

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

Interaktion des Sirtuins SIRT4 mit Mikrotubuli und Komponenten des
 γ TUSC (GCP2/3) Komplexes

Dissertation

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

vorgelegt von

Christoph Bross

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Peter Brenneisen

Für meine Frau Jana
und meine Söhne Hannes und Theo

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, M. Reza Ahmadian, and Roland P. Piekorz. Subcellular Localization and Mitotic Interactome Analyses Identify SIRT4 as a Centrosomally Localized and Microtubule Associated Protein. *Cells*. 2020 24. August, 9(9):1950. doi: 10.3390/cells9091950

Zusammenfassung (deutsch)

Sirtuine fungieren hauptsächlich als Deacetylasen, Deacylasen und ADP-Ribosyltransferasen. Insbesondere SIRT4 konnte dabei als Effektorprotein identifiziert werden, welches im Zusammenhang mit mitochondrialer Dysfunktion und zellulärer Seneszenz steht. SIRT4 fungiert als Tumorsuppressor, wobei in vielen Tumoren die Expression runterreguliert ist. Es konnten extramitochondriale Bindungspartner von SIRT4 identifiziert werden, z.B. GCP2 und GCP3, welche entscheidend sind für den Zellzyklus. Sie formen den *gamma-Tubulin Small Complex*, welcher entscheidend für die Rekrutierung des *gamma-Tubulin Ring Complex* (γ TuSC) ist und damit für die Ausbildung und Stabilisierung der Mikrotubuli an den mitotischen Zentrosomen. Die Interaktion von GCP2/GCP3 mit SIRT4 wurde in dieser Arbeit verifiziert. Zusätzlich konnte eine subzelluläre Ko-Lokalisation von SIRT4 mit GCP2/GCP3 am Zentrosom sowie am mitotischen Spindelapparat durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie nachgewiesen werden. Schließlich konnte durch Mikrotubuli-Pulldown gezeigt werden, dass SIRT4 (i) an polymerisierte Mikrotubuli bindet und (ii) in α -Tubulin Ko-Immunopräzipitations-Experimenten mit α -Tubulin interagiert. Um den Einfluss von SIRT4 auf die mitotische Zellteilung zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit transient transfizierte SIRT4-eGFP exprimierende HeLa-Zellen mit Hilfe eines reversiblen CDK1-Inhibitors in der G₂-Phase arretiert. Nach Wiedereintritt in den Zellzyklus konnte gezeigt werden, dass es bei diesen Zellen zu einer deutlichen Verlangsamung der Mitose kommt im Vergleich zu eGFP exprimierenden Kontrollzellen. Diese Befunde führten zu einem Arbeitsmodell, das die Verzögerung der Mitose durch eine Bindung von SIRT4 zunächst an α -Tubulin Monomere vermittelt wird, welche im Anschluss durch den γ TuSC an das Minus-Ende der Mikrotubuli rekrutiert werden und dort Einfluss auf die Funktion des mitotischen Spindelapparates nehmen. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit GCP3-spezifischen lentiviralen shRNA-Konstrukten transfiziert und selektiert. In ersten Analysen zeigte sich eine signifikante Runterregulation der GCP3 Proteinmengen und dessen zentrosomaler Lokalisation. Zukünftige Untersuchungen sollten insbesondere die konfokalmikroskopische Überprüfung der zentrosomalen Lokalisation von SIRT4 in Abhängigkeit von GCP3 und dem γ TuSC zum Ziel haben.

Zusammenfassung (englisch)

Sirtuins function mainly as deacetylases, deacylases and ADP-ribosyltransferases. SIRT4 in particular has been identified as an effector protein associated with mitochondrial dysfunction and cellular senescence. SIRT4 acts as a tumour suppressor, whereby its expression is downregulated in many tumours. Extramitochondrial binding partners of SIRT4 have been identified, e.g. GCP2 and GCP3, which are crucial for the cell cycle. They form the gamma-tubulin small complex, which is crucial for the recruitment of the gamma-tubulin ring complex (γ TuSC) and thus for the formation and stabilisation of microtubules at the mitotic centrosomes. The interaction of GCP2/GCP3 with SIRT4 was verified in this study. In addition, a subcellular co-localisation of SIRT4 with GCP2/GCP3 at the centrosome as well as at the mitotic spindle apparatus could be detected by confocal laser scanning microscopy. Finally, microtubule pull-down demonstrated that SIRT4 (i) binds to polymerised microtubules and (ii) interacts with α -tubulin in α tubulin co-immunoprecipitation experiments. To investigate the influence of SIRT4 on mitotic cell division, transiently transfected SIRT4-eGFP expressing HeLa cells were arrested in G2 phase using a reversible CDK1 inhibitor. After re-entry into the cell cycle, these cells were shown to undergo a significant slowdown in mitosis compared to eGFP-expressing control cells. These findings led to a working model that the delay in mitosis is mediated by binding of SIRT4 initially to α -tubulin monomers, which are subsequently recruited by the γ TuSC to the minus end of the microtubules, where they influence the function of the mitotic spindle apparatus. To investigate this hypothesis in more detail, HeLa-cells were transfected with GCP3-specific lentiviral shRNA constructs and selected. Initial analyses showed a significant downregulation of GCP3 protein levels and its centrosomal localisation. Future studies should focus in particular on the confocal microscopic examination of the centrosomal localisation of SIRT4 in relation to GCP3 and the γ TuSC.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	Cyclin-abhängige-Kinase
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
cLSM	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie
CoA	Koenzym A
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fötales Kälberserum
GCP	Gamma-tubulin Complex Component
GDH	Glutamatdehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC6	Histon-deacetylase-6
HEK293	Menschliche embryonale Nierenzellen
HeLa	Henrietta Lacks-Zellen
HT1080	Humane Fibrosarkom-Zellen
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium
LTX	Lipofectamin-Transfection Reagent
MAP	Mikrotubuli-assoziierte-Proteine
MP	Mikrotubulipellet

MTOC	Mikrotubuli-organisierendes-Zentrum
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NAD ⁺	Nicotinamid adenine dinucleotide
NP40	Nonidet P-40
PBS	Phosphate-Puffered saline
PCM	Pericentriolar material
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PFA	Paraformaldehyd
Ro3306	CDK1 Inhibitor Roche 3306
rpm	Rounds per minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
shRNA	Small hairpin Ribonukleinsäure
SIRT	Sirtuin
TCL	Total cell lysate
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
α -KG	Alpha-Ketoglutarat
γ -TuRC	Gamma-Tubulin-Ring-Komplex
γ -TuSC	Gamma-Tubulin-Small-Komplex

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung (deutsch)	I
Zusammenfassung (englisch)	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Der Zellzyklus	1
1.2 Der mitotische Spindelapparat	3
1.2.1 Regulierung der Mikrotubulidynamik während der Mitose	5
1.3 Der γ-TuSC Komplex	6
1.4 Die GCP-Proteinfamilie	7
1.5 Sirtuine	8
1.5.1 SIRT4	9
1.6 Ziele der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Chemikalien und Lösungen	13
2.1.2 Enzyme	15
2.1.3 Puffer und Medien	16
2.1.3 Antikörper	20
2.1.4 Vektoren und Plasmide	21
2.1.5 Bakterienstämme	21
2.1.6 Laborgeräte	22
2.1.7 Verbrauchsmaterial	23
2.1.8 Humane Zelllinien	25
2.1.9 Kits	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Bakterielle Transformation	26
2.2.2 Bakterielle Kultivierung zwecks Plasmidisolierung	26
2.2.3 Glycerolkonservierung von Bakterienstämmen	26
2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Maxi-Prep)	27
2.2.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	28

2.2.6	Restriktionsverdau	28
2.2.7	DNA-Gelelektrophorese	28
2.2.8	Kultivierung humaner Zelllinien	29
2.2.9	Zellzählung (Neubauer-Zählkammer)	30
2.2.10	Kryokonservierung von Zelllinien	30
2.2.11	Zellzyklussynchronisierung	31
2.2.12	Transfektion von Plasmid-DNA	31
2.2.13	Zelllyse und Gewinnung von Proteinlysaten	32
2.2.14	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	33
2.2.15	Ko-Immunopräzipitation.....	33
2.2.16	Anti-eGFP Nanobody Ko-Immunopräzipitation	34
2.2.17	Mikrotubuli-Pulldown-Assay	34
2.2.18	Mitotischer Index.....	35
2.2.19	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
2.2.20	Western Blot/Immunoblotanalyse	36
2.2.21	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (cLSM).....	36
2.2.22	Durchflusszytometrie.....	37
2.2.23	Generierung stabil transfizierter Klone zur shRNA-vermittelten zellulären Depletion von GCP3	38
3	Ergebnisse	40
3.1	SIRT4 ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein	40
3.2	SIRT4 interagiert und ko-lokalisiert intrazellulär mit GCP2 und GCP3	45
3.3	ShRNA-vermittelte zelluläre Depletion von GCP3	49
3.4	Ektopische Expression von SIRT4 verzögert die mitotische Progression im Zellzyklus	52
4	Diskussion	56
4.1	Extramitochondriale Proteininteraktion und Ko-Lokalisation von ... SIRT4 mit Komponenten des mitotischen Spindelapparats	56
4.2	SIRT4 als Teil des γ-TuSC und die Rolle von γ-TURC und α-/β-Tubulin dimeren in der Rekrutierung von SIRT4 an den Spindelapparat	58
4.3	Generierung stabiler GCP3-depletierter Zelllinien mit defekter γ-TURC-Funktion	59

4.4	Die Auswirkung erhöhter SIRT4-Mengen auf den mitotischen Zellzyklus und die Proliferation.....	60
4.5	Arbeitsmodell und Ausblick.....	61
5	Abbildungsverzeichnis	63
6	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	64
7	Danksagung	70

kommt. In dieser Phase werden alle für die anschließende DNA-Synthese wichtigen Bestandteile synthetisiert. Es kommt zur Bildung von Zellorganellen, der Synthese von tRNA und rRNA, der Bildung von Bestandteilen des mitotischen Spindelapparates sowie Histonen und vielen weiteren Proteinen und Enzymen. Der DNA-Gehalt der G₁-Zelle kann als 2N beschrieben werden. Dieser N-Wert beschreibt DNA-zytometrisch die Größe des Genoms [4]. Im Anschluss an die G₁-Phase kommt die S-Phase, in welcher der DNA-Gehalt der Zelle verdoppelt wird. Am Ende dieser Phase ist der DNA-Gehalt der Zelle als 4N zu bezeichnen. In der darauffolgenden G₂-Phase werden Replikationsfehler behoben und die Vorbereitungen für die Mitose abgeschlossen. Die Zellgröße nimmt in dieser Phase weiter zu. Die G₁-, S- und G₂-Phasen lassen sich zur sogenannten Interphase zusammenfassen, welche zwischen zwei Zellteilungen stattfindet (Abb. 1). Im Anschluss folgt die Mitose. Das zuvor verdoppelte Erbgut wird mit Hilfe des mitotischen Spindelapparates auf zwei Tochterzellen verteilt. Die Phase der Mitose dauert in menschlichen Zellen ca. 60 bis 90 Minuten und hat damit nur einen geringen zeitlichen Anteil am gesamten Zellzyklus. Der Prozess der Zellteilung ist ein hoch kontrollierter Prozess. Kommt es im Zuge der Mitose zu Missverteilungen der DNA kann dies schwerwiegende Folgen für den Organismus haben, bei denen ein klarer Zusammenhang zur Tumorentstehung und zu Aneuploidien besteht [5]. Um diesen extrem wichtigen Schritt der DNA-Verteilungen zu kontrollieren existieren mehrere Kontrollpunkte, an denen der Status der Zelle während des Zellzyklus kontrolliert wird. Zu den wichtigsten Kontrollpunkten gehören der G₁-, G₂- und Metaphase-Kontrollpunkt. Diese Kontrollpunkte dienen dazu bei auftretenden Fehlern den Zellzyklus zu stoppen und dann die Fehler zu beheben. Im Falle von irreparablen Schäden kann an den Kontrollpunkten auch der Zelltod eingeleitet werden oder die Zelle in die zelluläre Seneszenz übergehen [6]. Einer der Hauptmechanismen der Zellzyklusregulation sind die sogenannten Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK). In den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus liegen diese Cycline in verschiedenen Konzentrationen vor. In Abhängigkeit von Menge und Grad der Phosphorylierung der CDK steuern diese die Aktivierung anderer regulatorischer Faktoren und deren Genexpression [3].

1.2 Der mitotische Spindelapparat

Die mitotische Zellteilung kann selbst nochmals in mehrere Phasen eingeteilt werden. Nach Eintritt in die Mitose, nach Abschluss der G₂ Phase, beginnt die Mitose mit der Prophase (Abb. 2). In dieser Phase beginnen die in der S-Phase verdoppelten Zentrosomen sich langsam voneinander zu entfernen bis sie jeweils an den zu bildenden Spindelpolen positioniert sind. Dort bilden sie jeweils ein Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC). Zentrosomen sind zelluläre Strukturen, welche nicht von einer Membran umgeben sind, und in dessen Kern sich zwei zylindrische Mikrotubuli-Strukturen, die sogenannten Zentriolen, befinden. Diese sind umgeben von einer dichten Hülle aus Proteinen, welche als periozentrioläres Material (PCM) bezeichnet wird. Zu Beginn der Mitose ändert sich die Zusammensetzung und die Größe des PCM, um die Fähigkeit des Zentrosoms, die Keimbildung der Mikrotubuli einzuleiten, zu verbessern [7]. Während dieses Prozesses rundet sich die Zelle ab, die Kernmembran fragmentiert und die Chromosomen beginnen zu kondensieren. Schließlich werden die Chromosomen mit Mikrotubuli verknüpft und in der sich anschließenden Metaphase am Zelläquator gleichmäßig positioniert (Abb. 2).

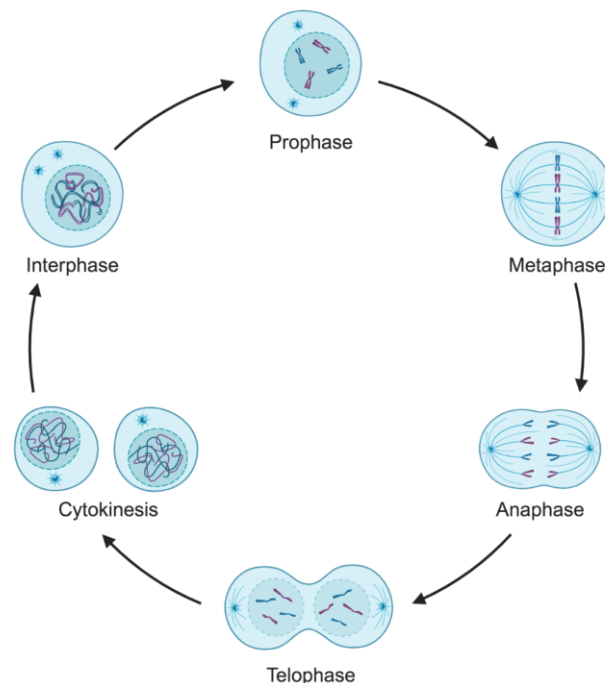


Abb. 2: **Schematische Darstellung der Mitose.** Erstellt mit BioRender.com

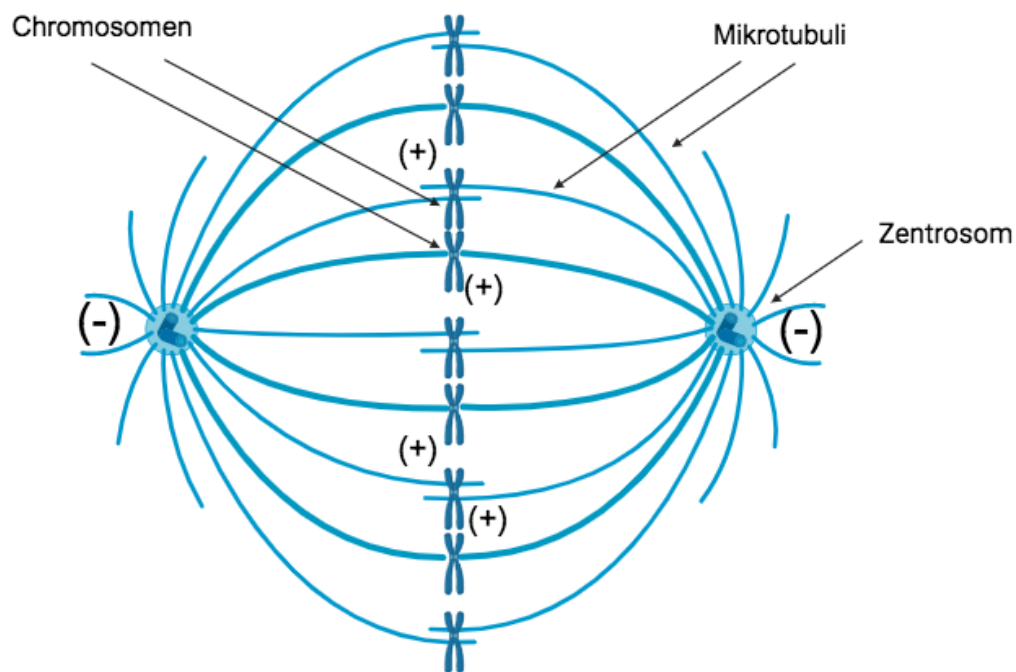


Abb. 3: **Schematische Darstellung des mitotischen Spindelapparates.** Erstellt mit BioRender.com

Nun beginnt sich der mitotische Spindelapparat zu bilden (Abb. 3). Es entsteht ein komplexes Netzwerk aus Mikrotubuli, welche aus polymerisierten α -/ β -Tubulin Heterodimeren bestehen. Diese gehen aus den Zentrosomen am sogenannten PCM hervor, welche den Ursprung der Keimbildung der Mikrotubuli darstellen, die sogenannten Minus-Pole der Mikrotubulipolymerisation (Abb. 3). Dort lagern sich nun immer weitere α , β -Tubulin-Heterodimere an und es entsteht ein hoch dynamischer, wechselnder Prozess aus Polymerisation und Depolymerisation, welcher auch als dynamische Instabilität bezeichnet wird [8, 9]. Die anschließende bipolare Ausrichtung der Mikrotubuli in der Metaphase wird vom sogenannten Metaphase-Checkpoint („*Spindle assembly checkpoint*“) kontrolliert [10-12]. Anschließend an die Metaphase folgt die sogenannte Anaphase. In dieser Phase lösen sich die Schwesterchromatiden voneinander, indem die sogenannten Kohäsine, welche diese vorher zusammenhielten, abgebaut werden [13]. Die geteilten Schwesterchromatiden werden nun an den Polen der neu entstehenden Zelle positioniert. In der nun folgenden Telophase beginnen die Chromatiden wieder zu dekondensieren und es wird eine neue Kernmembran gebildet (Abb. 2). Der entstandene mitotische Spindelapparat

wird abgebaut und es entsteht wieder das deutlich weniger dynamische Mikrotubuligerüst der Interphase. Mit der abschließenden Zytokinese ist die Zellteilung abgeschlossen und es sind zwei neue Tochterzellen entstanden, die nun wieder den Zellzyklus von vorne durchlaufen können.

1.2.1 Regulierung der Mikrotubulidynamik während der Mitose

In Interphase-Zellen dienen die Mikrotubuli der Organisation des Zytoplasmas. Sie positionieren den Nukleus und alle Zellorganellen und sind an intrazellulären Transportvorgängen z.B. von Mitochondrien im Rahmen der selektiven Autophagie (Mitophagie) beteiligt [14]. Sie sind stabile Polymere und formen zusammen mit den Aktinfilamenten und den Intermediärfilamenten das Zytoskelett, welches der Zelle ihre Stabilität verleiht. Dieses Skelett ist aber anders als es der Name vermuten lässt ein dynamisches Konstrukt, welches ständiger Veränderung durch Polymerisation und Depolymerisation unterworfen ist [15].

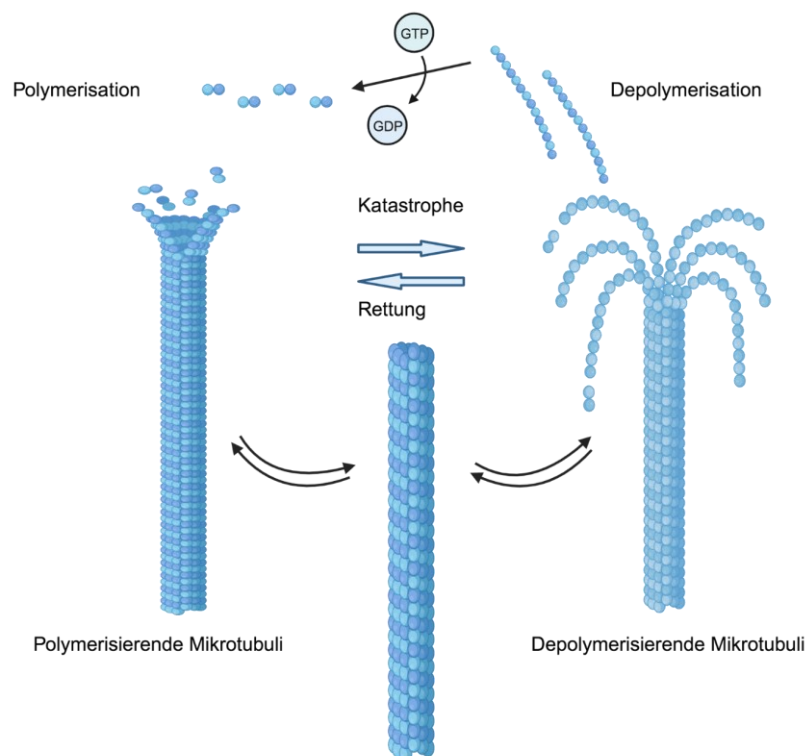


Abb. 4: **Schematische Darstellung der dynamischen Instabilität intrazellulärer Mikrotubuli.** Verändert nach Conde et al. [9]. Erstellt mit BioRender.com

In der Mitose kommt es zu einer Umorganisation der Mikrotubuli hin zum sogenannten mitotischen Spindelapparat (Abb. 3). Dabei kommt es zu Wachstum von Mikrotubuli ausgehend von den Mikrotubuli organisierenden Zentren, den Zentrosomen. Dieser dynamische Prozess ist abhängig von GTP und dem Wachsen des Mikrotubulus durch das Anbinden eines weiteren α/β -Tubulin-Heterodimers am Plus-Ende des Mikrotubulus. Dadurch, dass es sofort zu einer Hydrolyse des GTP zu GDP kommt, kann es jederzeit zu dem Zusammenbrechen des Mikrotubulus kommen, der sogenannten Katastrophe, einer schlagartigen Depolymerisation. Nach der Hydrolyse zu GDP entsteht das sogenannte GDP-Cap, welches den Mikrotubulus für kurze Zeit am Plus-Ende stabilisiert [16]. Dieser Prozess wird auch als dynamische Instabilität bezeichnet (Abb. 4). Die Tubulin-Heterodimere benötigen GTP, welches am β -Tubulin gebunden ist, sowohl für die Polymerisation als auch Depolymerisation. Durch die Hydrolyse von GTP zu GDP wird ein weiteres Dimer gebunden und durch das vorhandene GDP-Cap stabilisiert. Kommt es nun zum Verlust des GDP liegt das Zentrum des Mikrotubulus frei und es kommt zu einer rapiden Depolymerisation [17]. Da es gerade in der Mitose extrem wichtig ist, dass das Mikrotubuligerüst des Spindelapparates stabil bleibt, gibt es die sogenannten Mikrotubuli-assoziierten-Proteine (MAPs), welche für eine Stabilisierung der Mikrotubuli sorgen. Durch die Anwesenheit von MAPs in gereinigten Mikrotubuli konnte gezeigt werden, dass es zu einer höheren Rate des sogenannten *rescues* kommt, also der Stabilisierung und weiteren Polymerisierung des Mikrotubulus. In Abwesenheit der MAPs kommt es signifikant öfter zur sogenannten Katastrophe, also der Depolymerisation des Mikrotubulus [18].

1.3 Der γ -TuSC Komplex

γ -Tubulin wurde schon früh als einer der entscheidenden Faktoren für die Ansammlung von α/β -Tubulin-Einheiten identifiziert [19]. Mit der Zeit wurde jedoch klar, dass an diesem komplexen Prozess noch weitere Proteine in Form eines größeren Proteinkomplexes beteiligt sind [19]. In Studien mit Hefen konnten in diesem Zusammenhang die Proteine Gamma-tubulin Complex Component 2 (GCP2) und Gamma-tubulin Complex Component 3 (GCP3) als Interaktoren von γ -Tubulin identifiziert werden. Diese beiden Proteine bilden zusammen mit zwei γ -Tubulin-Einheiten den sogenannten γ -Tubulin-small-complex (γ -TuSC) [20]. In elektronenmikroskopischen

Studien konnte die Struktur des γ -TuSC als eine Y-förmige Struktur, bei der jeweils am C-Terminus von GCP2 und GCP3 ein γ -Tubulin Molekül interagiert, dargestellt werden. Der N-Terminus von GCP2 und GCP3 binden jeweils aneinander und halten so den γ -TuSC zusammen [21]. In der dreidimensionalen Darstellung des γ -TuSC ist dieser vergleichbar mit der Anordnung von α/β -Tubulin-Einheiten in einem Mikrotubulus. Basierend auf diesen Interaktionen besteht ein Modell für die Mikrotubuli-Nukleation, in welchem eine Helix aus sieben γ -TuSC als optimale Strukturvorlage für die Ansammlung eines Mikrotubulus aus α/β -Tubulin-Einheiten fungiert. In Vertebraten reicht der γ -TuSC allein nicht aus, um das Mikrotubuligerüst aufzubauen. In komplexeren Organismen kommt zu diesem Zweck der wesentlich größere γ -Tubulin-ring-complex (γ -TuRC) zum Einsatz (Abb.5). Dieser Multiproteinkomplex formt in Eukaryoten den Grundstock zur Bildung des Mikrotubuligerüsts an den Minus-Polen der Zentrosomen [22].

1.4 Die GCP-Proteinfamilie

Die Gamma-Tubulin-Komplexprotein-Familie (GCP's) besteht aus bisher fünf bekannten Mitgliedern, *i.e.*, GCP2, GCP3, GCP4, GCP5 sowie GCP6. GCP 2 und GCP 3 bilden zusammen mit γ -Tubulin den γ -TuSC [20], welcher einen Subkomplex zu dem deutlich größeren γ -TuRC darstellt. GCP4, GCP5 und GCP6 sind essentielle Bestandteile dieses Komplexes. Trotz ihrer Wichtigkeit sind immer nur wenige Kopien dieser Proteine mit einem Ring assoziiert [23]. In menschlichen Zellen befinden sich inaktive γ -TuRC's im Zytoplasma und werden nach ihrer Aktivierung zu den Keimzentren der Mikrotubuli rekrutiert. In Depletionstudien von GCP4, GCP5 und GCP6 konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen dieser GCP-Proteine die stabile Ausbildung von γ -TuRC verhindert und somit keine Rekrutierung von γ -Tubulin zum Zentrosom und zu den Spindelmikrotubuli stattfinden kann [24-26]. Dadurch kommt es zu Fehlern bei der Verdopplung von Zentriolen und bei der Spindelausbildung, was häufig die Bildung von monopolaren Spindeln zur Folge hat [25]. Der genaue Mechanismus der Rekrutierung der inaktiven γ -TuRC aus dem Zytoplasma ist bisher noch nicht bekannt. Es wird unter anderen vermutet, dass Pericentrin eine Rolle in der γ -TuRC Rekrutierung zum MTOC spielt [27]. Durch Depletionsversuche

konnte gezeigt werden, dass vor allem durch die Depletion von GCP3 und GCP6 die Menge an γ -TuRC deutlich reduziert war, was zu der Annahme führte, dass diese beiden Proteine von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung der Ringkomplexe sind. Im Besonderen konnte gezeigt werden, dass der mitotische Index bei Depletion von GCP3 oder GCP6 ähnlich stark verringert ist, während er nach Depletion von GCP4 und GCP5 nur geringfügig abnimmt [28]. In der Mitose konnten ähnliche Befunde erhoben werden, d.h., vor allem bei GCP3- und GCP6-Mangel traten vermehrt monopolare Spindeln und schlecht organisierte Mikrotubuli auf [28].

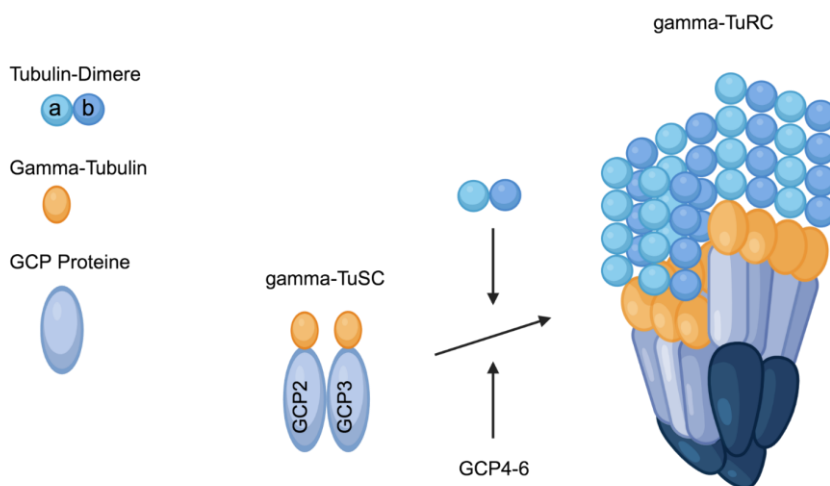


Abb. 5: **Schematische Darstellung des γ -TuSC und des γ -TuRC.** Verändert nach Tovey et al. [29]. Erstellt mit BioRender.com

1.5 Sirtuine

Die Sirtuine sind eine evolutionär konservierte Proteinenzymfamilie bestehend aus sieben Isoformen (SIRT1-7) beim Menschen. Sirtuine im Allgemeinen besitzen eine einzigartige enzymatisch aktive Domäne, die vom Bakterium bis zum Menschen hoch konserviert vorliegt und NAD^+ als Ko-Substrat benötigt [30]. Sirtuine fungieren typischerweise als NAD^+ -abhängige Deacetylasen, Deacetylasen oder ADP-Ribosyltransferasen [31, 32], können aber auch abhängig vom Sirtuin spezifischere enzymatische Aktivitäten aufweisen. Des Weiteren unterscheiden sich die einzelnen Sirtuine, abgesehen von ihren katalytischen Domänen, vor allem durch die unterschiedlich langen Aminosäuresequenzen an den N- und C-Termini, welche für die

intrazelluläre Lokalisation (N-Terminus) und möglicherweise Proteinstabilität (C-Terminus) der Sirtuine verantwortlich sind [30].

Sirtuine führen eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben innerhalb der Zelle aus. Bisher ist bekannt, dass diese wichtigen Regulatoren an verschiedenen Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt sind. Zu diesen gehören z.B. epigenetische Mechanismen zur (In)aktivierung von Genen, Alterungs- bzw. Seneszenzprozesse, metabolische Regulation in Mitochondrien/Zellmetabolismus, Apoptose-Signalwege, DNA-Reparatur, aber auch die Regulation des Zellzyklus [33].

1.5.1 SIRT4

SIRT4 wird in Säugetieren in den meisten Zelltypen nur in geringen Proteinmengen vorgefunden [34]. SIRT4 lokalisiert innerhalb der Zelle typischerweise in der Mitochondrienmatrix (Abb. 6) und ist in bestimmten Gewebetypen (Leber-, Hoden- und Nierengewebe) wie auch in mitochondrienreichen Geweben wie Hirngewebe, der quergestreiften Muskulatur, Leber und β -Zellen des Pankreas am höchsten exprimiert [6, 35]. SIRT4 weist speziell eine NAD^+ -abhängige ADP-Ribosyltransferase-Aktivität auf [36, 37]. Aufgrund der mitochondrialen Lokalisation von SIRT4 wurde als dessen erstes Substrat die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) beschrieben [37] (Abb. 6). SIRT4 katalysiert die Anheftung von ADP-Ribose aus NAD^+ an die GDH (ADP-Ribosylierung) [37] und inhibiert dadurch die GDH-Aktivität. GDH katalysiert die Reaktion von L-Glutamat zu α -Ketoglutarat und hat eine entscheidende Rolle im Glutamat- und Glutamin-Metabolismus. Dieser spielt eine wichtige Rolle in der Bildung von Energie in Form von ATP, da er den Zitratzyklus anaplerotisch mit α -Ketoglutarat speist und damit entscheidend für die Proliferation der Zelle ist (Abb. 6). Generell ist die Zelle beim Auf- und Abbau von Aminosäuren auf die Bereitstellung von α -Ketosäuren angewiesen. Insgesamt kann man zusammenfassen, dass SIRT4 als metabolischer Tumorsuppressor somit ein direkter Interaktionspartner der GDH ist und dadurch Einfluss auf den Glutamin-Metabolismus sowie auch auf die Insulinsekretion hat [37, 38]. Das ebenfalls mitochondrial lokalisierte Sirtuin SIRT3 erhöht dagegen die Aktivität von GDH durch dessen Deacetylierung. Generell werden SIRT3 und SIRT4 als funktionell antagonistisch zueinander beschrieben [39, 40]. Schließlich besitzt SIRT4 auch eine Lipoamidase-Aktivität, durch welche

die Pyruvat-Dehydrogenase Aktivität als anaplerotische Reaktion inhibiert wird (Abb. 6). Einer Studie zufolge inhibiert es den Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) Komplex durch Hydrolyse entscheidender Ko-Faktoren, den Lipoamiden [34], so, dass die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA gehemmt wird (Abb. 6).

Interessanterweise wird die Gentranskription und -expression von SIRT4 als Antwort auf mTOR *signaling* inhibiert, was zu einer positiven Beeinflussung des Glutamin-Metabolismus und damit einhergehend der Proliferation der Zelle führt [41]. Eine mögliche Erklärung ist die Interaktion von SIRT4 mit der GDH, welche durch eine Suppression von SIRT4 eine erhöhte Aktivität zeigt und dadurch den Zitratzyklus positiv beeinflusst und zu einer erhöhten Zellproliferationsrate führt.

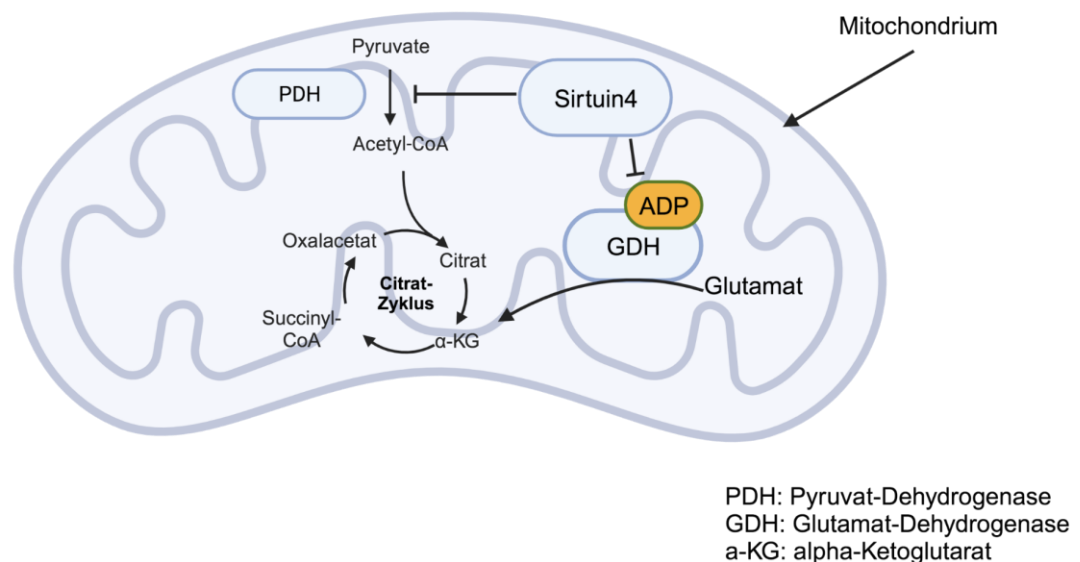


Abb. 6: **Schematische Darstellung der Funktionen von SIRT4 im Mitochondrium.** Erstellt mit BioRender.com

Interessanterweise legen neuere Studien nahe, dass SIRT4 auch extramitochondrial lokalisiert [1, 42, 43] und dort nukleäre und/oder zytoplasmatische Funktionen einnimmt. So wurde SIRT4 am meiotischen Spindelapparat während der Eizellreifung identifiziert [43]. In gealterten Mäusen konnten höhere SIRT4-Proteinmengen nachgewiesen werden, welche mit einer höheren Frequenz meiotischer Defekte assoziiert sind. Diese konnten durch zelluläre Depletion von SIRT4 reduziert werden

[43]. Ramadani-Muja et al. konnten mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie eine vermehrte stressinduzierte Lokalisation von SIRT4 im Zellkern und Zytoplasma beobachten [42]. Die Arbeit von Mehrabipour et al. beschrieb kürzlich eine Interaktion von SIRT4 mit C-RAF, einer zentralen, zytoplasmatisch lokalisierten regulatorischen Kinase im MAPK-Signalweg, wobei dieser durch SIRT4 möglicherweise über eine inhibitorische Interaktion mit C-RAF gehemmt werden kann [44]. Schließlich konnte auch basierend auf der hier vorliegenden Promotionsarbeit eine neuartige Lokalisation und Funktion von SIRT4 am Spindelapparat im Rahmen der mitotischen Zellteilung gezeigt werden [1].

1.6 Ziele der Arbeit

SIRT4 stellt ein *bona fide* mitochondriales Protein mit einer weitgehend unverstandenen extramitochondrialen Lokalisation und Funktion dar. SIRT4 wurde in Vorarbeiten an den Zentrosomen detektiert und in einer Proteomanalyse wurden mehrere Interaktionspartner identifiziert, welche wichtig für die Spindeldynamik während der mitotischen Zellteilung sind. Es sollte also zunächst die Interaktion von SIRT4 mit Mikrotubuli mit Hilfe von Mikrotubuli-Pulldown-Experimenten und Westernblot-Analysen untersucht werden. Weitergehend sollte die in der Proteom-Analyse identifizierte Interaktion von SIRT4 mit GCP2 und GCP3 mittels Ko-Immunopräzipitationsexperimenten bestätigt und untersucht werden. Auch die subzelluläre Ko-Lokalisation von SIRT4 und GCP2 und GCP3, insbesondere während den unterschiedlichen Phasen der Mitose, sollte mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie untersucht werden. Abschließend sollte eine shRNA-vermittelte zelluläre Depletion von GCP3 etabliert werden, um die funktionelle Bedeutung der GCP3-SIRT4 Interaktion für die mitotische Lokalisation von SIRT4 an den Zentrosomen und dem Spindelapparat zu klären.

Diese Punkte führen somit zu den folgenden Kernfragen dieser Arbeit:

1. Interagiert SIRT4 mit Mikrotubuli?
2. Ko-Immunopräzipitiert SIRT4 mit GCP2/GCP3?
3. Ko-Lokalisiert SIRT4 mit GCP2 und GCP3 an den Zentrosomen und Mikrotubuli?
4. Rekrutiert GCP3 SIRT4 an die mitotische Spindel?
5. Welche funktionelle Rolle spielt SIRT4 in der Mitose?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien/Lösungen	Hersteller/Vertreiber
1x Collagen IV Lyophilisat	Sigma
2-Mercaptoethanol	SIGMA Life Science
2-Propanol	VWR
3-(N-morpholino)propansulfonic acid (MOPS)	ICN
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich
Aceton	MERCK
Acrylamid	Thermo Scientific
Agarose	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem
Bromphenolblau	Thermo Scientific
Calciumchlorid (CaCl ₂)	MERCK
CHAPS	Roth
CO ₂ independent media [-] Glutamine	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	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 (G-418)	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	Roth
Methanol	VWR
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumcitrat	MERCK
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	MERCK
Nocodazol	Sigma Aldrich
Oligomycin	Fisher
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	Life Science
Puromycin	GENAXXON Bioscience
RO-3306	Sellekchem
Roti®-Histofix	Roth
Rotiforese-Gel	Roth

Rotipore 5x Bradford reagent solution	Roth
Sodium orthovanadate (Na_3VO_4)	Life Science
Taxol®	Sigma Aldrich
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Trehalose	Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	MERCK
Trypanblau 0,4%	BIO-RAD
Trypsin	Genaxxon Bioscience
TurboFect Transfection Reagent	Life Technologies
Tween-20	Sigma-Aldrich
β -Glycerophosphat	SIGMA Life Science

2.1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme	Vertreiber
HIND III	Thermo Scientific
NOT I	Thermo Scientific

2.1.3 Puffer und Medien

Ko-IP Waschpuffer

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

EDTA (0,5 M) Stocklösung (200 ml)

Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37,22 g
H ₂ O	140 ml
Einstellen auf pH 8,0	
Auf 200ml mit Milli-Q-Wasser auffüllen	

10x RunningPuffer Stocklösung (5 L)

Tris	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	
Einstellen auf pH=8,3	

10x BlottingPuffer Stocklösung (1 L)

Tris	30,29 g (0,25 M)
Glycin	142,63 g (1,9 M)
Auf 1 L mit Milli-Q-Wasser auffüllen	

1x BlottingPuffer (2 L)

10 x BlottingPuffer	200 ml
Methanol	400 ml
Milli-Q-Wasser	1400 ml
Vor Gebrauch frisch angesetzt	

10x TBS Stocklösung (2 L)

Tris	121,14 g (500 mM)
NaCl	175,32 g (1500mM)
Auf 2 L mit Milli-Q-Wasser auffüllen.	
Einstellen auf pH 7,5	
Autoklavieren	

5x 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-Puffer	500 ml
Einmal aufkochen, vor jedem Gebrauch ebenfalls aufkochen.	

Trenngelpuffer (TGP) Stocklösung (1 L)

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.

Sammelgelpuffer (SGP) Stocklösung (1 L)

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 auf ein Gesamtvolumen von 1 L mit Milli-Q-Wasser auffüllen

SDS-PAGE – Herstellung von Sammelgel und Trenngel

10 %	2 Gele:	
	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	8 ml	3,4 ml
Acrylamid	6,6 ml	1 ml
TGP	5,2 ml	-
SGP	-	1,5 ml
10 % APS	200 µl	60 µl
TEMED	8 µl	6 µl

4X PHEM Puffer:

Pipes 60,57 g (0,5 M) in 400 ml dest. Wasser

HEPES 11,92g

EGTA 7,6 g

Magnesiumsulfat 1,97g

Einstellen auf pH-Wert 6,8

Auf 500 ml auffüllen mit dest. Wasser

Protease und Phosphatase Inhibitor hinzugeben

Autoklavieren

Lagerbar bei 4°C

2.1.3 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper (Spezies)

anti-Beta-Aktin (aus Maus)
anti-Flag M2 (aus Hase)
anti-Flag M2 (aus Maus)
anti-GFP (aus Maus)
anti-GFP (aus Maus)
anti-GCP2 (aus Maus)

anti-GCP3 (aus Maus)

anti-SIRT4 (aus Hase)

anti-SIRT4 (aus Maus)
anti- α -Tubulin (aus Ratte)
anti-eGFP (aus Hase)

Hersteller/Vertreiber

Santa Cruz (sc-47778)
Sigma Aldrich (F7425)
Abcam (ab49763)
Roche (14717400)
Roche (1181446001)
Santa Cruz (sc. 377117)
Santa Cruz (sc. 373758)
Santa Cruz (sc. 135053)
Sigma-Aldrich
Santa Cruz (sc-5286)
Thermo Scientific

Sekundärantikörper (konfokale Laserscanning-Mikroskopie und Western Blotting)

Antikörper

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

Hersteller

Invitrogen
Invitrogen
Invitrogen
Invitrogen
Invitrogen
Invitrogen
Invitrogen
Invitrogen

IRDye® 680RD anti-rabbit
IRDye® 800CW anti-goat
IRDye® 800CW anti-rabbit

LI-COR
LI-COR
LI-COR

2.1.4 Vektoren und Plasmide

pcDNA3.1-SIRT4-GFP
pLKO.1
pCMV3-TUBGCP2-Flag
pCMV3-TUBGCP3-Flag

AG Piekorz
Sigma-Aldrich
Sino Biological
Sino Biological

2.1.5 Bakterienstämme

E.coli DH5 α

Thermo Scientific

2.1.6 Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller/ Vertreiber
LSM 510-Meta (Konfokalmikroskop)	Zeiss
Bio Budget	Technologies GmbH
Block-Heater	Stuart Scientific
Zentrifuge 5424	Eppendorf
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia
FACS Calibur + Flowing Software	BD Bioscience
Function Line	Heraeus
Gel Imager	Intas
Infinite M200Pro Decan Reader	Tecan
Inkubator Hera Cell	Heraeus
Kaltzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf
Lichtmikroskop Axiovert 28	Zeiss
PCR-Mastercycler	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	Neubauer
Nikon Eclipse TE2000-E Mikroskop	Nikon
Odyssey Infrared Technology	LI-COR
pH-meter	Inolab
Peqlab Nano Drop 2000c	Thermo Scientific
Schüttelinkubator 3031	GFL
Shaking Incubator-Multitron	INFORS
Sterilbank Hera Safe	Heraeus
Tecan Microplate Reader	Tecan
Thermo-Shaker	Universal Labor- technik
UV-Kammer	INTAS
Vortexer: VF 2	IKA Labortechnik

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Sonstige Materialien

	Hersteller/Vertreiber
100 mm Zellkulturschale	TPP
12-well Zellkulturplatte	TPP
150 mm Zellkulturschale	TPP
24-well Zellkulturplatte	CytoOne
6-well Zellkulturplatte	CytoOne
Amersham Protran Nitrocellulosemembran	GE Health Care Life Sciences
Cell scraper	Greiner bio-one
Counting slides	BIO-RAD
Deckgläser Ø 18 mm	VWR
Deckgläser Ø 22 mm	VWR
FACS Canto II	BD Bioscience
Filterpapier Westernblot	Wathman™
Glas Pasteurpipetten	BRAND
Graduated Tips, 1250 µl XL	Tip One
Graduated Tips, 300 µl	Tip One
Graduated Tips, 10 µl	Tip One
ibi Treat 60µ-Dish (Lebendzellaufnahmen)	Ibidi
Kolben, 50 ml	DURAN
Kolben, 100 ml	DURAN
Kolben, 250 ml	DURAN
Kolben, 500 ml	DURAN
Kolben, 1000 ml	DURAN
Küvetten	Sarstedt
Laborflasche, 250 ml	DURAN
Laborflasche, 500 ml	DURAN
Laborflasche, 1000 ml	DURAN
Laborflasche 2000 ml	DURAN
Objektträger	NeoLab
Omnifix-Spritzen (5 ml)	BRAUN

Petri-Dish (Bakterien)	Greiner bio-one
Polystyrene Round-Bottom Tube, 5 ml	Falcon
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Safe Seal Microtubes, 1,5 ml	Sarstedt
Stripette, 5ml	Costar
Stripette, 10 ml	Costar
Stripette, 25 ml	Costar

2.1.8 Humane Zelllinien

Zelllinie Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
HEK293	embryonale Nierenzellen	AG Piekorz/ DSMZ
HEK293-eGFP	embryonale Nierenzellen	AG Piekorz [45]
HEK293-SIRT4-eGFP	embryonale Nierenzellen	AG Piekorz [45]
HeLa	Epithelzellen Zervixkarzinom	AG Piekorz/ DSMZ
HeLa pUC-eGFP	Epithelzellen Zervixkarzinom	AG Piekorz [1, 46]
HeLa pUC-SIRT4-eGFP	Epithelzellen Zervixkarzinom	AG Piekorz [1, 46]
HT1080	Bindegewebszellen Fibrosarkom	AG Mielke

2.1.9 Kits

Kits	Hersteller/Vertreiber
NucleoBond® Xtra Midi / Maxi	Machery-Nagel

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterielle Transformation

Bei der bakteriellen Transformation handelt es sich um ein Verfahren zur Einschleusung von Plasmid-DNA in Bakterien, um diese Plasmid-DNA zu vermehren.

Bei der Transformation wurde zunächst das Plasmid in 20 µl Wasser (ddH₂O) verdünnt. Im nächsten Schritt wurden kompetente *E. coli* Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 2 µl der Plasmidsuspension mit einer angestrebten DNA-Konzentration von 1 µg/µl in die Bakteriensuspension gegeben und vorsichtig resuspendiert. Nun musste dieser Ansatz zwei Minuten auf Eis inkubiert und anschließend ein 45 Sekunden lang andauernder Hitzeschock bei 42°C durchgeführt werden. Im Anschluss wurden die Bakterien wieder auf Eis gelagert. Nun wurde dieser Bakteriensuspension 200 µl LB-Medium hinzugefügt und diese für 40 Minuten bei 350 rpm und 37°C im Thermoinkubator geschüttelt. Anschließend wurden die transformierten Bakterien mit einer Pipette aufgenommen, auf einer mit einem speziellen Antibiotikum (Kanamycin, 50µg/ml) behandelten Agar-Platte ausgebracht und bei 37°C über Nacht im Inkubator inkubiert.

2.2.2 Bakterielle Kultivierung zwecks Plasmidisolierung

Zur Kultivierung des transformierten Bakterienstammes wurde von der inkubierten Agar-Platte eine Kolonie ausgewählt und damit ein Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium inokuliert. Dieses wurde mit dem passenden Antibiotikum versetzt, um ein Heranwachsen nicht transformierter Bakterien zu verhindern. Diese angesetzte Bakterienkultur wurde im Anschluss i.d.R. über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bei 110 rpm inkubiert.

2.2.3 Glycerolkonservierung von Bakterienstämmen

Am nächsten Tag wurde nach einer optischen Überprüfung der bakteriellen Kultur, d.h. bei ausreichender Bakteriendichte, ein Cryo-stock dieses Stammes angelegt.

Dazu wurde die Kultur aus dem Schüttelinkubator entnommen und dann 500 µl dieser Kultur in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dann fügte man dieser Kultur 500 µl einer 65%igen Glycerinlösung hinzu und resuspendierte diese Lösung vorsichtig mit der Pipette. Dieses Tube wurde im Anschluss beschriftet und zunächst für 60 Sekunden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C im Ultratiefkühlschrank verwahrt.

2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Maxi-Prep)

Die Isolierung der Plasmide wurde mit einem Kit der Firma Macherey Nagel durchgeführt. In diesem Set sind verschiedene Puffer und Lösungen enthalten. Das vorbereitete Bakterienpellet wurde zunächst mit 12 ml RE-ES Puffer mit RNase A (50 mg auf 500 ml RE-ES Puffer) gelöst. Im Anschluss wurden 12 ml PufferLYS-EF hinzugefügt und das Gefäß fünfmal invertiert. Nun wurde eine Säule in eine Haltevorrichtung gehängt und mit einem Filter bestückt, welcher mit 25 ml EQ-EF Puffer benetzt wurde. Zu dem Isolierungsansatz wurden dann 12 ml NEU-EF Puffer gegeben und invertiert, bis es zu einem Farbumschlag ins klare gekommen war. Der Ansatz musste fünf Minuten auf Eis inkubiert werden und wurde dann für fünf Minuten bei 4000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und langsam auf den vorbereiteten Filterrand getropft. Direkt im Anschluss wurden 10 ml FIL-EF Puffer auf den Filter gegeben. Nach Durchlaufen der gesamten Flüssigkeit wurde der Filter verworfen. Nun wurden zunächst 90 ml ENDO-EF Puffer und im Anschluss 35 ml WASCH-EF Puffer durch die Säule laufen gelassen. Nun wurde ein neues 15 ml Falcon-Gefäß unter die Säule gestellt und 15 ml ELU-EF Puffer in die Säule gegeben, welche im Anschluss entsorgt werden kann. In das Falcon-Gefäß mit dem DNA-Eluat wurden dann 10,5 ml Isopropanol (Electran) pipettiert und dieser Ansatz wurde bei 4500 x g für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden 5 ml 70%-iges Ethanol hinzugegeben und der Ansatz erneut unter identischen Bedingungen abzentrifugiert. Das entstandene Pellet musste nun trocknen und wurde danach mit 500 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Zum Schluss erfolgte eine DNA-Konzentrationsbestimmung.

2.2.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Das isolierte Plasmid musste auf den Gehalt und die Reinheit der DNA überprüft werden. Dazu wurde 1 µl des isolierten Plasmids auf der Testspitze des Nano-Drop Spektralphotometers platziert. Nach einer kurzen Messung erhält man das Verhältnis von DNA zu Protein (oD_{260}/oD_{280}), um die Reinheit des Plasmids zu beschreiben und zusätzlich die Konzentration der DNA in µg/µl.

2.2.6 Restriktionsverdau

Die durch Transformation hergestellte Plasmid-DNA musste vor ihrer weitergehenden Verwendung überprüft werden. Zum Zwecke dessen wendete man den sogenannten Restriktionsverdau an. Bei dieser Methode wurden spezifische Restriktionsenzyme eingesetzt, welche die gewünschte DNA linearisieren bzw. an fest definierten Basensequenzen schneiden. So erhält man linearisierte DNA-Fragmente mit definierter Größe. Dazu wurde 1 µg Plasmid-DNA mit dem vorgesehenen 10x Reaktionspuffer und dem/den geeigneten Restriktionsenzym(en) inkubiert. Zur Kontrolle wurde immer ein Probenansatz ohne Restriktionsenzyme angesetzt. Diese Proben wurden bei 37°C für zwei Stunden inkubiert.

2.2.7 DNA-Gelelektrophorese

Die durch den Restriktionsverdau aufgespaltenen oder linearisierten Basensequenzen des Plasmids wurden mit Hilfe einer DNA-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurde ein 1%-iges Agarosegel gegossen und zusammen mit HD Green in die Gelelektrophoresekammer gegeben. Es wurden 2 g Agarose in 200 ml 1xTAE-Puffer (TRIS-HCl, Acetat, EDTA) in der Mikrowelle erhitzt, bis es flüssig war und im Anschluss in eine bereits vorbereitete Gelgieß-Apparatur mit entsprechendem Ladungskamm gegeben. In das flüssige Gel wurden vorher 2,5 µl HD Green pipettiert. Durch die Verwendung von HD Green wird die DNA fluoreszenzmarkiert, um die Restriktionsbanden später sichtbar zu machen. Die Proben wurden in die Kammern des Kamms pipettiert und anschließend wurde die Apparatur unter Span-

nung gesetzt. Bei gleichbleibenden 100 V wurde das Gel für 35 Minuten laufen gelassen. Dabei wandert die negativ geladene DNA in Richtung Pluspol und trennt sich ihrer Größe nach auf (d.h., anhand der Anzahl an Basenpaaren). Nach den abgelaufenen 35 Minuten wurde das Gel aus der Apparatur entnommen und in einen Intas-Gel-Imager gegeben. Die sichtbar gewordenen Banden können mit Hilfe eines benutzten Gel-Standards analysiert werden und mit den durch den Restriktionsverdau entstandenen Basensequenzen verglichen werden, um sicherzustellen, dass es sich um die gewünschten Sequenzen handelt und somit die erfolgreiche Isolierung des Plasmids überprüft werden kann.

2.2.8 Kultivierung humaner Zelllinien

Bei der Kultivierung humaner Zelllinien musste ein geeignetes Nährmedium benutzt werden. Für die Arbeiten in der Zellkultur wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) benutzt. Dieses Medium wurde vor dem Einsatz in der Zellkultur unter sterilen Bedingungen mit einem geeigneten Antibiotikum (Pen/Strep) und fötalem Kälberserum (FCS) versetzt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Zellinkubator inkubiert. Alle drei bis vier Tage, in Abhängigkeit ihrer Konfluenz, mussten die Zelllinien passagiert werden. Das alte Medium musste von den Zellen abgesaugt werden und anschließend wurden diese mit 1xPBS^{-/-} gewaschen und dann mit einer geeigneten Menge Trypsin versetzt um die Zelladhäsion zu lösen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Zellen mit 5 ml DMEM aus der Zellkulturflasche aufgenommen und in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß übertragen. Dieses wurde für 5 min bei 1200 x g zentrifugiert, sodass sich die Zellen am Boden des Falcons sammeln. Das Trypsin-DMEM-Gemisch wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert. Die nun vereinzelter Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:10 oder 1:20 in Abhängigkeit ihrer vorherigen Konfluenz neu ausplattiert. Bei stabil transfizierten Zelllinien musste je nach Resistenz entweder eine Puromycin oder G418 hinzugefügt werden, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Ist die Ausbringung einer definierten Anzahl an Zellen vonnöten, so wurden diese vereinzelter Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und einem Mikroskop gezählt und mit definierter Zellanzahl ausgebracht.

2.2.9 Zellzählung (Neubauer-Zählkammer)

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer benutzt. Dazu wurden 10 µl der durch Passagieren der Zellkultur vereinzelter Zellen entnommen und 10 µl Trypanblau vermischt. Trypanblau wird durch lebende Zellen wieder ausgeschleust. Somit ist eine optische Unterscheidung gegenüber toten Zellen möglich. 10 µl dieser angefärbten Zellsuspension wurden zwischen die Grundplatte und die Deckplatte der Zählkammer gegeben. Die Grundplatte musste an den Rändern leicht befeuchtet werden, damit die Deckplatte nicht verrutschen kann und mit dem richtigen Abstand auf der Grundplatte liegt. Ist dies der Fall, waren am Rand an der Kontaktfläche beider Platten sogenannte Interferenzfarben zu sehen. Anschließend wurden die Zellen in vier, durch Linien eingeteilte Quadranten gezählt und mit folgender Formel die Zellzahl bestimmt:

$$\frac{\text{Gesamtzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Kammern}} \times 2 (\text{Gesamtvolumen der Probe}) \times 10000 = \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

Nun musste nur noch die entsprechende Menge an Zellsuspension berechnet und dann auf einer Zellkulturschale ausgebracht werden.

2.2.10 Kryokonservierung von Zelllinien

Zur Kryokonservierung humaner Zelllinien wurden die in Kultur gehaltenen Zellen bis zu einer Konfluenz von mindestens 80% kultiviert und anschließend wie beim Vorgang des Passagierens aufgenommen. Das gewonnene Zellpellet wurde nicht in Zellkulturmedium resuspendiert, sondern in 4,5 ml FCS (10% DMSO). Diese Suspension wurde nun zu je 1ml in vorbereitete Kryo-Röhrchen pipettiert. Diese Kryo-Röhrchen wurden zunächst in einer mit Isopropanol befüllten Cryo-Safe-Box für zwei Tage in den Ultratiefkühlschrank bei -80°C gestellt. Die Cryo-Safe-Box garantiert durch das Isopropanol ein gleichmäßiges und schonendes Einfrieren mit einer Temperaturreduktion von 1°C pro Minute. Im Anschluss an diesen Schritt wurden die Zellen in den Röhrchen aus der Cryo-Safe-Box entnommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.11 Zellzyklussynchronisierung

Durch die Zugabe des selektiven CDK1-Inhibitors RO3306 können Zellen reversibel in der G₂/M-Phase der Mitose arretiert werden [47]. Zur Synchronisierung der Zellen wird das Medium der ausgebrachten Zellen vorsichtig von den Zellkulturplatten abgenommen und es wird neues, RO3306-haltiges Medium auf die Zellen gegeben. Bei HEK293-Zellen beträgt die benötigte Konzentration für einen G₂/M-Arrest 10 µM. Diese Zellen werden nun maximal zwölf Stunden mit diesem Medium inkubiert. Durch vorsichtiges Entfernen des RO3306-haltigen Mediums und einem vorsichtigen Hinzugeben von frischem Kulturmedium sind die jetzt synchronisierten Zellen in der Lage den G₂/M Arrest zu überwinden. Nun kann die Progression der Zellen durch G₂ und unterschiedliche Mitosephasen untersucht werden. Zusätzlich kann durch diese Methode auch die subzelluläre Lokalisation definierter Proteine in bestimmten Zellteilungsschritten untersucht werden.

2.2.12 Transfektion von Plasmid-DNA

Bei der Transfektion humaner Zelllinien wurde ein zuvor isoliertes bakterielles Plasmid in die Zelle eingebracht, um neue transient oder stabil transfizierte Zelllinien mit neuen Eigenschaften, wie zum Beispiel der Überexpression bestimmter Proteine, zu erhalten. Zum Zwecke der Transfektion wurden unterschiedliche Transfektionsmedien eingesetzt. Vor Versuchsbeginn wird eine für den Versuch benötigte Menge an Zellen in 15 cm Zellkulturschalen ausgebracht. Nach ca. 48 Stunden werden diese Zellen mit einer Konfluenz von optimaler Weise um die 50-60% transfiziert. Dafür wird die entsprechende Transfektionslösung nach der Calciumchlorid-Methode oder mittels Turbofect oder Lipofectamin LTX Reagentien nach Herstellerangaben angesetzt. Die Calciumchlorid-Methode wurde zur Transfektion der HEK293 Zellen eingesetzt. Bei einer Konfluenz von ca. 60-70 % wurde die Transfektionslösung vorbereitet, welche aus 15 µg Plasmid-DNA, 445 µl sterilem Wasser und 55 µl 2,5 M CaCl₂ besteht. Dazu kamen 500 µl 2xBBS. Nach einer Inkubationsphase von 20 min wurden 1000 µl dieser Lösung vorsichtig auf die Zellen gegeben. Nach sechs bis acht Stunden sollte ein Mediumswechsel erfolgen, um zelltoxische Effekte zu verhindern. Turbofect wurde zumeist als Transfektionsmedium genutzt, um Zellen für die konfokale Mikroskopie vorzubereiten. Die auf 24 well-plates ausgebrachten

Zellen (75000 pro well, 24 Stunden vor Transfektion) wurden dann mit einer Lösung bestehend aus 100 µl serumfreiem DMEM, 1 µg Plasmid DNA, dem doppelten Volumen an Turbofect, und einem mit OptiMem-Medium aufgefüllten Gesamtvolumen von 200 µl nach einer Inkubation von 15-20 Minuten bei RT transfiziert. Ein Mediumswechsel sollte nach sechs Stunden erfolgen und die Transfektionseffizienz war nach 48 Stunden ausreichend, um die Zellen weitergehend zu untersuchen. Auch die Lipofectamin LTX-Methode wurde für die konfokale Mikroskopie genutzt. Die Aussaat der Zellen erfolgte analog zu der von Turbofect, also in 24 well-Platten. Nun wurden zwei Reagenzien vorgelegt. Zunächst 2,5 µl Lipofectamin LTX und 62,5 µl OptiMem, danach im 2. Schritt 0,5 µg Plasmid DNA, 0,625 µl LTX-Plus Reagenz, und 31,25 µl OptiMem. Diese beiden wurden kurz vor Transfektion vermischt und vorsichtig auf die Zellen gegeben. Am nächsten Morgen sollte ein Medienwechsel erfolgen und nach 24 Stunden konnte mit dieser Methode mit der Untersuchung der Zellen begonnen werden. Bei allen Methoden sollte eine Zellkonfluenz von 70-90 % vor der weitergehenden Untersuchung erreicht sein.

2.2.13 Zellyse und Gewinnung von Proteinlysaten

Zur weiteren Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen und Proteinmengen mussten die kultivierten und transfizierten Zellen lysiert werden. Dazu wurden zunächst die Zellkulturplatten aus dem Inkubator entnommen und das Medium abgesaugt. Im Anschluss wurden die HEK293-Zellen mit PBS^{-/-} vorsichtig von der Platte abgespült und in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß übertragen. Diese Zellsuspension wurde bei 1200 x g für fünf Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml 1x PBS^{-/-} resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Dieses wurden nun bei 4°C und 500 x g für ca. 3-5 Minuten erneut abzentrifugiert. Ziel war es, möglichst alle Reste des Nährmediums zu entfernen. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet nun mit Lysipuffer versetzt, in Abhängigkeit von der Größe des Pellets zwischen 25 und 40 µl eines NP40- oder CHAPS-Lysipuffers. Das Zellpellet wurde resuspendiert und die zu lysierenden Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur direkten weiteren Verwendung mussten die Zelllysate nun auf Eis aufgetaut und abzentrifugiert werden, um ein Proteinlysate im Überstand zu erhalten. Dies geschieht bei

15000 x g und 4°C für 30 min. Der entstandene Überstand (TCL, total cell lysate) wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Tube übertragen. Die Proteinlysate konnten nun weitergehend untersucht werden.

2.2.14 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um die Vergleichbarkeit insbesondere von Westernblot-Experimenten zu gewährleisten, muss eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde der Bradford-Test benutzt. Für diesen Test werden Verdünnungsreihen der Proteinlysate im Verhältnis 1:5 bis 1:100, in Abhängigkeit von der Konzentration des Lysats angefertigt. Zum Vergleich der Proben wird eine Eichgerade aus definierten BSA-Proteinkonzentrationen gemessen. Bei dieser Methode wird der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 eingesetzt, welcher mit unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Durch diese Komplexbildung ändert sich das Absorptionsspektrum der Komplexe und kann photometrisch bestimmt werden [48], sodass eine Quantifizierung der Proteinkonzentrationen durch einen Vergleich mit der BSA-Eichgerade durchgeführt werden kann.

2.2.15 Ko-Immunopräzipitation

Zum Nachweis einer Protein-Protein Interaktion wurde die Ko-Immunopräzipitation eingesetzt. Bei dieser Methode wurde ein aus humanen Zellkulturen gewonnenes Zelllysate (75 µg Gesamtprotein) mit 1-2 µg spezifischem Antikörper über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Im nächsten Schritt benötigt man Protein A/G gekoppelte Sepharose Beads. Diese mit hoher Spezifität an den F_c-Teil von Antikörpern bindenden Beads müssen zuvor in 5 %-iger BSA-Lösung geblockt werden, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Dem zuvor inkubierten Proteinlysate-Antikörper-Gemisch wurden nun 20 µl der A/G Sepharose-Beads hinzugegeben und die Ansätze bei 4°C rotierend für zwei Stunden inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurde die Probe jeweils dreimal bei 500 x g abzentrifugiert und mit Waschpuffer vorsichtig gewaschen. Die so abzentrifugierten und gewaschenen Beads wurden dann mit 2x Laemmli-Puffer bei 95°C für 10 Minuten denaturiert und im Anschluss mittels SDS-PAGE analysiert und auf spezifische Bindungspartner mit Hilfe der

Western Blot Analyse untersucht.

2.2.16 Anti-eGFP Nanobody Ko-Immunopräzipitation

Für die anti-eGFP Ko-Immunopräzipitation [49] wurden Zelllysate SIRT4-eGFP überexprimierender HEK293-Zellen gewonnen und im Hinblick auf ihre Bindungspartner des eGFP-fusionierten Proteins analysiert. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 3000 µg Gesamtprotein pro Probe eingesetzt und mit 30 µl einer anti-eGFP-Nanobody Bead-Suspension versetzt. Diese Beads wurden zuvor aus der Stock-Lösung entnommen und viermal mit IP-Waschpuffer gewaschen. Zum Abnehmen des Waschpuffers nach der Zentrifugation bei 500 x g wurde eine Insulinspritze benutzt, welche aufgrund ihres geringen Kanüldurchmessers nur die Flüssigkeit abnimmt, nicht jedoch die Beads. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die aufgereinigten Beads mit 100 µl Waschpuffer pro Probe versetzt. Die Proteinlysate wurden nun bei 4°C rotierend über Nacht inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Proben viermal mit 1000 µl Waschpuffer vorsichtig gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurden die Proben bei 500 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit der Insulinspritze abgenommen. Bei den jeweils letzten beiden Waschschriften wurde das Pellet sehr vorsichtig trocken gezogen. Das Pellet wurde nun mit 2x Laemmli Ladungspuffer versetzt, bei 95°C für 10 Minuten denaturiert und schließlich einer SDS-PAGE und Immunoblotanalyse unterzogen.

2.2.17 Mikrotubuli-Pulldown-Assay

Für die Durchführung des Mikrotubuli-Pulldown-Assays [50] wurden zuvor ausgebrachte Zellen bei einer Konfluenz von 80-90 % geerntet und im Anschluss mit dem Dounce-Homogenisator schonend aufgeschlossen (in PHEM-Buffer), um möglichst alle Zellbestandteile intakt zu halten. Dieses so erhaltene Lysat wurde bei 14000 x g für 30 min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen und als Gesamtzelllysat (TCL) verwendet. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung wurden nun gleiche Mengen Gesamtprotein auf zwei Proben verteilt. Eine Probe wurde mit Taxol

(finale Konzentration von 20 μM) und GTP (10 $\mu\text{g/ml}$) zur Stabilisierung der Mikrotubuli versetzt. Die andere Probe wurde analog mit Nocodazol (finale Konzentration 100 μM) zur Destabilisierung der Mikrotubuli versetzt. Diese Proben mussten nun bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert werden. Von diesen beiden Proben wurde nun jeweils 1 ml auf ein 15%-iges Sucrosekissen gegeben und bei 14000 x g für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand und die Sucroseschicht abgenommen und ersterer auch auf Proteinkonzentration hin untersucht. Die bei der mit Taxol versetzten Proben entstandene Pellets wurden vorsichtig in PHEM-Puffer gewaschen und erneut bei 14000 x g für 15 min abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Ansätze in 2x Laemmli Ladungspuffer denaturiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert.

2.2.18 Mitotischer Index

Zur Analyse des mitotischen Indexes wurden stabil transfizierte HeLa-Zelllinien, die eGFP und SIRT4-eGFP exprimieren, mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Die Zelllinien wurden reversibel mit dem CDK1-Inhibitor RO3306 in der G₂-Phase arretiert (2.2.11). Nach dem *release* aus G₂ durch zweimaliges Waschen der Zellen und Mediumwechsel wurden die Zellen zu bestimmten Zeitpunkten (30 min, 60 min, 120 min, 240 min) mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert und im Hinblick auf den Prozentsatz mitotischer Zellen quantifiziert.

2.2.19 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der Methode der SDS-PAGE besteht die Möglichkeit Proteine anhand ihrer Molekulargewichte aufzutrennen. Für die Durchführung wurden zuvor hergestellte und auf ihren Proteingehalt hin untersuchte Zelllysate analysiert. Nach der Denaturierung mit SDS- und β -Merkaptoethanolhaltigem Laemmli-Ladungspuffer sind die Proteine einheitlich mit einer negativen Ladung besetzt. Dadurch ist es möglich die Proteine unabhängig von ihrer Ladung und ihrer Konformation in einem denaturierenden Polyacrylamidgel anhand ihres Molekulargewichts zu analysieren. In Abhängigkeit von ihrer Größe laufen die Proteine bei einer für eine bestimmte Zeit konstant

angelegten Spannung unterschiedlich schnell durch das Gel. Die Spanne der aufzuschlüsselnden Proteingrößen konnte durch die Prozentigkeit (Gehalt an Acrylamid vs. Bisacrylamid) des Gels bestimmt werden. Um die Proteine anhand ihrer Größe analysieren zu können musste immer ein standardisierter Proteinmarker mitaufgetrennt und analysiert werden. Im Anschluss wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe des Western Blots auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und danach die entsprechenden Proteine durch Immunodetektion nachgewiesen.

2.2.20 Western Blot/Immunoblotanalyse

Bei der Western Blot Analyse wurden die zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteinlysate auf eine spezielle Nitrocellulosemembran übertragen, um definierte Proteine mittels Immunodetektion sichtbar zu machen. Zu diesem Zweck wurde eine Blotting-Apparatur mit Transferpuffer befüllt. Das zuvor hergestellte SDS-PAGE Gel wurde in eine spezielle Klammer überführt. In dieser wurde das Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran gelegt und beidseits mit 3 Lagen an Whatman-Papier und jeweils einem Schwamm fixiert. Die Membran musste dabei immer anodenseitig positioniert werden. Diese Klammer wurde nun in die Blottingkammer überführt. Es wurde ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die mit SDS beladenen negativ geladenen Proteine in Richtung des Plus-Pol wandern. Nach dem Transfer wurde die Membran in TBST gelöstem fettarmem Trockenmilchpulver (5%) für mindestens 2 Stunden rollend inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen primären Antikörper (Verdünnung i.d.R. 1:1000) gegen das zu detektierende Protein inkubiert. Dieser primäre Antikörper musste dann in einem zweiten Schritt nach drei Waschschritten mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper (1:20.000) detektiert werden. Die so auf der Membran markierten Proteine konnten nun mit Hilfe eines LICOR-Detektors detektiert und analysiert werden.

2.2.21 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (cLSM)

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde eingesetzt, um Proteine in transient oder stabil transfizierten Zellen zu visualisieren und untersuchen zu können.

Die zu untersuchenden Zelllinien wurden zunächst auf Coverslips ausgebracht werden. Bei der Fixation der Zellen wurde eine 4%-iges Paraformaldehyd (PFA)-Lösung benutzt. Zuvor wurden die Zellen drei-Mal mit PBS^{+/+} gewaschen und im Anschluss für 20 Minuten mit PFA fixiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut gewaschen und im Folgenden permeabilisiert. Dies geschah mit 500 µl 0,25%-igem TritonX-100 in PBS^{-/-} für eine Dauer von 5 min. Im nächsten Schritt wurden die Zellen wieder gewaschen und mit einer 3%-igen BSA-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. In der Zwischenzeit konnte die Lösung für den primären Antikörper vorbereitet werden. Diese wurden in einer Konzentration von 1:1000 oder 1:500 in 1%iger BSA-Lösung angesetzt. Nach dem Entfernen der Blocking-Solution wurde der primäre Antikörper in Aliquots von je 140 µl auf die jeweiligen Coverslips gegeben. Die Zellen mussten nun über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert werden. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Coverslips dreimal gewaschen. Daraufhin wurden die sekundären Alexa-Antikörper, welche im Verhältnis von 1:500 in 1%-iger BSA-Lösung vorbereitet wurden, auf die Zellen gegeben und diese Ansätze für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Anfärbung des Zellkerns mit Hilfe von DAPI, welches in einer Konzentration von 1:200.000 in PBS^{-/-} vorbereitet wurde. Nach erneut zweimaligem Waschen erfolgte nun das sogenannte mounting. Zu diesem Zweck wurde Prolong Gold tropfenweise auf spezielle Objektträger gegeben und die vorsichtig getrockneten Coverslips mit den Zellen nach unten auf dem Tropfen platziert. Die Slides mussten nun 24 h trocknen und konnten dann mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskop analysiert werden.

2.2.22 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde benutzt, um die Expression von GFP-gekoppelten Proteinen in stabil transfizierten Zelllinien zu überprüfen. Bei dieser FACS Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) wurden die vorher vereinzelt und resuspendierten Zellen in je 500 µl Aliquots in spezielle FACS-Röhrchen übertragen. Diese Zellen wurden nun im FACS anhand ihrer Oberflächenbeschaffenheit, ihrer Masse und ihres Volumens durch mehrere Laser detektiert und grafisch dargestellt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit der Flowing-Software, einer frei erhältlichen Software zur Analyse durchflusszytometrischer Daten. Die Darstellung und Analyse erfolgte in jeweils einem Histogramm pro Zelllinie und einer dazugehörigen Dot-Plot. Wichtig ist immer eine Negativkontrolle von eGFP negativen Zellen, um die eGFP-Positivität korrekt bewerten zu können. Sollte eine Zelllinie ihre eGFP-Positivität verloren haben musste diese verworfen werden und eine neue Linie aufgetaut werden.

2.2.23 Generierung stabil transfizierter Klone zur shRNA-vermittelten zellulären Depletion von GCP3

Für die Generierung stabil transfizierter Klone wurde eine shRNA (small hairpin RNA) der Firma Sigma-Aldrich verwendet, d.h., das pLKO.1 Vektorsystem mit einer Puromycinresistenz.

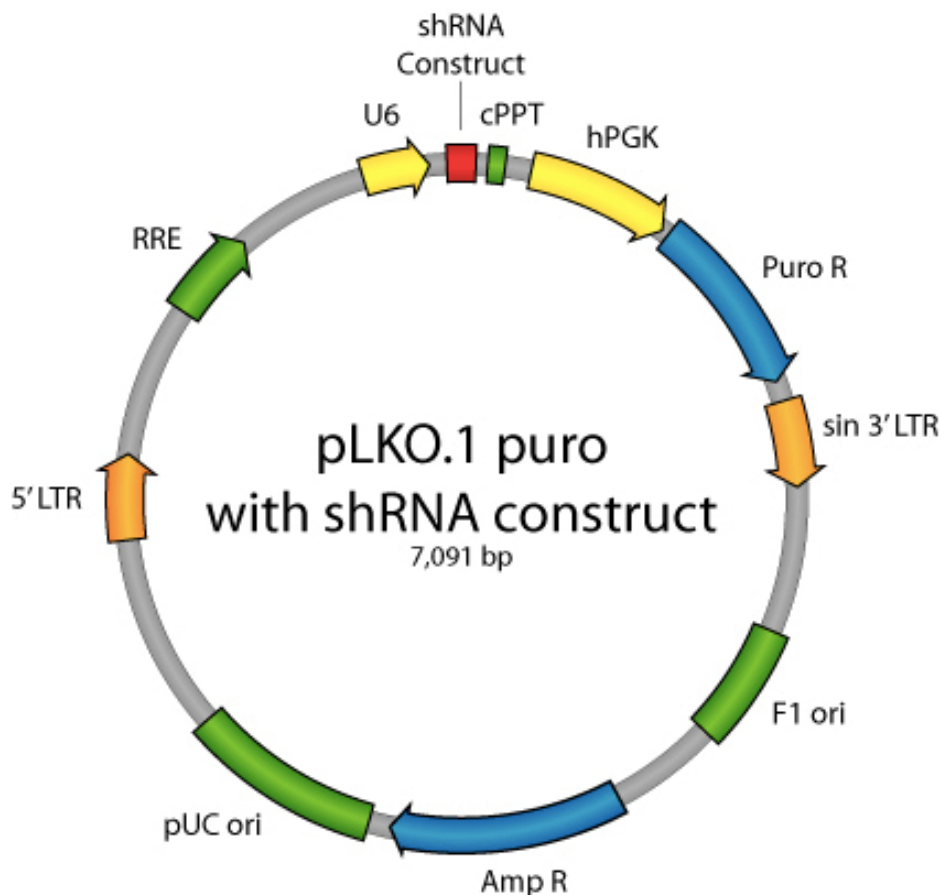


Abb. 7: pLKO.1 puro Vektorkarte der lentiviralen shRNA-Plasmide gerichtet gegen GCP3.

Insgesamt wurden fünf gegen humanes GCP3 gerichtete pLKO.1 Vektoren (zusammen mit dem pLKO.1-Kontrollvektor ohne shRNA-Sequenz) analysiert.

Bezeichnung	Sequenz
TRCN0000431039 (= „039“) <u>✓</u>	CCGGTTCCTGTACCGCTGGATATATCTCGAGATATA- TCCAGCGGTACAGGAATTTTTTG
TRCN0000108335 (= „335“) <u>✓</u>	CCGGCGACATGGATAATGAAGATTTCTCGAGAAATCTTCA- TTATCCATGTCGTTTTTG
TRCN0000108336 (= „336“) <u>✓</u>	CCGGCGGGTGGTACTATGGAAATTACTCGAGTAATTT- CCATAGTACCACCGTTTTTG
TRCN0000108339 (= „339“) <u>✓</u>	CCGGGCATGGACTTTAACTGCAAATCTCGAGATTT- GCAGTTAAAGTCCATGCTTTTTG
TRCN0000429682 (= „682“) <u>✓</u>	CCGGTGCAGTGTAGACACGAAATTCTCGAGAATTT- CGTGTCTAGCAGTGCATTTTTTG

Abb. 8: **Sequenzen der shRNA-Plasmide gerichtet gegen GCP3**

Nach der zuvor beschriebenen Plasmidisolation wurden diese Plasmide in HeLa-Zellen mit Hilfe der Turbofect Methode transfiziert. Es muss immer auch ein Leervektor als Kontrolle mit ausgewertet werden, um auszuschließen, dass das eingesetzte Plasmid *per se* einen Einfluss hat. Um stabile Klone zu erhalten, wurden die Zellen unter Puromycinselektion gehalten und regelmäßig mit Hilfe der Western-blot Analyse auf die reduzierte GCP3-Proteinexpression hin untersucht. Zusätzlich wurden Analysen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie durchgeführt, um die Menge und subzelluläre Lokalisation der GCP3-Proteinmengen zu visualisieren.

3 Ergebnisse

3.1 SIRT4 ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein

Bei einer SIRT4-eGFP Interaktom/Proteomanalyse [1] erfolgten Identifikation neuer, extramitochondrialer Interaktionspartner von SIRT4, welche an der Ausbildung des sogenannten γ -TuSC beteiligt sind, wurde zunächst eine mögliche Assoziation von SIRT4 mit polymerisierten Mikrotubuli untersucht. Im Zuge dieser Arbeit wurde dies mit Hilfe von Mikrotubuli-Pulldown-Experimenten durchgeführt und hierfür stabil transfizierte HEK293 eGFP und HEK293 SIRT4-eGFP Zelllinien eingesetzt [1, 45]. Die Expression der Transgene und somit die eGFP-Positivität wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert und bestätigt (Abb. 9). Die Mikrotubuli-Pulldown Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert (Kap. 2.2.17) (Abb. 10A). Unter dem Einfluss von Taxol wurden die zellulären Mikrotubuli stabilisiert und deren Bindungspartner konnten anschließend nach differentieller Fraktionierung/Zentrifugation (Abb. 10A) im Mikrotubulipellet (MP) mittels Immunoblotanalyse untersucht werden. Des Weiteren wurde das Gesamtzelllysat (TCL), die cytosolische Fraktion (Cyt., vor Zugabe von Taxol) und der Überstand/Supernatant nach dem finalen Zentrifugationsschritt analysiert (Abb. 10A). Hierbei lagen der Fokus auf α -Tubulin als Kontrolle dafür, ob Mikrotubuli effizient pelletiert wurden. Zusätzlich stellte sich die wichtige Frage, ob SIRT4-eGFP, im Gegensatz zu eGFP, mit stabilisierten Mikrotubuli ko-pelletiert und somit mit diesen (direkt oder indirekt) interagiert.

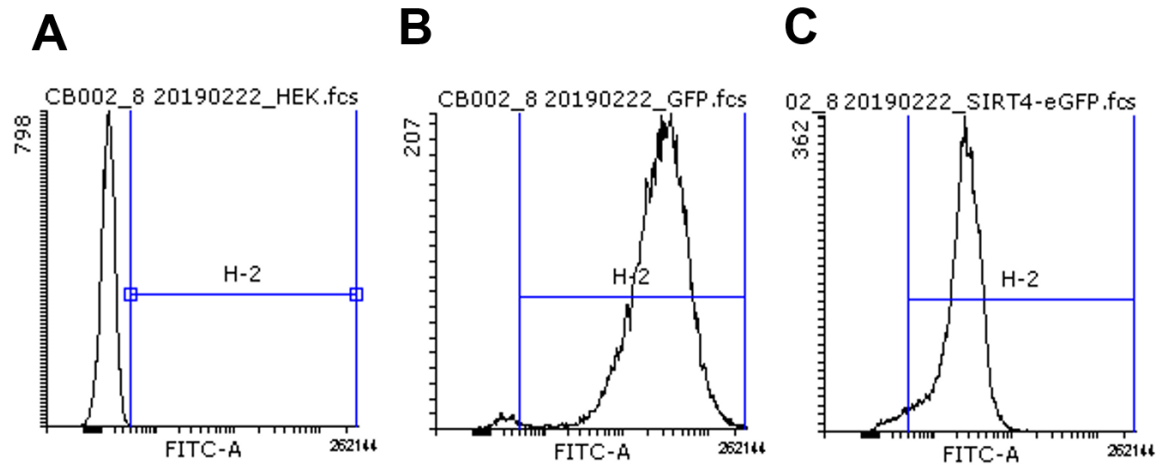


Abb. 9: **Durchflusszytometrische Analyse der eGFP (B) und SIRT4-eGFP (C) Expression in stabil transfizierten HEK293 Zellen.** Die GFP-Positivität ist im logarithmischen Maßstab in der X-Achse dargestellt (FITC-A). Parenterale HEK293-Zellen dienen als eGFP-Negativkontrolle (A).

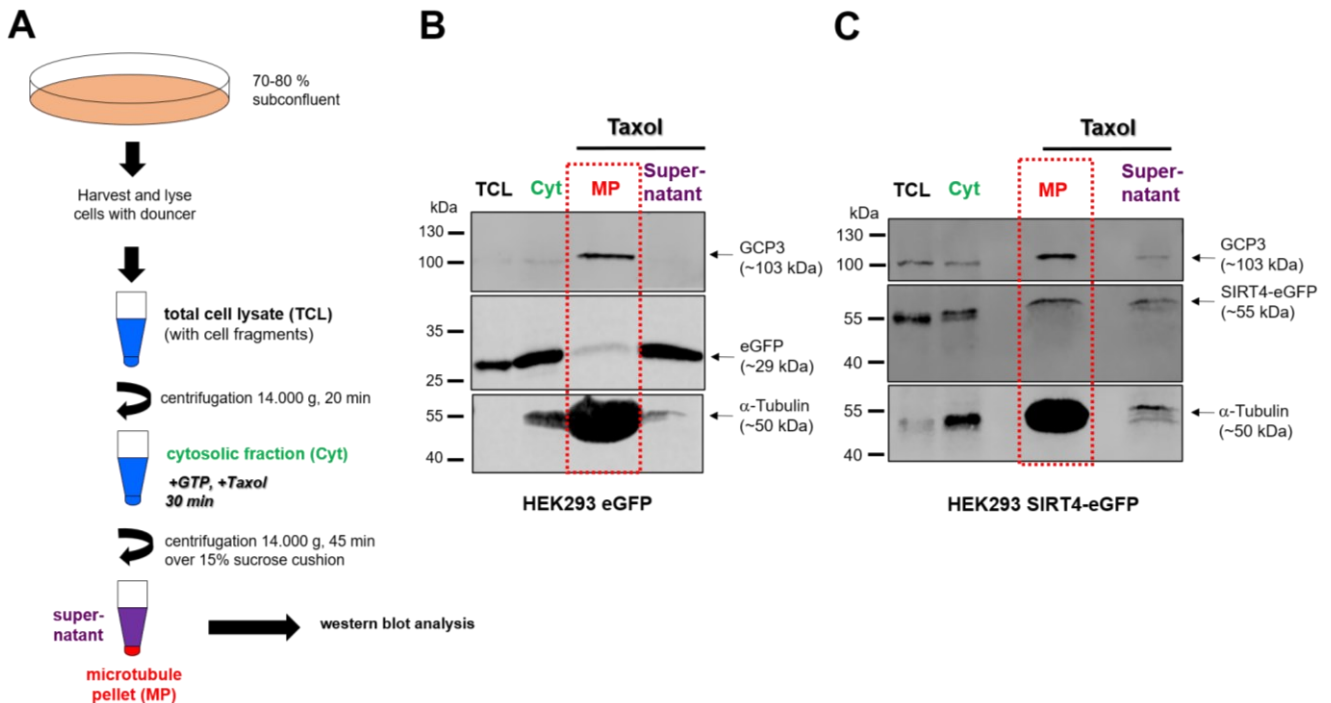


Abb. 10: **Interaktion von SIRT4-eGFP mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli.** (A) Schematischer Versuchsaufbau zu den Mikrotubuli-Pulldown-Experimenten. HEK293 eGFP (Kontrolle) und HEK293 SIRT4-eGFP Zellen (jeweils stabil transfizierte Zelllinien) wurden bei einer Konfluenz von ca. 70-80% geerntet und schonend mit einem Dounce-Homogenisator lysiert. Im Anschluss wurde das Lysat zentrifugiert, um eine zytosolische Fraktion zu erhalten. Zu dieser wurden GTP und Taxol hinzugefügt, um die Mikrotubuli zu stabilisieren. Dieser Ansatz wurde im Anschluss einer Zentrifugation durch ein 15%-iges Sukrose-Kissen unterzogen. Nach der Zentrifugation konnte das Mikrotubuli-Pellet entnommen und zusammen mit den anderen Fraktionen (TCL, Cytosol [Cyt] vor Zugabe von GTP und Taxol, Supernatant und Microtubule Pellet [MP] nach dem letzten Zentrifugationsschritt) mittels Immunoblotanalyse (B, HEK293 eGFP; C, HEK293 SIRT4-eGFP) untersucht werden (oben: anti-GCP3; Mitte: anti-eGFP; unten: anti-α-Tubulin).

In Abb. 10C ist eine klare Ko-Präzipitation von SIRT4-eGFP mit α -Tubulin als einem Hauptbestandteil von Mikrotubuli und dem Mikrotubuli (Minuspol)-bindenden γ TURC-Faktor GCP3 gezeigt. Die restlichen Banden von SIRT4-eGFP und GCP3 im Überstand/Supernatant sind auf den Versuchsaufbau zurückzuführen, in dem keine 100%-ige Pelletierung und Aufreinigung der Mikrotubuli möglich war. Der Unterschied in der Intensität der SIRT4-eGFP und GCP3-Banden zum Überstand/supernatant lässt aber vermuten, dass es zu einer deutlichen Anreicherung im MP gekommen ist bei ungefähr je Fraktion gleich geladener Proteinmenge. Des Weiteren weist die intensive α -Tubulin Bande (im MP) auf eine sehr gute Sedimentation und Anreicherung der stabilisierten Mikrotubuli hin. Im Gegensatz hierzu konnte eGFP als Kontrolle kaum im MP nachgewiesen werden, während aber GCP3 und α -Tubulin, letzteres wieder in hohen Mengen, präzipitiert werden konnten (Abb. 10B). Insgesamt zeigen diese Daten, die mit einem Teil der noch im Folgenden aufgeführten Befunde bereits publiziert wurden [1], dass ektopisch exprimiertes SIRT4, direkt oder indirekt, mit zellulären Mikrotubuli interagiert.

Um die Interaktion von SIRT4-eGFP mit Mikrotubuli zu bestätigen, wurden zusätzlich Ko-Immunopräzipitationsexperimente (Abb. 11A) mit α -Tubulin-spezifischen Antikörpern und Gesamtzelllysaten aus HEK293 eGFP und HEK293 SIRT4-eGFP Zellen durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Befunden in Abb. 10 konnte im Präzipitat mit anti- α -Tubulin-Antikörpern eine Interaktion von SIRT4-eGFP mit α -Tubulin in der Westernblotanalyse nachgewiesen werden (Abb. 11B). Im Gegensatz hierzu wurde keine Ko-Immunopräzipitation mit eGFP als Kontrolle beobachtet, obwohl α -Tubulin, in zum SIRT4-eGFP Ansatz vergleichbarer Menge, präzipitiert wurde (Abb. 11B, unteres Panel).

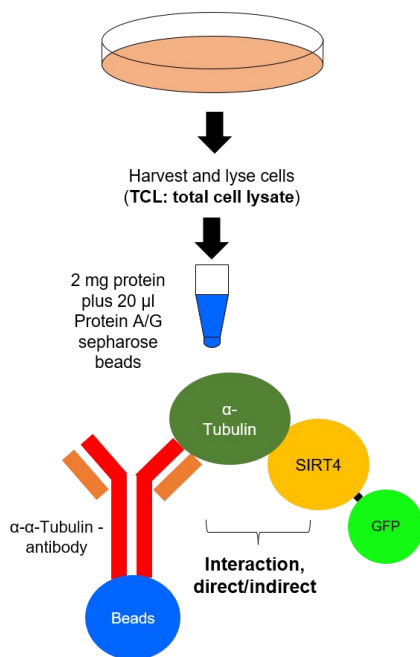
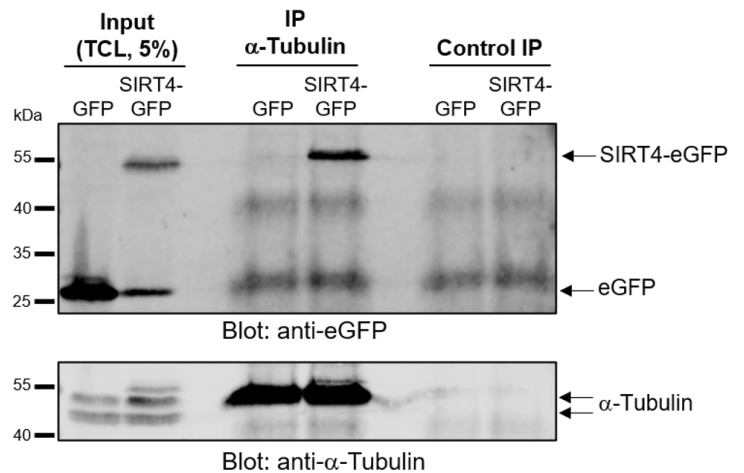
A**B**

Abb. 11: **SIRT4-eGFP Ko-Immunopräzipitiert mit α -Tubulin.** (A) Schematischer Ablauf der Ko-Immunopräzipitation, bei welcher Gesamtzelllysate (TCL) mit α -Tubulin spezifischen Antikörpern und im Nachgang mit Protein A/G Sepharose Beads versetzt werden, um im Anschluss die (direkte/indirekte) Interaktion zwischen α -Tubulin und SIRT4 in der Westernblotanalyse zu untersuchen. (B) HEK293 eGFP (Kontrolle) und HEK293 SIRT4-eGFP Zellen (jeweils stabil transfizierte Zelllinien) wurden isoliert und Gesamtzelllysate mittels Ko-Immunopräzipitationsanalyse auf eine Interaktion mit α -Tubulin Interaktion analysiert. IP, Immunopräzipitation.

Diese Ergebnisse zur Assoziation von SIRT4-eGFP mit Mikrotubuli, einmal polymerisiert durch den Einsatz von Taxol im Mikrotubuli-Pulldown (Abb. 10) und einmal ohne Taxol-Stabilisierung (Abb. 11), lassen vermuten, dass SIRT4-eGFP möglicherweise bereits mit den Bausteinen der Mikrotubuli, den α -Tubulin/ β -Tubulin Heterodimeren, interagiert. Es blieb jedoch unklar, ob und wie (und wann im Zellzyklus) SIRT4-eGFP durch α -Tubulin/ β -Tubulin Heterodimere aktiv an die (Minus-Enden der) Mikrotubuli rekrutiert wird, wie dies reguliert wird, und welchen Einfluss SIRT4-eGFP letztendlich auf den Verlauf der Mitose ausübt.

3.2 SIRT4 interagiert und ko-lokalisiert intrazellulär mit GCP2 und GCP3

Aufgrund der neuartigen Interaktion von SIRT4-eGFP mit α -Tubulin und Mikrotubuli wurde in weiterführenden Analysen die Interaktion von SIRT4-eGFP mit GCP2 und GCP3 in Ko-Immunopräzipitationsanalysen sowie die subzelluläre Ko-Lokalisation dieser Proteine mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie näher analysiert.

Die Resultate der Ko-Immunopräzipitationsanalyse mit Gesamtzelllysaten aus HEK293 eGFP und HEK293 SIRT4-eGFP Zellen sowie anti-eGFP Nanobody Be-ads (Ablauf schematisch dargestellt in Abb. 12A) weisen hierbei auf eine (direkte/indirekte) Interaktion von SIRT4-eGFP sowohl mit GCP2 (Flag-tagged und ektopisch exprimiert), als auch mit endogenem GCP3 hin (Abb. 12B, C). Alternativ könnte SIRT4-eGFP an nur eine Komponente des γ TUSC (γ -Tubulin/GCP2/GCP3) binden, sodass dann die anderen Komponenten ko-immunopräzipitieren könnten. Im Gegensatz hierzu konnte eine Interaktion von eGFP als Negativkontrolle weder mit GCP2-Flag noch mit GCP3 beobachtet werden. Als *caveat* ist jedoch das fehlende GCP2-Flag Signal in HEK293 eGFP-Zellen (Input/TCL) (Abb. 12B) zu sehen, möglicherweise bedingt durch eine nicht ausreichende Detektionsdauer der Western-blot-Membran und/oder durch eine im Vergleich zu SIRT4-eGFP niedrigere Transfektionseffizienz des GCP2-Flag Plasmids. Insgesamt bestätigen diese Befunde aber die Daten aus der massenspektrometrischen SIRT4-eGFP Interaktom/Proteomanalyse [1] und bekräftigen das Bild einer (direkten/indirekten) Interaktion der γ -TuSC-Proteine GCP2 und GCP3, entweder einzeln oder im γ TUSC, mit SIRT4-eGFP.

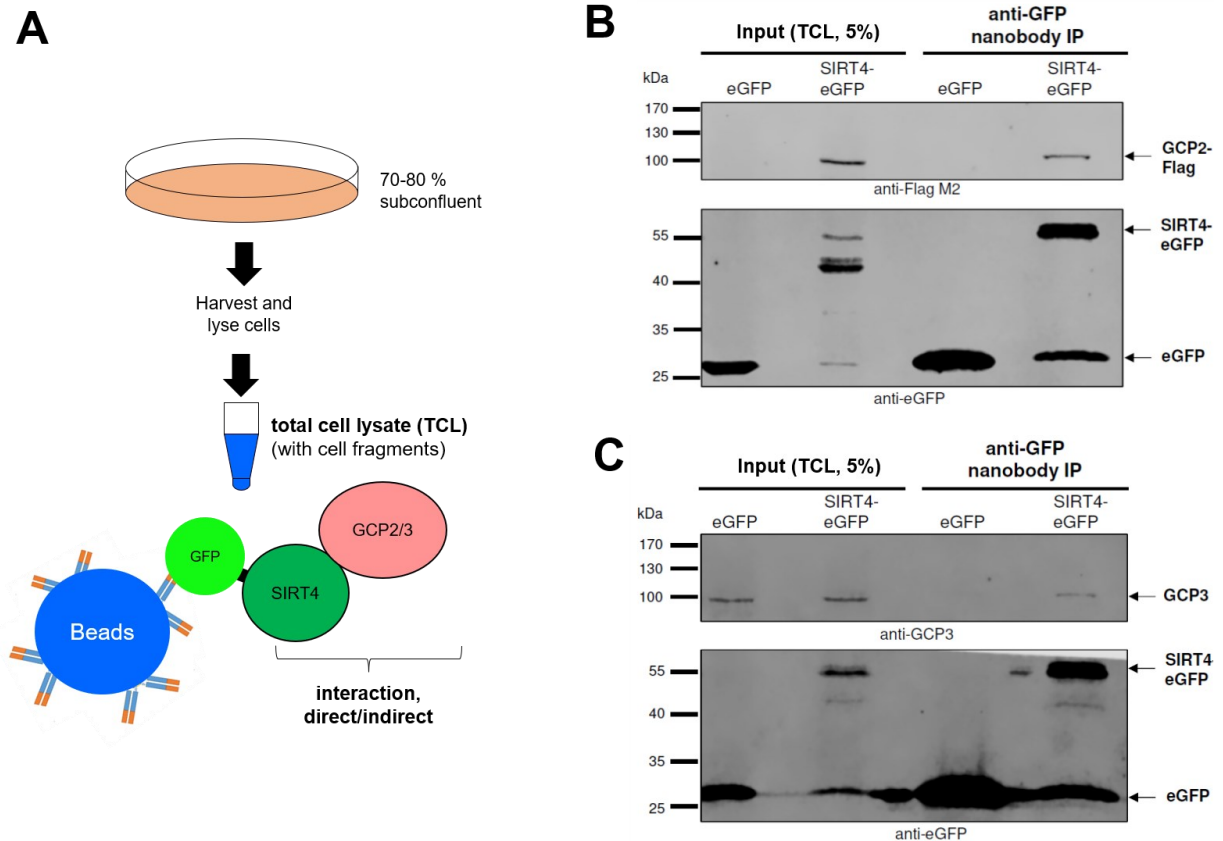


Abb. 12: **SIRT4-eGFP ko-immunopräzipitiert mit GCP2 und GCP3.** (A) Schematischer Ablauf der Ko-Immunopräzipitation, bei welcher Gesamtzelllysate (TCL) aus HEK293 eGFP (Kontrolle) bzw. HEK293 SIRT4-eGFP Zellen (jeweils stabil transfizierte Zelllinien) mit anti-GFP Nanobody Beads versetzt werden, um im Anschluss die (direkte/indirekte) Bindung zwischen SIRT4-eGFP und GCP2-Flag bzw. GCP3 mittels Westernblotanalyse zu untersuchen. (B) Interaktion von SIRT4-eGFP mit transfiziertem GCP2-Flag. (C) Interaktion von SIRT4-eGFP mit endogenem GCP3. IP, Immunopräzipitation.

Im nächsten Schritt wurde die subzelluläre (Ko-) Lokalisation von endogen exprimiertem SIRT4 zusammen mit GCP2 oder GCP3 (beide endogen oder nach Transfektion ektopisch exprimiert) mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie in HT1080 Fibrosarkomzellen analysiert. Diese Zelllinie zeigt im Gegensatz zu HEK293-Zellen eine für die Immunhistochemie und die Durchführung konfokaler Mikroskopieanalysen notwendige stabile Oberflächenzelladhärenz. Endogenes SIRT4 konnte mittels eines geeigneten Antikörpers detektiert werden (siehe Kap.2.2.21), der im Gegenteil zur Westernblotmethode in der Immunofluoreszenz technisch funktioniert und anwendbar ist [1]. In einem vorgelagerten Experiment wurden HT1080 Zellen bzgl. RO3306-vermittelter G₂-Arretierbarkeit und mitotischem *release* in den Zellzyklus, Zellfixierung und geeigneter Antikörperverdünnung und -färbung der fixierten Zellen getestet und untersucht

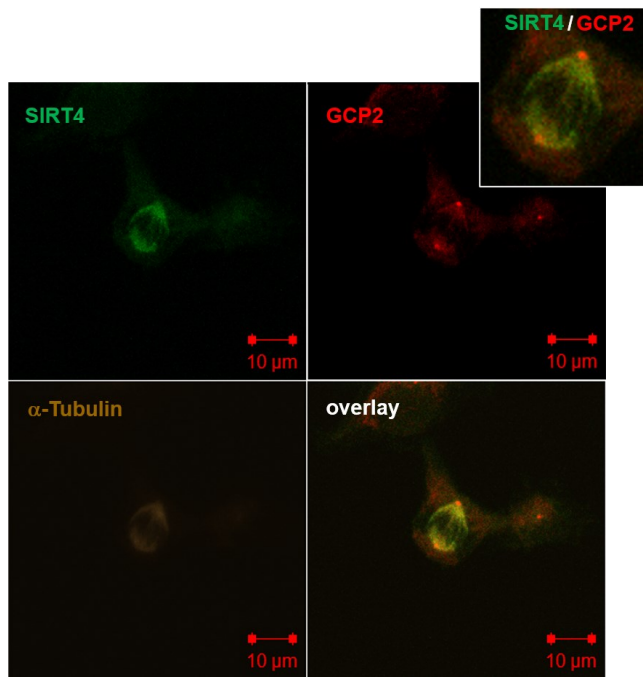
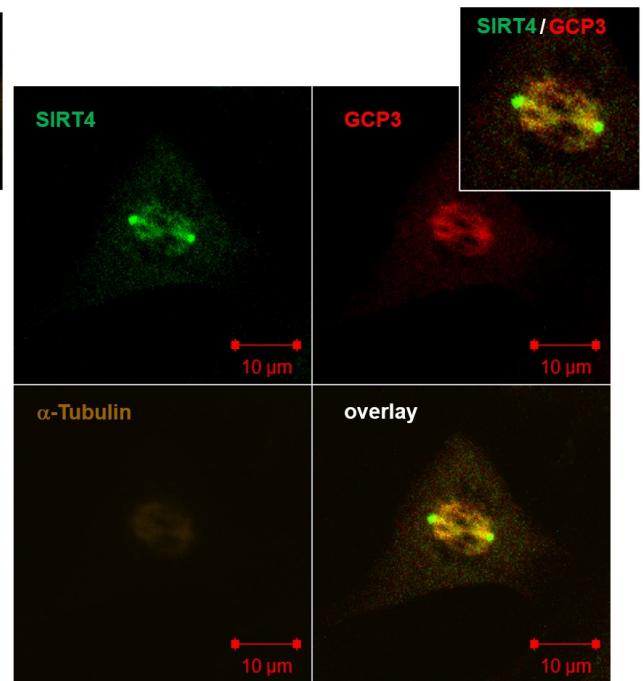
A**B**

Abb. 13: **Endogenes SIRT4 ko-lokalisiert partiell mit endogenem GCP2 (A) und GCP3 (B) am mitotischen Spindelapparat.** HT1080-Zellen nach *release* aus dem RO3306-induziertem G₂-Arrest fixiert, angefärbt mit Antikörpern gegen endogenes SIRT4 (grün), endogenes GCP2 bzw. GCP3 (rot), sowie α -Tubulin (braun) und danach konfokal-mikroskopisch analysiert und dokumentiert.

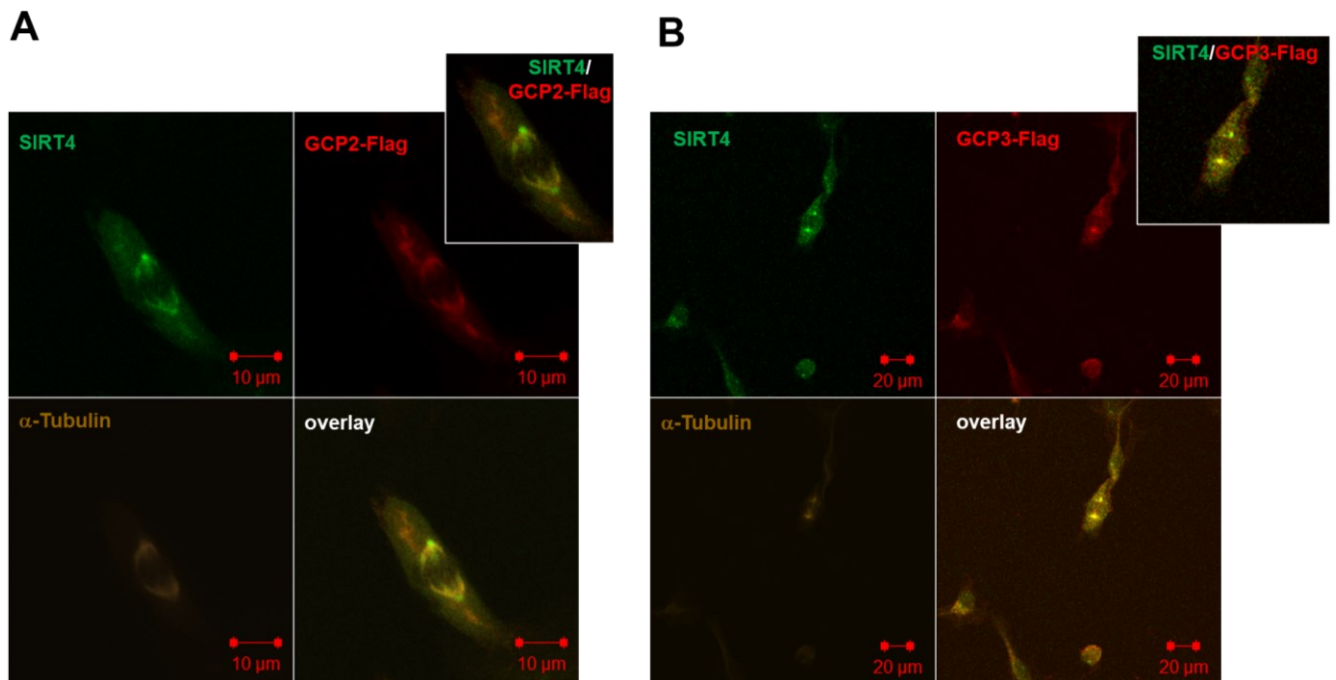


Abb. 14: **Endogenes SIRT4 ko-lokalisiert partiell mit transfiziertem GCP2-Flag (A) und GCP3-Flag (B) am mitotischen Spindelapparat.** HT1080-Zellen wurden fixiert, angefärbt mit Antikörpern gegen endogenes SIRT4 (grün), GCP2-Flag bzw. GCP3-Flag (anti-Flag M2; rot), sowie α -Tubulin (braun) und danach konfokal-mikroskopisch analysiert und dokumentiert.

Zunächst wurde die subzelluläre Lokalisation des endogen exprimierten SIRT4-Proteins und der γ TUSC Komponenten GCP2 (Abb. 13A) und GCP3 (Abb. 13B) in sich teilenden, charakteristisch α -Tubulin-gefärbten HT1080-Zellen untersucht. Hierbei konnte eine deutliche Lokalisation aller drei Proteine am mitotischen Spindelapparat (*i.e.*, Zentrosomen und mitotische Spindel) beobachtet werden. Auffallend ist eine eher zentrosomale/spindelpolnahe Ko-Lokalisation von SIRT4 mit GCP2 und GCP3 an der mitotischen Spindel. Vergleichbare Ergebnisse konnten in HT1080-Zellen erhoben werden, in denen entweder GCP2-Flag oder GCP3-Flag nach Transfektion ektopisch exprimiert wurde. Ähnlich zu den in Abb. 13 gezeigten Färbungen wurde auch hier eine eher zentrosom/spindelpolnahe (Ko-) Lokalisation von SIRT4 und GCP2-Flag/GCP3-Flag beobachtet (Abb. 14). Die Ergebnisse der konfokal-mikroskopischen Analyse unterstützen die biochemischen Befunde der SIRT4-Mikrotubuli Interaktion (Abb. 10 und 11) und SIRT4-GCP2/GCP3 Ko-Immunopräzipitation. Die zentrosomnahe Ko-Lokalisation von SIRT4 und GCP2/GCP3 führte daher zu der Hypothese, dass GCP2/GCP3 als γ TUSC Komponenten und für die (-)Enden

der Mikrotubuli charakteristische MAPs (Mikrotubuli-assoziierte Proteine) die zentrosomale Rekrutierung von SIRT4 verantworten bzw. regulieren. Als Konsequenz könnte SIRT4 dann die weitere Ausbildung und Dynamik der mitotischen Mikrotubuli negativ beeinflussen, insbesondere durch die SIRT4-Histondeacetylase 6 (HDAC6) vermittelte Deacetylierung von α -Tubulin am Lysin 40 (K40) [1].

3.3 ShRNA-vermittelte zelluläre Depletion von GCP3

Um die Hypothese einer GCP3 (γ TUSC-) abhängigen Rekrutierung von SIRT4 an die mitotischen Spindelpole zu überprüfen, wurde im nächsten Schritt ein lentiviral/pLKO.1-Vektor basiertes Protokoll der Expression von shRNAs etabliert, die zur zellulären Depletion von GCP3 führen. Diese Experimente wurden in HEK293-Zellen (zwecks Immunoblotanalyse der GCP3-Proteinmengen) sowie in HeLa-Zellen (zwecks konfokaler Laserscanning-Mikroskopie von GCP3) durchgeführt. Neben der Vektorkontrolle (shRNA die unspezifisch keine Depletion verursacht) wurden zunächst vier GCP3-spezifische shRNAs ausgetestet. Hierbei wurden die entsprechenden pLKO.1-Vektoren zunächst in HEK293-Zellen transfiziert, diese einer ständigen Puromycin-Selektion unterzogen und die GCP3-Proteinexpression bis zu 12 Tage nach Transfektion mittels Immunoblotanalyse und densitometrischer Quantifizierung untersucht (Abb. 15). Es zeigten sich im zeitlichen Verlauf unterschiedliche Effizienzen der GCP3-Runterregulation für die untersuchten shRNAs, wobei sich auch die Konstanz der Runterregulation unterschied. Eine stabile Reduktion der GCP3-Proteinmengen war aber durch die shRNAs 682 und 336 (letztere konstant auf etwa 60%) möglich (Abb. 15A, B), wobei shRNA 336 zunächst für weitere Experimente genutzt wurde.

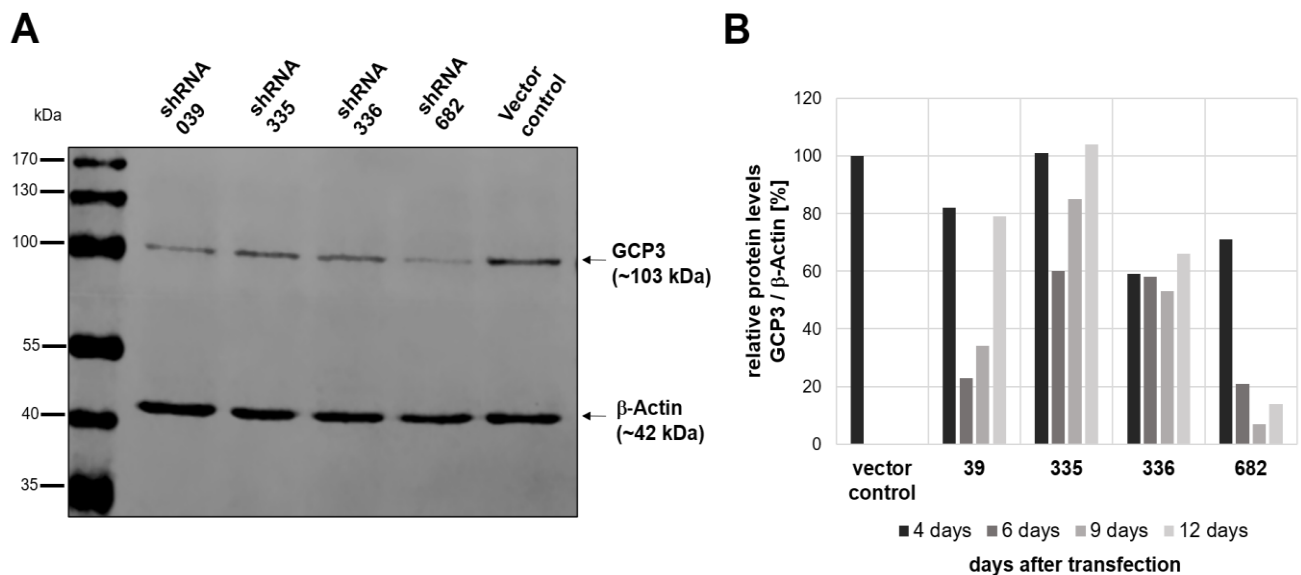


Abb. 15: **shRNA-vermittelte zelluläre Depletion von GCP3 in HEK293-Zellen.** (A) Die Expression von GCP3 wurde durch stabile Expression von GCP3-spezifischen shRNAs mittels des lentiviralen pLKO.1 Vektorsystems runterreguliert und die GCP3-Proteinmengen mittels Immunoblotting analysiert. Der pLKO.1-Vektor mit shRNA die unspezifisch keine Depletion verursacht (vector control) diente als Negativkontrolle. (B) Densitometrische Immunoblotanalyse und Zeitverlauf der Puromycin-Selektion und GCP3-Proteinmengen in HEK293-Zellen nach Transfektion und stabiler, pLKO.1-abhängiger Expression GCP3-spezifischer shRNAs.

Im nächsten Schritt wurde pLKO.1-shRNA 336 in (im Gegensatz zu HEK293-Zellen) deutlich adhärenteren HeLa-Zellen transfiziert und transient exprimiert. Die Zellen wurden fixiert, mit einem GCP3-spezifischen Antikörper gefärbt und einer konfokalen Laserscanning-Mikroskopieanalyse unterzogen. Bei den shRNA 336 transfizierten HeLa-Zellen war das Signal von GCP3 nur noch sehr schwach darstellbar, wobei die dargestellten mitotischen, α -Tubulin markierten Spindeln eher irregulär erschienen (Abb. 16, rechte Hälfte). Letzterer Befund steht im Einklang mit der Notwendigkeit von GCP3 (und somit einem funktionellen γ TUSC) für die korrekte Ausbildung der mitotischen Spindel [51]. Im Gegensatz hierzu waren die GCP3-Signale in den Kontroll-HeLa-Zellen zusammen mit den α -Tubulin gefärbten mitotischen Spindeln deutlich nachweisbar (Abb. 16, linke Hälfte). Somit konnte konsistent zu den Befunden aus Abb. 15 durch die Expression der shRNA 336 eine Runterregulation und Reduktion der zellulären GCP3-Proteinmengen erzielt werden. Danach wurden weiterführende konfokale Mikroskopieexperimente in HeLa-Zellen durchgeführt, um zu klären, inwieweit die shRNA 336 vermittelte GCP3-Reduktion (und somit wahrscheinlich fehlerhafte γ TUSC-Funktion) zu einer reduzierten zentrosomalen

Lokalisation von endogenem SIRT4 führt. Diese Untersuchungen konnten jedoch aufgrund technischer Schwierigkeiten mit dem SIRT4-Antikörper sowie Beendigung der Laborphase der Promotionsarbeit nicht mehr abgeschlossen werden.

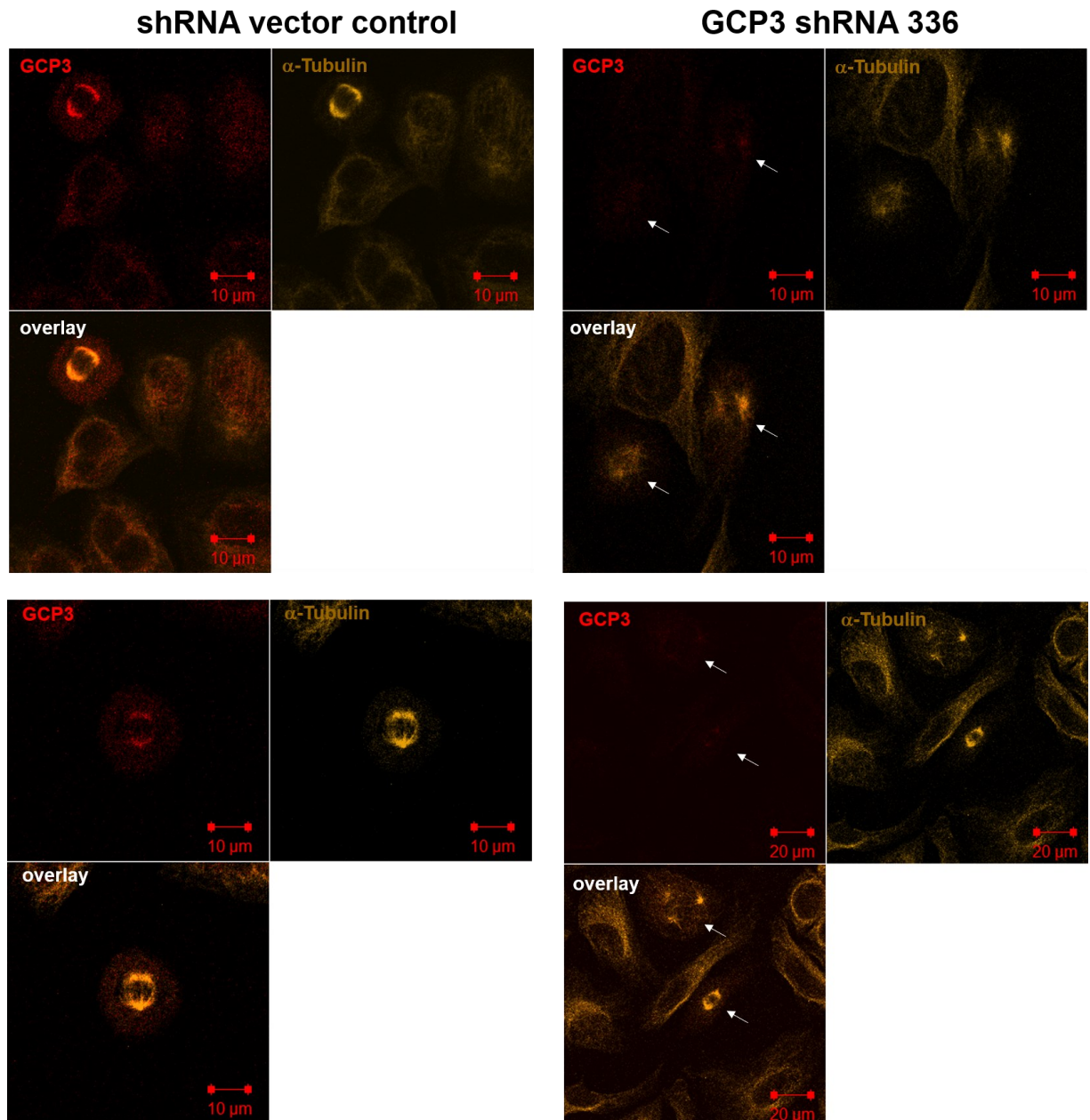


Abb. 16: **shRNA-vermittelte zelluläre Depletion von GCP3 in HeLa-Zellen.** Die Expression von GCP3 wurde durch transiente Transfektion (pLKO.1 Vektorsystem) der GCP3-spezifischen shRNA 366 runterreguliert und die GCP3-Proteinmengen mittels konfokaler Mikroskopie analysiert (rechte Abbildungen). Der pLKO.1-Vektor die unspezifisch keine Depletion verursacht (Vector control) diente als Negativkontrolle (linke Abbildungen). Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen GCP3 (rot) und α -Tubulin (braun) angefärbt.

3.4 Ektopische Expression von SIRT4 verzögert die mitotische Progression im Zellzyklus

Im Folgenden wurde der Einfluss von erhöhten SIRT4-Mengen auf die Zellzyklusprogression, im Besonderen auf die mitotische Zellteilung, untersucht. Hierbei wurden stabil SIRT4-eGFP überexprimierende HeLa-Zellen und HeLa-eGFP Kontrollzellen verwendet, um eine konfokal-mikroskopische, quantitative Zellzyklusanalyse mitotischer Zellen durchzuführen (siehe Kap. 2.2.18) und die Frage zu klären, ob die Überexpression von SIRT4 die mitotische Progression verlangsamt. Die Generierung der untersuchten HeLa-Zelllinien mittels des retroviralen pUC2CL12IPwo Vektorsystems und deren Erstcharakterisierung bzgl. stabiler eGFP bzw. SIRT4-eGFP Expression erfolgte bereits durch Drews et al. [46].

Diese eGFP- (Kontrolle) bzw. SIRT4-eGFP exprimierenden HeLa-Zelllinien wurden mit dem CDK1-Inhibitor RO3306 in der G₂-Phase arretiert und durch Waschen der adhärennten Zellen mit Medium und gefolgt von einem kompletten Mediumwechsel aus dem G₂-Arrest entlassen. Die Zellen wurden bei definierten Zeitpunkten (30 min, 60 min, 120 min, 240 min) nach *release* in die Mitose fixiert, einer Antikörperfärbung unterzogen und konfokalmikroskopisch (Abb. 17) sowie quantitativ analysiert (Abb. 18) analysiert. Typische mitotische Zellen sind hierbei durch eine Spindelfärbung (α -Tubulin) zusammen mit Pericentrin positiven Spindelpolen/Zentrosomen gekennzeichnet.

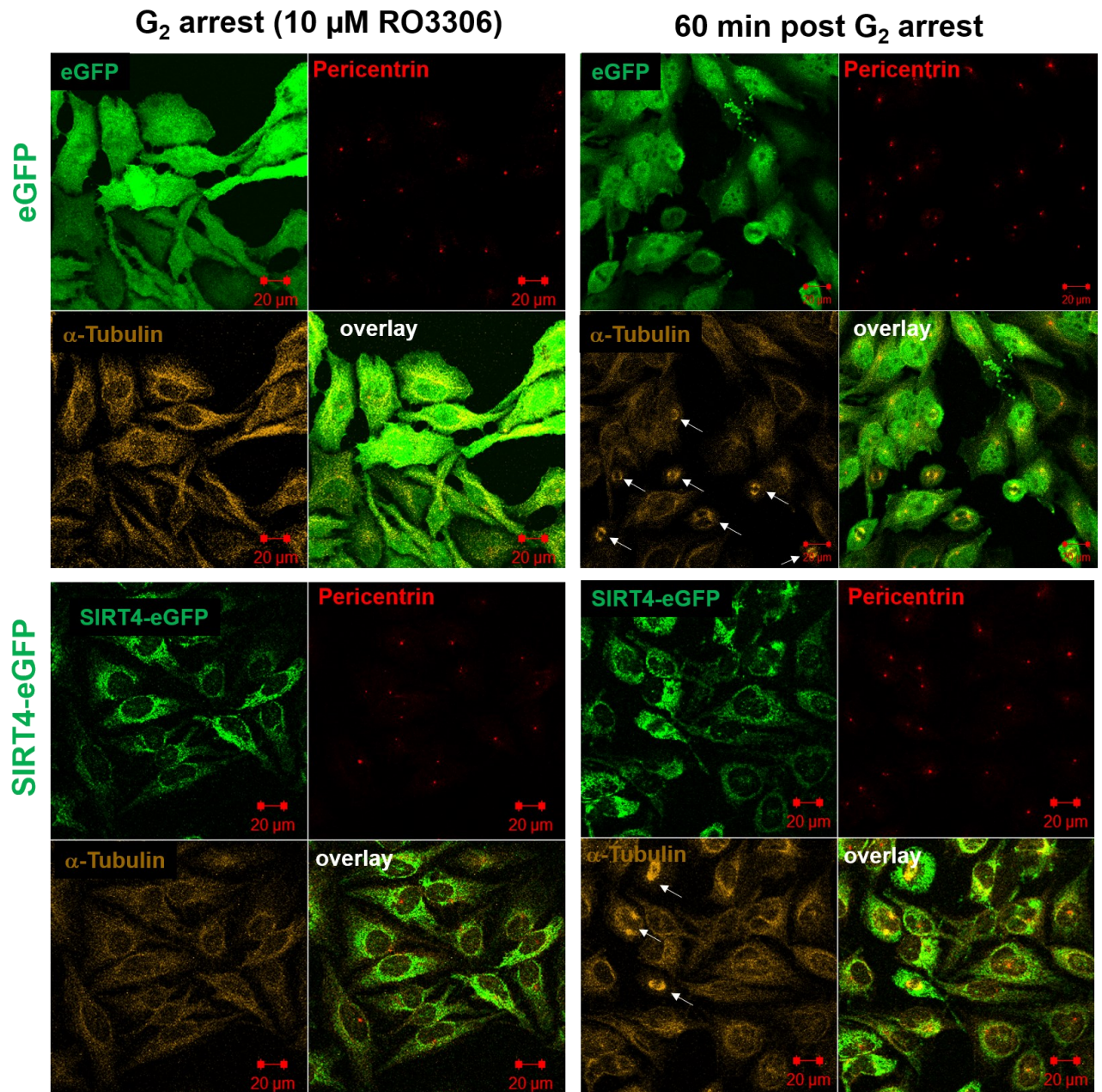


Abb. 17: **Mitotische Zellzyklusprogression von HeLa pUC2-Zelllinien, die stabil eGFP (Kontrolle; oben) oder SIRT4-eGFP (unten) exprimieren.** Die Zelllinien wurden durch Zugabe des reversiblen CDK1-Inhibitors RO3306 in G₂ arretiert (linke Abbildungen) und 60 min nach *release* aus dem G₂-Arrest (durch Wegwaschen von RO3306 und Mediumwechsel, rechte Abbildungen) mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen den zentrosomalen Marker Pericentrin (rot) und den Spindelmarker α-Tubulin (braun) angefärbt. Der mitotische Index wurde durch quantitative Analyse von Post-G₂-Zellen mit mitotischen Spindeln (α-Tubulin/Pericentrin) bestimmt (Auswertung in **Abb. 18**).

Exemplarisch gezeigt sind in Abb. 17 die konfokal-mikroskopischen Aufnahmen zum Zeitpunkt des G₂-Arrests (Abb. 17, links) und HeLa-Zelllinien 60 min nach RO3306-Wegnahme und G₂-*release* in die Mitose (Abb. 17, rechts). Erwartungsgemäß zeigen die in G₂ arretierten Zellen keinerlei mitotische (dicht α-Tubulin positive)

Spindelapparate, wohingegen 60 min post-release typisch mitotische Spindelapparate deutlich zu erkennen sind (Abb. 17, rechts, siehe Pfeile). Um eine Aussage über den Einfluss von SIRT4 auf die zeitliche Progression durch die Mitose von HeLa-Zellen treffen zu können, wurden alle analysierten Zeitpunkte bis 240 min nach *G₂ release* quantitativ analysiert und hierbei der Prozentsatz mitotischer Zellen nach Auszählung von etwa 270 bis 400 Zellen pro Zeitpunkt und Zelllinie bestimmt (Abb. 18A und B).

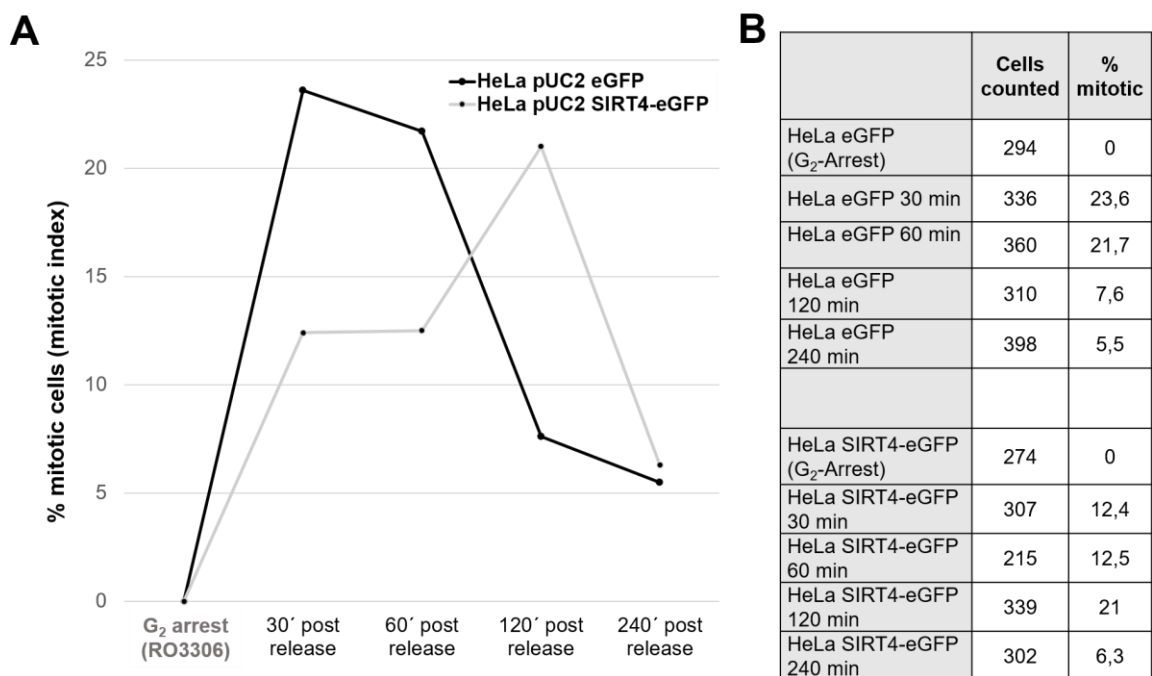


Abb. 18: **Mitotische Zellzyklusprogression von HeLa Zelllinien, die stabil eGFP (Kontrolle) oder SIRT4-eGFP exprimieren.** Die Zelllinien wurden wie in Abb. 17 gezeigt behandelt und dann der mitotische Index bei definierten Zeitpunkten nach *G₂*-Arrest durch quantitative Analyse von Post-*G₂*-Zellen mit mitotischen Spindeln (α -Tubulin als Spindelmarker, Pericentrin als Spindelpolmarker) bestimmt. Die Daten entstammen einem Experiment, bei dem 215 bis knapp 400 Zellen pro Zelllinie und Zeitpunkt ausgezählt und analysiert wurden.

Die Befunde der Zellzyklusanalyse (Abb. 17 und 18) zeigten, dass SIRT4 die Progression der Mitose in HeLa-Zellen deutlich verlangsamt. Im Fall der HeLa-Kontrollzellen, welche lediglich eGFP überexprimieren, zeigen bereits 30 min nach *G₂ release* 23,6 % der ausgezählten Zellen eine mitotische Spindel mit Pericentrin-positiven Spindelpolen. Nach 60 min sind es ähnlich viele (21,7 %). Der Anteil von Zellen mit mitotischem Spindelapparat nimmt nach 120 Minuten deutlich ab auf 7,6 %, da

ein Großteil der Zellen die Mitose in die nächste G₁-Phase durchlaufen hat. Im Gegensatz hierzu war bei den stabil SIRT4-eGFP überexprimierenden HeLa-Zellen eine deutliche Verzögerung der mitotischen Progression zu erkennen. Es zeigte sich, dass 30 min nach Auswaschen des CDK1-Inhibitors RO3306 und somit G₂ *release* lediglich 12,4 % der Zellen und bei 60 min ebenfalls nur 12,5 % der Zellen eine mitotische Spindel ausgebildet haben (Abb. 18). Erst nach 120 Minuten wurde in den SIRT4-eGFP überexprimierenden Zellen eine verzögerte und ähnlich hohe Anzahl an mitotischen Spindelapparaten nachgewiesen (21 %), wie sie bereits bei 30 min für HeLa-eGFP Zellen sichtbar war. SIRT4 führt also durch eine direkte oder indirekte Interaktion mit einem oder mehreren an der Ausbildung des mitotischen Spindelapparates beteiligten Proteinen/Regulatoren zu einer deutlichen zeitlichen Verzögerung der mitotischen Zellteilung.

4 Diskussion

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde geben einen Einblick in eine mögliche extramitochondriale Rolle von SIRT4 während der mitotischen Zellteilung. Es konnte gezeigt werden, dass SIRT4 ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein ist, welches mit GCP2 und GCP3, Komponenten des γ -TuSC, interagiert. Dieser Proteinkomplex ist essenziell für die Keimbildung der Mikrotubuli an den Spindelpolen in der Mitose [52], was nahelegt, dass die zentrosomale Interaktion von SIRT4 mit GCP2 und GCP3 zu einer Hemmung der Kernbildung der Mikrotubuli führt und damit die Zellteilung und Proliferation der Zellen verlangsamt. Die Befunde dieser Arbeit legen daher eine weitere tumorsuppressive Funktion von SIRT4 in der Zellzyklusprogression [1] neben der bereits bekannten Inhibierung des Glutaminmetabolismus nahe [53].

4.1 Extramitochondriale Proteininteraktion und Ko-Lokalisation von SIRT4 mit Komponenten des mitotischen Spindelapparats

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SIRT4 mit Mikrotubuli interagiert und ko-lokalisiert. Anhand von Ko-Immunopräzipitationsexperimenten, konfokaler Mikroskopie und Mikrotubuli-Pulldown-Experimenten wurde eine Interaktion, entweder direkt oder indirekt, von SIRT4 mit α -Tubulin, GCP2 und GCP3 (Abb. 11 und 12) sowie eine Ko-Lokalisation dieser Proteine am mitotischen Spindelapparat (Abb. 13 und 14) gezeigt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei SIRT4 um ein mikrotubuliassoziiertes Protein (MAP) handelt. MAPs wurden ursprünglich beschrieben als Proteine, die an Mikrotubuli binden und diese stabilisieren. Über die Zeit wurden zahlreiche MAPs identifiziert, wobei die genaue Funktion vieler dieser Proteine in der dynamischen Instabilität von Mikrotubuli noch unklar ist [54]. Es existieren fünf MAP-Gruppen, denen verschiedene Mitglieder anhand ihrer Funktion zugeteilt wurden. Zur ersten Gruppe zählen die beweglichen MAPs (z.B. Dynein und Kinesine), welche molekulare Kraft erzeugen und z.B. den Mikrotubuli-vermittelten Transport von Cargo oder Organellen vermitteln [55, 56]. Gruppe zwei beschreibt Proteine, die zur Depolymerisation oder einem Brechen der Mikrotubuli führen [57]. Hierzu zählen z.B. Katanin, Spastin oder Fidgetin. In Gruppe drei finden sich MAPs

wie die GCP-Faktoren des γ TURC, die als Keimbildner der Mikrotubuli fungieren [58]. Schließlich beinhaltet Gruppe vier der MAPs Proteine, die nur am Plus- oder Minusende der Mikrotubuli binden und dort eine definierte Funktion einnehmen, wie z.B. die (+)-Pol stabilisierende und die Mikrotubulidynamik regulierende Rolle von EB3 [59].

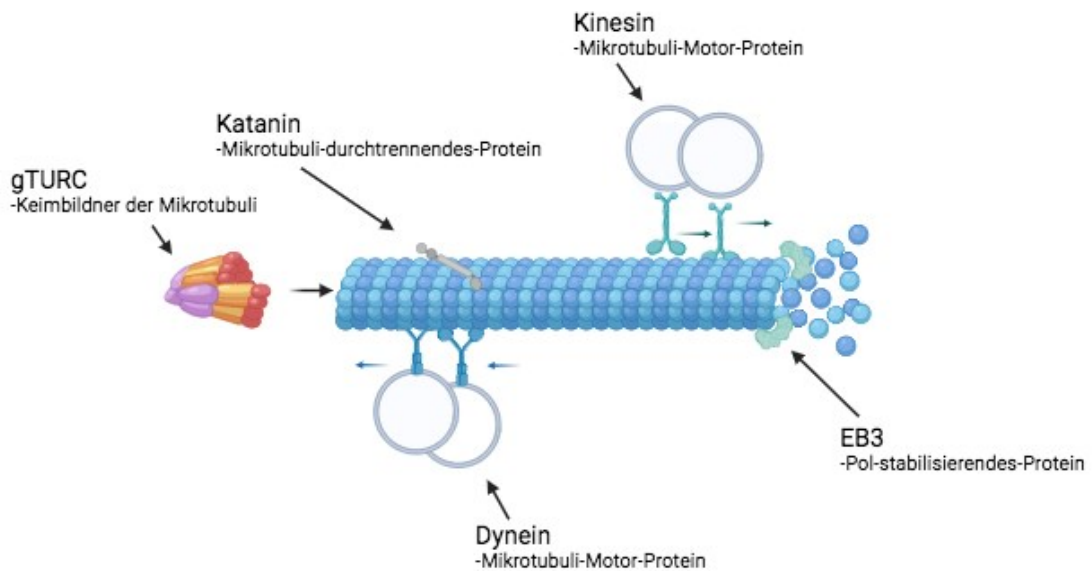


Abb. 19: **Schematische Darstellung einiger Mikrotubuli-Assoziierten-Proteine (MAP's).** Verändert nach Wattanathamsan et al. [60]. Erstellt mit BioRender.com

Die MAPs der ersten vier Gruppen sind klar durch deren Funktion definiert [54], wohingegen Mitglieder der fünften Gruppe eine sehr große heterogene Gruppe von Proteinen repräsentiert, welche an Mikrotubuli binden, diese stabilisieren oder destabilisieren können, aber noch nicht systematisch eingeteilt wurden [61, 62].

Sirtuine haben unterschiedliche Lokalisationen innerhalb der Zelle und scheinen diese auch zu wechseln. SIRT1 und SIRT2 lokalisieren im Zytoplasma und im Kern, was sich durch Kernexportsignale bei SIRT1 zeigt [63], und auch bei SIRT2 konnte die subzelluläre Lokalisierung im Zellkern und im Zytoplasma nachgewiesen werden [64]. Innerhalb der Gruppe der mitochondrialen Sirtuine (SIRT3, SIRT4 und

SIRT5) ist vor allem SIRT3 prädominant in Mitochondrien lokalisiert, wobei für alle drei Mitglieder N-terminal gelegene mitochondriale Zielsequenzen identifiziert werden konnten [65]. SIRT3 kann aber, bei gleichzeitiger Expression von SIRT5, durch einen unbekannten Mechanismus das Mitochondrium verlassen und auch im Zellkern mit bisher unbekannter nukleärer Funktion nachgewiesen werden [66]. Beispiele für extramitochondriale Lokalisationen und Funktionen von SIRT4 und SIRT5 beinhalten z.B. die Interaktion von SIRT4 mit C-RAF im RAF-MEK-ERK Signalweg [44] sowie die SIRT5-vermittelte posttranslationale Modifikation von Histon H3 in der transkriptionellen Regulation [67].

Gemäß der oben vorgenommenen Definition der MAPs und der Analyse der subzellulären Lokalisation der Sirtuine, insbesondere SIRT4, kann man SIRT4 in die fünfte Gruppe der MAPs einordnen. Die aktuelle Literatur legt nahe, dass mitochondriale Sirtuine in der Lage sind ihre intrazelluläre Lokalisation zu verändern [1, 65, 66]. In parallel durchgeführten Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte zusätzlich gezeigt werden, dass SIRT4 mit der Mikrotubuli-assoziierten α -Tubulin-Deacetylase HDAC6 interagiert, die hierbei die HDAC6 Proteinmengen erhöht/stabilisiert und dadurch zu verminderten Acetyl- α -Tubulin (K40) Proteinmengen führt. Dies hat wahrscheinlich eine geringere Stabilität der Mikrotubuli während der Mitose zur Folge [1]. Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass SIRT4 zu den MAPs gezählt werden kann, wobei eine nähere Charakterisierung der Funktion an den Mikrotubuli sowie der genauen regulatorischen Rolle von SIRT4 in der mitotischen Zellteilung durchgeführt werden muss.

4.2 SIRT4 als Teil des γ -TuSC und die Rolle von γ -TURC und α/β -Tubulindimeren in der Rekrutierung von SIRT4 an den Spindelapparat

SIRT4 ko-lokalisiert und interagiert mit α -Tubulin und den Komponenten des γ -TuSC, GCP2 und GCP3. α -Tubulin liegt immer als Heterodimer mit β -Tubulin in der Zelle vor. Diese Heterodimere werden dann durch die sogenannten Tubulin-Spezifischen-Chaperone in den Zustand versetzt, in dem sie für die Mitose polymerisiert werden können [68]. Neben einer GCP2/GCP3-vermittelten Rekrutierung von

SIRT4 an die Spindelpole wäre es alternativ auch denkbar, dass die Rekrutierung von SIRT4 an die Spindelpole/(-)-Enden der Mikrotubuli über α/β -Tubulin Heterodimere von Statten geht. Für diese Hypothese spricht, dass bei der Ko-Immunopräzipitation von α -Tubulin in der Westernblotanalyse SIRT4 als Interaktionspartner von α -Tubulin identifiziert werden konnte (Abb. 11), nicht jedoch GCP2 oder GCP3 (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund spricht dafür, dass die primäre Rekrutierung von SIRT4 an die Mikrotubuli über α/β -Tubulin Heterodimere stattfindet. Im Verlauf der Mitose wird zu Beginn aus mehreren γ -TuSC ein Keimbildungszentrum für die Mikrotubuli gebildet, welches die Polymerisation der Mikrotubuli reguliert [69]. Zusammen mit GCP4, GCP5 und GCP6 bilden sie dann den γ -TuRC (gamma-tubulin-ring-complex), welcher aus den α/β -Tubulin Heterodimeren während der Mitose Mikrotubuli zur Chromosomentrennung formiert [70]. Eine Möglichkeit ist es also, dass SIRT4 über die α/β -Tubulin Heterodimere zum γ -TuSC gelangt und dann von dort Einfluss auf die Mikrotubulidynamik nehmen könnte, beispielsweise über die bereits erwähnte Interaktion mit HDAC6 an den Mikrotubuli (Arbeitsmodell in Abb. 17), gefolgt von einer geringeren Stabilität der Mikrotubuli [1].

Tubulin wird regulativ durch verschiedene Mechanismen posttranslational modifiziert und interagiert so mit einem breiten Spektrum an Proteinen, was eine hohe funktionelle Tubulindiversität zur Folge hat, den sog. „Tubulin-Code“ [71, 72]. Die Tubulinmodifikationen führen dazu, dass verschiedene Effektoren an den Tubulinen binden können und damit vor allem die Dynamik der Mikrotubuli verändert werden kann [73]. Eine Zugehörigkeit von SIRT4 zu diesen Effektoren und der exakte Rekrutierungsmechanismus über GCP2/GCP3 und/oder α/β -Tubulindimere müsste in weitergehenden Experimenten weitergehend untersucht werden.

4.3 Generierung stabiler GCP3-depletierter Zelllinien mit defekter γ TURC-Funktion

Durch die Generierung stabil GCP3 shRNA-exprimierender Zelllinien wurde die Grundlage geschaffen, um die Hypothese (Abb. 17) zu testen, dass der γ -TUSC (GCP2/GCP3) die für die Rekrutierung und Lokalisation von SIRT4 an die spindelpolnahen Enden der Mikrotubuli notwendig ist. In dieser Arbeit wurde GCP3 für die

Generierung der stabilen Klone ausgewählt, da in den Immunopräzipitationsversuchen eine deutliche Interaktion von SIRT4 auch mit endogenem GCP3 gezeigt werden konnte (siehe Abb. 12). Außerdem konnte keine eindeutige Ko-Lokalisation mit GCP2-Flag am Zentrosom beobachtet werden, was aber kritisch zu bewerten ist, da in anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe dies bestätigt werden konnte. Die Schwierigkeit der Generierung GCP3-depletierter Zellen besteht darin, dass GCP3 essentiell für die Zelle ist und ein Knock-down zu schweren mitotischen Defekten führen und ein Überleben der Zelle bedrohen kann [28]. Es wurden verschiedene shRNA-Targetsequenzen eingesetzt und mit Hilfe von mehrmaliger Expressionskontrolle die Zelllinien für eingehende und zukünftige Analysen gewählt, welche (i) zeitlich am stabilsten eine Runterregulation von GCP3 zeigten und (ii) noch Proliferationsfähigkeit und Vitalität aufwiesen (siehe Abb. 16). Weitere Studien mittels Mikrotubuli-Pulldown sowie konfokalmikroskopische Untersuchungen sollten nun mit diesen Klonen durchgeführt werden, um eine potentielle Veränderung der Interaktion mit Mikrotubuli und mitotischen Lokalisation von SIRT4 in Abhängigkeit von GCP3 zu analysieren.

Ein wichtiges, noch ausstehendes Kontrollexperiment ist die Analyse der GCP2/GCP3 Lokalisation am mitotischen Spindelapparat in SIRT4-depletierten Zellen. Hier könnte man abhängig vom Ergebnis ausschließen, dass SIRT4 die subzelluläre Lokalisation GCP2/GCP3 reguliert, im Gegensatz zu dem in Abb. 20 diskutierten und auf den Befunden dieser Arbeit beruhenden Arbeitsmodell.

4.4 Die Auswirkung erhöhter SIRT4-Mengen auf den mitotischen Zellzyklus und die Proliferation

Die Daten dieser Arbeit und weiterführende Daten der Arbeitsgruppe zeigen, dass SIRT4 als mitochondriale SIRT-Isoform auch im Zytosol lokalisiert und in der Mitose an den Spindelpolen/Zentrosomen zu finden ist [1]. Es interagiert mit GCP2, GCP3 und α -Tubulin. Dies bestätigen vorhergegangene massenspektrometrische Daten der Arbeitsgruppe [45]. Die Überexpression von SIRT4 führt zu einer verlangsamten Progression durch die Mitose (siehe Abb. 18), letztlich einhergehend mit der bereits beschriebenen antiproliferativen Wirkung von SIRT4 [74, 75]. Die in dieser Arbeit

durchgeführten konfokal-mikroskopischen Zellzyklusanalysen (siehe Abb. 17) sollten wiederholt und ebenfalls mit den generierten Zelllinienmodellen mit shRNA-vermittelter GCP3-Depletion (siehe Abb. 16) durchgeführt werden. Letztere Punkte konnten aufgrund der begrenzten Zeit nicht mehr durchgeführt werden.

4.5 Arbeitsmodell und Ausblick

Das in Abb. 20 aufgeführte Arbeitsmodell bildet eine Basis für weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf die mitotische Lokalisation und Funktion von SIRT4 und die Interaktion mit Komponenten des mitotischen Spindelapparates. Die Basis des Arbeitsmodells ist die GCP2/3 abhängige Rekrutierung von SIRT4 an die Mikrotubuli und damit an den mitotischen Spindelapparat. Durch die Interaktion von SIRT4 mit HDAC6 an den Mikrotubuli kommt es zu erhöhten Proteinleveln von HDAC6. Diese Interaktion könnte durch eine vermehrte Deacetylierung von α -Tubulin durch HDAC6 zu verminderter Stabilität und Dynamik der Mikrotubuli kommen. Insbesondere die folgenden Punkte wären anzugehen. Zunächst sollte in stabil GCP3 shRNA exprimierenden Zellen die genaue mitotische Lokalisation von SIRT4 konfokalmikroskopisch analysiert werden. Möglicherweise kommt es bei geringeren Mengen an GCP3 zu einer veränderten mitotischen Lokalisation von SIRT4 an der Spindel. So könnte ein erster mechanistischer Einblick in den Rekrutierungsmechanismus von SIRT4 an die Spindel gewonnen werden. Im nächsten Schritt sollte mit der in dieser Arbeit etablierten Mikrotubuli-Pulldown Methode die möglicherweise reduzierte Interaktionsfähigkeit von SIRT4 mit Mikrotubuli nach GCP3-Depletion getestet werden.

Auch sollten bereits vorhandene SIRT4-depletierte Zelllinienmodelle untersucht werden, um insbesondere konfokalmikroskopisch zu überprüfen und ggf. auszuschließen, dass SIRT4 die mitotische Lokalisation der γ -TUSC Komponente GCP3 reguliert.

Schließlich sollte die quantitative Analyse des Einflusses erhöhter SIRT4-Proteinmengen auf die Mitose und Zellproliferation expandiert und statistisch ausgewertet werden. Hier liegen bereits weitere Befunde der Arbeitsgruppe vor [1] (Daten nicht gezeigt).

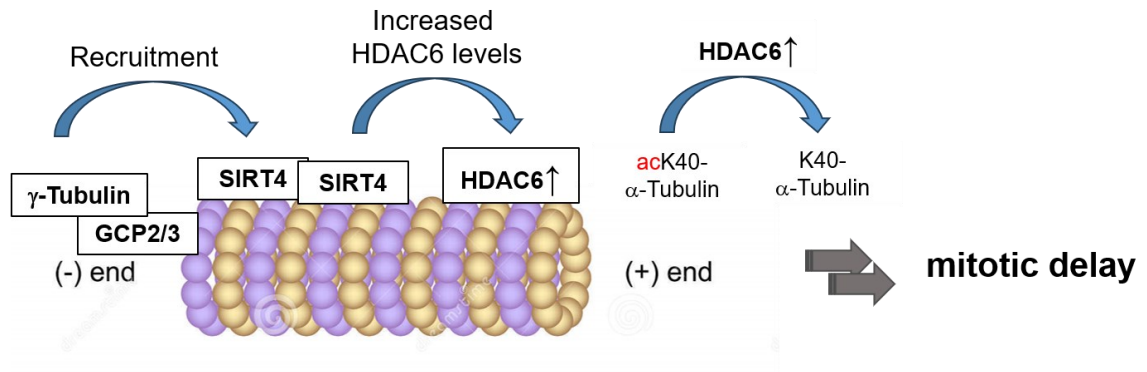


Abb. 20: **Zusammenfassung und Arbeitsmodell einer möglichen GCP2/3-abhängigen Rekrutierung von SIRT4 an die (-) Enden der Mikrotubuli und somit an den mitotischen Spindelapparat.** An den Mikrotubuli, hier an den (+)-Enden könnte SIRT4 über eine Interaktion mit HDAC6 und Erhöhung dessen Proteinmengen eine vermehrte Deacetylierung von α -Tubulin und somit eine verminderte Stabilität und Dynamik der mitotischen Mikrotubuli bewirken [1]. Weitere Erklärungen im Text.

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des mitotischen Zellzyklus	1
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Mitose	3
Abb. 3:	Schematische Darstellung des mitotischen Spindelapparates	4
Abb. 4:	Schematische Darstellung der dynamischen Instabilität intrazellulärer Mikrotubuli	5
Abb. 5:	Schematische Darstellung des γ -TuSC und des γ -TuRC.....	8
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Funktionen von SIRT4 im Mitochondrium	10
Abb. 7:	pLKO.1 puro Vektorkarte der lentiviralen shRNA-Plasmide gerichtet gegen GCP3.	38
Abb. 8:	Sequenzen der shRNA-Plasmide gerichtet gegen GCP3.....	39
Abb. 9:	Durchflusszytometrische Analyse der eGFP (B) und SIRT4-eGFP (C) Expression in stabil transfizierten HEK293 Zellen	41
Abb. 10:	Interaktion von SIRT4-eGFP mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli	42
Abb. 11:	SIRT4-eGFP Ko-Immunopräzipitiert mit α -Tubulin.....	44
Abb. 12:	SIRT4-eGFP ko-immunopräzipitiert mit GCP2 und GCP3.....	46
Abb. 13:	Endogenes SIRT4 ko-lokalisiert partiell mit endogenem GCP2 (A) und GCP3 (B) am mitotischen Spindelapparat	47
Abb. 14:	Endogenes SIRT4 ko-lokalisiert partiell mit transfiziertem GCP2-Flag (A) und GCP3-Flag (B) am mitotischen Spindelapparat	48
Abb. 15:	shRNA-vermittelte zelluläre Depletion von GCP3 in HEK293-Zellen...	50
Abb. 16:	shRNA-vermittelte zelluläre Depletion von GCP3 in HeLa-Zellen	51
Abb. 17:	Mitotische Zellzyklusprogression von HeLa pUC2-Zelllinien, die stabil eGFP (Kontrolle; oben) oder SIRT4-eGFP (unten) exprimieren.....	53
Abb. 18:	Mitotische Zellzyklusprogression von HeLa Zelllinien, die stabil eGFP (Kontrolle) oder SIRT4-eGFP exprimieren.....	54
Abb. 19:	Schematische Darstellung einiger Mikrotubuli-Assoziierten-Proteine (MAP's)	57
Abb. 20:	Zusammenfassung und Arbeitsmodell einer möglichen GCP2/3- abhängigen Rekrutierung von SIRT4 an die (-) Enden der Mikrotubuli und somit an den mitotischen Spindelapparat.....	62

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Bergmann, L., et al., *Subcellular Localization and Mitotic Interactome Analyses Identify SIRT4 as a Centrosomally Localized and Microtubule Associated Protein*. Cells, 2020. **9**(9).
2. Nasmyth, K., *Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation*. Science, 2002. **297**(5581): p. 559-65.
3. Reed, S.I., *Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(11): p. 855-64.
4. Swift, H., *The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1950. **36**(11): p. 643-54.
5. Kops, G.J., B.A. Weaver, and D.W. Cleveland, *On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(10): p. 773-85.
6. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.
7. Rale, M.J., R.S. Kadzik, and S. Petry, *Phase Transitioning the Centrosome into a Microtubule Nucleator*. Biochemistry, 2018. **57**(1): p. 30-37.
8. Draber, P., V. Sulimenko, and E. Draberova, *Cytoskeleton in mast cell signaling*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 130.
9. Conde, C. and A. Caceres, *Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(5): p. 319-32.
10. King, R.W., et al., *How proteolysis drives the cell cycle*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1652-9.
11. Zachariae, W. and K. Nasmyth, *Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex*. Genes Dev, 1999. **13**(16): p. 2039-58.
12. Musacchio, A., *The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics*. Curr Biol, 2015. **25**(20): p. R1002-18.
13. Peters, J.M., *The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond*. Mol Cell, 2002. **9**(5): p. 931-43.
14. Mackeh, R., et al., *Autophagy and microtubules - new story, old players*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 5): p. 1071-80.
15. Desai, A. and T.J. Mitchison, *Microtubule polymerization dynamics*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 83-117.

16. Gierke, S., P. Kumar, and T. Wittmann, *Analysis of microtubule polymerization dynamics in live cells*. Methods Cell Biol, 2010. **97**: p. 15-33.
17. Panda, D., H.P. Miller, and L. Wilson, *Determination of the size and chemical nature of the stabilizing "cap" at microtubule ends using modulators of polymerization dynamics*. Biochemistry, 2002. **41**(5): p. 1609-17.
18. Itoh, T.J. and H. Hotani, *Microtubule-stabilizing activity of microtubule-associated proteins (MAPs) is due to increase in frequency of rescue in dynamic instability: shortening length decreases with binding of MAPs onto microtubules*. Cell Struct Funct, 1994. **19**(5): p. 279-90.
19. Zheng, Y., et al., *Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex*. Nature, 1995. **378**(6557): p. 578-83.
20. Knop, M. and E. Schiebel, *Spc98p and Spc97p of the yeast gamma-tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p*. EMBO J, 1997. **16**(23): p. 6985-95.
21. Kollman, J.M., et al., *The structure of the gamma-tubulin small complex: implications of its architecture and flexibility for microtubule nucleation*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(1): p. 207-15.
22. Farache, D., et al., *Functional Analysis of gamma-Tubulin Complex Proteins Indicates Specific Lateral Association via Their N-terminal Domains*. J Biol Chem, 2016. **291**(44): p. 23112-23125.
23. Gunawardane, R.N., et al., *Characterization and reconstitution of Drosophila gamma-tubulin ring complex subunits*. J Cell Biol, 2000. **151**(7): p. 1513-24.
24. Izumi, N., et al., *GSK-3beta regulates proper mitotic spindle formation in cooperation with a component of the gamma-tubulin ring complex, GCP5*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 12981-91.
25. Bahtz, R., et al., *GCP6 is a substrate of Plk4 and required for centriole duplication*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 2): p. 486-96.
26. Scheidecker, S., et al., *Mutations in TUBGCP4 alter microtubule organization via the gamma-tubulin ring complex in autosomal-recessive microcephaly with chorioretinopathy*. Am J Hum Genet, 2015. **96**(4): p. 666-74.
27. Zimmerman, W.C., et al., *Mitosis-specific anchoring of gamma tubulin complexes by pericentrin controls spindle organization and mitotic entry*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(8): p. 3642-57.
28. Cota, R.R., et al., *MZT1 regulates microtubule nucleation by linking*

- gammaTuRC assembly to adapter-mediated targeting and activation. J Cell Sci*, 2017. **130**(2): p. 406-419.
29. Tovey, C.A. and P.T. Conduit, *Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes and beyond. Essays Biochem*, 2018. **62**(6): p. 765-780.
 30. Martinez-Redondo, P. and A. Vaquero, *The diversity of histone versus nonhistone sirtuin substrates. Genes Cancer*, 2013. **4**(3-4): p. 148-63.
 31. Chen, Y., et al., *SIRT4 inhibits cigarette smoke extracts-induced mononuclear cell adhesion to human pulmonary microvascular endothelial cells via regulating NF-kappaB activity. Toxicol Lett*, 2014. **226**(3): p. 320-7.
 32. Herskovits, A.Z. and L. Guarente, *Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. Cell Res*, 2013. **23**(6): p. 746-58.
 33. 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.
 34. Mathias, R.A., et al., *Sirtuin 4 is a lipamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. Cell*, 2014. **159**(7): p. 1615-25.
 35. Huang, J.Y., et al., *Mitochondrial sirtuins. Biochim Biophys Acta*, 2010. **1804**(8): p. 1645-51.
 36. Ahuja, N., et al., *Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. J Biol Chem*, 2007. **282**(46): p. 33583-92.
 37. 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.
 38. Jeong, Seung M., et al., *SIRT4 Has Tumor-Suppressive Activity and Regulates the Cellular Metabolic Response to DNA Damage by Inhibiting Mitochondrial Glutamine Metabolism. Cancer Cell*, 2013. **23**(4): p. 450-463.
 39. Lombard, D.B., et al., *Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. Mol Cell Biol*, 2007. **27**(24): p. 8807-14.
 40. 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.
 41. Csibi, A., et al., *The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. Cell*, 2013. **153**(4): p. 840-54.
 42. 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).
43. Zeng, J., et al., *SIRT4 is essential for metabolic control and meiotic structure during mouse oocyte maturation*. Aging Cell, 2018. **17**(4): p. e12789.
 44. 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).
 45. Lang, A., et al., *SIRT4 interacts with OPA1 and regulates mitochondrial quality control and mitophagy*. Aging (Albany NY), 2017. **9**(10): p. 2163-2189.
 46. Drews, L., et al., *Ammonia inhibits energy metabolism in astrocytes in a rapid and glutamate dehydrogenase 2-dependent manner*. Dis Model Mech, 2020. **13**(10).
 47. Vassilev, L.T., et al., *Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(28): p. 10660-5.
 48. 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.
 49. Rothbauer, U., et al., *A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(2): p. 282-9.
 50. Gomez-Baldo, L., et al., *TACC3-TSC2 maintains nuclear envelope structure and controls cell division*. Cell Cycle, 2010. **9**(6): p. 1143-55.
 51. Draberova, E., et al., *Overexpression and Nucleolar Localization of gamma-Tubulin Small Complex Proteins GCP2 and GCP3 in Glioblastoma*. J Neuropathol Exp Neurol, 2015. **74**(7): p. 723-42.
 52. Pouchucq, L., et al., *gamma-Tubulin small complex formation is essential for early zebrafish embryogenesis*. Mech Dev, 2018. **154**: p. 145-152.
 53. Cai, G., et al., *SIRT4 functions as a tumor suppressor during prostate cancer by inducing apoptosis and inhibiting glutamine metabolism*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 12208.
 54. Bodakuntla, S., et al., *Microtubule-Associated Proteins: Structuring the Cytoskeleton*. Trends Cell Biol, 2019. **29**(10): p. 804-819.
 55. Hirokawa, N., et al., *Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(10): p. 682-96.
 56. Bhabha, G., et al., *How Dynein Moves Along Microtubules*. Trends Biochem

- Sci, 2016. **41**(1): p. 94-105.
57. McNally, F.J. and A. Roll-Mecak, *Microtubule-severing enzymes: From cellular functions to molecular mechanism*. J Cell Biol, 2018. **217**(12): p. 4057-4069.
 58. Roostalu, J. and T. Surrey, *Microtubule nucleation: beyond the template*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(11): p. 702-710.
 59. Akhmanova, A. and M.O. Steinmetz, *Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(12): p. 711-26.
 60. Wattanathamsan, O. and V. Pongrakhananon, *Emerging role of microtubule-associated proteins on cancer metastasis*. Front Pharmacol, 2022. **13**: p. 935493.
 61. Ramkumar, A., B.Y. Jong, and K.M. Ori-McKenney, *ReMAPping the microtubule landscape: How phosphorylation dictates the activities of microtubule-associated proteins*. Dev Dyn, 2018. **247**(1): p. 138-155.
 62. Frost, B., J. Gotz, and M.B. Feany, *Connecting the dots between tau dysfunction and neurodegeneration*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(1): p. 46-53.
 63. Tanno, M., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6823-32.
 64. Haigis, M.C. and D.A. Sinclair, *Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 253-95.
 65. 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.
 66. Nakamura, Y., et al., *Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **366**(1): p. 174-9.
 67. Zorro Shahidian, L., et al., *Succinylation of H3K122 destabilizes nucleosomes and enhances transcription*. EMBO Rep, 2021. **22**(3): p. e51009.
 68. Tian, G. and N.J. Cowan, *Tubulin-specific chaperones: components of a molecular machine that assembles the alpha/beta heterodimer*. Methods Cell Biol, 2013. **115**: p. 155-71.
 69. Zupa, E., et al., *The cryo-EM structure of a gamma-TuSC elucidates*

- architecture and regulation of minimal microtubule nucleation systems*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 5705.
70. Liu, P., et al., *Insights into the assembly and activation of the microtubule nucleator gamma-TuRC*. Nature, 2020. **578**(7795): p. 467-471.
 71. Verhey, K.J. and J. Gaertig, *The tubulin code*. Cell Cycle, 2007. **6**(17): p. 2152-60.
 72. Janke, C. and J.C. Bulinski, *Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(12): p. 773-86.
 73. Roll-Mecak, A., *The Tubulin Code in Microtubule Dynamics and Information Encoding*. Dev Cell, 2020. **54**(1): p. 7-20.
 74. 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.
 75. Jeong, S.M., et al., *SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism*. Cancer Cell, 2013. **23**(4): p. 450-63.

7 Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Erarbeitung und Zusammenstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Reza Ahmadian. Seine Bereitschaft mir die Durchführung dieser Forschung unter seiner Leitung zu ermöglichen, war entscheidend. Ein besonderer Dank gilt auch Peter Brenneisen als Ko-Betreuer, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Großer Dank gilt auch Jürgen Scheller, Leiter des Instituts, der durch Bereitstellung der finanziellen Mittel die Durchführung der Dissertation möglich machte.

Ich möchte mich bei allen im Institut für BCMII bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und mich im Labor immer unterstützt haben.

Besonderer Dank auch an Andreas Reichert für die ausgiebige Nutzung des konfokalen Mikroskops seiner Arbeitsgruppe ohne das ein signifikanter Teil der Daten und Ergebnisse sonst nicht möglich gewesen wäre.

Schließlich möchte ich mich herzlich bei Roland Piekorz als ständigen Ansprechpartner in allen Belangen bedanken. Als direkter Betreuer mit immer neuen Ideen zu Experimenten und Methoden hat er einen großen Anteil an dem Gelingen des gesamten Forschungsprojekts. Er hatte immer die passenden Tipps. Seine Betreuung und Anleitung sowie die Diskussionen mit ihm haben meine wissenschaftliche Arbeit stets vorangetrieben.

Ich möchte mich auch herzlich bei meiner Frau bedanken, die immer mit Rat und Tat zur Stelle war und mich auch in teils anstrengenden Zeiten während der Promotion unterstützt hat. Auch möchte ich meinen Kindern danken, die in den letzten Jahren oft auf mich verzichten mussten.