich folgende Fragestellungen und Ziele für die vorliegende Arbeit:

1. Welche subzelluläre Lokalisation weisen die RAF-Paraloge ARAF, BRAF und CRAF auf? Diese Frage sollte biochemisch mittels subzellulärer Fraktionierung und zellulär mittels konfokalen-mikroskopischen Analysen geklärt werden.
2. Interagiert SIRT4 mit RAF-Proteinen? Diese Frage sollte wiederum biochemisch mittels Koimmunpräzitationsanalyse und subzellulär mittels konfokal-mikroskopischer Experimente geklärt werden.
3. Welche funktionelle Relevanz hat die vermutete SIRT4-RAF Kinase-Protein-Interaktion in Bezug auf den mitochondrialen *fission* Regulator DRP1? Die Aktivierung von DRP1 sollte mittels *Westernblot* Analyse in Zellen untersucht werden, in denen die Expression von ARAF (shRNA) oder CRAF (CRISPR-Cas9-vermittelter *knockout*) inhibiert wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien/ Lösungen	Hersteller
1x Collagen IV Lyophilisat	Sigma
2-Mercaptoethanol	SIGMA Life Science
2-Propanol	VWR
3-(<i>N-morpholino</i>)propansulfonicacid (MOPS)	ICN
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich
Aceton	Merck
Acrylamid	
Agarose	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem
Bromphenolblau	
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
CCCP	
CHAPS	Roth
CO ₂ independent media [-] Glutamine	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DSMO)	Sigma-Aldrich
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	GERBU Biotechnik
Dulbeccos´ s Modified Eagle Medium 1x (DMEM)	Invitrogen
Ethanol	VWR
Fetales Kälberserum (FBS)	Invitrogen
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Scientific
Geneticin (G418)	Genaxxon Bioscience
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
HCl	Roth
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Roth
Igepal (NP40)	Merck
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kalziumchlorid (KCl)	Merck
L-Glutamine	Millipore
LB-Agar-Powder	AppliChem
Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent	Invitrogen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich
Mangan(II)-chlorid (MnCl ₂)	Roth
Mannitol	
Methanol	VWR
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumcitrat	Merck

Chemikalien/ Lösungen	Hersteller
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Merck
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Paraformaldehyd	Merck
PBS (Dulbecco´s Phosphat gepufferte Salzlösung 10x)	PAN Biotech
Penicillin/Streptomycin-Lösung (P/S)	Genaxxon Bioscience
Piperazin-N,N`-bis (2-ethansulfonsäure) (PIPES)	AppliChem
PMSF	Sigma
Ponceau S	SERVA
Prolong Gold Antifade Medium	Invitrogen
Propidiumiodid	SIGMA Life Science
Puromycin	GENAXXON Bioscience
Roti®-Histofix	Roth
Rotiforese-Gel	Roth
Rotipore 5 x <i>Bradford reagent solution</i>	Roth
Sodium orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	SIGMA Life Science
Sucrose	
TAE-Puffer	
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Trehalose	
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck
Trypanblau 0,4%	BIO-RAD
Trypsin	Genaxxon Bioscience
TurboFect <i>Transfection Reagent</i>	Life Technologies
Tween-20	Sigma-Aldrich
β-Glycerophosphat	SIGMA Life Science
<i>Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche

2.1.2 Enzyme

Enzyme	Hersteller
HIND III	Thermo Scientific
NOT I	Thermo Scientific

2.1.3 Puffer und Medien

Puffer und Medien

Ko-IP Waschpuffer

Herstellung

Tris-HCl, pH 7,4 50 mM
Chaps 0,3 %
Deoxycholate Na⁺ 0,25 %
NaCl 120 mM
EDTA 1 mM
PMSF 1 mM
Na₃VO₄ 1 mM
NaF 1 mM

EDTA (0,5 M) Stocklösung 200 ml

37,22 g Na₂EDTA 2H₂O
140 ml H₂O
Einstellen auf pH 8.0
Mit 200 ml mit Milli-Q-Wasser auffüllen

10 x Running Buffer Stocklösung (5 l)

Tris-HCl 150 g (0,125 M)
Glycine 720 g (0,96 M)
SDS 50 g (0,5 (w/v))
Auf 5 l mit Milli-Q-Wasser auffüllen

10 x Blotting Buffer Stocklösung (1 l)

Einstellen auf pH 8,3
Tris 30,29 g (0,25 M)
Glycin 142,63 g (1,9 M)
Auf 1 l mit Milli-Q-Wasser auffüllen

1 x Blottingbuffer (2 l)

10 x Blottingbuffer 200 ml
Methanol 400 ml
Milli-Q-Wasser 1400 ml
Vor Gebrauch frisch ansetzen

10 x TBS Stocklösung (2 l)

Tris 121,14 g (500 mM)
NaCl 175,32 g (1500 mM)
Einstellen auf pH 7,5
Autoklavieren

5 x Laemmli Stocklösung (40 ml)

SDS 10% (8 ml)
Glycerin/ Glycerol 100% (4 ml)
1M Tris HCl pH 6,8 (1 ml)
β-Mercaptoethanol (2 ml)
Auf 40 ml mit Milli-Q-Wasser auffüllen

1% Agarosegel

Agarosepulver (5 g)
1 x TAE-Buffer (500 ml)
Einmal aufkochen, vor jedem Gebrauch ebenfalls aufkochen

Puffer und Medien

Trenngelpuffer (TGP) Stocklösung (1 l)

Sammelgelpuffer (SGP) Stocklösung (1 l)

Trenngel (10 %)

Sammelgel (10 %)

Herstellung

Tris-HCl 181,71 g (1,5 M)

SDS 4 g (0,4%)

Auf 950 ml mit Milli-Q-Wasser auffüllen

Einstellen auf pH 8,8

Anschließend auf ein Gesamtvolumen von 1 l mit Milli-Q-Wasser auffüllen

Tris-HCl 60,57 g (0,5 M)

SDS 4 g (0,4%)

Auf 950 ml mit Milli-Q-Wasser auffüllen

Einstellen auf pH 6,8

Anschließend Gesamtvolumen von 1 l mit Milli-Q-Wasser auffüllen

H₂O 8 ml

Acrylamid 6,6 ml

TGP 5,2 ml

10 % APS 200 µl

TEMED 8 µl

H₂O 3,4 ml

Acrylamid 1 ml

SGP 1,5 ml

10 % APS 60 µl

TEMED 6 µl

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primärantikörper

Antikörper (Spezies)

anti-ARAF (C20) (aus Hase)

anti-ARAF (A-5) (aus Maus)

anti-ATP5A1 (aus Hase)

anti-β-Actin (aus Maus)

anti-CRAF (aus Maus)

anti-FLAG M2 (aus Hase)

anti-FLAG M2 (aus Maus)

anti-GAPDH (aus Maus)

anti-GAPDH (aus Maus)

anti-GFP (aus Maus)

anti-GFP (aus Maus)

anti-Lamin A/C (aus Hase)

anti-MTC02 (aus Maus)

anti-MTC02 (aus Maus)

anti-Na/K-ATPase (aus Maus)

anti-pDRP1 Ser616 (aus Maus)

Hersteller/ Vertreiber

Santa Cruz (sc-408)

Santa Cruz (sc-166771)

Proteintech (14676-1-AP)

Santa Cruz (sc-47778)

Santa Cruz

Sigma Aldrich (F7425)

Abcam (ab49763)

Abcam (ab8245)

Santa Cruz (sc-47724)

Roche (14717400)

Roche (1181446001)

Cell Signaling

Abcam (ab3298)

Santa Cruz (sc-166178)

Sigma

Cell Signaling

Antikörper (Spezies)

anti-Raf1 (aus Hase)
anti-SIRT4 (aus Hase)
anti-SIRT4 (aus Maus)

Hersteller/ Vertreiber

Abcam(ab181115)
Santa Cruz (sc-135053)
Sigma-Aldrich
(SAB1407208)

2.1.4.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper

Alexa Fluor®488 dye anti-*goat* IgG
Alexa Fluor®488 dye anti-*mouse* IgG
Alexa Fluor®488 dye anti-*rabbit* IgG
Alexa Fluor®546 dye anti-*mouse* IgG
Alexa Fluor®546 dye anti-*rabbit* IgG
Alexa Fluor®546 dye anti-*rat* IgG
Alexa Fluor®633 dye anti-*mouse* IgG
Alexa Fluor®633 dye anti-*rat* IgG
IRDye® 680RD anti-*rabbit*
IRDye® 800CW anti-*goat*
IRDye® 800CW anti-*rabbit*

Hersteller

Invitrogen
LI-COR
LI-COR
LI-COR

2.1.5 Vektoren und Plasmide

pcDNA3.1-Sirt4-GFP
pLKO.1 puro ARAF shRNA 116
pLKO.1 puro ARAF shRNA 244
pLKO.1 puro ARAF shRNA 567
pLKO.1 puro ARAF shRNA 571
pLKO.1 puro ARAF shRNA 981
pLKO.1 puro leer Vektor
pCMV-FLAG-ORF ARAF
pCMV-FLAG-ORF BRAF
pCMV-FLAG-ORF CRAF

AG Piekorz
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
SinoBiologicals
Sinobiologicals
SinoBiologicals

2.1.6 Bakterienstämme

E.coli DH5α

2.1.7 Laborgeräte

Laborgeräte

Bio Budget
Block-Heater
Electrophoresis Power Supply EPS 600
FACS Calibur + Flowing Software
Function Line
Gel Imager
Infinite M200Pro Decan Reader
Inkubator Hera Cell
Kaltzentrifuge Centrifuge 5417R
Lichtmikroskop Axiovert 28
LSM 510-Meta 200M (Konfokalmikroskop)

Hersteller

Technologies GmbH
Stuart Scientific
Pharmacia
BD Bioscience
Heraeus
Intas
Tecan
Heraeus
Eppendorf
Zeiss
Zeiss

Laborgeräte

Neubauer Zählkammer
Nikon Eclipse TE2000-E
Odyssey Infrared Technology
PCR-Mastercycler
pH-meter
Peqlab Nano Drop 2000c
Schüttelinkubator 3031
Shaking Incubator-Multitron
Sterilbank Hera Safe
Tecan Microplate Reader
Thermo-Shaker
UV-Kammer
Vortexer: VF 2
Zentrifuge 5424
Zentrifuge 5810R

Hersteller

Neubauer
Nikon
LI-COR
Eppendorf
Inolab
Thermo Scientific
GFL
INFORS
Heraeus
Tecan
Universal Labortechnik
INTAS
IKA Labortechnik
Eppendorf
Eppendorf

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Sonstige Materialien

100 Zellkultur Schale
12-*well* Zellkulturplatte
150 mm Zellkultur Schale
24-*well* Zellkulturtestplatte
6-*well* Zellkulturtestplatte
Amersham Protran Nitrocellulosemembran
Cell scraper
Counting slides
Deckgläser Ø 18 mm
Deckgläser Ø 22 mm
FACS Canto II
Filterpapier *Westernblot*
Glas-Pasteurpipetten
Graduated Tips, 1250 µl XL
Graduated Tips, 300 µl
Graduated Tips, 10 µl
ibi Treat 60µ-Dish (Lebendzellaufnahmen)
Kolben, 50 ml
Kolben, 100 ml
Kolben, 250 ml
Kolben, 500 ml
Kolben, 1000 ml
Küvetten
Laborflasche, 250 ml
Laborflasche, 500 ml
Laborflasche, 1000 ml
Laborflasche 2000 ml

Hersteller

TPP
TPP
TPP
CytoOne
CytoOne
GE Health Care Life Sciences
Greiner bio-one
BIO-RAD
VWR
VWR
BD Bioscience
WhatmanTM
BRAND
Tip One
Tip One
Tip One
Ibidi
DURAN
DURAN
DURAN
DURAN
DURAN
Sarstedt
DURAN
DURAN
DURAN
DURAN

Sonstige Materialien

Objektträger
Omnifix-Spritzen (5 ml)
Petri-Dish (Bakterien)
Polystyrene Round-Bottom Tube, 5 ml
Safe Seal Microtubes 1,5 ml
Stripette, 5ml
Stripette, 10 ml
Stripette, 25 ml

Hersteller

NeoLab
BRAUN
Greiner bio-one
Falcon
Sarstedt
Costar
Costar
Costar

2.1.9 Zelllinien

Humane Zelllinien - Bezeichnung

HEK293
HEK293-eGFP
HEK293-SIRT4-eGFP
HEK293-SIRT4-(H161Y)-eGFP
HEK293-SIRT4-(Δ 28)-eGFP
HeLa
HeLa-pUC-eGFP
HeLa-pUC-SIRT4-eGFP
SKBR3
SKBR3-CRAF- *knockout*

Beschreibung, Spezies, Herkunft

Embryonale Nierenzellen,
AG Piekorz / DSMZ
Embryonale Nierenzellen,
AG Piekorz [110]
Epithelzellen Zervixkarzinom
AG Piekorz / DSMZ
Epithelzellen Zervixkarzinom
AG Piekorz [57]
Epithelzellen Zervixkarzinom
AG Piekorz[57]
Epithelzellen Adenokarzinom
AG Ahmadian/ DSMZ
(unpubliziert)
Epithelzellen Adenokarzinom
AG Ahmadian
(unpubliziert)

2.1.10 Kits

Kits

NucleoBond® Xtra Midi / Maxi

Hersteller

Machery-Nagel

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Bakterielle Transformation

Unter Transformation versteht man das Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien mit dem Ziel, die Plasmid-DNA zu vermehren. Bei der Transformation von Plasmid-DNA wurde das Plasmid zunächst in 20 µl gereinigtem Wasser verdünnt. Im nächsten Schritt wurden kompetente *E. coli* Bakterienstämme auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die Plasmidsuspension (1µg/µl; 1 µl) in die Bakteriensuspension gegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt.

Dieser Ansatz wurde dann für zwei Min. auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock von 45 Sek. bei 42 °C. Danach wurden die Bakterien direkt wieder auf Eis gelagert. Die Bakteriensuspension wurde mit 200 µl LB-Medium versetzt. Diese Lösung wurde 40 Min. bei 350 rpm und 37 °C im Thermoinkubator geschüttelt. Anschließend wurde die gesamte Lösung mit einer Pipette aufgenommen, auf eine mit Antibiotika (Kanamycin 50 µg/ ml) behandelte Selektions-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.2 Bakterielle Kultivierung zwecks Plasmidisolierung

Zur Kultivierung des transformierten Bakterienstammes wurden 200 ml LB-Medium in einem 1-L-Erlenmeyerkolben verwendet. Dazu wurde eine Kolonie von der Agarplatte abgenommen und mit dem LB-Medium im Erlenmeyerkolben inokuliert. Anschließend wurde das Selektionsantibiotikum zugegeben. Alle Schritte wurden in der Nähe einer blauen, rauschenden Flamme durchgeführt.

Über Nacht wurde der Erlenmeyerkolben in einen Schüttelinkubator gestellt und bei 37 °C und 110 rpm für ca. 16 Std. inkubiert.

2.2.1.3 Glycerolkonservierung von Bakterienstämmen

Nach der Herstellung der Bakterienkultur sollte diese in Glycerin konserviert werden. Dazu wurden 500 µl der Vorkultur mit 500 µl einer mit destilliertem Wasser verdünnten Glycerinlösung (65 %) versetzt. Anschließend wird der Glycerolstock in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt, für 60 Sek. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in einem Ultratiefkühlschrank bei - 80 °C gelagert.

2.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Maxi-Präp)

Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit einem Kit der Firma Marchery Nagel (Düren). Zunächst wurde das Bakterienpellet aufgetaut und in einem Gefäß mit 12 ml Buffer RE-ES mit RNase A 50 mg in 500 ml Buffer RES gelöst. Das gelöste Pellet wurde fünfmal mit 12 ml Puffer LYS-EF invertiert. Ein in eine Säule eingesetzter Spezialfilter aus dem Kit wurde in eine Haltevorrichtung gestellt und mit 25 ml Buffer EQ-EF benetzt, indem der Buffer in kreisenden Bewegungen über den Filterrand gegossen wurde. In das 15 ml Falcon-Gefäß wurden 12 ml Puffer NEU-EF gegeben und so lange invertiert, bis die Lösung ihre blaue Farbe verlor, und 5 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei 4000 rpm für 5 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der klare Überstand abgenommen und auf den Filterrand gegeben. 10 ml Puffer FIL-EF wurden auf den Filterrand gegeben und es wurde gewartet, bis die gesamte Flüssigkeit durchgelaufen war. Anschließend wurde der Filter von der Säule entfernt. In weiteren Schritten wurden 90 ml Puffer ENDO-EF und 35 ml Puffer WASH-EF durch die Säule gegeben. Anschließend wurde ein neues Gefäß unter die Säule gestellt und 15 ml Puffer ELU-EF in die Säule gegeben. Die Säule konnte weggeworfen werden. Das Gefäß wurde mit 10,5 ml Isopropanol (Electran, Propan-2-ol) versetzt und bei 4500 x g für 30 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen, 5 ml 70%iges Ethanol zugegeben und erneut bei 4500 x g für 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde das Plasmidpellet getrocknet und in 500 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Nach erneutem Mischen auf einem Schüttler konnte die DNA-Konzentration bestimmt werden (*Nanodrop*, siehe unten).

2.2.1.5 Restriktionsverdauanalyse

Zur Verifizierung des isolierten Plasmids wurden geeignete Restriktionsenzyme eingesetzt, die in der Lage waren, die ringförmige Plasmid-DNA zu linearisieren bzw. Fragmente definierter Länge herauszuschneiden. Je nach Plasmid wurden die geeigneten Restriktionsenzyme und Puffer den entsprechenden Datenblättern entnommen. Neben dem Restriktionsverdau wurde parallel eine Plasmidkontrollprobe ohne Verdau mit Restriktionsenzymen eingesetzt und analysiert.

2.2.1.6 DNA-Gelelektrophorese

Die (un)geschnittenen Plasmide wurden anschließend zur Größenkontrolle mittels Gelelektrophorese unter Verwendung eines 1%igen Agarosegels aufgetrennt. Dazu wurden 2 g Agarose in 200 ml 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle bis zur Verflüssigung erhitzt und anschließend in einer bereits vorbereiteten Gelgießvorrichtung mit entsprechendem Kamm geliert. Die vorherige Zugabe von 2,5 µl HD-Green in die Agarose dient der späteren UV-Detektion der DNA-Fragmente. Die zuvor im Restriktionsverdau geschnittenen DNA-Fragmente werden im Agarosegel nach ihrer Größe (d. h. nach der Anzahl ihrer Basenpaare) aufgetrennt. So kann durch die Bestimmung der spezifischen Größe der DNA-Fragmente die erfolgreiche Isolierung und die Identität des Plasmids überprüft werden.

2.2.1.7 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle wurde das relative Verhältnis von DNA zu Protein in einem Photospektrometer (Nanodrop) bestimmt. Dazu wurde ein Mikroliter der Plasmid-DNA in die Messspitze gegeben. Die Plasmidkonzentration wurde in µg/µl angegeben.

2.2.1.8 Transfektion von Plasmid-DNA

Der Transfer der codierenden cDNA-Sequenzen in eine Zelle erfolgt über ein isoliertes Plasmid, das in eukaryotische Zellen eingebracht wird. Dadurch kann das gewünschte Protein über die zelleigene Proteinbiosynthese ektopisch exprimiert werden. Dabei kann der Expressionsvektor, der für das gewünschte Protein kodiert, transient oder stabil transfiziert werden. Um das isolierte Plasmid in die Zelle einzuschleusen, wurden geeignete Transfektionsreagenzien benötigt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit Lipofectamin 3000, Turbofekt und der CaCl₂-Methode gearbeitet. Die CaCl₂-Methode wurde hauptsächlich für die HEK293 Zelllinien verwendet. Dazu wurden 24 Std. vor der Transfektion ca. 1 Mio. Zellen in 30 ml Dulbeccos *Modified Eagles* Medium (DMEM^{+/+}) in eine 15 cm Zellkulturschale ausgestrichen. Bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 60-70 % wurde eine Transfektionslösung hergestellt. Diese enthielt 15 µg der gewünschten Plasmid-DNA, 445 µl steriles Wasser und 55 µl CaCl₂ (2,5 M) in einem Endvolumen von 500 µl, dem 500 µl 2 x BBS unter Erzeugung von 4 bis 6 Luftblasen zugegeben wurden. Diese Lösung wurde dann vorsichtig auf die Zellen getropft und das Medium durch vorsichtiges

Schwenken gemischt. Nach 6-8 Std. wurde das Medium gewechselt, um der zelltoxischen Wirkung des Transfektionsreagenzes entgegenzuwirken. Die Transfektion mit Turbofect wurde meist in Verbindung mit konfokaler Mikroskopie auf 24-well-Platten durchgeführt. Dabei wurden 75.000 Zellen 24 h vor der Transfektion ausgesät. 100 µl serumfreies DMEM wurden mit 1 µg Plasmid-DNA und dem doppelten Volumen Turbofect versetzt. Mit Opti-MEM wurde auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die Transfektionslösung für 15 - 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Bei einer Zellkonfluenz von 70 - 90 % wurde die Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben, wobei die Ansätze geschwenkt wurden, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Nach 48 Std. bei 37 °C im Zellinkubator konnten die Zellen für die Analyse verwendet werden. In einigen Fällen erfolgte die Transfektion mit der Lipofectamin 3000-Methode, ebenfalls hauptsächlich für die konfokale Mikroskopie. Die Aussaat der Zellen erfolgte analog zur Transfektion mit Turbofect in 24-well Platten. 24 Std. später wurden 2,5 µl Lipofectamin LTX und 62,5 µl Opti-MEM in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. In ein weiteres 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden 0,5 µg Plasmid-DNA, 0,625 µl Plus Reagenz und 31,25 µl Opti-MEM gegeben. Anschließend wurden die beiden Lösungen gemischt und 50 µl pro Well für die Transfektion verwendet. Die Zellkonfluenz bei der Transfektion sollte ebenfalls 60 - 70% betragen. Nach 24 Std. bei 37 °C im Zellinkubator konnten die transfizierten Zellen isoliert und analysiert werden.

2.2.1.9 Generierung stabil transfizierter Zelllinien

Mit Hilfe von shRNA-kodierenden Expressionsplasmiden der Firma Sigma-Aldrich (pLKO.1) wurden HeLa-Zelllinien generiert, die shRNAs gegen die ARAF-Kinase exprimierten. Die Expressionsplasmide wurden zuvor durch Transformation in kompetente Bakterienstämme gewonnen und isoliert. Zur Selektion stabil transfizierter Zellen wurden die shRNA-kodierenden Expressionsplasmide mit einer Puromycin-Resistenz verwendet. Die Transfektion wurde mit Turbofect durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden Zellen generiert, die den Basisvektor (pLKO.1) ohne shRNA-Sequenz enthielten. Zur Generierung stabiler Zelllinien wurden die Zellen unter Puromycin-Selektion (2 µl/ ml) gehalten.

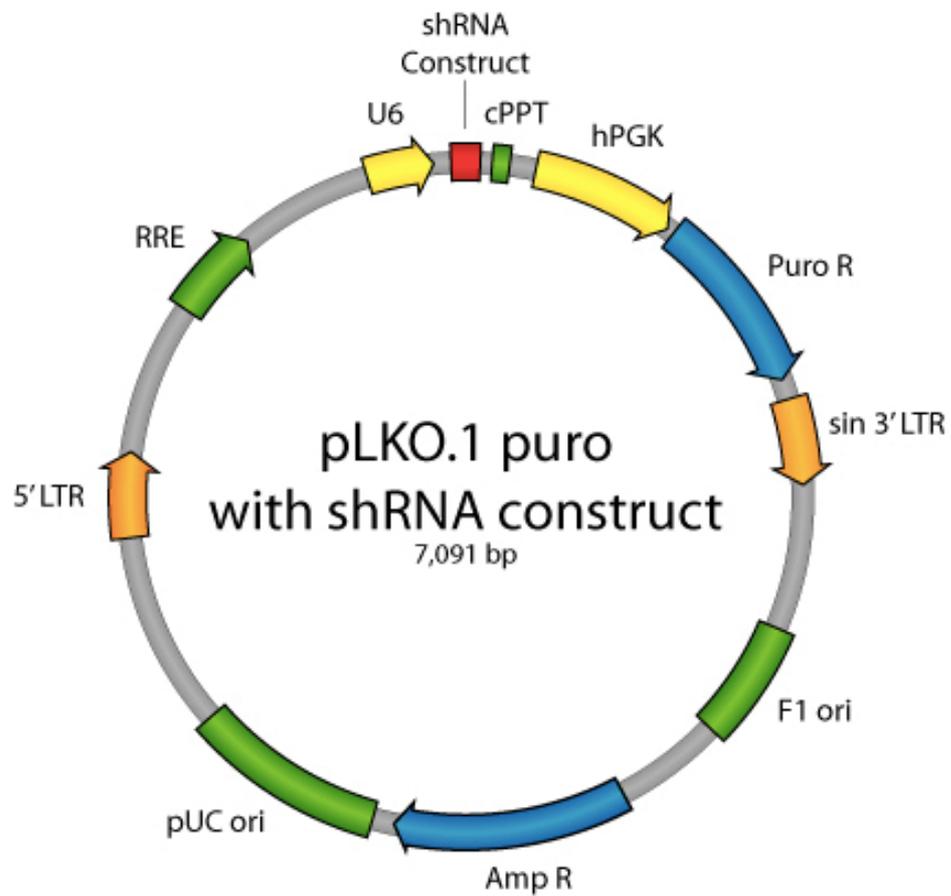


Abb. 3: pLKO.1 puro Vektorkarte der shRNA-Plasmide gerichtet gegen ARAF.

Insgesamt wurden fünf gegen humanes ARAF gerichtete pLKO.1-Vektoren (zusammen mit dem pLKO.1-Kontrollvektor ohne shRNA-Sequenz) analysiert.

Tabelle 1: Sequenzen der shRNA-Plasmide gerichtet gegen ARAF

Bezeichnung	Sequenz
TRCN0000191116	CCAACAGTTCTACCACAGTGT
TRCN0000199244	CCCTGTCTCCTCCATCATTG
TRCN0000000567	CCAGCCAATCAATGTTTCGTCT
TRCN0000000571	GACTCTCAAGGGACGAAAGA
TRCN0000199981	GCACTGATGCTGCCGGTAGTA

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Zellyse und Gewinnung von Proteinlysaten

Zur Gewinnung der Proteinlysate mussten die Zellkompartimente zerstört werden, um das gewünschte Protein verfügbar zu machen. Dazu wurde das alte Medium entfernt und den Zellen vorsichtig 1 x PBS/- (ohne Calcium und Magnesium) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen aus der Zellkulturschale herausgespült. Diese Zellsuspension wurde dann in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß (Falcon) überführt und bei 1200 x g für 5 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml 1 x PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Als nächster Schritt erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 500 x g für 3 - 5 Min. bei 4 °C. Abschließend wurde der Überstand wieder abgenommen und die Zellen mit einer geeigneten Menge Lysis-Puffer versetzt. Im Rahmen dieser Promotion wurden Lysis-Puffer mit 0,5 % NP40 oder 0,3 % CHAPS verwendet. Die Zellen wurden dann kurz in Stickstoff schockgefroren und auf Eis aufgetaut, bevor die Lysate für 20 Min. bei 11.000 x g und 4°C zentrifugiert wurden. Der abschließende Überstand wurde als Gesamtzelllysat gewonnen und bei - 20 °C gelagert.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach *Bradford* erfolgt durch quantitative Bindung des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brillant-Blue G-250 an die Proteine. Die Bindung des Farbstoffs an die negativ geladenen und unpolaren Seitenketten der Proteine führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm [111]. Mittels einer definierten Eichgrade, die aus BSA in verschiedenen Konzentrationen hergestellt wurde, konnte auf die Proteinkonzentration einer Probe geschlossen werden. Die Proben wurden photometrisch analysiert und die Proteinkonzentration in µg/ml angegeben.

2.2.2.3 Anti-eGFP Nanobody-vermittelte Kolimmunopräzipitation

Die anti-eGFP Koimmunopräzipitation wurde mit Zelllysaten durchgeführt, in denen SIRT4-eGFP überexprimiert war. Mit geeigneten anti-eGFP *Nanobody Beads* konnten eGFP Fusionsproteine wie SIRT4-eGFP spezifisch und hochaffin immunopräzipitiert werden. Dazu mussten die anti-eGFP *Nanobody Beads* zunächst gewaschen werden. Für einen Ansatz wurden 30 µl Beads und 500 µl Immunopräzipitation (IP)-

Waschpuffer verwendet. In jedem Waschschrift wurde die Suspension für 5 Min. bei 4°C und 500 x g zentrifugiert, wobei der IP-Waschpuffer nach jeder Zentrifugation ausgetauscht wurde. Nach drei Waschschriften wurden 200 µl Waschpuffer zu den anti-eGFP *Nanobody Beads* gegeben, so dass jeweils 15 µl Beads in 100 µl Volumen gelöst waren. Der Proteingehalt des Zellysats wurde mittels *Bradford*-Test bestimmt. Anschließend wurden 3 mg Protein aus dem Gesamtzellysat mit 100 µl der hergestellten anti-eGFP *Nanobody Beads* Lösung versetzt und diese Ansätze über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert [112].

2.2.2.4 Subzelluläre Fraktionierung

Die subzelluläre Fraktionierung ist ein Verfahren zur Trennung und Anreicherung von Proteinfractionen aus verschiedenen Zellkompartimenten. Hierfür wurde ein Mito-Lysis-Puffer benötigt, der 220 mM Mannitol, 70 mM Saccharose, 1 mM EDTA und 20 mM HEPES bei einem Gesamtvolumen von 50 ml und einem pH-Wert von 7,5 enthielt. Dem Puffer wurde eine Tablette Protease-Inhibitor zugesetzt und mit gereinigtem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Die ständige Kühlung des Mito-Lysis-Puffers und aller Proben während der Durchführung auf Eis war von entscheidender Bedeutung. Zu Beginn wurden die Zellen durch Trypsinisierung von den Zellkulturschalen gelöst, vereinzelt und nach Zentrifugation als Zellpellets isoliert. Ein Teil des Zellpellets wurde für das Gesamtzellysat entnommen, um später als Kontrollprobe zu dienen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml kaltem Mito-Lysis-Puffer resuspendiert. Die Zellyse erfolgte ohne Detergenzien mit einer Insulinspritze durch zehnmaliges Auf- und Absaugen. Die zytoplasmatische Fraktion wurde sechsmal hintereinander bei 16.000 x g für 10 Min. zentrifugiert, wobei jeweils der Überstand abzentrifugiert wurde und das Pellet zurückblieb. Schließlich wurde der Überstand erneut bei 7 000 x g für 15 Min. zentrifugiert. Der verbleibende Überstand definiert die zytoplasmatische Fraktion, während die Pellets die mitochondrial angereicherte Fraktion darstellten. Diese Pellets wurden vereinigt und in 700 µl Mito-Lysis-Puffer resuspendiert. Es folgte eine zweimalige Zentrifugation bei 16.000 x g für 10 Min. bei 4 °C, wobei nach jedem Schritt das Pellet in 900 µl Mito-Lysis-Puffer resuspendiert und der Überstand abgenommen wurde. Es folgte eine dreimalige Zentrifugation bei 7 000 x g für 15 Min. bei 4 °C mit Resuspension in jeweils 900 µl. Schließlich wurde das Pellet in 60 µl Mito-Lysis-Puffer resuspendiert, auf einen Sucrosegradienten aufgetragen und bei 12 000 x g für 5 Min. bei 4 °C

zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde zweimal wiederholt. Das erhaltene Pellet wurde schließlich je nach Größe in 40 - 80 µl Resuspensionspuffer bestehend aus 40 mM Tris-HCl pH, 150 mM NaCl, 3% Glycerin, 0,5 mM DTT und Protease-Inhibitor gelöst. Die Proben wurden bis zur *Western-Blot*-Analyse bei - 80 °C gelagert.

2.2.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Proteinanalyse wurde die *SDS-PAGE* verwendet. Zellysate oder Koimmunpräzipitationen wurden mit dem entsprechenden Laemmli-Denaturierungspuffer versetzt und für 10 Min. bei 95 °C erhitzt. Letzterer enthielt SDS, das den Proteinen eine einheitliche negative Ladung verlieh. Dadurch war es möglich, die Proteine in einem elektrischen Feld weitgehend unabhängig von ihrer Ladung nach ihrem Molekulargewicht zu trennen. Diese wanderten je nach Größe unterschiedlich schnell durch die Gelmatrix. Sowohl die Porengröße der Gelmatrix (d.h. der Gelanteil) als auch die Spannung konnten in Abhängigkeit von der Größe des zu untersuchenden Proteins variiert werden. Anschließend wurden die Proteine mittels *Western Blot* auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran transferiert und durch Immundetektion mit primären und sekundären (fluoreszierenden) Antikörpern visualisiert.

2.2.2.6 Western Blot / Immuno Blot-Analyse

Die mittels *SDS-PAGE* aufgetrennten Proteinlysate wurden im nächsten Schritt auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Um die Proteine von der Gelmatrix auf die Membran übertragen zu können, musste zunächst ein Gefäß mit *Blotting*-Puffer gefüllt werden. Die Nitrocellulosemembran wurde auf einen Schwamm und drei Lagen *Whatman*-Papier gelegt. Darauf wurde das *SDS-PAGE*-Gel luftblasenfrei positioniert, gefolgt von wiederum drei Lagen *Whatman*-Papier und einem weiteren Schwamm. Diese Konstruktion wurde mit einer Klammer umgeben, verschlossen und in einem *Blotting*-Gerät fixiert. Anschließend wurden die Proteine bei einer Spannung von 110 Volt für 40 Min. auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend wurde die Membran für 1 Std. in einer Blockierungslösung (5 % Milchpulver in TBST) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, typischerweise in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:1000 in Blockierlösung, über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurde der sekundäre Antikörper in einer Konzent-

ration von 1:20.000 eingesetzt, um die spezifischen Antikörpersignale mittels Fluoreszenz-Bildgebung durch einen Detektor (LI-COR) messen und dokumentieren zu können.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Für die Kultivierung der humanen Zelllinien wurde ein geeignetes Nährmedium benötigt, das für die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich sein konnte. Für die HEK293-Zelllinien wurde DMEM als Basismedium verwendet.

Das Medium wurde mit einem geeigneten Antibiotikum (Penicillin/ Streptomycin) und FCS (fötale Kälberserum; 10 %) versetzt, um einerseits eine Kontamination mit Bakterien zu vermeiden und andererseits die Zellen ausreichend mit Wachstumsfaktoren zu versorgen. Die Zellen wurden bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % in Zellinkubatoren kultiviert. Eine regelmäßige Kontrolle der Konfluenz und der Färbung des Mediums als Indikator für den pH-Wert des Nährmediums war notwendig, um die Vitalität der Zellen zu erhalten. Wurde eine Konfluenz von mehr als 80 % erreicht, mussten die Zellen geteilt werden. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1 x PBS^{-/-} (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen je nach Zelllinie für 5 - 10 Min. mit Trypsin-EDTA inkubiert, um die Zelladhäsion zu lösen. Die abgelösten Zellen wurden mit 10 ml geeignetem Nährmedium aufgenommen, durch Pipettieren vereinzelt und in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß (Falcon) überführt. Anschließend wurden die Zellen für 5 Min. bei 1200 x g zentrifugiert. Schließlich wurde das Zellpellet in 10 ml geeignetem Nährmedium resuspendiert. Die nun isolierten Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:20 in eine frische T75 Zellkulturflasche ausgestrichen. Um die stabil transfizierten Zellen unter einem konstanten Selektionsdruck zu halten, wurde dem Zellmedium ein geeignetes Selektionsmittel zugesetzt. Im Falle der stabil transfizierten HEK293 Mutanten wurde G418 (Endkonzentration: 400 µg/ml) verwendet. Bei anderen Zelllinien wurde in dieser Arbeit auch Puromycin (2 µg/ml) verwendet.

2.2.3.2 Kryokonservierung von Zelllinien

Für die langfristige Konservierung humaner Zelllinien wurde eine möglichst frühe Passage der Zellen kryokonserviert. Die kryokonservierten Zellen sollten in einer T75 Zellkulturflasche eine Mindestkonfluenz von ca. 70 - 80 % aufweisen, was einer

Konzentration von etwa 1 Million Zellen pro ml entspricht. Vor der Konservierung wurden die Zellen durch Trypsinisierung isoliert. Anschließend wurden sie in Vollmedium resuspendiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit Einfriermedium (4,5 ml FCS und 0,5 ml Dimethylsulfoxid) gemischt und auf fünf 1 ml Cryoröhrchen verteilt. Anschließend wurden die Cryoröhrchen in eine Cryosafebox gestellt, die mit Isopropanol gefüllt war. Die Cryosafebox sorgt für eine gleichmäßige Temperaturabstufung von 1 °C pro Min. im - 80°C-Schrank. Nach einer Verweildauer von 2 Tagen im - 80 °C Schrank konnten die Cryoröhrchen in den Stickstofftank überführt werden.

2.2.3.3 Zellzählung (Neubauer Zählkammer)

Wird für ein Experiment eine möglichst genaue Zellzahl benötigt, können die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt werden. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert und abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen. Anschließend wurden 10 µl dieser Zellsuspension entnommen und mit 10 µl Trypanblau versetzt. Lebende Zellen sind in der Lage, den blauen Farbstoff aktiv auszuschleusen, so dass sich die Farbe in den toten Zellen anreicherte. 10 µl der mit Trypanblau versetzten Zellsuspension wurden in eine entsprechend vorbereitete Neubauer-Kammer gegeben. Dazu wurden zwei leicht angefeuchtete Glasplatten verwendet. Diese mussten so aufeinander geschoben werden, dass sie aneinander haften blieben. Wenn die charakteristischen bläulichen Lichtbrechungen, die so genannten Newtonschen Interferenzfarben, auftraten, war der richtige Abstand des Glasplättchens auf der Neubauer-Zählkammer gewährleistet. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen in den schachbrettartigen Quadranten der Platte gezählt. Anschließend wurde die Zellzahl pro ml Zellsuspension nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Gesamtzahl der gezählten lebenden Zellen} \times 2 \text{ Gesamtvolumen der Probe Mischungsverhältnis (vorher)} \times 100 \times \text{Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Kammern} \times \text{ml}}$$

2.2.4 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Für die konfokale *Laserscanning* Mikroskopie wurden sowohl nicht transfizierte als auch transient oder stabil transfizierte Zellen auf *Coverslips* mit 13 mm Durchmesser in einer 24-well Zellkulturplatte ausgesät. Die Anzahl der ausgesäten Zellen hing von der Größe und der Zellteilungsrate der verwendeten Zelllinien ab. Vor der Aus-

saat wurden die *Coverslips* dreimal mit sterilem PBS-Puffer (mit Calcium und Magnesium; PBS^{+/-}) gespült. Für die Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauerkammer verwendet. Die Zellen wurden tropfenweise auf die *Coverslips* aufgetragen, wobei auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu achten war. Nicht transfizierte Zellen wurden, falls erforderlich, 24 Std. nach dem Aufbringen transfiziert und weitere 48 Std. später fixiert. Die Fixierung erfolgte mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung (PFA). Anschließend wurden die *Coverslips* dreimal mit je 1 ml PBS-Puffer pro *well* gewaschen. Die Fixierung der adhärennten Zellen erfolgte mit 4 % PFA für 20 Min., gefolgt von einem weiteren Waschschriff mit 1 ml PBS^{+/-}. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mittels Permeabilisierungslösung (500 µl pro *well*; 0,25 % Triton X-100 in PBS^{-/-}; 5 Min.) für die Antikörper zugänglich gemacht. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 1 ml PBS^{-/-} gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen erfolgte durch Inkubation der Zellen in 3 % BSA in 1 ml PBS^{-/-} für 1 Std. bei Raumtemperatur. Nach Entfernung der Blockierungslösung wurden die Zellen mit 140 µl primärer Antikörperlösung (Verdünnung 1:500 bis 1:1000 in 1 % BSA in 1 ml PBS^{-/-}) versetzt und über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze dreimal mit 1 ml PBS^{-/-} für jeweils 5 Min. auf einem Schüttler im Dunkeln gewaschen. Die sekundären AlexaFluor-Antikörper wurden 1:500 in 1 % BSA in PBS^{-/-} verdünnt. 140 µl der verschiedenen Antikörperlösungen wurden vorsichtig in die jeweiligen Ansätze pipettiert und für 2 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgten drei- bis fünfminütige Waschschriffe mit PBS^{-/-}. Zum Nachweis des Zellkerns wurde DAPI in einer Verdünnung von 1:20000 in PBS^{-/-} verwendet. Anschließend wurden die Zellen auf den *Coverslips* zweimal mit PBS^{-/-} gewaschen, bevor sie auf Objektträger aufgebracht und mit einem Eindeckmedium (Prolong Gold) fixiert wurden. Nach einer Trocknungszeit von 24 Std. konnten die Zellen mittels eines Meta-Konfokal-Mikroskops LSM 510 der Firma Carl Zeiss mit einem Immersionsobjektiv 40/1.3 bei einer Wellenlänge von 468 nm, 488 nm, 543 nm und 633 nm analysiert und die Daten dokumentiert werden.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Zur regelmäßigen Überprüfung und Dokumentation der eGFP-Positivität stabil transfizierter Zelllinien, die eGFP als Kontrolle oder SIRT4-eGFP-Fusionsproteine exprimieren, wurde die Durchflusszytometrie mit einem FACS-Gerät (FACS Canto

II von BD) durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Zelllinien trypsinisiert, die Zellen isoliert und in spezielle FACS-Röhrchen überführt. In der Durchflusszytometrie wurden die Zellen einzeln nach Volumen, Oberflächenbeschaffenheit und Granularität per Laser detektiert und in verschiedenen Diagrammen sichtbar gemacht. Die Vereinzelung erfolgte mittels Überdruck und einer speziellen Trägerflüssigkeit. Diese Zellen wurden an einem Laser (Anregung bei 405 nm) vorbeigeführt, wodurch eGFP angeregt wurde. Dies führte zur Emission von Photonen mit einer für dieses Protein charakteristischen Wellenlänge. Das Licht wurde von verschiedenen Filtern und Spiegeln reflektiert und gebündelt, um schließlich von Sensoren detektiert zu werden. Unabhängig von einem fluoreszierenden Protein können die Größe und die Granularität der Zellen mit Hilfe des Vorwärtsstreulichts (FCS) und des Seitwärtsstreulichts (SSC) gemessen werden. Die Auswertung erfolgte mit einer speziellen *Flowing-Software* (FlowJo).

3 Ergebnisse

3.1 Subzelluläre Lokalisation von RAF-Kinase Paralogen

3.1.1 Biochemische Analyse der RAF-Kinase Paralogen mittels subzellulärer Fraktionierung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, wo die verschiedenen RAF-Paraloge in der Zelle lokalisiert sind. Um entsprechende Untersuchungen durchführen zu können, mussten zunächst FLAG-ARAF-, FLAG-BRAF- und FLAG-CRAF-Konstrukte in HEK293-Zellen transient transfiziert werden (siehe Kap. 2.2.1.8). Anschließend wurden die Zellkompartimente durch verschiedene differentielle Zentrifugationsschritte voneinander getrennt (siehe Kap. 2.2.2.5). Diese Methode erlaubt eine deutliche Anreicherung, jedoch keine Aufreinigung der jeweiligen Zellkomponenten. Mit Hilfe einer *Westernblot*-Analyse konnte eine erste Aussage über die subzelluläre Verteilung der RAF-Paraloge getroffen werden. Als Marker für die verschiedenen Zellkompartimente dienten Antikörper gegen die Proteine GAPDH (cytosolischer Marker), ATP5A1 (mitochondrialer Marker), Na/K-ATPase (Zellmembranmarker) und Lamin A/C (nukleärer Marker). Die nach Transfektion exprimierten FLAG-ARAF, FLAG-BRAF und FLAG-CRAF Proteine wurden mit einem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper detektiert.

Eine Anreicherung der beiden Zellfraktionen „Zytoplasma“ und „Mito-angereichert“ aus dem Gesamtzelllysat konnte erreicht werden (Abb. 4). Die Markeranalyse zeigte jedoch, dass neben den Mitochondrien auch andere Zellkompartimente mit der Mitochondrienfraktion angereichert wurden, wie z.B. die Plasmamembran und Bestandteile der Zellkernmembran. Das Zytoplasma hingegen war rückstandsfrei gereinigt und wies einen hohen Anteil an FLAG-BRAF, aber einen deutlich geringeren Anteil an FLAG-ARAF und FLAG-CRAF auf. Interessanterweise waren alle drei ektopisch exprimierten RAF-Paraloge deutlich und vergleichbar in der „Mito-angereicherten“ Fraktion nachweisbar (Abb. 4), wobei dieser Befund letztlich nicht eindeutig eine stärker mitochondrienassoziierte Lokalisation von FLAG-ARAF und FLAG-CRAF (im Vergleich zu FLAG-BRAF) belegt. Um daher mit Hilfe einer komplementären Methode eine weitergehende Aussage über die Lokalisation der RAF-Kinase-Paraloge treffen zu können, wurden im nächsten Schritt konfokale *Laserscanning* Mikroskopie-Aufnahmen angefertigt.

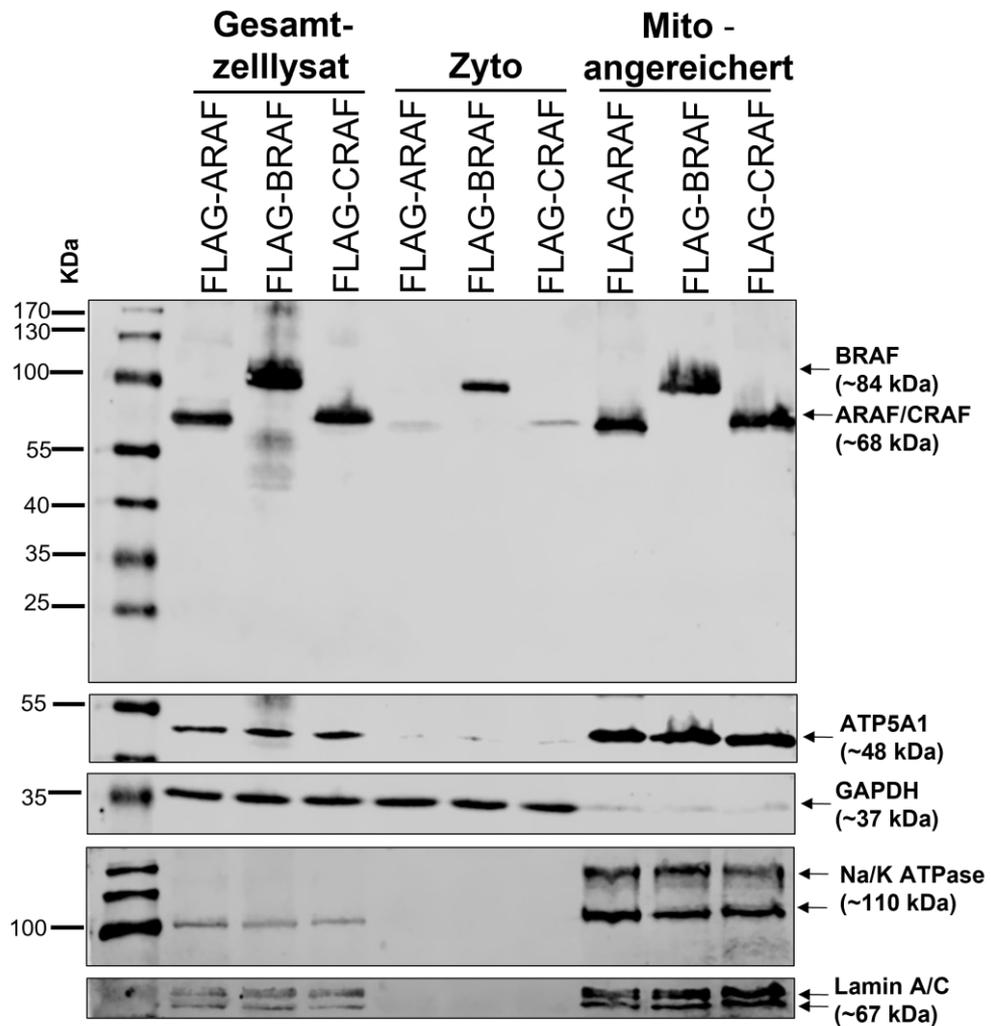


Abb. 4: Subzelluläre Lokalisation der RAF-Kinase Paraloge.

Westernblot-Analyse zur Bestimmung der Lokalisation von FLAG-ARAF-, FLAG-BRAF- und FLAG-CRAF-Konstrukten in transfizierten HEK293-Zelllinien. Dargestellt sind das Gesamtzelllysat, die zytoplasmatische Fraktion (Zyto) und die angereicherte mitochondriale Fraktion (Mito-angereichert). Zur Validierung der subzellulären Fraktionierung wurden entsprechende Markerproteine der einzelnen Fraktionen mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

3.1.2 Analyse der subzellulären Verteilung der RAF-Kinase Paraloge mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie

Zur genaueren Analyse der Verteilung der RAF-Paralogen wurden HeLa-Zellen transient mit den Expressionskonstrukten FLAG-ARAF, FLAG-BRAF oder FLAG-CRAF transfiziert, fixiert und das mitochondriale Netzwerk mit Antikörpern gegen MTC02, einer mitochondrialen Komponente der Atmungskette, angefärbt. Zusätzlich wurden Antikörper gegen FLAG M2 verwendet, um die jeweiligen RAF-Paraloge nachzuweisen. Die in Abb. 5 dargestellten Ergebnisse des konfokalen *Laserscannings* weisen auf eine partielle Überlagerung (*Overlay*) von MTC02 mit FLAG-ARAF und FLAG-CRAF hin. Ein mitochondriales *Overlay* mit FLAG-BRAF konnte nicht eindeutig beobachtet werden. Zusätzlich wurde die subzelluläre Lokalisation von endogenem ARAF untersucht, da hier im Gegensatz zu BRAF und CRAF mikroskopierbare Antikörper zur Verfügung standen. Auch für endogen exprimiertes ARAF konnte ähnlich wie für FLAG-ARAF eine partielle Überlagerung mit MTC02 und damit eine mitochondriale Kolokalisation verifiziert werden (Abb. 6). Somit deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass sowohl ARAF als auch CRAF an bzw. in Mitochondrien lokalisiert sind.

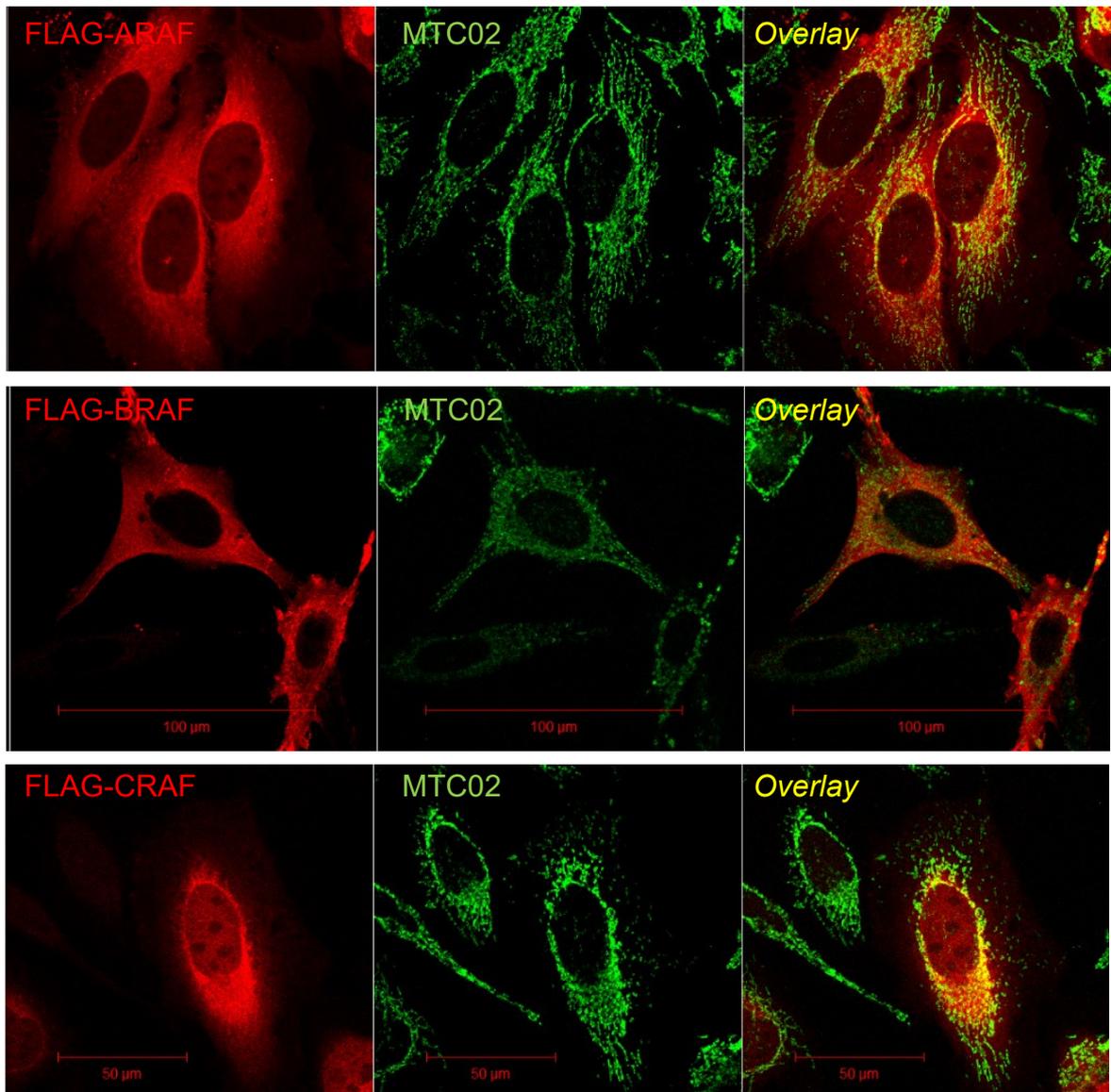


Abb. 5: Konfokale *Laserscanning* Mikroskopie von FLAG-RAF Proteinen und Mitochondrien in transfizierten HeLa-Zellen.

Transfizierte HeLa-Zellen zeigen eine partielle Kolo-kalisation (*Overlay*) von FLAG-ARAF bzw. FLAG-CRAF mit Mitochondrien. Die Zellen wurden immunzytochemisch mit Antisera gegen FLAG-ARAF, FLAG-BRAF oder FLAG-CRAF (anti-FLAG M2; rot) und MTC02 (Mitochondrienmarker; grün) inkubiert und konfokal-mikroskopisch analysiert.

Maßstab: Balken = 100 µm bzw. 50 µm.

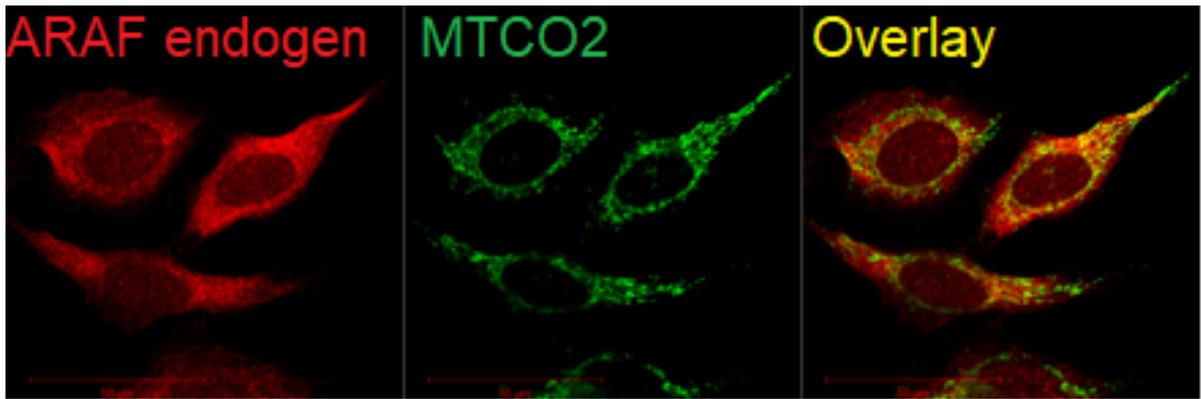


Abb. 6: Konfokale Laserscanning Mikroskopie von endogenem ARAF und dem Mitochondrienmarker MTCO2.

Hela-Zellen zeigen eine partielle Kolokalisation (*Overlay*) von endogenem ARAF mit dem mitochondrialen Marker MTCO2. Die Antikörper gegen endogenes BRAF und CRAF waren aufgrund von Vorexperimenten nicht für die konfokale Mikroskopie geeignet.

Maßstab: Balken = 50 µm.

3.2 Interaktion von SIRT4 mit RAF-Kinase Paraloge

3.2.1 Analyse der SIRT4 – RAF-Kinase Interaktion mittels Koimmunopräzipitation

In früheren Arbeiten konnte mittels Massenspektrometrie und Proteomanalyse ein SIRT4-Interaktom beschrieben werden [28], in dem ARAF und CRAF als neue potentielle Interaktionspartner des *bona fide* mitochondrial lokalisierten Sirtuins SIRT4 identifiziert wurden. Um diese Ergebnisse weiter zu validieren, wurden im nächsten Schritt Gesamtzelllysate aus eGFP- und SIRT4-eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen gewonnen und Koimmunopräzipitationsexperimente mit der anti-eGFP-*Nanobody*-Methode (siehe Kap. 2.2.4) durchgeführt. Die HEK293-eGFP Zelllinie diente als Kontrolle, um eine Interaktion von SIRT4-interagierenden Proteinen mit eGFP ausschließen zu können.

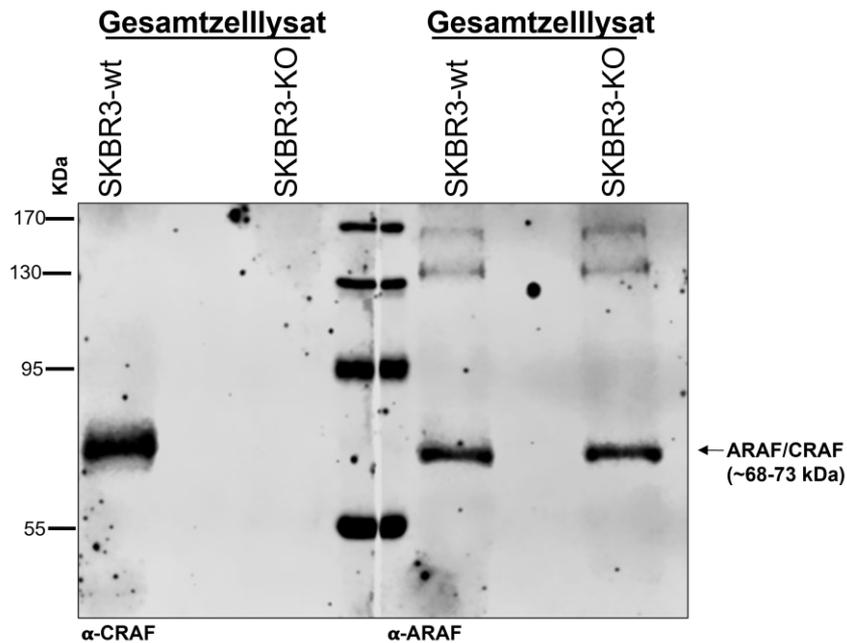


Abb. 7: Validierung der ARAF und CRAF-spezifischen Antikörper.

Westernblot-Analyse zur Bestimmung der ARAF-CRAF-Antikörper. Dargestellt sind das Gesamtzelllysate der SKBR3-wt und SKBR3-KO-Zellen. Zur Validierung der Antikörper gegen ARAF und CRAF wurde der linke Teil des Westernblots mit spezifischen CRAF-Antikörpern inkubiert. Der rechte Teil des Westernblots wurde mit einem spezifischen ARAF-Antikörper inkubiert.

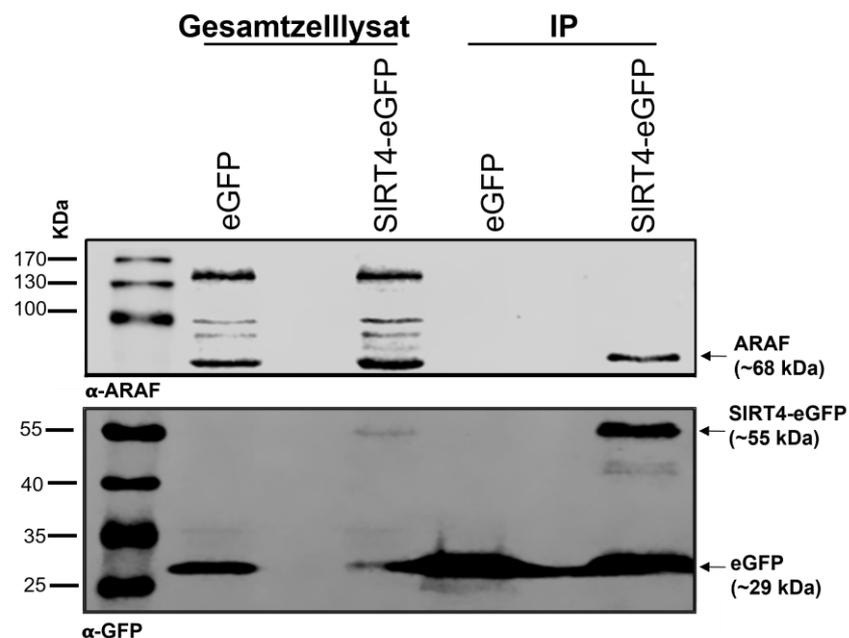


Abb. 8: SIRT4-eGFP, nicht aber eGFP, interagiert mit endogenem ARAF.

Die eGFP/SIRT4-eGFP-Immunpräzipitation (IP) wurde mit Gesamtzelllysaten von HEK293-Zelllinien durchgeführt, die stabil eGFP oder SIRT4-eGFP exprimieren. Es wurden *single-domain-antibodies* (*Nanobodies*) verwendet, die gegen eGFP gerichtet sind. Die IP wurde mit 2 mg Gesamtzellprotein durchgeführt. Im Western Blot wurden eGFP und endogenes ARAF mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Mit Hilfe dieser Koimmunopräzipitationsexperimente konnte eine (direkte oder indirekte) Interaktion von SIRT4-eGFP mit ARAF, BRAF und CRAF gezeigt werden (Abb. 8 - 10).

Endogenes BRAF hingegen scheint in der Koimmunopräzipitation nur schwach mit SIRT4-eGFP zu interagieren (Abb. 9). Als nächstes stellten sich unter anderem die Fragen, ob die SIRT4-RAF-Interaktion von der enzymatischen Aktivität von SIRT4 abhängt und in welchen Zellkompartimenten sie stattfindet, wobei letzteres im nächsten Kapitel ebenfalls mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie untersucht wurde. Zur Klärung der obigen Fragen wurde zusätzlich eine SIRT4-Mutante untersucht, die entweder enzymatisch inaktiv war (H161Y) oder der die ersten 28 Aminosäuren des N-Terminus fehlten (Δ 28N) (Abb. 11). Da dieser für die Translokation des SIRT4-Proteins in das Mitochondrium benötigt wird, kann das Δ N28-SIRT4-eGFP-Protein nach seiner Synthese nicht mehr in das Mitochondrium transportiert werden und verbleibt somit im Zytoplasma [113]. Diese mutierten SIRT4-DNA-Sequenzen wurden zuvor stabil in HEK293-Zellen transfiziert und entsprechend stabile Zelllinien selektiert [113]. Die eGFP-Positivität und damit die Expression der SIRT4-Konstrukte in diesen Zelllinien wurde regelmäßig mittels durchflusszytometrischer Analysen (siehe Kap. 2.2.5) überprüft (Abb. 12).

Die Ergebnisse einer ersten Anti-eGFP- Koimmunopräzipitationsanalyse zeigten, dass SIRT4 und die beiden SIRT4-Mutanten H161Y und Δ N28 in ähnlichem Ausmaß mit der endogenen ARAF-Kinase interagieren können (Abb. 13). Die SIRT4-ARAF-Interaktion scheint also extramitochondrial und unabhängig von der enzymatischen Aktivität von SIRT4 zu erfolgen.

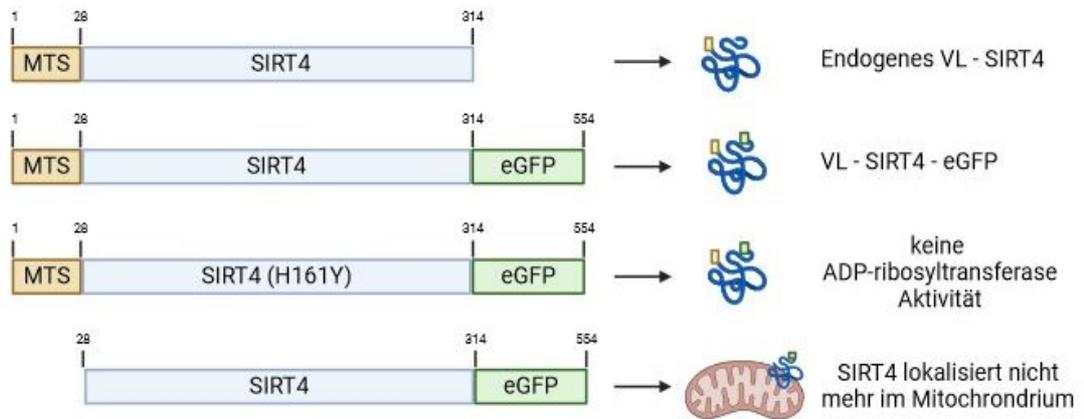


Abb. 11: Stabile Expression von SIRT4-eGFP Varianten in HEK293-Zellen.

Schematische Darstellung von SIRT4 im Vergleich zu SIRT4-eGFP, der enzymatisch inaktiven Punktmutante SIRT4(H161Y)-eGFP und der N-terminalen Deletionsmutante Δ N28-SIRT4-eGFP. VL: Volle Länge; MTS, *mitochondrial translocation sequence*. Erstellt mit Biorender.com.

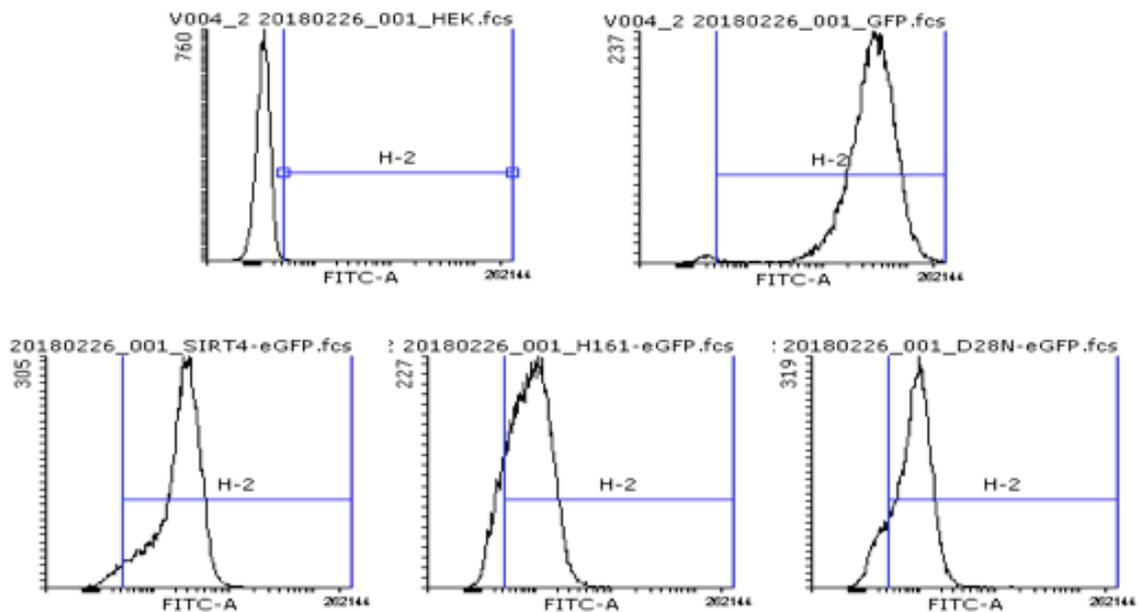


Abb. 12: Überprüfung von HEK293-Zelllinien, die stabil SIRT4-eGFP bzw. dessen Mutanten exprimieren.

Zur Überprüfung der eGFP-Positivität der generierten stabilen HEK293-Zelllinien wurden durchflusszytometrische Analysen (FACS) durchgeführt. Aufgetragen wurde die Anzahl der Zellen auf der Y-Achse gegen die Stärke des detektierten eGFP-Signals auf der X-Achse (logarithmisch). Es wurden jeweils 10.000 Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Das Balkendiagramm zeigt die prozentuale eGFP-Positivität in den jeweiligen Zelltypen.

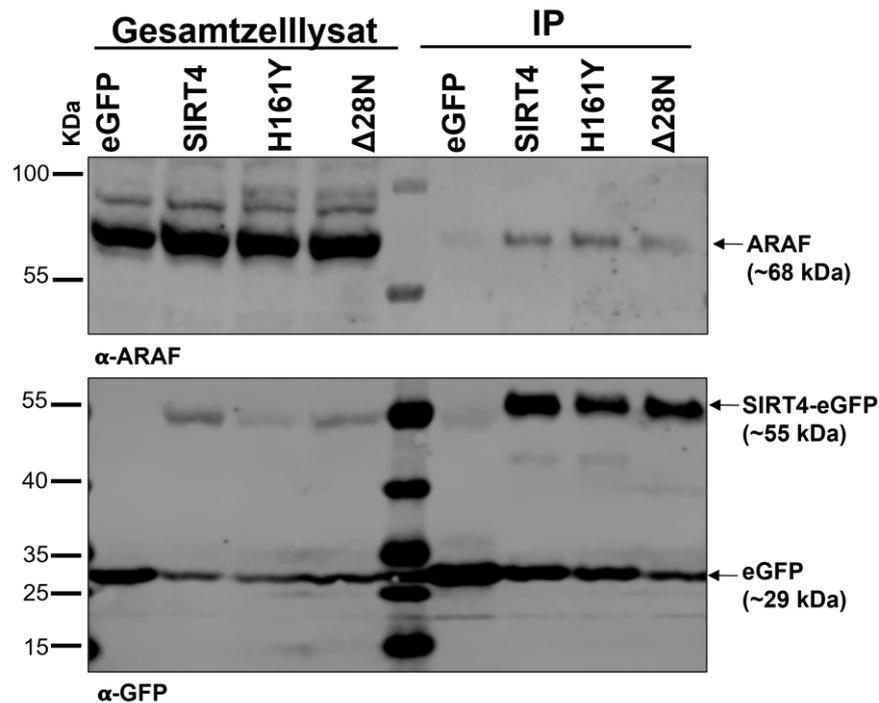


Abb. 13: ARAF interagiert mit SIRT4-eGFP und den untersuchten SIRT4-eGFP Mutanten.

Die SIRT4-eGFP-Immunpräzipitation (IP) wurde mit Gesamtzelllysaten von HEK293-Linien durchgeführt, die stabil eGFP oder SIRT4-eGFP exprimieren. Zusätzlich wurden die Mutanten Δ 28N-SIRT4-eGFP und SIRT4(H161Y)-eGFP untersucht. Dazu wurden *single-domain-antibodies* (*Nanobodies*) verwendet, die gegen eGFP gerichtet sind. Die IP wurde mit 3 mg Gesamtzellprotein durchgeführt und im *Western Blot* wurden eGFP und endogenes ARAF mit spezifischen Antikörpern detektiert.

3.2.2 Analyse der SIRT4 - RAF-Kinase Kolokalisation mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie

Da in den Koimmunpräzipitationsexperimenten bereits eine (direkte oder indirekte) Interaktion von ARAF und CRAF mit SIRT4 gezeigt werden konnte, sollten die bisherigen Daten mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie nochmals untermauert werden. Dazu wurde eine transiente Transfektion mit N-terminal FLAG-*Tag* versetzten ARAF-, BRAF- und CRAF-Konstrukten in Hela-pUC2-SIRT4-eGFP-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse in Abb. 14 zeigen, dass SIRT4-eGFP eine leichte bzw. deutlichere Kolokalisation mit FLAG-ARAF bzw. FLAG-BRAF aufweist, während überraschenderweise keine Kolokalisation mit FLAG-CRAF beobachtet wurde. Letzteres Ergebnis steht im Widerspruch zu den in Abb. 10 dargestellten Daten der Koimmunpräzipitation.

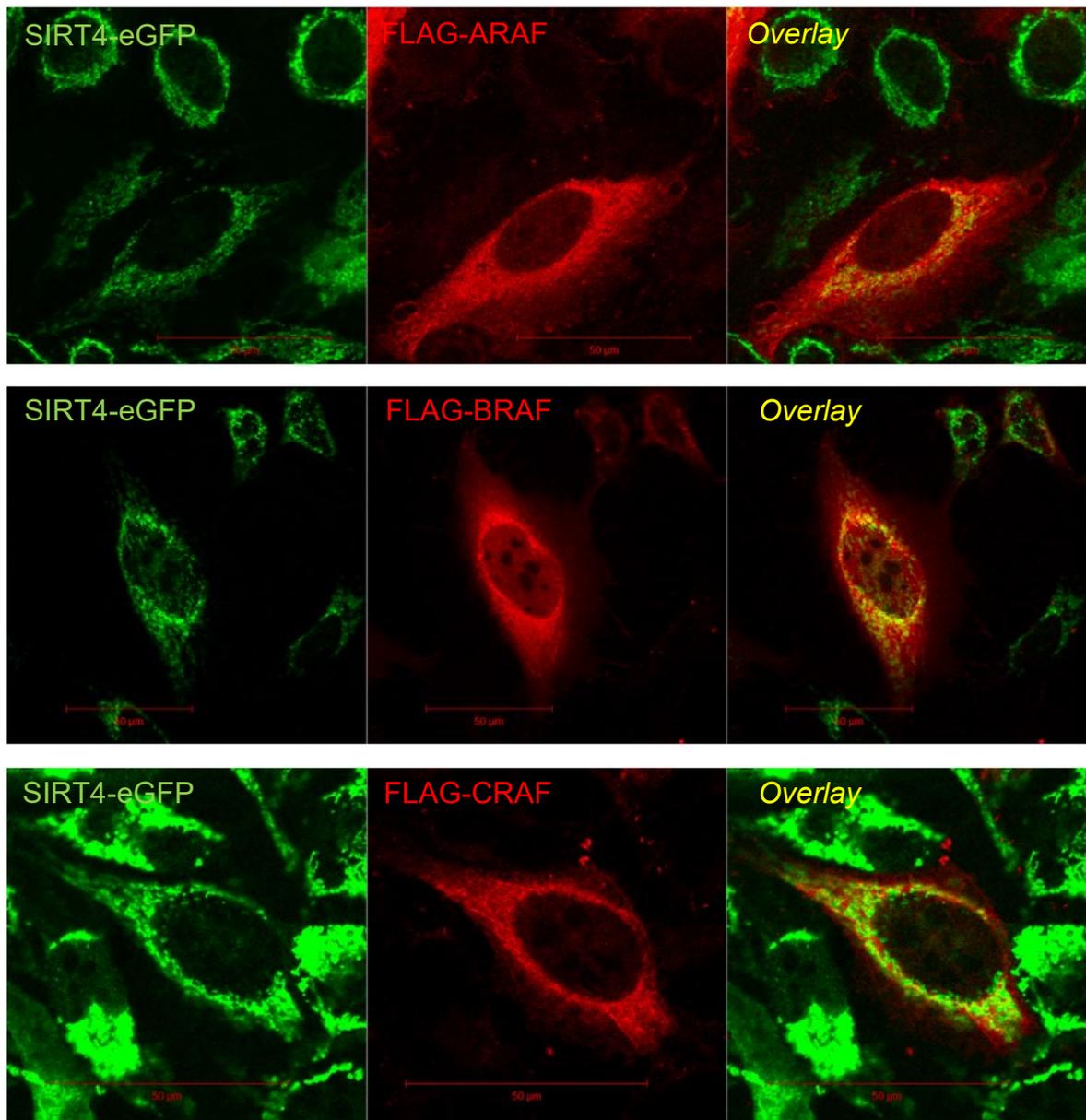


Abb. 14: Konfokale *Laserscanning* Mikroskopie von FLAG-RAF Fusionsproteinen und SIRT4-eGFP in HeLa-Zellen.

In dem für die konfokale Mikroskopie geeigneten HeLa-Zellmodell konnte eine partielle Kolo-kalisation (*Overlay*) von FLAG-ARAF, FLAG-BRAF oder FLAG-CRAF (jeweils rot dargestellt) mit SIRT4-eGFP (grün) beobachtet werden. FLAG-CRAF zeigte in diesem Experiment keine erkennbare Kolo-kalisation (*Overlay*) mit SIRT4-eGFP.

Maßstab: Balken = 50 μm .

Zur übersichtlichen Darstellung wurde die folgende Tabelle erstellt. Für endogenes ARAF konnte eine Kolo-kalisation mit MTC02 und SIRT4 eGFP gezeigt werden. FLAG-ARAF bestätigte dieses Ergebnis und untermauert durch die Daten der sub-zellulären Fragmentierung, dass ARAF in den Mitochondrien lokalisiert zu sein scheint. Problematisch ist, dass der endogene BRAF-Antikörper in den konfokalen *Laserscanning* Mikroskopie-Experimenten nicht nachgewiesen werden konnte. Für

FLAG-BRAF zeigt sich jedoch eine schwache Kolokalisation mit MTC02 und eine starke mit SIRT4-eGFP. Die subzelluläre Fraktionierung deutet auf eine überwiegend zytosolische Verteilung hin. Endogenes CRAF konnte mit SIRT4-eGFP immunpräzipitiert werden. Für FLAG-CRAF konnte eine Kolokalisation mit MTC02 sowie eine Kolokalisation mit SIRT4-eGFP gezeigt werden.

Tabelle 2: Übersichtliche Darstellung der Lokalisation und Kolokalisation von endogenen RAF-Paralogen und ARAF-, BRAF- und CRAF-Kinasen

RAF kinase	Colocalisation MTC02 (Mitochondria)	Colocalisation SIRT4-eGFP	Subcellular fractionation		SIRT4-eGFP Coimmunoprecipitation
ARAF (endogenous)	+	+	n.d.	n.d.	++
FLAG-ARAF	+	+	+	++	n.d.
BRAF (endogenous)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+ / -
FLAG-BRAF	+ / -	++	++	+	n.d.
CRAF (endogenous)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	++
FLAG-CRAF	++	+ / -	+	++	n.d.

3.3 Funktionelle Interaktion von ARAF und CRAF mit DRP1

3.3.1 *Small hairpin* (shRNA)-vermittelte zelluläre Depletion von ARAF in HEK293-Zellen

Bisher konnte eine mitochondrienassoziierte Interaktion und Kolokalisation von ektopisch exprimiertem SIRT4 mit den RAF-Kinasen und MAPK-Aktivatoren ARAF und CRAF beobachtet werden (Tab. 2). Unklar war jedoch die Funktion dieser Interaktion in Bezug auf die MAPK (ERK)-vermittelte Phosphorylierung und damit Aktivierung der GTPase DRP1, die für die mitochondriale *fission* und Mitophagie essentiell ist [109]. DRP wird hierbei an der Position Serin 616 (S616) phosphoryliert. In dieser Arbeit sollte zunächst die funktionelle Rolle von ARAF und CRAF bei der Phosphorylierung des *fission* Regulators DRP1 untersucht werden. Dazu wurde die

Expression von ARAF und CRAF durch shRNA-vermittelte Depletion von ARAF in HEK293-Zellen (Abb. 16A und B) bzw. durch CRISPR-Cas9-vermittelte Deletion von CRAF in SKBR3-Zellen herunterreguliert. Letztere SKBR3 CRAF k.o. Zellen wurden von Dr. Marcel Buchholzer und Prof. Reza Ahmadian (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II) zur Verfügung gestellt.

Die zelluläre Depletion von ARAF wurde mit fünf verschiedenen spezifischen shRNAs (116, 224, 567, 571, 981) durchgeführt, die in den lentiviralen Expressionsvektor pLKO.1 kloniert wurden und gegen verschiedene Abschnitte der humanen ARAF mRNA gerichtet sind (Abb. 15). Als Kontrolle diente der Vektor pLKO.1 ohne eingebaute shRNA (Leervektor), der keinen Einfluss auf die ARAF-Expression haben sollte. Die pLKO.1-Konstrukte, die alle einen Puromycin-Selektionsmarker tragen, wurden in HEK293-Zellen transfiziert und die Zellen in Puromycin-haltigem Wachstumsmedium selektiert. Zur Überprüfung der zellulären ARAF-Proteindepletion wurden in regelmäßigen Abständen (4 bis 12 Tage nach Transfektion) *Westernblot-Analysen* durchgeführt (Abb. 16A) und die relativen ARAF-Proteinmengen (ARAF/ β -Aktin) mittels *ImageJ*-basierter densitometrischer Analyse der Proteinbanden ausgewertet (Abb. 16B). Es konnte gezeigt werden, dass die shRNA-Konstrukte 244 und 567 die effizienteste Herunterregulation von ARAF (bis zu ca. 70 %) in HEK293-Zellen ermöglichen (Abb. 16B).

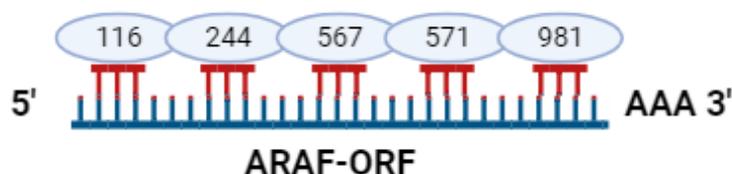


Abb. 15: Schematische Darstellung der mRNA-Struktur des ARAF-Transkripts und der relativen Lage der untersuchten ARAF spezifischen shRNAs.

Die roten Balken stellen die Anti-sense Stränge der shRNA-Konstrukte 116 bis 981 dar.
Erstellt mit Biorender.com.

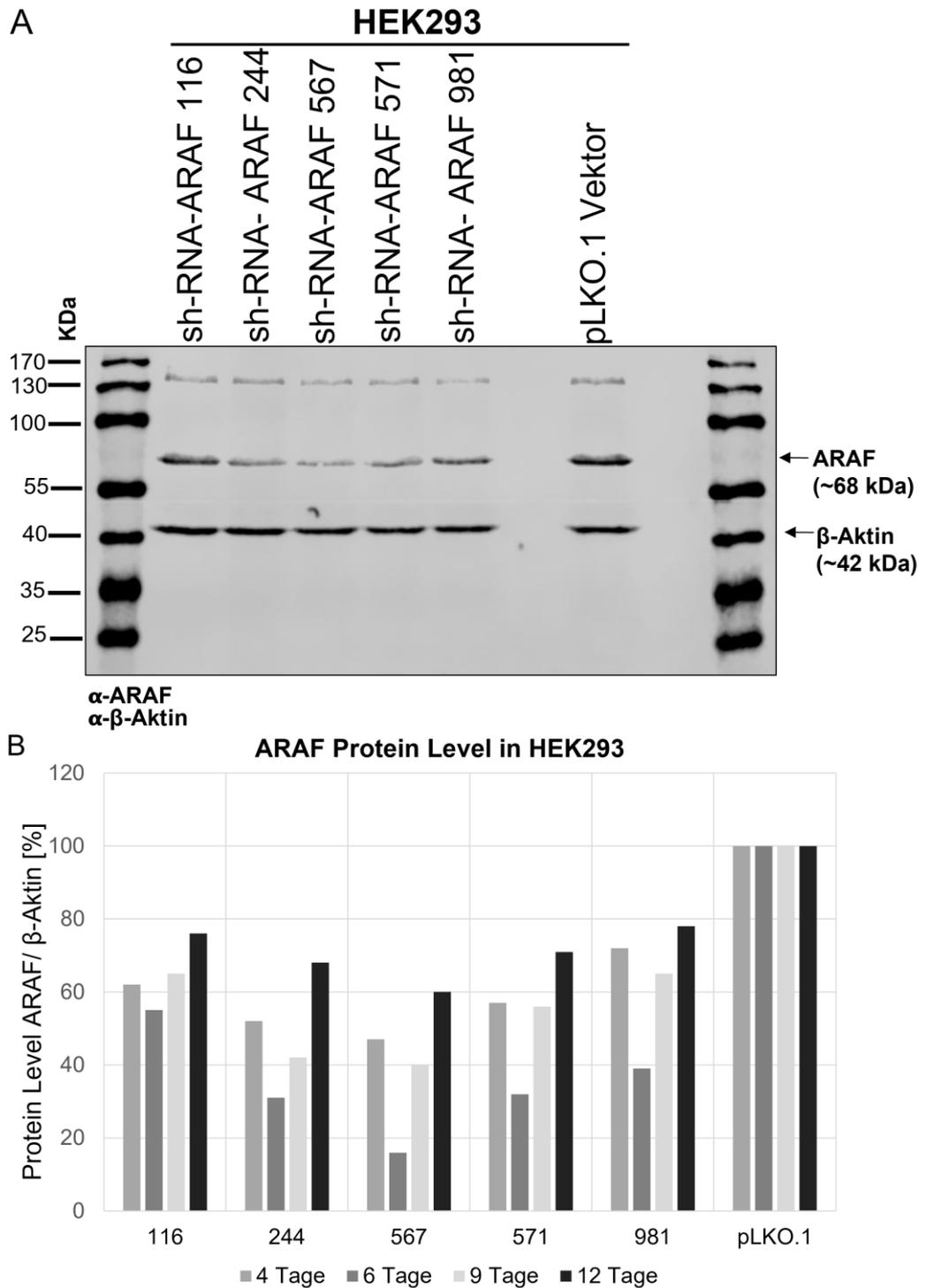


Abb. 16: shRNA-vermittelte Depletion von ARAF in HEK293 Zellen.

Die Überprüfung der Depletion von ARAF durch pLKO.1-shRNA-Konstrukte erfolgte durch *Western Blot*-Analyse transfizierter HEK293-Zellen. Hierzu wurden spezifische Antikörper gegen ARAF (oberer Teil der aufgeschnittenen Membran) und β -Aktin (Ladungskontrolle; unterer Teil der aufgeschnittenen Membran) verwendet (**A**). Anschließend wurden die Bandenintensitäten von ARAF im Vergleich zu β -Aktin mit Hilfe des Programms *ImageJ* verglichen und in einem Balkendiagramm dargestellt (Kontrollzellen, die den pLKO.1-Vektor ohne shRNA exprimieren: 100%) (**B**).

3.3.2 Einfluss der zellulären Depletion von ARAF und *knockout* von CRAF auf die Phosphorylierung des Pro-*fission* Regulators DRP1

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung der Herunterregulation von ARAF bzw. des CRAF-*knockouts* auf den Pro-*fission* Faktors DRP1 untersucht. Wie oben beschrieben, wurden ARAF-depletierte HEK293-Zellen und SKBR3-Zellen mit CRAF-Defizienz verwendet. Die Zelllinien wurden in Kombination mit Oligomycin und CCCP (jeweils 5 µM) behandelt, um die mitochondriale Atmungskette zu inhibieren, dadurch mitochondrialen Stress zu induzieren und schließlich mitochondriale *fission* und Autophagie auszulösen. Die behandelten Zellen wurden nach 10 Min. zum ersten Mal und nach insgesamt 60 Min. erneut geerntet. Nach der Zellyse und Probenaufbereitung der Gesamtzelllysate wurden *Westernblot*-Analysen durchgeführt. Hierbei sollte geklärt werden, ob unter den verwendeten mitochondrialen Stressbedingungen die reduzierte/fehlende Expression von ARAF bzw. CRAF zu einer reduzierten MAPK-vermittelten Phosphorylierung von DRP1 (S616) führt.

In einem ersten Experiment zeigte sich ein heterogenes Bild in ARAF-depletierten HEK293-Zellen im Vergleich zu HEK293-Vektorkontrollzellen. Während die pDRP1 (Ser616)-Proteinmengen nach Oligomycin/ CCCP-Behandlung in beiden untersuchten ARAF shRNAs früh nach 10 Min. erhöht waren, wurde nach 60 Min. Behandlung eine (erwartete) Reduktion von pDRP1 (S616) beobachtet (Abb. 17 A und B). Diese unterschiedliche Regulation von pDRP1 (S616) könnte möglicherweise mit einer noch nicht ausreichenden Herunterregulation von ARAF durch die eingesetzten shRNAs zusammenhängen.

Ein konsistenteres Bild ergab sich bei der Analyse von SKBR3 CRAF k.o.-Zellen, in denen die CRAF-Defizienz mittels eines CRAF-spezifischen Antikörpers im *Western Blot* bestätigt werden konnte (Abb. 18A). Im Vergleich zu SKBR3-Wildtypzellen waren die pDRP1 (S616)-Proteinmengen in CRAF k.o.-Zellen sowohl nach 10-minütiger als auch nach 60-minütiger Oligomycin/ CCCP-Behandlung deutlich reduziert. Diese ersten Ergebnisse deuten darauf hin, dass ARAF und CRAF als positive Regulatoren der Phosphorylierung von DRP1 an Serin 616 fungieren.

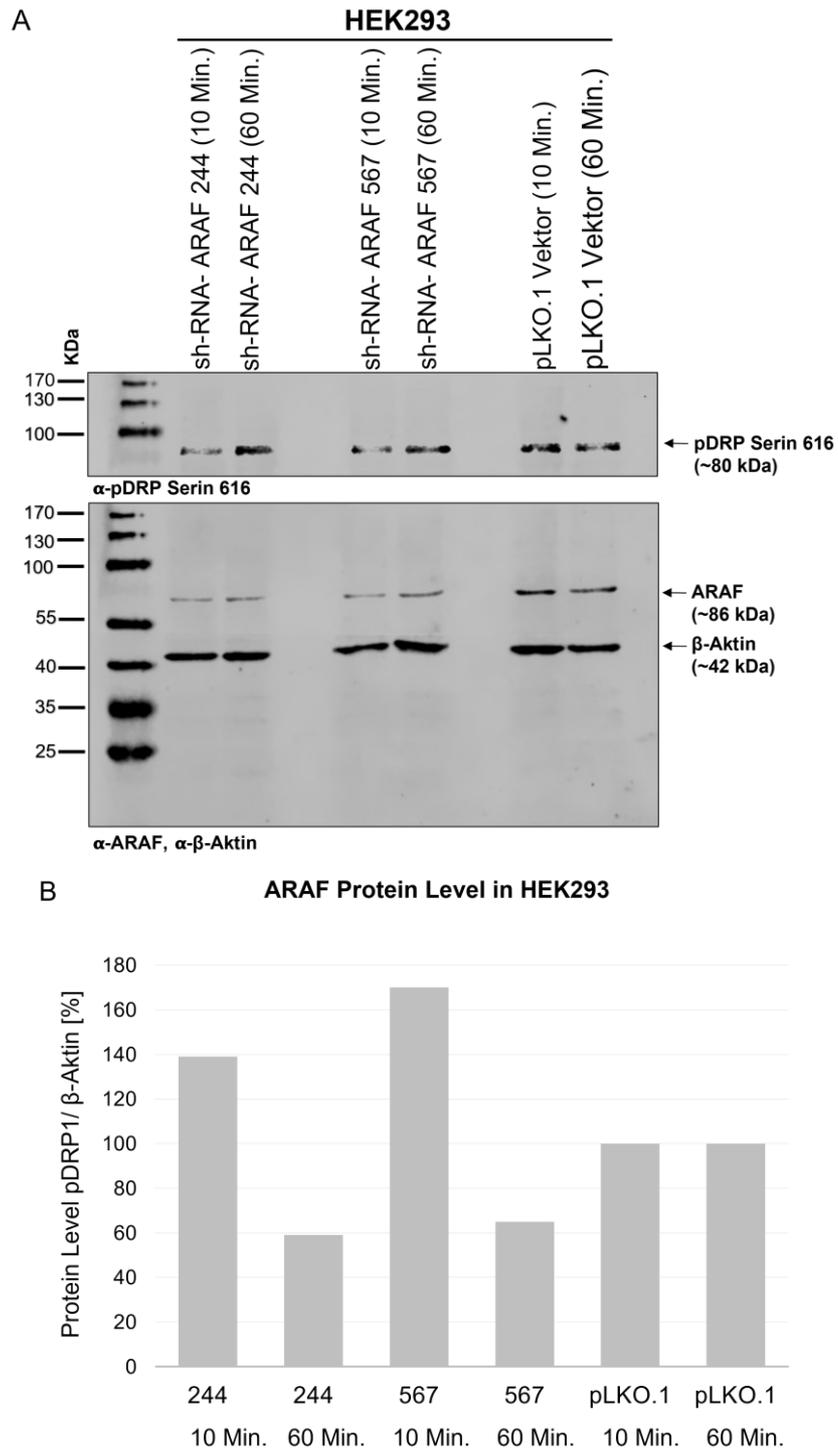


Abb. 17: Eine reduzierte ARAF-Expression in HEK293-Zellen ist assoziiert mit erniedrigten pDRP (S616) Proteinmengen nach 60-minütiger Oligomycin/ CCCP Behandlung und mitochondrialem Stress.

(A) *Westernblot*-Analyse zur Bestimmung der Proteinmenge von pDRP1 (Ser616) in HEK293-pLKO.1 (Leervektor) und HEK293 shRNA244 und shRNA567 Zellen. Die *Westernblots* wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CRAF, pDRP1 (Ser616) und β -Aktin als Ladekontrolle inkubiert. Mit Hilfe der Software *ImageJ* wurden die relativen Proteinmengen von pDRP1 (Ser616) auf die Ladungskontrolle β -Aktin normiert und in einem Balkendiagramm dargestellt **(B)**.

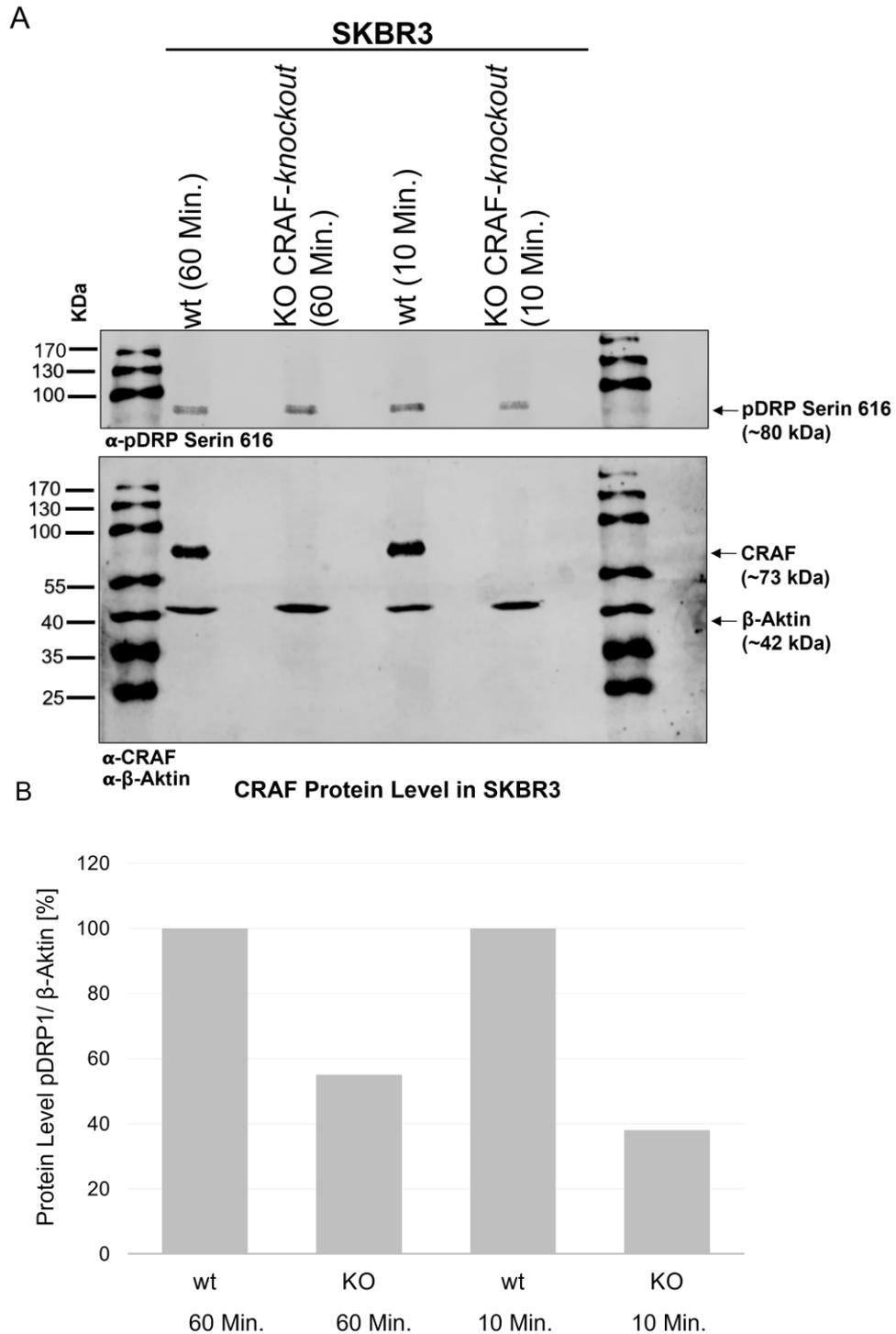


Abb. 18: Die Proteinmengen von pDRP1 (S616) sind in CRAF-knockout SKBR3-Zellen gegenüber Wildtyp-Zellen nach Oligomycin/CCCP-induziertem mitochondrialen Stress reduziert.

(A) *Western blot*-Analyse zur Bestimmung der Proteinmengen von pDRP1 (Ser616) in SKBR3-Wildtyp- und SKBR3-CRAF-knockout-Zellen. Die *Westernblots* wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CRAF, pDRP1 (Ser616) und β-Aktin als Ladekontrolle inkubiert. Mit Hilfe der Software *ImageJ* wurden die relativen Proteinmengen von pDRP1 (Ser616) auf die Ladungskontrolle β-Aktin normiert und in einem Balkendiagramm dargestellt **(B)**.

4 Diskussion

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit Daten erhoben werden, die darauf hindeuten, dass BRAF im Vergleich zu den beiden anderen Paralogen CRAF und ARAF vermehrt im Zytoplasma vorkommt, während ARAF und CRAF, nicht aber BRAF, vermehrt in oder an Mitochondrien lokalisieren. In Vorarbeiten [28, 46] konnte massenspektrometrisch ein SIRT4-Interaktom entschlüsselt werden, dass durch die Anwesenheit von ARAF und CRAF auffiel. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Interaktion von ARAF und CRAF mit dem *bona fide* mitochondrial lokalisierten Sirtuin SIRT4 mittels Koimmunopräzipitation validiert. Eine zytoplasmatische Interaktion kann nicht ausgeschlossen werden, da ARAF mit $\Delta N28$ -SIRT4, einer SIRT4-Deletionsmutante, der die N-terminale mitochondriale Zielsequenz fehlt, koimmunopräzipitiert und SIRT4 bereits auch im Zytoplasma nachgewiesen wurde [53, 57]. Diese Befunde konnten zum Teil durch die Kolo-kalisation von FLAG-ARAF und SIRT4-eGFP in konfokalen *Laserscanning* Mikroskopie-Bildern bestätigt werden (Abb. 14). Schließlich konnten auf funktioneller Ebene nach erfolgreicher zellulärer Depletion von ARAF teilweise reduzierte Mengen des mitochondrialen Pro-*fission* Faktors pDRP1 (Ser616) nachgewiesen werden (Abb. 17 und B). Im Falle eines CRAF-*knockouts* konnte eine deutlich reduzierte Menge an pDRP1 (Ser616) Protein im Vergleich zu CRAF-*Wildtyp* SKBR-Zellen beobachtet werden (Abb. 18 A und B). Somit scheinen ARAF und CRAF die Phosphorylierung und Aktivierung des mitochondrialen Pro-*fission* Faktors DRP1 über den MAPK-Signalweg positiv zu regulieren. Die geplante Untersuchung eines zeitlich inhibierenden Einflusses von SIRT4 auf ARAF und CRAF und damit auf die MAPK-vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung von pDRP1 (S616) konnte aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der Etablierung eines induzierbaren SIRT4-eGFP Expressionssystemes in SKBR3 Zellen nicht durchgeführt werden.

Die Ergebnisse, die zu den Ergebnissen dieser Arbeit geführt haben, mögliche Wirkungsmechanismen und eine kritische Reflexion der in dieser Arbeit angewandten Methoden sowie ein Ausblick auf die Weiterentwicklung des Projektes werden im folgenden Teil dieser Arbeit vorgestellt und diskutiert.

Subzelluläre Lokalisation der RAF-Kinase Paraloge

Zu Beginn dieser Arbeit sollte zunächst die Lokalisation der RAF-Kinase-Paraloge in der Zelle durch subzelluläre Fraktionierung untersucht werden. Da auch SIRT4 prädominant in den Mitochondrien lokalisiert ist und als potentieller Interaktionspartner gilt, stellte sich die Frage nach der Verteilung der RAF-Kinasen in der Zelle bzw. deren Lokalisation in den Mitochondrien [13]. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die RAF-Kinasen ubiquitär in der Zelle verteilt sind, wobei ARAF, BRAF und CRAF in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorzukommen scheinen [107]. Bisher konnte gezeigt werden, dass ARAF mit den mitochondrialen Import-Protein-Komplexen TIM und TOM der inneren und äußeren Mitochondrienmembran interagiert. Analysen hochaufgereinigter mitochondrialer Fraktionen konnten ARAF, aber nicht CRAF in oder an den Mitochondrien nachweisen [107]. Andere Publikationen kommen zu gegenteiligen Ergebnissen. In der Arbeit von Galmiche et al. [106] konnte unter anderem mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie gezeigt werden, dass CRAF paralogspezifisch an den Mitochondrien lokalisiert ist. Darüber hinaus scheint CRAF die Form und Verteilung der Mitochondrien zu beeinflussen [106].

Strukturelle Besonderheiten aller RAF-Paraloge schränken ihre Lokalisation in der Zelle weiter ein. So zeigte sich, dass alle RAF-Paraloge über N-terminale RBD- (RAS-binding) oder CRD- (cystein-rich) Domänen direkt oder indirekt über RAS an die Plasmamembran gebunden sind. Die Rekrutierung der RAF-Kinasen erfolgt aus dem Zytosol [77]. Nach Durchführung der subzellulären Fraktionierung stellte sich heraus, dass das in dieser Arbeit verwendete Protokoll nur für die Aufreinigung der zytosolischen Fraktion optimal geeignet war, da in der mitochondrialen Fraktion neben den Mitochondrien auch Nuklei und Plasmamembranen angereichert wurden. Dies konnte anhand fraktionsspezifischer Markerproteine der schließlich membranhaltigen Partikelfraktion im Vergleich zum Gesamtzelllysat abgeleitet werden (Abb. 4). Daher kann in dieser Arbeit nur eine belastbare Aussage über die relative Verteilung der RAF-Kinasen im Zytosol gemacht werden. Es zeigte sich, dass in der zytosolischen Fraktion vermehrt BRAF angereichert war, während die Mengen an ARAF und auch CRAF reduziert waren. Im weiteren Verlauf konnte mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie eine Kolo-kalisation von Mitochondrien (gemessen am MTC02/COXII-Marker) mit FLAG-ARAF- oder FLAG-CRAF-Fusionsproteinen reproduzierbar nachgewiesen werden (Tab. 2). Es wurden bewusst N-terminale

FLAG-RAF Fusionsproteine verwendet, da im Gegensatz zu ARAF (Abb. 6) die vorhandenen Antikörper gegen endogenes CRAF oder BRAF in konfokalmikroskopischen Experimenten technisch nicht funktionierten. Andererseits sollten Unspezifitäten der Anti-RAF-Antikörper vermieden werden, da insbesondere ARAF und CRAF starke Ähnlichkeiten in Molekulargewicht und Struktur aufweisen [77]. Somit kann aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass sowohl ARAF als auch CRAF in oder an den Mitochondrien lokalisiert sind. Weitere Untersuchungen stützen diese These. So konnte gezeigt werden, dass die anti-apoptotische Wirkung von CRAF zumindest teilweise aus einer Interaktion mit dem Onkogen Bcl-2 an der Mitochondrienmembran resultiert [114, 115]. Weitere Arbeiten zeigten ebenfalls, dass ARAF in oder an den Mitochondrien lokalisiert ist. So wurde eine Interaktion von ARAF mit der sterilen *20-like* Kinase MST2 beobachtet, die mit zellulärer Apoptose assoziiert ist [87]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ARAF-MST2-Interaktion in den Mitochondrien stattfindet.

ARAF und CRAF stellen einen direkten oder indirekten Interaktionspartner des Sirtuins SIRT4 dar

In einem nächsten Schritt sollte die Interaktion von ARAF und CRAF mit SIRT4-eGFP mittels anti-eGFP Koimmunopräzipitationsanalysen untersucht werden (Kap. 2.2.2.3). Da die Expression endogener SIRT4-Proteinmengen sehr gering ist und zum Zeitpunkt dieser Arbeit kein für die Immunopräzipitation verwendbarer anti-SIRT4-Antikörper zur Verfügung stand [59, 110], wurden für die Koimmunopräzipitation von endogenem ARAF und CRAF Zelllysate von stabil SIRT4-eGFP exprimierenden HEK293 Zellen verwendet.

Die nachgewiesene (direkte oder indirekte) Interaktion von SIRT4 mit ARAF (Abb. 8), BRAF (Abb. 9) und CRAF (Abb. 10) muss jedoch in ihrer Aussagekraft kritisch hinterfragt werden. Insbesondere CRAF und BRAF gelten als Effektorproteine von KRAS, die neben der Homodimerisierung auch heterodimerisieren können [116], MEK1/2 und ERK1/2 aktivieren [117] und somit Einfluss auf Zellzyklus und Proliferation nehmen [1]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ARAF und CRAF in der Lage sind, funktionelle Heterodimere zu bilden [118]. Daher kann in den Koimmunopräzipitationsexperimenten dieser Arbeit nicht unterschieden werden, ob SIRT4 mit ARAF oder CRAF-Homodimeren oder ARAF/CRAF-Heterodimeren interagiert. Weiterhin könnte SIRT4 ausschließlich/spezifisch mit ARAF, aber nicht

mit CRAF interagieren oder umgekehrt. Um insbesondere die letzte Frage zu beantworten, wären entsprechende Koimmunopräzipitationsexperimente in Zellen wichtig, in denen ARAF depletiert (HEK293; Abb. 17) bzw. CRAF deletiert (SKBR3; Abb. 18) wurde. Sollte z.B. in CRAF-deletierten Zellen keine SIRT4-ARAF Koimmunopräzipitation mehr stattfinden, würde dies für eine indirekte Interaktion von SIRT4 mit ARAF über CRAF, letzteres in ARAF/CRAF Heterodimeren, sprechen. Dies wiederum würde bedeuten, dass SIRT4 spezifisch mit CRAF und nicht mit ARAF interagiert. Die Autoren konnten mit rekombinant exprimierten und aufgereinigten N-Termini der RAF-Kinasen zeigen, dass SIRT4 über die N-terminale *cystein-riche-domaine* (CRAF_{CRD}) an CRAF, nicht aber an ARAF oder BRAF bindet. Interessanterweise konnte keine Interaktion von SIRT3 oder SIRT5 mit CRAF_{CRD} beobachtet werden [119]. Die Autoren beschreiben somit eine paralog/ paralogsspezifische, offenbar direkte Interaktion von SIRT4 mit der CRAF-Kinase.

Bezogen auf die Daten dieser Arbeit würde dies bedeuten, dass die Interaktion von SIRT4 mit ARAF indirekt über die Bindung von SIRT4 an CRAF erfolgt, welches in ARAF/CRAF-Heterodimeren vorliegt. Interessanterweise interagiert SIRT4 spezifisch mit pS259-CRAF, welches durch inaktivierende Phosphorylierung an S259 in einem 14-3-3 - gebundenen, inaktiven *pre-Signaling* Zustand vorliegt [80]. In Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen führte eine erhöhte zelluläre SIRT4-Expression zu einer verstärkten Hochregulation von pS259-CRAF und einer damit einhergehenden verminderten Phosphorylierung von ERK1/2. Diese Befunde bestätigen die Rolle von SIRT4 als zytoplasmatischer Tumorsuppressor [46], wobei SIRT4 in diesem Fall über eine CRAF-Interaktion eine Hemmung des MAPK-Signalweges bewirkt [119]. Die Frage, ob SIRT4 posttranslationale Modifikationen an CRAF (und evtl. ARAF) vornimmt und dadurch CRAF (und evtl. ARAF) reguliert, ist unklar. Es gibt jedoch eine Verbindung zwischen BRAF und SIRT1, die als Modell dienen könnte [120]. Eine Acetylierung des Lysins 601 (K601) von BRAF durch die p300-Acetyltransferase fördert die BRAF-Kinaseaktivität und damit die Zellproliferation [89]. Diese Aktivierung wird wiederum durch SIRT1 gehemmt, das BRAF an K601 deacetyliert, wodurch die Proliferation gehemmt wird. SIRT1 vermittelt also die Hypoacetylierung von BRAF und damit die Feinabstimmung des RAF/MAPK-Kinase-Signalwegs. Inwieweit CRAF und ARAF durch Acetylierungs- und Deacetylierungszyklen reguliert werden, ist derzeit nicht bekannt [121, 122].

Möglicher subzellulärer Interaktionsort von SIRT4 und den RAF-Kinasen

Um ein geeignetes Modell der SIRT4-ARAF/CRAF-Interaktion zu entwerfen, war die Analyse der intrazellulären Lokalisation dieser Interaktion von besonderer Bedeutung. Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von SIRT4-eGFP bestätigten die Hypothese, dass es sich um ein mitochondrial dominantes Protein handelt, das hauptsächlich in der Mitochondrienmatrix vorkommt [13]. In den gleichen Analysen zeigte ein geringer Anteil von SIRT4-eGFP eine Assoziation mit der Mitochondrienmembran. Eigene Untersuchungen zeigten ebenfalls eine enge Kollokalisierung von SIRT4-eGFP und dem mitochondrialen Marker MTC02 (=COXII, ein Bestandteil der Atmungskette) in konfokalen *Laserscanning* Mikroskopie-Aufnahmen [110] (Daten nicht gezeigt). Neuere Daten weisen jedoch auf eine mögliche neue Rolle von extramitochondrial lokalisiertem SIRT4 hin [57]. Diese Befunde von Bergmann et al. deuten neben der bekannten Funktion im mitochondrialen Stoffwechsel auf eine Regulation des mitotischen Zellzyklusverlaufs hin. SIRT4 erscheint dort als zentrosomales und Mikrotubuli-assoziiertes Protein [57]. Verantwortlich für die mitochondriale Lokalisation von SIRT4 ist seine N-terminale mitochondriale Zielsequenz (MTS, *mitochondrial transfer sequence*) [51]. Die Δ N28-SIRT4-Mutante ist eine SIRT4-Deletionsvariante, der die MTS fehlt und die daher nicht mehr ins Mitochondrium transloziert werden kann [57]. Da Δ N28-SIRT4 noch eine Interaktion mit ARAF zeigte (vermutlich indirekt über CRAF, wie bereits oben diskutiert) (Abb. 13), ist davon auszugehen, dass RAF-Kinasen im Zytoplasma (neben einer möglichen Interaktion im Mitochondrium) mit SIRT4 interagieren können. Zusätzlich wurde die Interaktion zwischen der enzymatisch inaktiven SIRT4(H161Y)-Mutante und ARAF (auch hier vermutlich indirekt über CRAF, wie bereits oben diskutiert) untersucht. Daraus konnte geschlossen werden, dass die ADP-Ribosyltransferase von SIRT4 für die Interaktion mit ARAF/CRAF nicht von Bedeutung ist. In den Analysen des SIRT4-Interaktoms konnte jedoch gezeigt werden, dass 293 Interaktionspartner mit SIRT4-Wildtyp und der SIRT4(H161Y)-Mutante interagieren, 162 ausschließlich mit dem SIRT4-Wildtyp und 17 ausschließlich mit der SIRT4(H161Y)-Mutante [51, 57]. Diese Untersuchungen können jedoch nur bedingt Aufschluss über den Lokalisationsort und den enzymatischen Mechanismus der SIRT4-CRAF/ARAF-Interaktion geben.

Mögliche Auswirkung der SIRT4-RAF Interaktion auf die Phosphorylierung und Aktivierung des *pro-fission*-Faktors pDRP1 (S616)

Der Einfluss von SIRT4 auf die mitochondriale *fission* und *fusion* konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden. Zum einen interagiert SIRT4 mit der *Dynamin-related* GTPase L-OPA1 und stabilisiert diese als Schlüsselregulator der mitochondrialen Fusion, was mit einer Hemmung der Mitophagie verbunden ist [110]. Andererseits reduziert SIRT4 die ERK-vermittelte Phosphorylierung des *Pro-fission* Faktors pDRP1, wodurch die mitochondriale *fission* und damit die Mitophagie gehemmt wird [109]. Eine weitere Studie konnte einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ERK2, einem Bestandteil des RAS/RAF/MAPK-Kinasewegs, und der Phosphorylierung des *Pro-fission* Faktors pDRP1 herstellen [108], wobei die Beteiligung der einzelnen RAF-Kinasen nicht untersucht wurde [108]. Aufgrund der oben zitierten Studien zum Einfluss von CRAF auf die Form und Verteilung der Mitochondrien [106] wurde vermutet, dass es einen Einfluss auf den *Pro-fission* Faktor pDRP1 geben könnte. In diesem Zusammenhang wurde eine Vielzahl von Modifikationen des *Pro-fission* Faktors pDRP1 beschrieben. Eine posttranslationale Modifikation von DRP1 durch Phosphorylierung an Ser616 erfolgt auch durch den Zellzykluskomplex CDK1/CyclinB, wobei dies keinen direkten Effekt auf die GTPase-Aktivität von DRP1 hat, sondern die Bindungsaffinität von DRP1 an Mitochondrien und damit deren Spaltung erhöht. Eine weitere Phosphorylierung von DRP1 an Ser637 konnte durch Protein Kinase A (PKA) und Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Protein Kinase I α (CaMKI α) gezeigt werden, wobei es zu einer Reduktion der GTPase-Aktivität von DRP1 und einer Hemmung seiner Translokation in die Mitochondrien kommt [123]. Schließlich kann die CaMKI α -Kinase durch Phosphorylierung von DRP1 an Ser600 zu einer Stimulation von dessen mitochondrialer Translokation führen. Daraus resultiert eine erhöhte Bindungsaffinität von pDRP1 an Fis1, was wiederum zu einer erhöhten Fragmentierung der Mitochondrien führt [124]. Somit wird die mitochondriale *fission* und die nachgeschaltete Mitophagie durch dynamische Phosphorylierungsschritte von DRP1 und nachfolgende Proteininteraktionen induziert [123].

In dieser Arbeit wurde die Expression von CRAF in HEK293 Zellen mittels small hairpin RNA (shRNA) herunterreguliert. Zusätzlich wurden CRAF-*knockout* SKBR3-Zellen untersucht (Buchholzer & Ahmadian, unveröffentlicht). In beiden Zellmodel-

len wurde der Gehalt an pDRP1 (Ser616) im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Kontrollzellen untersucht (Abb. 18A und B). Hierbei konnte in ersten Experimenten eine vorläufige Korrelation zwischen erniedrigten Proteinmengen an pDRP1 (Ser616) und der Depletion von ARAF bzw. dem *knockout* von CRAF (im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollzellen) ermittelt werden. Diese *Western-Blot*-Analysen müssen jedoch in weiteren unabhängigen Experimenten reproduzierbar wiederholt werden, was im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war.

Ausblick und weitere Experimente

Auf der Suche nach weiteren Interaktionspartnern von SIRT4 konnten mittels massenspektrometrischer Proteomanalyse die SIRT4-Interaktionspartner ARAF und CRAF identifiziert werden [57]. Diese Untersuchungen ermöglichten eine neue Betrachtung sowohl von ARAF und CRAF als auch von SIRT4 im Rahmen der mitochondrialen *fusion* und *fission* [110]. Es ist bekannt, dass SIRT4 die ERK-vermittelte Phosphorylierung des Pro-*fission* Faktors pDRP1 reduziert [109]. Da ERK ein Bestandteil des RAS-RAF-MAPK Kinasewegs ist und somit auch durch ARAF und CRAF beeinflusst wird [106, 117], stellte sich die Frage, ob es einen gemeinsamen Weg für die ERK-vermittelte Phosphorylierung von pDRP1 gibt (Abb. 19). In weiteren Arbeiten wurde der Einfluss von CRAF auf die mitochondriale Dynamik beschrieben, was ein weiteres Indiz für eine gemeinsame Regulation des Pro-*fission* Faktors pDRP1 darstellt [106]. In dieser Arbeit konnte erstmals eine Interaktion von SIRT4 mit ARAF und CRAF durch Koimmunopräzipitationsanalysen nachgewiesen werden, wobei letzterer wahrscheinlich eine direkte SIRT4-CRAF-Interaktion darstellt (ARAF indirekt im Rahmen von ARAF/CRAF-Heterodimeren; [119]). Zukünftige weiterführende Arbeiten sollten die Dimerbildung der RAF-Paraloge berücksichtigen und entsprechende Koimmunopräzipitationsanalysen mit geeigneten *knockout* Zelllinienmodellen durchführen. Die subzelluläre Fraktionierung war auch ein interessanter und breitflächiger Ansatz zur Untersuchung der Lokalisation der RAF-Paraloge. Dieser Befund sollte in einer Weiterführung des Projektes mit Hilfe effizienterer subzellulärer Fraktionierungsanalysen in entsprechenden RAF-Paraloge *knockout* Zelllinienmodellen wiederholt werden. Leider war es nicht möglich, den Einfluss von SIRT4 auf CRAF und ARAF und den MAPK-pDRP1 (S616) Signalweg zu untersuchen, da die Etablierung eines induzierbaren Systems zur

kontrollierbaren Expression von SIRT4 nicht realisiert werden konnte. Dieses Experiment sollte Teil zukünftiger Arbeiten sein, um einen möglichen Einfluss von SIRT4 auf den RAS-RAF-MAPK Kinaseweg und weiter auf die Regulation von pDRP1 mit anschließender *fission* und Mitophagie zu untersuchen.

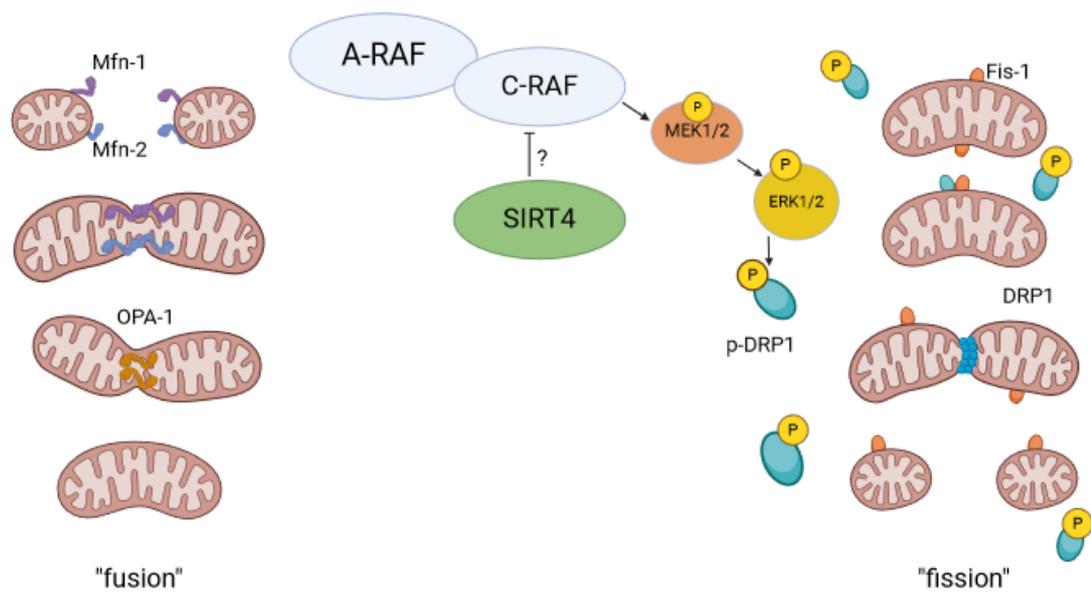


Abb. 19: Darstellung der zugrundeliegenden Arbeitshypothese dieser Arbeit

Schematische Darstellung der putativen Rolle von SIRT4 als Inhibitor der RAF-Kinasen ARAF und CRAF und den Einfluss auf pDRP1 als *downstream* des MAPK-Kinasewegs. Erstellt mit Biorender.com.

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mitochondriale Lokalisation von SIRT4.	2
Abb. 2: Schematische Struktur der humanen Sirtuin-Familie.	5
Abb. 3: pLKO.1 puro Vektorkarte der shRNA-Plasmide gerichtet gegen ARAF.	23
Abb. 4: Subzelluläre Lokalisation der RAF-Kinase Paraloge.	32
Abb. 5: Konfokale <i>Laserscanning</i> Mikroskopie von FLAG-RAF Proteinen und Mitochondrien in transfizierten HeLa-Zellen.	34
Abb. 6: Konfokale <i>Laserscanning</i> Mikroskopie von endogenem ARAF und dem Mitochondrienmarker MTC02.	35
Abb. 7: Validierung der ARAF und CRAF-spezifischen Antikörper.	36
Abb. 8: SIRT4-eGFP, nicht aber eGFP, interagiert mit endogenem ARAF.	36
Abb. 9: SIRT4-eGFP, nicht aber eGFP, interagiert mit endogenem BRAF.	37
Abb. 10: SIRT4-eGFP, aber nicht eGFP, interagiert mit endogenem CRAF. ...	37
Abb. 11: Stabile Expression von SIRT4-eGFP Varianten in HEK293-Zellen. ...	39
Abb. 12: Überprüfung von HEK293-Zelllinien, die stabil SIRT4-eGFP bzw. dessen Mutanten exprimieren.	39
Abb. 13: ARAF interagiert mit SIRT4-eGFP und den untersuchten SIRT4- eGFP Mutanten.	40
Abb. 14: Konfokale <i>Laserscanning</i> Mikroskopie von FLAG-RAF Fusionsproteinen und SIRT4-eGFP in HeLa-Zellen.	41
Abb. 15: Schematische Darstellung der mRNA-Struktur des ARAF- Transkripts und der relativen Lage der untersuchten ARAF spezifischen shRNAs.	43
Abb. 16: shRNA-vermittelte Depletion von ARAF in HEK293 Zellen.	44
Abb. 17: Eine reduzierte ARAF-Expression in HEK293-Zellen ist assoziiert mit erniedrigten pDRP (S616) Proteinmengen nach 60-minütiger Oligomycin/ CCCP Behandlung und mitochondrialem Stress.	46
Abb. 18: Die Proteinmengen von pDRP1 (S616) sind in CRAF- <i>knockout</i> SKBR3-Zellen gegenüber Wildtyp-Zellen nach Oligomycin/CCCP- induziertem mitochondrialen Stress reduziert.	47
Abb. 19: Darstellung der zugrundeliegenden Arbeitshypothese dieser Arbeit	55

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzen der shRNA-Plasmide gerichtet gegen ARAF23

**Tabelle 2: Übersichtliche Darstellung der Lokalisation und Kolokalisation
von endogenen RAF-Paralogen und ARAF-, BRAF- und CRAF-Kinasen42**

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Twig, G. and O.S. Shirihai, *The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(10): p. 1939-51.
2. Wallace, D.C., W. Fan, and V. Procaccio, *Mitochondrial energetics and therapeutics*. *Annu Rev Pathol*, 2010. **5**: p. 297-348.
3. Sorrentino, V., K.J. Menzies, and J. Auwerx, *Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2018. **58**: p. 353-389.
4. Lin, H., et al., *Inhibition of DRP-1-Dependent Mitophagy Promotes Cochlea Hair Cell Senescence and Exacerbates Age-Related Hearing Loss*. *Front Cell Neurosci*, 2019. **13**: p. 550.
5. Noguchi, M. and A. Kasahara, *Mitochondrial dynamics coordinate cell differentiation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **500**(1): p. 59-64.
6. Wai, T. and T. Langer, *Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation*. *Trends Endocrinol Metab*, 2016. **27**(2): p. 105-117.
7. Vara-Perez, M., B. Felipe-Abrio, and P. Agostinis, *Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation*. *Cells*, 2019. **8**(5).
8. Schmidt, L., Heckmann, *Physiologie des Menschen*. Vol. 31. 2010.
9. Vardy, L. and T. Toda, *The fission yeast gamma-tubulin complex is required in G(1) phase and is a component of the spindle assembly checkpoint*. *EMBO J*, 2000. **19**(22): p. 6098-111.
10. Zhou, L., et al., *SIRT5 promotes IDH2 desuccinylation and G6PD deglutarylation to enhance cellular antioxidant defense*. *EMBO Rep*, 2016. **17**(6): p. 811-22.
11. Wang, X., et al., *Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease*. *J Neurosci*, 2009. **29**(28): p. 9090-103.
12. Pirinen, E., G. Lo Sasso, and J. Auwerx, *Mitochondrial sirtuins and metabolic homeostasis*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2012. **26**(6): p. 759-70.
13. Ahuja, N., et al., *Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(46): p. 33583-92.
14. Landry, J., et al., *The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(11): p. 5807-11.
15. Mei, Z., et al., *Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016. **35**(1): p. 182.
16. Frye, R.A., *Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein*

- ADP-ribosyltransferase activity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(1): p. 273-9.
17. Kaeberlein, M., M. McVey, and L. Guarente, *The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms*. Genes Dev, 1999. **13**(19): p. 2570-80.
 18. Zhu, Y., et al., *SIRT3 and SIRT4 are mitochondrial tumor suppressor proteins that connect mitochondrial metabolism and carcinogenesis*. Cancer Metab, 2014. **2**: p. 15.
 19. Benavente, C.A., S.A. Schnell, and E.L. Jacobson, *Effects of niacin restriction on sirtuin and PARP responses to photodamage in human skin*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e42276.
 20. Tan, Y., et al., *A SIRT4-like auto ADP-ribosyltransferase is essential for the environmental growth of Mycobacterium smegmatis*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2016. **48**(2): p. 145-52.
 21. Imai, S., et al., *Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 795-800.
 22. Osborne, B., et al., *The role of mitochondrial sirtuins in health and disease*. Free Radic Biol Med, 2016. **100**: p. 164-174.
 23. Sauve, A.A., et al., *The biochemistry of sirtuins*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 435-65.
 24. Martinez-Redondo, P. and A. Vaquero, *The diversity of histone versus nonhistone sirtuin substrates*. Genes Cancer, 2013. **4**(3-4): p. 148-63.
 25. Jin, Q., et al., *Cytoplasm-localized SIRT1 enhances apoptosis*. J Cell Physiol, 2007. **213**(1): p. 88-97.
 26. Zhong, L., et al., *The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha*. Cell, 2010. **140**(2): p. 280-93.
 27. North, B.J., et al., *The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 437-44.
 28. Bergmann, L., et al., *Subcellular Localization and Mitotic Interactome Analyses Identify SIRT4 as a Centrosomally Localized and Microtubule Associated Protein*. Cells, 2020. **9**(9).
 29. Tanno, M., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6823-32.
 30. Fu, W., Y. Liu, and H. Yin, *Mitochondrial Dynamics: Biogenesis, Fission, Fusion, and Mitophagy in the Regulation of Stem Cell Behaviors*. Stem Cells Int, 2019. **2019**: p. 9757201.
 31. North, B.J. and E. Verdin, *Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein*

- deacetylases*. *Genome Biol*, 2004. **5**(5): p. 224.
32. Hallows, W.C., S. Lee, and J.M. Denu, *Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(27): p. 10230-10235.
 33. Schwer, B., et al., *Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(27): p. 10224-10229.
 34. Lombard, D.B., et al., *Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(24): p. 8807-14.
 35. Haigis, M.C., et al., *SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells*. *Cell*, 2006. **126**(5): p. 941-54.
 36. Jeong, S.M., et al., *SIRT4 protein suppresses tumor formation in genetic models of Myc-induced B cell lymphoma*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(7): p. 4135-44.
 37. Lang, A., et al., *MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4*. *Aging (Albany NY)*, 2016. **8**(3): p. 484-505.
 38. Zhang, M., et al., *SIRT5 deficiency suppresses mitochondrial ATP production and promotes AMPK activation in response to energy stress*. *PLoS One*, 2019. **14**(2): p. e0211796.
 39. Nakagawa, T., et al., *SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle*. *Cell*, 2009. **137**(3): p. 560-70.
 40. Greene, K.S., et al., *SIRT5 stabilizes mitochondrial glutaminase and supports breast cancer tumorigenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019.
 41. Mostoslavsky, R., et al., *Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6*. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 315-29.
 42. Ianni, A., et al., *SIRT7-dependent deacetylation of NPM promotes p53 stabilization following UV-induced genotoxic stress*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021. **118**(5).
 43. Choudhury, M., et al., *SIRT7-mediated modulation of glutaminase 1 regulates TGF-beta-induced pulmonary fibrosis*. *FASEB J*, 2020. **34**(7): p. 8920-8940.
 44. Yu, M., et al., *SIRT7 Deacetylates STRAP to Regulate p53 Activity and Stability*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(11).
 45. Ho, L., et al., *SIRT4 regulates ATP homeostasis and mediates a retrograde signaling via AMPK*. *Aging (Albany NY)*, 2013. **5**(11): p. 835-49.

46. Lang, A., et al., *SIRT4 interacts with OPA1 and regulates mitochondrial quality control and mitophagy*. Aging (Albany NY), 2017. **9**(10): p. 2163-2189.
47. de Moura, M.B., et al., *Overexpression of mitochondrial sirtuins alters glycolysis and mitochondrial function in HEK293 cells*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e106028.
48. Han, Y., et al., *SIRT4 and Its Roles in Energy and Redox Metabolism in Health, Disease and During Exercise*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 1006.
49. Csibi, A., et al., *The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4*. Cell, 2013. **153**(4): p. 840-54.
50. Mathias, R.A., et al., *Sirtuin 4 Is a Lipoamidase Regulating Pyruvate Dehydrogenase Complex Activity*. Cell, 2014. **159**(7): p. 1615-1625.
51. Michishita, E., et al., *Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4623-35.
52. Zeng, J., et al., *SIRT4 is essential for metabolic control and meiotic structure during mouse oocyte maturation*. Aging Cell, 2018. **17**(4): p. e12789.
53. Ramadani-Muja, J., et al., *Visualization of Sirtuin 4 Distribution between Mitochondria and the Nucleus, Based on Bimolecular Fluorescence Self-Complementation*. Cells, 2019. **8**(12).
54. Yang, W., et al., *Mitochondrial Sirtuin Network Reveals Dynamic SIRT3-Dependent Deacetylation in Response to Membrane Depolarization*. Cell, 2016. **167**(4): p. 985-1000 e21.
55. Liu, L., et al., *Dual function microtubule- and mitochondria-associated proteins mediate mitotic cell death*. Cell Oncol, 2009. **31**(5): p. 393-405.
56. Mathias, R.A., T.M. Greco, and I.M. Cristea, *Identification of Sirtuin4 (SIRT4) Protein Interactions: Uncovering Candidate Acyl-Modified Mitochondrial Substrates and Enzymatic Regulators*. Methods Mol Biol, 2016. **1436**: p. 213-39.
57. Bergmann, L., et al., *Subcellular Localization and Mitotic Interactome Analyses Identify SIRT4 as a Centrosomally Localized and Microtubule Associated Protein*. Cells, 2020. **9**(9).
58. Tang, X., et al., *Mitochondrial Sirtuins in cardiometabolic diseases*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(16): p. 2063-2078.
59. Mathias, R.A., et al., *Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity*. Cell, 2014. **159**(7): p. 1615-25.
60. Liu, R., et al., *CDK1-Mediated SIRT3 Activation Enhances Mitochondrial Function and Tumor Radioresistance*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(9): p. 2090-102.

61. Torrens-Mas, M., et al., *Sirtuin 3 silencing impairs mitochondrial biogenesis and metabolism in colon cancer cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2019. **317**(2): p. C398-C404.
62. Schwer, B., et al., *The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase*. J Cell Biol, 2002. **158**(4): p. 647-57.
63. Shi, T., et al., *SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13560-7.
64. Onyango, P., et al., *SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13653-8.
65. Hebert, A.S., et al., *Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome*. Mol Cell, 2013. **49**(1): p. 186-99.
66. Fernandez-Marcos, P.J., et al., *Muscle or liver-specific Sirt3 deficiency induces hyperacetylation of mitochondrial proteins without affecting global metabolic homeostasis*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 425.
67. Schlicker, C., et al., *Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5*. J Mol Biol, 2008. **382**(3): p. 790-801.
68. Fan, J., et al., *Tyr phosphorylation of PDP1 toggles recruitment between ACAT1 and SIRT3 to regulate the pyruvate dehydrogenase complex*. Mol Cell, 2014. **53**(4): p. 534-48.
69. Ozden, O., et al., *SIRT3 deacetylates and increases pyruvate dehydrogenase activity in cancer cells*. Free Radic Biol Med, 2014. **76**: p. 163-172.
70. Park, J., et al., *SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways*. Mol Cell, 2013. **50**(6): p. 919-30.
71. Bell, E.L. and L. Guarente, *The SirT3 divining rod points to oxidative stress*. Mol Cell, 2011. **42**(5): p. 561-8.
72. Sundaresan, N.R., et al., *Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(9): p. 2758-71.
73. Zhang, L., et al., *Differential protein acetylation assists import of excess SOD2 into mitochondria and mediates SOD2 aggregation associated with cardiac hypertrophy in the murine SOD2-tg heart*. Free Radic Biol Med, 2017. **108**: p. 595-609.
74. Lin, Z.F., et al., *SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **441**(1): p. 191-5.

75. Luo, Y.X., et al., *SIRT4 accelerates Ang II-induced pathological cardiac hypertrophy by inhibiting manganese superoxide dismutase activity*. Eur Heart J, 2017. **38**(18): p. 1389-1398.
76. Rapp, U.R., et al., *Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(14): p. 4218-22.
77. Rezaei Adariani, S., et al., *Structural snapshots of RAF kinase interactions*. Biochem Soc Trans, 2018. **46**(6): p. 1393-1406.
78. Avruch, J., et al., *Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade*. Recent Prog Horm Res, 2001. **56**: p. 127-55.
79. Desideri, E., A.L. Cavallo, and M. Baccarini, *Alike but Different: RAF Paralogs and Their Signaling Outputs*. Cell, 2015. **161**(5): p. 967-970.
80. Wellbrock, C., M. Karasarides, and R. Marais, *The RAF proteins take centre stage*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(11): p. 875-85.
81. Leicht, D.T., et al., *Raf kinases: function, regulation and role in human cancer*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1196-212.
82. Osborne, J.K., E. Zaganjor, and M.H. Cobb, *Signal control through Raf: in sickness and in health*. Cell Research, 2012. **22**(1): p. 14-22.
83. Morrison, D.K., *The Raf-1 Kinase as a Transducer of Mitogenic Signals*. Cancer Cells-a Monthly Review, 1990. **2**(12): p. 377-382.
84. An, S., et al., *A-Raf: A new star of the family of raf kinases*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2015. **50**(6): p. 520-31.
85. Downward, J., *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 11-22.
86. Maurer, G., B. Tarkowski, and M. Baccarini, *Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities*. Oncogene, 2011. **30**(32): p. 3477-88.
87. Rauch, J., et al., *Differential localization of A-Raf regulates MST2-mediated apoptosis during epithelial differentiation*. Cell Death Differ, 2016. **23**(8): p. 1283-95.
88. Tartaglia, M., B.D. Gelb, and M. Zenker, *Noonan syndrome and clinically related disorders*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011. **25**(1): p. 161-79.
89. Roring, M. and T. Brummer, *Aberrant B-Raf signaling in human cancer -- 10 years from bench to bedside*. Crit Rev Oncog, 2012. **17**(1): p. 97-121.
90. Nakhaei-Rad, S., et al., *Structural fingerprints, interactions, and signaling networks of RAS family proteins beyond RAS isoforms*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2018. **53**(2): p. 130-156.

91. Tran, T.H., et al., *KRAS interaction with RAF1 RAS-binding domain and cysteine-rich domain provides insights into RAS-mediated RAF activation*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 1176.
92. Nguyen, K., et al., *Exploring CRD mobility during RAS/RAF engagement at the membrane*. Biophys J, 2022. **121**(19): p. 3630-3650.
93. Fang, Z., et al., *Multivalent assembly of KRAS with the RAS-binding and cysteine-rich domains of CRAF on the membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(22): p. 12101-12108.
94. Dhillon, A.S., et al., *Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation*. EMBO J, 2002. **21**(1-2): p. 64-71.
95. Chong, H., J. Lee, and K.L. Guan, *Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation*. EMBO J, 2001. **20**(14): p. 3716-27.
96. Matallanas, D., et al., *Raf family kinases: old dogs have learned new tricks*. Genes Cancer, 2011. **2**(3): p. 232-60.
97. Li, Z.L., P. Prakash, and M. Buck, *A "Tug of War" Maintains a Dynamic Protein-Membrane Complex: Molecular Dynamics Simulations of C-Raf RBD-CRD Bound to K-Ras4B at an Anionic Membrane*. ACS Cent Sci, 2018. **4**(2): p. 298-305.
98. Vandamme, D., et al., *Regulation of the MAPK pathway by raf kinase inhibitory protein*. Crit Rev Oncog, 2014. **19**(6): p. 405-15.
99. Morrison, D.K. and R.E. Cutler, *The complexity of Raf-1 regulation*. Current Opinion in Cell Biology, 1997. **9**(2): p. 174-179.
100. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3291-3310.
101. Karnoub, A.E. and R.A. Weinberg, *Ras oncogenes: split personalities*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008. **9**(7): p. 517-531.
102. Gutierrez-Erlandsson, S., et al., *R-RAS2 overexpression in tumors of the human central nervous system*. Molecular Cancer, 2013. **12**.
103. Giblin, W., M.E. Skinner, and D.B. Lombard, *Sirtuins: guardians of mammalian healthspan*. Trends Genet, 2014. **30**(7): p. 271-86.
104. Schulze, A., et al., *The transcriptional response to Raf activation is almost completely dependent on Mitogen-activated Protein Kinase Kinase activity and shows a major autocrine component*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(7): p. 3450-63.
105. Zuber, J., et al., *A genome-wide survey of RAS transformation targets*. Nat Genet, 2000. **24**(2): p. 144-52.

106. Galmiche, A., et al., *Isoform-specific interaction of C-RAF with mitochondria*. J Biol Chem, 2008. **283**(21): p. 14857-66.
107. Yuryev, A., et al., *Isoform-specific localization of A-RAF in mitochondria*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4870-8.
108. Kashatus, J.A., et al., *Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth*. Mol Cell, 2015. **57**(3): p. 537-51.
109. Fu, L., et al., *SIRT4 inhibits malignancy progression of NSCLCs, through mitochondrial dynamics mediated by the ERK-Drp1 pathway*. Oncogene, 2017. **36**(19): p. 2724-2736.
110. Lang, A. and R.P. Piekorz, *Novel role of the SIRT4-OPA1 axis in mitochondrial quality control*. Cell Stress, 2017. **2**(1): p. 1-3.
111. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
112. Rothbauer, U., et al., *A versatile nanotrapp for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(2): p. 282-9.
113. Lang, A., et al., *Correction: SIRT4 interacts with OPA1 and regulates mitochondrial quality control and mitophagy*. Aging (Albany NY), 2018. **10**(9): p. 2536c.
114. Wang, H.G., U.R. Rapp, and J.C. Reed, *Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria*. Cell, 1996. **87**(4): p. 629-38.
115. Wang, H.G., et al., *Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase*. Oncogene, 1994. **9**(9): p. 2751-6.
116. Rushworth, L.K., et al., *Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(6): p. 2262-72.
117. Drosten, M. and M. Barbacid, *Targeting the MAPK Pathway in KRAS-Driven Tumors*. Cancer Cell, 2020. **37**(4): p. 543-550.
118. Venkatanarayan, A., et al., *CRAF dimerization with ARAF regulates KRAS-driven tumor growth*. Cell Rep, 2022. **38**(6): p. 110351.
119. Mehrabipour, M., et al., *SIRT4 as a novel interactor and candidate suppressor of C-RAF kinase in MAPK signaling*. Life Sci Alliance, 2024. **7**(6).
120. Dai, X., et al., *Acetylation-dependent regulation of BRAF oncogenic function*. Cell Rep, 2022. **38**(3): p. 110250.
121. Wang, Y., et al., *SIRT4-Catalyzed Deacetylation of Axin1 Modulates the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 872444.

122. Zhang, F., et al., *Deacetylation of MTHFD2 by SIRT4 senses stress signal to inhibit cancer cell growth by remodeling folate metabolism*. J Mol Cell Biol, 2022. **14**: p. mjac020.
123. Chang, C.R. and C. Blackstone, *Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1201**: p. 34-9.
124. Han, X.J., et al., *CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology*. J Cell Biol, 2008. **182**(3): p. 573-85.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mich bei der Erarbeitung und Erstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Reza Ahmadian und Björn Stork, die als Gutachter fungiert haben und mir damit den Rahmen für die Erstellung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Mein Dank gilt auch Jürgen Scheller, der mir durch eine zusätzliche Finanzierung die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht hat und mich herzlich in seinem Institut aufgenommen hat.

Bedanken möchte ich mich bei allen am Institut für BCMII, die mich im Labor unterstützt haben. Ich konnte mich jederzeit an alle Mitarbeiter wenden und habe jede Unterstützung erhalten, die ich brauchte. Ein besonderer Dank geht an Marcel Buchholzer, ohne dessen Unterstützung und Know-how viele Experimente nicht möglich gewesen wären.

Ebenso möchte ich mich bei Christoph Bross bedanken, mit dem ich im Team viele Probleme lösen konnte.

Danke auch an alle, mit denen ich in Kooperationen zusammengearbeitet habe und die mir Einblick in ihre Projekte und Forschungsgebiete gegeben haben.

Zuletzt möchte ich Roland Piekorz herzlich danken. Mentor, direkter Betreuer und vor allem Schlüsselfigur des gesamten Projektes. Seine Betreuung und Anleitung, insbesondere aber auch unsere Diskussionen haben mir gezeigt, wie gute wissenschaftliche Praxis in die Tat umgesetzt werden kann.

Der größte Dank gilt meiner Frau und meinen Kindern, die in den letzten Jahren oft auf mich verzichten mussten.

Es gibt unzählige Menschen, die ich hier aufzählen könnte, die mir in vielfältiger Weise geholfen haben, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Euch allen vielen Dank!