

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

**Die Rolle von SIRT4 und dessen Interaktionspartnern OPA1 und
HDAC6 in der CoCl₂/Pseudohypoxie-induzierten Autophagie**

Dissertation

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

vorgelegt von

Isabell Lehmkuhl

2026

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. Andreas Reichert

Drittgutachter: PD Dr. rer. nat. Frank Eßmann

Für meine Familie – in tiefer
Dankbarkeit für alles.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Lehmkuhl, I.*, Amin, K.*, Hampel, N., Iram, A., Hesse, J., Wiek, C., Thuy Vy Nguyen, J., Hanenberg, H., Scheller, J., Ahmadian, MR., Stork, B., Floss, DM., Piekorz, RP., (2025), SIRT4 positively regulates autophagy via ULK1, but independently of HDAC6 and OPA1, *bioRxiv*, 649368

*gleichberechtigte Erstautoren

Hampel, N., Georgy, J., Mehrabipour, M., Lang, A., **Lehmkuhl, I.**, Scheller, J., Ahmadian, MR., Floss, DM., Piekorz, RP., (2023), CoCl₂-triggered pseudohypoxic stress induces proteasomal degradation of SIRT4 via polyubiquitination of lysines K78 and K299, *FEBS Open Bio*, (12) 2187-2199

Zusammenfassung

Das Sirtuin SIRT4 fungiert über verschiedene NAD⁺-abhängige enzymatische Aktivitäten in der Kontrolle von zellulärem Metabolismus und mitochondrialer Dynamik. In der Regulation der Autophagie nimmt SIRT4 sowohl eine aktivierende als auch eine inhibitorische Rolle ein. In diesem Zusammenhang ist die Funktion von SIRT4 in der Hypoxie- oder CoCl₂/(Pseudohypoxie)-induzierten Autophagie jedoch bislang unverstanden. Daher wurde in dieser Arbeit die Rolle von SIRT4 und seiner enzymatisch inaktiven, potenziell dominant-negativ wirkenden Mutante SIRT4(H161Y) auf die CoCl₂-induzierte Autophagie charakterisiert. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf den Einfluss der SIRT4-Interaktionspartner und Autophagie-Regulatoren Histondeacetylase 6 (HDAC 6) und *Optic atrophy 1* (OPA1) gelegt.

Die erhobenen Befunde zeigten, dass der Anstieg des *autophagic flux* (*Microtubule-associated protein 1B-light chain 3* (LC3B-II)-Zunahme) nach CoCl₂-Behandlung spezifisch in SIRT4(H161Y)-exprimierenden Zellen stark reduziert war. Dies ging einher mit deutlich erhöhten HDAC6- und OPA1-L-Proteinmengen. Die daraufhin erfolgte pharmakologische Inhibition der putativen SIRT4-Effektoren HDAC6 und OPA1 mittels Tubacin beziehungsweise MYLS22 konnte jedoch die LC3B-II-Zunahme in SIRT4(H161Y)-exprimierenden HEK293-Zellen nach CoCl₂-Behandlung nicht wiederherstellen. Des Weiteren wurde durch den Einsatz von Bafilomycin A1, einem Inhibitor der Autophagosom-Lysosom-Fusion, ein beschleunigter autophagolysosomaler Abbau von LC3B-II in CoCl₂-behandelten, SIRT4(H161Y)-exprimierenden HEK293-Zellen ausgeschlossen. Dagegen wurde überraschenderweise eine Stabilisierung der Phosphorylierung von *Unc-51 like autophagy activating kinase* (ULK1) an den Serinpositionen 638 und 758 in SIRT4(H161Y)-exprimierenden HEK293-Zellen nach CoCl₂-Behandlung beobachtet. ULK1 spielt hierbei eine regulatorische Schlüsselrolle in der frühen Phase/Initiation der Autophagie, die durch Phosphorylierung an Serin 638 und 758 gehemmt wird. Zusammenfassend lassen die in dieser Arbeit erhobenen Befunde vermuten, dass (i) SIRT4(H161Y) unter Pseudohypoxie dominant-negativ auf den *autophagic flux*/LC3B-II-Zunahme wirkt, (ii) dies unabhängig von den SIRT4-Interaktoren HDAC6 und OPA1 erfolgt, (iii) eine erhöhte Autophagierate nicht für die erniedrigten LC3B-II-Mengen verantwortlich ist und schließlich (iv) SIRT4(H161Y) bei Pseudohypoxie die Phosphorylierung von ULK1 an Serin 638 und 758 stabilisiert. Aufgrund dieser Befunde und der anscheinend dominant-negativen Wirkung von SIRT4(H161Y) ist zu vermuten, dass SIRT4 unter Stressbedingungen die frühe Autophagiephase/Bildung von LC3B-II über die Modulation der ULK1-Aktivierung reguliert.

Summary

The sirtuin SIRT4 functions via various NAD⁺-dependent enzymatic activities in the control of cellular metabolism and mitochondrial dynamics. SIRT4 plays both an activating and an inhibitory role in the regulation of autophagy. However, the function of SIRT4 in hypoxia- or CoCl₂/(pseudohypoxia)-induced autophagy is not understood. Therefore, in this study, the role of SIRT4 and its enzymatically inactive, potentially dominant-negative mutant SIRT4(H161Y) on CoCl₂-induced autophagy was characterized. Particular focus was placed on the influence of the SIRT4 interaction partners and autophagy regulators histone deacetylase 6 (HDAC6) and optic atrophy 1 (OPA1).

The findings showed that the increase in autophagic flux (microtubule-associated protein 1B-light chain 3 (LC3B-II) increase) after CoCl₂ treatment is significantly reduced specifically in SIRT4(H161Y)-expressing HEK293 cells, accompanied by significantly increased HDAC6 and OPA1-L protein levels. However, subsequent pharmacological inhibition of the putative SIRT4 effectors HDAC6 and OPA1 using tubacin and MYLS22, respectively, failed to restore the LC3B-II-increase in SIRT4(H161Y)-expressing HEK293 cells after CoCl₂ treatment. Furthermore, the use of bafilomycin A1, an inhibitor of autophagosome-lysosome fusion, ruled out an accelerated autophagolysosomal degradation of LC3B-II in CoCl₂-treated, SIRT4(H161Y)-expressing HEK293 cells. Surprisingly, however, stabilization of the phosphorylation of Unc-51-like autophagy-activating kinase (ULK1) at serine positions 638 and 758 was observed in SIRT4(H161Y)-expressing HEK293 cells after CoCl₂ treatment. ULK1 plays a key regulatory role in the early phase/initiation of autophagy, which is inhibited by phosphorylation at serine 638 and 758. Taken together, the findings obtained in this study suggest that (i) SIRT4(H161Y) has a dominant-negative effect on autophagic flux/LC3B-II increase under pseudohypoxia, (ii) this occurs independently of the SIRT4 interactors HDAC6 and OPA1, (iii) an increased autophagy rate is not responsible for the observed decreased LC3B-II levels, and finally (iv) SIRT4(H161Y) stabilizes the inhibitory phosphorylation of ULK1 at serine 638 and 758 during pseudohypoxia. Based on these findings and the apparent dominant-negative effect of SIRT4(H161Y), it can be assumed that SIRT4 regulates the early autophagy phase/formation of LC3B-II under stress conditions by modulating ULK1 activation.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der Makroautophagie.	2
Abb. 2: Initiation der Autophagie und Nukleation der Isolierungsmembran.	3
Abb. 3: Erweiterung der Autophagosomenmembran durch zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme.	5
Abb. 4: Fusion von Autophagosom und Lysosom.	6
Abb. 5: Fusion und <i>Fission</i> von Mitochondrien.	9
Abb. 6: Formen der Mitophagie.	10
Abb. 7: HIF-1 α Signalweg in der Hypoxie.	12
Abb. 8: Schematische Darstellung der mitochondrialen Sirtuine.	13
Abb. 9: FACS- und Immunoblot-basierte Messung der SIRT4-eGFP/SIRT4(H161Y)-Expression in stabilen HEK293-Zelllinien.	38
Abb. 10: Ergebnis der Sequenzierung der SIRT4-eGFP und SIRT4(H161Y)-eGFP-Transkripte in stabil exprimierenden HEK293-Zellen.	39
Abb. 11: Aktivierung von HIF-1 α durch CoCl ₂ in SIRT4/SIRT4(H161Y)-exprimierenden HEK293-Zellen.	40
Abb. 12: Mikroskopische Aufnahmen der HEK293 eGFP-Zellen.	41
Abb. 13: Mikroskopische Aufnahmen der HEK293 SIRT4-eGFP-Zellen.	42
Abb. 14: Mikroskopische Aufnahmen der HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen.	43
Abb. 15: SIRT4(H161Y)-exprimierende HEK293-Zellen zeigen eine deutlich reduzierte LC3B-II-Bildung nach CoCl ₂ -Behandlung für 24 h.	45
Abb. 16: SIRT4(H161Y)-exprimierende HEK293-Zellen zeigen eine deutlich reduzierte LC3B-II-Bildung nach CoCl ₂ -Behandlung für 36 h.	46
Abb. 17: Erhöhte HDAC6-Proteinmengen und erniedrigte acetylierte K40 α -Tubulin-Proteinmengen in SIRT4- und SIRT4(H161Y)-exprimierenden HEK293-Zellen.	48
Abb. 18: Tubacin vermittelte Hemmung von HDAC6 hat keinen positiven Einfluss auf die LC3B-II-Proteinmengen in CoCl ₂ -behandelten HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen.	50
Abb. 19: SIRT4(H161Y) stabilisiert OPA1-L unter CoCl ₂ -induzierter Pseudohypoxie.	52
Abb. 20: Der OPA1-Inhibitor MYLS22 senkt bei einer Konzentration von 50 μ M das OPA1-L/OPA1-S-Proteinverhältnis in HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen.	53
Abb. 21: MYLS22-vermittelte Inhibition von OPA1 führt nicht zu erhöhten LC3B-II-Proteinmengen in CoCl ₂ -behandelten HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen.	54
Abb. 22: Die kombinierte Behandlung mit BafA1 führt nicht zu erhöhten LC3B-II-Proteinmengen in CoCl ₂ -behandelten HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen.	56
Abb. 23: Stabilisierung von ULK1 pS758 durch SIRT4(H161Y)-Expression unter Pseudohypoxie.	58
Abb. 24: Stabilisierung von ULK1 pS638 durch SIRT4(H161Y)-Expression unter Pseudohypoxie.	59
Abb. 25: Die ATG13-Proteinmengen werden in den drei analysierten Zelllinien unter Pseudohypoxie nicht signifikant beeinflusst.	60
Abb. 26: Die FIP200-Proteinmengen werden in den drei analysierten Zelllinien unter Pseudohypoxie nicht signifikant beeinflusst.	61
Abb. 27: SIRT4 und SIRT4(H161Y) vermitteln eine starke Stabilisierung von OPA1-L unter klassischer Hypoxie (1 % O ₂ Sauerstoffgehalt).	63
Abb. 28: Mögliche Ansatzpunkte von SIRT4 in der Regulation der Autophagie.	69
Abb. 29: Mögliche Ansatzpunkte, an denen SIRT4 die Autophagie-Initiation und den <i>autophagic flux</i> regulieren könnte und dessen Funktion hierbei möglicherweise durch Überexpression von SIRT4(H161Y) dominant-negativ beeinflusst wird.	73
Abb. 30: Mögliche Rolle von SIRT4 in der ULK1-abhängigen Regulation der Autophagieinitiation.	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Antibiotika 17
Tabelle 2: Liste verwendeter Primärantikörper 17
Tabelle 3: Liste verwendeter Sekundärantikörper 18
Tabelle 4: Zusammenstellung verwendeter Chemikalien und Reagenzien 19
Tabelle 5: Übersicht verwendeter Kits 20
Tabelle 6: Auflistung verwendeter Laborgeräte 21
Tabelle 7: Übersicht verwendeter Oligonukleotide 22
Tabelle 8: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen 22
Tabelle 9: Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien 23
Tabelle 10: Übersicht verwendeter Zelllinien 24
Tabelle 11: Übersicht der Anzahl an ausgesäten Zellen 33
Tabelle 12: Übersicht über das Volumen an verwendetem Medium pro Zellkulturplatte 33
Tabelle 13: Auflistung verwendeter Substanzen zur Behandlung der Zellen 34
Tabelle 14: Die Rolle von SIRT4 in der Autophagieregulation 67

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ac.K40 α-Tubulin	Acetyliertes K40 α -Tubulin
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
Ambra1	<i>activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte-Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATG	Autophagie regulierende Protease
ATP	Adenosintriphosphat
BafA1	Bafilomycin A1
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine</i> Serum Albumin
°C	Celsius
C	Cytosin
CCCP	Carbonyl Cyanide Chlorophenylhydrazone
cDNA	Komplementäre DNA
CoCl₂	Kobalt (II)-chlorid Hexahydrat
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
ddH₂O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Drp1	<i>Dynamamin related protein 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced</i> grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FADH	<i>Flavin-Adenin-Dinukleotid</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FIP200	<i>focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa</i>
Fis1	<i>Fission 1</i>
G	Glycin
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Guanin Cytosin Puffer
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTPase	GTP-bindendes Protein
H	Histidin
HDAC	Histondeacetylase
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen

Abkürzungsverzeichnis

HF	<i>high fidelity</i> Puffer
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HRE	Hypoxie-responsive Elemente
IDE	Insulin-degradierendes Enzym
K40	Lysin 40
kDa	Kilodalton
LC3B	<i>Microtubule-associated protein 1B-light chain 3</i>
mAB	Monoklonaler Antikörper
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MDB	<i>Membrane desalting buffer</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MFN	Mitofusin
mRNA	<i>messenger</i> RNA
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MYLS22	N-(1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4- YL)-3-methyl-1-PH ⁺
NADH/H⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
OMA	<i>overlapping proteolytic activity with m-AAA protease 1</i>
OPA1	<i>Optic atrophy 1</i>
OPA1-L	Lange Form von OPA
OPA1-S	Kurze Form von OPA
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PINK	<i>PTEN-induced kinase 1</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
pS	phosphoryliertes Serin
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
pVHL	Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rag	Ras-verwandte GTPasen
Ras	<i>Rat Sarcoma</i>
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
Rheb	<i>Ras homologue enriched in brain</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
pm	<i>rounds per minute</i>
SCFD1	<i>Sec1 Family Domain Containing 1</i>
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SIRT4	Sirtuin 4
SNAP	<i>synaptosomal-associated protein</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>

Abkürzungsverzeichnis

STX17	SNARE Protein Syntaxin 17
T	Thymin
TAE	Tris-acetat-EDTA Puffer
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween20
Temed	Tetramethylethylendiamin
TOM	Translokase der äußeren Membran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i>
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan Monolaurat –Lösung
ULK	<i>Unc-51 like autophagy activating kinase</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
Vps	<i>vacuolar protein sorting</i>
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membran Protein
Y	Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Inhaltsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Autophagie	1
1.1.1 Autophagie und deren Regulation	1
1.1.2 LC3B-II als Regulator und Marker der Autophagie	7
1.1.3 Rolle der Autophagie bei Erkrankungen	7
1.2 Mitochondriale Dynamik und Mitophagie	8
1.2.1 Funktion von Mitochondrien	8
1.2.2 Regulation der mitochondrialen Dynamik durch die GTPase OPA1	8
1.2.3 Formen und Regulation der Mitophagie	10
1.2.4 Induktion der Autophagie/Mitophagie durch CoCl ₂ -vermittelte Pseudohypoxie oder Hypoxie	11
1.3 Mitochondriale Sirtuine	12
1.3.1 Funktion mitochondrialer Sirtuine	12
1.3.2 Die Rolle von SIRT4 in der Regulation von Autophagie und Mitophagie	14
1.3.3 Interaktion von SIRT4 mit OPA1	15
1.3.4 Interaktion von SIRT4 mit HDAC6	15
1.4 Ziele der Arbeit	16
2 Material	17
2.1 Antibiotika	17
2.2 Antikörper	17
2.2.1 Primärantikörper	17
2.2.2 Sekundärantikörper	18
2.3 Chemikalien und Reagenzien	19
2.4 Kits	20
2.5 Laborgeräte	21
2.6 Oligonukleotide	22
2.7 Puffer und Lösungen	22
2.8 Verbrauchsmaterialien	23
2.9 Zelllinien	24
3 Methoden	25
3.1 Molekularbiologische Methoden	25
3.1.1 Aufschluss der Zellen zwecks mRNA-Isolierung	25
3.1.2 Isolierung und Aufreinigung von mRNA	25
3.1.3 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	26
3.1.4 Synthese von cDNA aus mRNA	26
3.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion	26
3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese	27
3.1.7 Extraktion der DNA aus Agarosegelen	28
3.1.8 DNA-Sequenzierung	28
3.2 Proteinbiochemische Methoden	29
3.2.1 Herstellung von Zellysaten	29
3.2.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	29
3.2.3 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30

3.2.4	Westernblot	31
3.2.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	31
3.3	Zellbiologische Methoden.....	32
3.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	32
3.3.2	Zellzählung mit der Neubauerzählkammer	32
3.3.3	Aussaat eukaryotischer Zellen für Experimente	33
3.3.4	Einfrieren, Lagern und Auftauen von Zelllinien	33
3.3.5	Behandlung von Zellen mit einem Induktor der Autophagie/Mitophagie und spezifischen Proteininhibitoren	34
3.3.6	Ernten von Zellen	34
3.3.7	Zellkultur unter Hypoxie.....	35
3.3.8	Durchflusszytometrie	35
3.4	Statistische Methoden	35
3.4.1	Westernblot	35
3.4.2	Durchflusszytometrie	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Expression von SIRT4-eGFP und dessen dominant-negativer Mutante SIRT4(H161Y)-eGFP in stabil transfizierten HEK293-Zellen	37
4.2	Aktivierung von HIF-1 α durch die CoCl ₂ -vermittelte Pseudohypoxie.....	39
4.3	Einfluss einer erhöhten Expression von SIRT4 und SIRT4(H161Y) auf die CoCl ₂ -induzierte Autophagie.....	44
4.3.1	Die ektopische Expression von SIRT4(H161Y) inhibiert den Anstieg von LC3B- II unter Pseudohypoxie.....	44
4.3.2	Der verringerte LC3B-II-Anstieg in SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen ist nicht bedingt durch erhöhte HDAC6-Proteinmengen	47
4.3.3	Der fehlende LC3B-II-Anstieg in SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierenden Zellen nach CoCl ₂ -Behandlung ist nicht bedingt durch erhöhte OPA1-L- Proteinmengen.....	51
4.4	BafA1 hat keinen Einfluss auf die LC3B-II-Proteinmengen in SIRT4(H161Y)- exprimierenden Zellen nach Behandlung mit CoCl ₂	55
4.5	SIRT4(H161Y) stabilisiert die auf die frühe Autophagie inhibitorisch wirkenden Phosphorylierungen von ULK1 an Serin 758 und 638	57
4.6	Die Expression von SIRT4 und SIRT4(H161Y) stabilisiert OPA1-L ebenfalls unter klassisch hypoxischen Bedingungen (1 % O ₂)	62
5	Diskussion	64
5.1	Zusammenfassung.....	64
5.2	Die Rolle von SIRT4 in der Autophagieregulation	65
5.3	CoCl ₂ -induzierte Pseudohypoxie als Modell der Hypoxie	67
5.4	Die Inhibition des LC3B-II-Anstiegs durch SIRT4(H161Y) in der CoCl ₂ -induzierten Autophagie ist unabhängig von HDAC6 und OPA1 und lässt sich nicht durch BafA1-Behandlung aufheben	68
5.5	SIRT4(H161Y) scheint über Stabilisierung von ULK1 pS758 und pS638 die Autophagie zu inhibieren	72
5.6	Ausblick	77
5.7	Schlussfolgerung.....	78
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	79

1 Einleitung

1.1 Autophagie

1.1.1 Autophagie und deren Regulation

Der Begriff Autophagie wurde erstmals 1963 von Christian de Duve beschrieben [1, 2]. Autophagie bedeutet, abgeleitet aus dem Griechischen für auto (selbst) und phagie (essen), eine Verdauung von zellulären Bestandteilen [3]. Durch die Autophagie gelangen Organellen und intrazelluläre Bestandteile zum Lysosom, wo sie abgebaut und später zum Teil wiederverwendet werden können [4]. Beispielsweise können Aminosäuren, die durch den Abbau von Proteinen entstehen, zur Energiegewinnung genutzt werden [5]. Die Autophagie ist ein wichtiger Prozess, um die innere Homöostase für die Anpassung an sich ändernde äußere Einflüsse wie Nährstoffmangel sowie zu der Beseitigung von Pathogenen aufrechtzuerhalten [3, 4]. Unter basalen Bedingungen ist die Autophagie gering. Erst unter Stressbedingungen beispielsweise in Form eines Nährstoffmangels, unter Hypoxie sowie bei Infektionen und Entzündungen kommt es zu einem Anstieg der Autophagie [4, 5]. Dahingegen ist sie bei Krebserkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen und Alterungsprozessen supprimiert [4, 5]. Je nach Art der zu degradierenden Stoffe wird differenziert zwischen der allgemeinen Autophagie, bei welcher unselektiv zytoplasmatische Komponenten abgebaut werden und der selektiven Autophagie, bei welcher spezifische Substrate abgebaut werden [6]. Die allgemeine Autophagie erfolgt insbesondere bei einem Nährstoffmangel. Dabei werden Proteine unselektiv abgebaut, um die Zelle mit metabolisch wichtigen Substraten zu versorgen und somit das Überleben der Zelle zu sichern [6, 7]. Die selektive Autophagie hingegen ist zielgerichtet. Es werden auf spezifische Stimuli zum Beispiel lediglich Mitochondrien abgebaut (Mitophagie), oder nur Ribosomen degradiert (Ribophagie). Weiterhin gelten der Abbau von Lipiden (Lipophagie) oder der Abbau von Bakterien und Viren (Xenophagie) als selektive Formen der Autophagie [7]. Die Autophagie wiederum kann differenziert werden in die Mikroautophagie, die Chaperon-vermittelte Autophagie sowie in die Makroautophagie (Abb. 1), welche die am besten erforschte Autophagieform darstellt [7].

Die Makroautophagie wird im Folgenden aus Gründen der besseren Lesbarkeit lediglich als Autophagie bezeichnet. Sie beruht auf der Bildung eines Autophagosoms, einem doppelmembranigen Organell [8]. Zunächst bildet sich dafür eine Isolierungsmembran, welche aus dem endoplasmatischen Retikulum geformt werden kann [8]. Als weitere mögliche Herkunft der Isolierungsmembran werden sowohl die äußere Membran von Mitochondrien bei Nährstoffmangel [9, 10] als auch die Plasmamembran [11] und der Golgi-Apparat [12] diskutiert. Die Isolierungsmembran verlängert und schließt sich, dadurch entsteht das

Autophagosom [13]. Schließlich kommt es zur Fusion der äußeren Autophagosomenmembran mit dem Lysosom. Dieses enthält Enzyme, die für den Abbau der umschlossenen Substanzen sowie der inneren Autophagosomenmembran benötigt werden [5, 14] (Abb. 1).

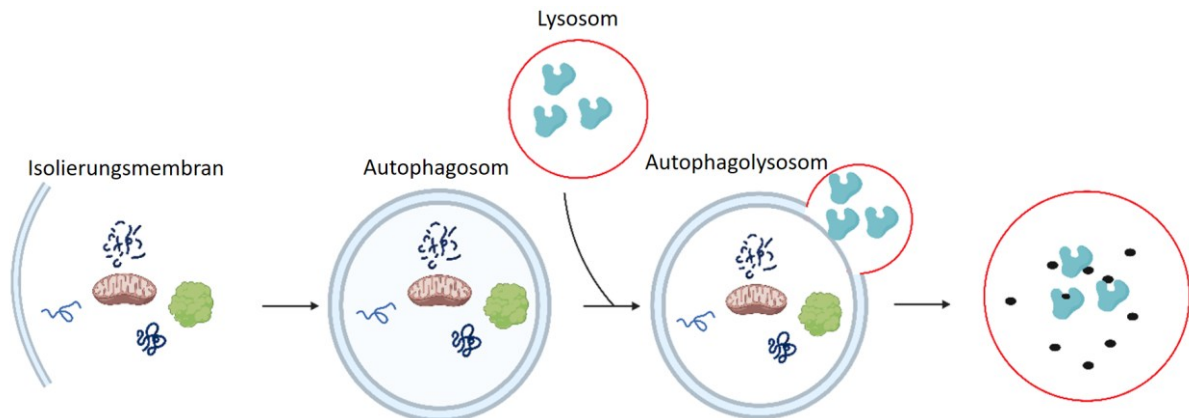


Abb. 1: Darstellung der Makroautophagie.

Schematische Darstellung des Ablaufs der Makroautophagie. Zu degradierende Substanzen werden von der Isolierungsmembran umschlossen. Nach Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom werden die Substanzen durch lysosomale Enzyme degradiert. Die Abbildung wurde mit biorender.com erstellt und modifiziert nach: Okamoto, 2014 [7].

Die Regulation der Autophagie erfolgt durch Proteinkinasen. Ein maßgeblicher Regulator der Autophagie ist *mammalian target of rapamycin complex* (mTORC), eine Serin-Threonin-Kinase, welche bei nährstoffreichen Bedingungen die Autophagie hemmt [15]. Dies geschieht durch die Inhibition von *Unc-51 like autophagy activating kinase 1* (ULK1) durch Phosphorylierung an dessen Serin 757 in murinen Zellen und Serin 758 in humanen Zellen, sowie an Serin 638 [15-20]. Gesteuert wird die Regulation der Autophagie unter anderem durch die Aminosäuren- und Nährstoffverfügbarkeit [21]. Bei Verfügbarkeit von Aminosäuren ist mTORC1 an das Lysosom gebunden, zusammen mit dem *Rat Sarcoma* (Ras)-verwandten Guanosintriphosphat-bindenden Protein (Rag GTPase) und dem Regulatorkomplex [22]. Bei einem Mangel an Aminosäuren dissoziiert mTORC1 vom Lysosom ab, wodurch die mTORC1-vermittelte Inhibition von ULK1 entfällt und die Autophagie initiiert wird [22]. Zusätzliche Faktoren, die die Initiation der Autophagie beeinflussen, sind ein Mangel an Glucose oder Adenosintriphosphat (ATP). Infolgedessen wird die Adenosinmonophosphat-aktivierte-Proteinkinase (AMPK) aktiviert, die intrazelluläres Adenosinmonophosphat (AMP) erkennt. AMPK aktiviert über eine Phosphorylierung der ULK1-Serinpositionen 317, 638 und 777 den ULK1-Komplex, was zur Initiation der Autophagie führt [16, 20, 23]. Diese Aktivierung von ULK1 wird unter hohem Nährstoffangebot durch eine Phosphorylierung an Serin 638 und Serin 758 durch mTORC1 verhindert [20, 23]. AMPK kann die Autophagie ebenfalls indirekt durch die Inhibition von mTOR induzieren. Dies erfolgt über *Tuberous sclerosis complex*

(TSC1/TSC2), welcher *Ras homologue enriched in brain* (Rheb) inhibiert und somit mTORC1 inaktiviert, was wiederum die Autophagie aktiviert [16, 22]. Im Gegensatz dazu hemmt die Aktivierung des Insulinrezeptors durch die Bindung von *Insulin growth factor-1* die Autophagie über die Aktivierung von Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) Klasse I. Letztere aktiviert die Proteinkinase B (AKT). Der TSC1/TSC2-Komplex wird inhibiert, wodurch Rheb und mTORC1 aktiv bleiben und demzufolge die Autophagie hemmen [22, 24, 25]. Pharmakologisch kann über die Inhibition von mTORC1 durch Rapamycin die Autophagie auch unter nährstoffreichen Bedingungen aktiviert werden [17, 26]. Nach der Aktivierung von ULK1 erfolgt die Phosphorylierung der Autophagie regulierenden Protease 13 (ATG13) und *focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa* (FIP200) [17]. Es entsteht ein ULK1-Komplex, bestehend aus ULK1, ATG13, FIP200 und ATG101 [27]. Durch den ULK1-Komplex, welcher an der Isolierungsmembran lokalisiert ist, wird die Autophagie initiiert [28, 29]. Weiterhin wird durch den Nährstoffmangel und den ULK1-Komplex der PI3K-Komplex Klasse III aktiviert, welcher sich aus Beclin-1, *vacuolar protein sorting 15* (Vps15) und Vps34 zusammensetzt. An den PI3K-Komplex der Klasse III können weitere Proteine binden, welche die Autophagie stimulieren – beispielsweise ATG14 [30, 31] und *activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy* (Ambra1) [16]. Der PI3K-Komplex Klasse III bindet über das myristoylierte Vps15 an die Isolierungsmembran. Dadurch kann die Nukleation erfolgen [32] und Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P) gebildet werden [21, 33] (Abb. 2).

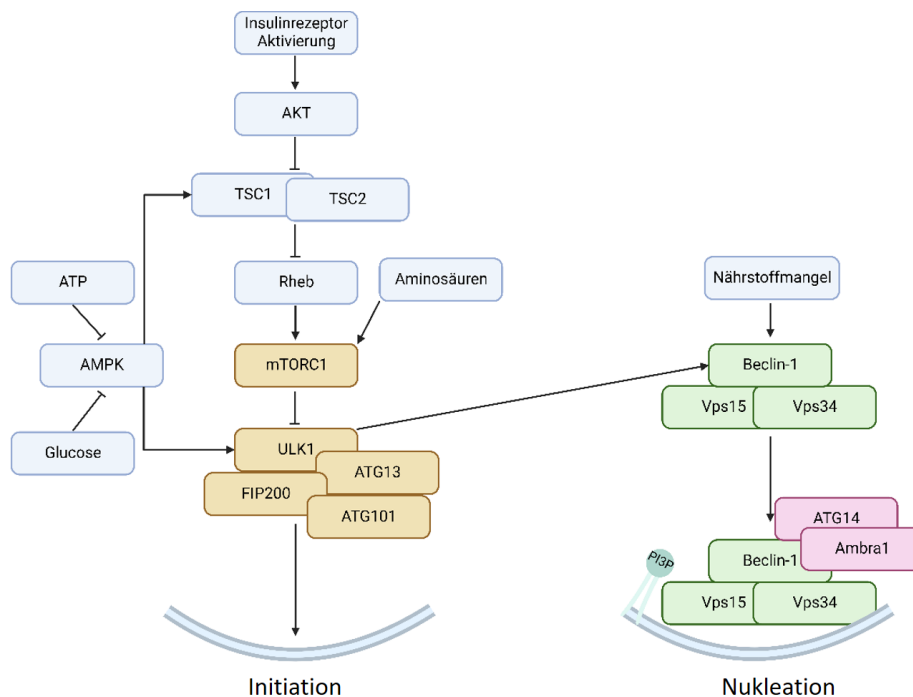


Abb. 2: Initiation der Autophagie und Nukleation der Isolierungsmembran.

Initiation der Autophagie über einen durch die Aktivierung des Insulinrezeptors und der Proteinkinase B (AKT) vermittelten Signalweg. Anschließend folgt die Inhibition von *mammalian target of rapamycin*

complex (mTORC1) und Aktivierung von *Unc-51 like autophagy activating kinase 1* (ULK1). Zudem ist der Prozess der Nukleation dargestellt. Ambr1: *activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy*, ATG: Autophagie regulierende Protease, AMPK: Adenosinmonophosphat-aktivierte-Proteinkinase, ATP: Adenosintriphosphat, FIP200: *focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa*, Rheb: von *Ras homologue enriched in brain*, TSC: *Tuberous sclerosis complex*, Vps: *vacuolar protein sorting*. Die Abbildung wurde mit biorender.com erstellt und modifiziert nach: Zhang, 2015 [21] und Dodson *et al.*, 2013 [16]. Hinsichtlich weiterer Erklärungen wird auf den Text verwiesen.

PI3P ist in großen Mengen in der Isolierungsmembran enthalten und wird von *WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein* (WIPI) erkannt. Letzteres kontrolliert die Lokalisation von ATG9, welches maßgeblich an der Autophagosomenbildung beteiligt ist [21]. WIPI2b rekrutiert ATG16L1 des ATG12–ATG5–ATG16L1-Komplexes [34]. Eine zentrale Rolle spielt zudem ATG2, das Lipide wie Phosphatidylethanolamin (PE) sowie PE-konjugierte Proteine – darunter das Gamma-Aminobuttersäure-Rezeptor-assoziierte Protein *Microtubule-associated protein 1B-light chain 3* (LC3) – transportiert. Dieser Transport erfolgt vom endoplasmatischen Retikulum zum Autophagosom und ist relevant für dessen Elongation [35, 36]. Zudem ist die Bindung von ATG2 an ATG9, welche den Lipidaustausch innerhalb der Doppelmembran des Autophagosoms bewirkt, essenziell für den Lipidtransport [37]. Dieser wird zusätzlich durch die Interaktion von ATG2 mit WIPI4 begünstigt [38, 39].

Für die Ausbildung des Autophagosoms und die Konjugation von LC3 an PE und ATG12 an ATG5 sind zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme von Bedeutung [34, 40]. Der ATG12–ATG5–ATG16L1-Komplex ist essenziell für die Verlängerung der Isolierungsmembran. Für dessen Bildung wird zunächst ATG12 – das C-terminal ein Glycin enthält – durch ATG7, ein Enzym mit E1-ähnlicher Funktion, aktiviert. ATG12 wird anschließend auf ATG10 übertragen, welches als E2-ähnliches Enzym wirkt. Zuletzt wird es an ATG5 konjugiert [21, 41, 42]. ATG12–ATG5 bindet an ATG16L1, welches an die Isolierungsmembran bindet [41-43]. Der ATG12–ATG5–ATG16L1-Komplex ist hauptsächlich an der Außenseite der Membran lokalisiert und dissoziiert von der Membran ab, bevor das Autophagosom vollständig gebildet ist [41, 42] (Abb. 3). Im Rahmen des zweiten ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystems wird zunächst das C-terminale Arginin von LC3B durch die Cystein-Protease ATG4 abgespalten, sodass ein Glycinrest am C-terminalen Ende verbleibt. [21, 44, 45]. Das prozessierte LC3B-I entsteht. LC3B-I wird nun durch eine ATP-abhängige Übertragung auf ATG7 konjugiert. Dabei bildet sich ein Thioesterintermediat aus ATG7 und LC3B-I. Das führt dazu, dass LC3B-I nun ein Thioesterintermediat mit dem E2-ähnlichen Enzym ATG3 bilden kann. Schließlich erfolgt eine Konjugation der C-terminalen Carboxylgruppe von LC3B-I an die Aminogruppe des PE durch das E3-ähnliche Enzym ATG12–ATG5–ATG16L1-Komplex. Dadurch entsteht LC3B-II, welches für die Elongation

wodurch die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom ermöglicht wird [21, 48] (Abb. 4). Bafilomycin A1 (BafA1) wird verwendet, um die Autophagie zu inhibieren. Einerseits inhibiert BafA1 die vakuoläre H^+ -ATPase, was zu einem Anstieg des intralysosomalen pH-Werts und damit zu einem verringerten lysosomalen Abbau führt [47, 49]. Andererseits wird die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen inhibiert [47, 50] (Abb. 4). Hierdurch wird die Autophagie inhibiert [47]. Durch Behandlung mit BafA1 erfolgt somit eine Akkumulation von LC3B-II [21].

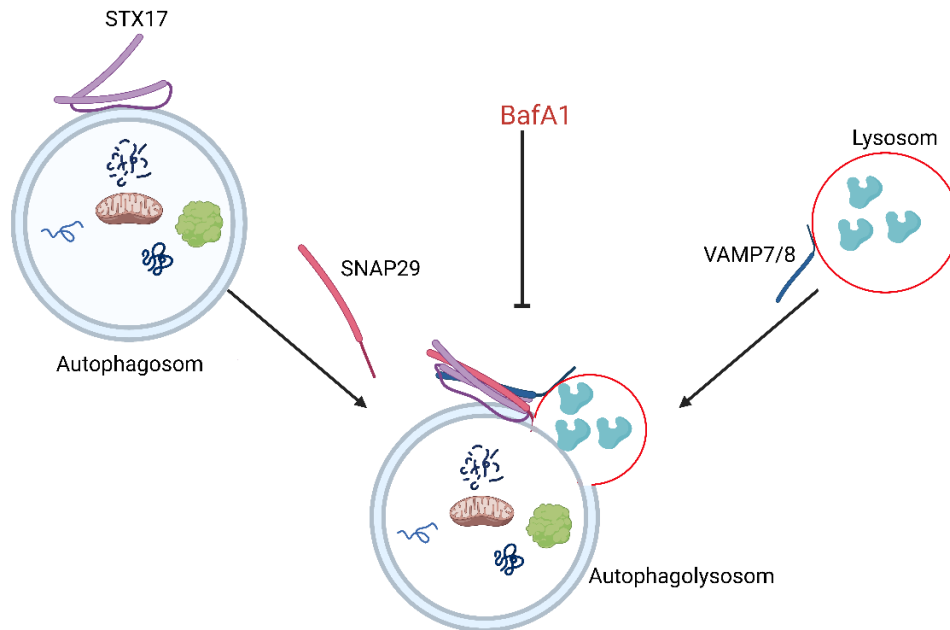


Abb. 4: Fusion von Autophagosom und Lysosom.

Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor protein syntaxin 17 (STX17) bildet gemeinsam mit *synaptosomal-associated protein 29* (SNAP29) einen Komplex, der über das Vesikel-assoziierte Membran Protein (VAMP7/8) die Fusion von Autophagosom und Lysosom vermittelt. Bafilomycin A1 (BafA1) ist ein Inhibitor dieser Fusion. Die Abbildung wurde mit biorender.com erstellt und modifiziert nach: Zhang, 2015 [21]. Hinsichtlich weiterer Erklärungen wird auf den Text verwiesen.

Ein weiterer an der Fusion von Autophagosom und Lysosom beteiligter Faktor ist die Histondeacetylase 6 (HDAC6) [51-53]. HDAC6 fördert die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen durch Deacetylierung und Aktivierung von Cortactin. Cortactin unterstützt die Bildung eines Aktin-Netzwerkes, welches die Fusion von Autophagosom und Lysosom begünstigt. Diese Mechanismen wurden bislang lediglich unter basaler, qualitätskontrollierender Autophagie, nicht jedoch bei Nährstoffmangel, beobachtet [51-53]. Zudem fördert HDAC6 bei Nährstoffmangel die Autophagosomenbildung durch Deacetylierung von LC3B-II [53-55]. Des Weiteren deacetyliert HDAC6 α -Tubulin an Lysin 40, wodurch die Stabilität von Mikrotubuli herabgesetzt wird [53, 56]. Das hingegen inhibiert den Transport vom Autophagosom zum Lysosom und somit auch die Autophagie [53, 56]. Mittels Tubacin kann die Deacetylase-Aktivität von HDAC6 inhibiert werden [54].

1.1.2 LC3B-II als Regulator und Marker der Autophagie

Nach Spaltung von LC3 zu LC3B-I und Konjugation an PE wird LC3B-II in die Isolierungsmembran eingebaut und trägt dementsprechend zur Autophagosomenbildung bei (1.1.1; Abb. 3). Erst nach Fusion mit dem Lysosom folgt der LC3B-II-Abbau. Daher wird LC3B-II, welches mit der Anzahl an Autophagosomen korreliert, als Marker der Autophagie verwendet [57]. Der ATG12–ATG5–ATG16L1-Komplex hingegen dissoziiert bereits vor dem Schließen der Autophagosomenmembran ab [21]. Gemessen wird der *autophagic flux*, welcher den Prozess von der Autophagosomenbildung bis zum Abbau im Lysosom beschreibt [5]. Dabei kann ein Anstieg an detektiertem LC3B-II einen Anstieg an Autophagie und somit die Bildung von Autophagosomen repräsentieren. Ebenfalls kann durch die Inhibition der Fusion von Autophagosom und Lysosom durch BafA1 (Abb. 4) und damit durch die Akkumulation der Autophagosomen ein LC3B-II-Anstieg erfolgen [5, 57]. Eine geringe Menge an LC3B-II kann hingegen durch folgende Faktoren entstehen: eine verringerte Autophagie, eine Hemmung der Autophagie in frühen Phasen vor der LC3B-II-Bildung oder eine schnelle lysosomale Degradierung [5, 57].

1.1.3 Rolle der Autophagie bei Erkrankungen

Der Prozess der Autophagie steht in engem Zusammenhang mit einer Vielzahl von Krankheiten, darunter Tumoren, neurodegenerativen Erkrankungen und Infektionen und spielt zudem eine Rolle im Alterungsprozess. Besonders im hohen Alter und bei neurodegenerativen Erkrankungen kommt es durch eingeschränkte Mitophagie zur Akkumulation von Autophagosomen und defekten Mitochondrien [21]. Bei Tumorerkrankungen kann die Autophagie sowohl als Tumorsuppressor als auch als onkogener Faktor wirken [58-60]. Autophagie wirkt einerseits als Tumorsuppressor, indem sie defekte Organellen entfernt und die Ausbreitung kanzerogener DNA-Mutationen verhindert [34]. Zudem ist TSC1/2, welches mTOR inhibiert und somit die Autophagie positiv reguliert, als Tumorsuppressor bekannt [21]. Im Einklang damit lässt sich bei Mutationen von ATG-Genen eine erhöhte Tumorgenese nachweisen [21, 61]. Andererseits kann die Autophagie in bereits bestehenden Tumoren die Malignität fördern, indem sie das Überleben von Tumorzellen insbesondere unter Stressbedingungen wie Nährstoffmangel oder Chemotherapie unterstützt. Demnach trägt die Autophagie zur Entstehung und Förderung von Therapieresistenzen bei Tumoren bei. [3, 34].

1.2 Mitochondriale Dynamik und Mitophagie

1.2.1 Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien sind intrazelluläre Zellorganellen, die aus einer äußeren und einer inneren Membran bestehen, wobei Letztere die Matrix umschließt [62]. Mitochondrien gelten als die Kraftwerke der Zelle, da sie für die Synthese von ATP bedeutsam sind [63]. Die ATP-Synthese erfolgt dabei hauptsächlich durch den Abbau von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen zu Acetyl-CoA, welches in den Zitratzyklus gelangt. Dort werden die Reduktionsäquivalente Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH/H⁺) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) produziert, die in der oxidativen Phosphorylierung genutzt werden [64]. In diesem Prozess werden Elektronen über vier Komplexe der Atmungskette übertragen, welche in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind. Dadurch gelangen am Ende, unter Verbrauch von O₂, Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum. Dieser aufgebaute Protonengradient wird durch die ATP-Synthase genutzt, um Adenosindiphosphat (ADP) unter Anlagerung eines Phosphatrests zu ATP zu phosphorylieren [64]. Zudem erkennen Mitochondrien den Bedarf an ATP. Steigt dieser Bedarf, steigen folglich auch die mitochondriale Masse und die oxidative Phosphorylierung [64]. Des Weiteren sind Mitochondrien an Harnstoffzyklus, Calcium-Homöostase, β -Oxidation, Häm-Synthese, Regulation der Apoptose und Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt [64-66].

1.2.2 Regulation der mitochondrialen Dynamik durch die GTPase OPA1

Die mitochondriale Dynamik wird durch das Gleichgewicht zwischen Fusion und *Fission* von Mitochondrien geregelt. Durch die Fusion verschmelzen Mitochondrien miteinander und bilden ein mitochondriales Netzwerk [67, 68]. Anhand des Prozesses der Fusion können Mutationen in der mitochondrialen DNA defekter Mitochondrien durch intakte DNA anderer Mitochondrien kompensiert werden. Ein Beispiel dafür ist das Teilen von synthetisierten Proteinen [69-71]. Des Weiteren ist die Toleranz gegenüber toxischem Stress erhöht [70]. Bei der *Fission* spalten sich Mitochondrien vom Netzwerk ab [67, 68]. Einerseits entstehen hierdurch isolierte Mitochondrien, andererseits ist *Fission* wichtig, um den Abbau von beschädigten Mitochondrien zu ermöglichen [70].

Bei der Fusion von Mitochondrien sind die GTPase *Optic atrophy 1* (OPA1) sowie Mitofusin 1 und 2 (MFN1/2) beteiligt [72, 73]. Dabei sind MFN1/2 für die Fusion der äußeren mitochondrialen Membran, in der sie auch lokalisiert sind, zuständig [72, 73]. OPA1 hingegen ist für die Fusion der inneren mitochondrialen Membran verantwortlich [72, 73] (Abb. 5). Dabei ist OPA1 im Intermembranraum lokalisiert und in der inneren mitochondrialen Membran

verankert [74-76]. OPA1 wird bei Entkopplung des Membranpotentials durch die an der inneren mitochondrialen Membran lokalisierte Zink-Metalloprotease *overlapping proteolytic activity with m-AAA protease 1* (OMA1) gespalten. Dabei spaltet OMA1 die lange Form von OPA1 (OPA1-L) in die kurze, inaktive Form (OPA1-S). Die Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten von OPA1-S hemmt die mitochondriale Fusion und fördert die *Fission* [75, 77, 78]. Bei der *Fission* von Mitochondrien sind im Wesentlichen *dynamamin related protein* (Drp1) und *Fission 1* (Fis1) beteiligt. Hierbei wird initial Drp1 aus dem Zytosol zu Fis1, einem Protein der äußeren mitochondrialen Membran, rekrutiert. Die GTPase Drp1 formt schließlich selbst Oligomere und legt sich wie ein Gürtel um einen spezifischen Ort des Mitochondriennetzwerks, um dieses an der Stelle einzuengen. Zudem wird die Einengung durch Aktinfilamente verstärkt, sodass sich Mitochondrien abspalten können [79, 80] (Abb. 5).

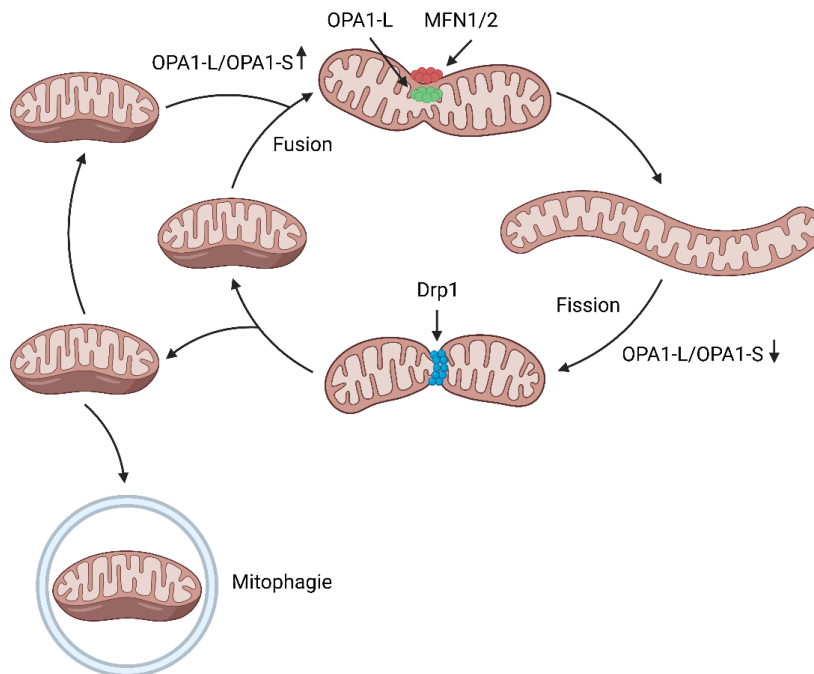


Abb. 5: Fusion und *Fission* von Mitochondrien.

Fusion und *Fission* von Mitochondrien werden durch das Verhältnis von *Optic atrophy 1* (OPA1-L) und OPA1-S, sowie *dynamamin related protein* (Drp1) reguliert. MFN: Mitofusin. Die Abbildung wurde mit biorender.com erstellt und modifiziert nach: Twig und Shirihai, 2011 [81]. Hinsichtlich weiterer Erklärungen wird auf den Text verwiesen.

Bei einem Ungleichgewicht an Fusion und *Fission* kann es zu einer Akkumulation von defekten Mitochondrien durch vermehrte Fusion kommen [82, 83]. Beispielsweise ist dies sowohl in seneszenten Zellen [82] als auch im Alterungsprozess zu beobachten [83]. Zudem wurde gezeigt, dass OPA1 und die mitochondriale Fusion mit vermehrtem Tumorwachstum, Metastasierung und Angiogenese assoziiert sind. Mittlerweile wurde der OPA1-Inhibitor N-(1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-3-methyl-1-phenyl-1H-imidazol-5-ylmethanamin (MYLS22) entwickelt, welcher möglicherweise in der Krebstherapie eingesetzt werden kann [84, 85].

1.2.3 Formen und Regulation der Mitophagie

Bei der Mitophagie handelt es sich um eine selektive Form der Autophagie, bei welcher Mitochondrien abgebaut werden [86]. Die Mitophagie wird durch *Fission* (1.2.2) von Mitochondrien begünstigt, da dysfunktionale Mitochondrien vom Mitochondriennetzwerk abgespalten werden. Dieser Prozess ist bedeutsam für die mitochondriale Qualitätskontrolle [21, 87, 88]. Mitophagie kann durch mitochondriale Schäden, Inhibition der Atmungskette und mitochondriale Depolarisation induziert werden [16, 81]. Differenziert wird zwischen der rezeptor-abhängigen Mitophagie und der ubiquitin-abhängigen Mitophagie [89, 90] (Abb. 6).

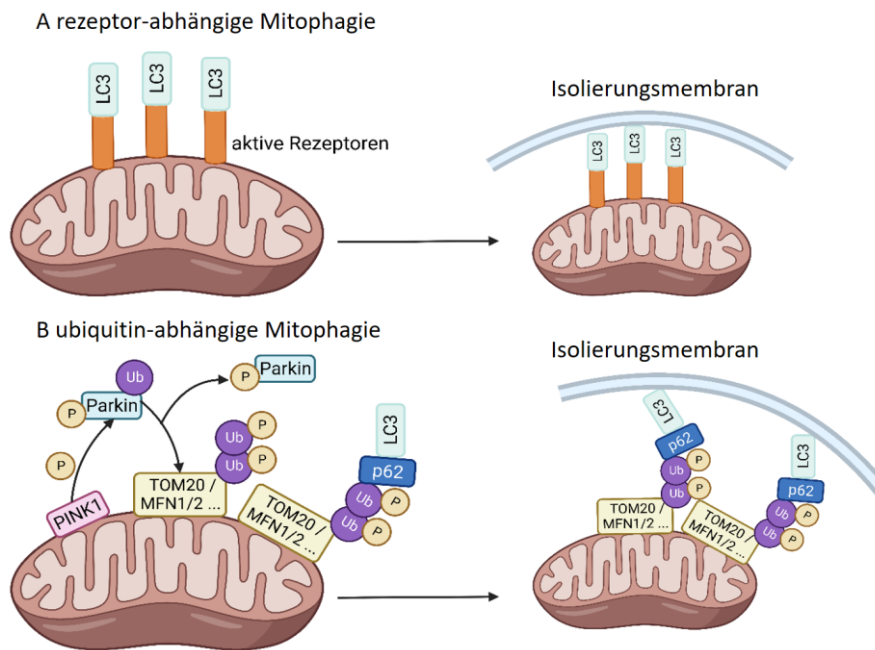


Abb. 6: Formen der Mitophagie.

Darstellung der (A) rezeptor-abhängigen und der (B) ubiquitin(Ub)-abhängigen Mitophagie. LC3: *Microtubule-associated protein 1B-light chain 3*, MFN: Mitofusin, P: Phosphat, p62: p62/*Sequestosome-1*, PINK: *Phosphatase and Tensin homolog (PTEN)-induced kinase 1*, TOM: Translokase der äußeren Membran. Die Abbildung wurde mit biorender.com erstellt und modifiziert nach: Tan *et al.*, 2016 [89] und Zhang, 2015 [21]. Hinsichtlich weiterer Erklärungen wird auf den Text verwiesen.

Bei der rezeptor-abhängigen Mitophagie kommt es durch zellulären Stress und Depolarisation der mitochondrialen Membran zu einer Akkumulation von Mitophagierezeptoren an der äußeren mitochondrialen Membran [21, 89, 90]. Die Rezeptoren binden spezifisch an LC3, welches die Formation der Isolierungsmembran um das Mitochondrium fördert. Dies geschieht hauptsächlich über *NIP3-like protein X*-Rezeptoren, welche an der äußeren Membran exprimiert werden und Homodimere bilden sowie über *FUN14 domain-containing protein 1*-Rezeptoren, welche dephosphoryliert werden [21, 89, 90]. Dabei findet die Interaktion der Rezeptoren mit LC3 und die dadurch induzierte Mitophagie insbesondere unter hypoxischen Bedingungen statt [91, 92] (Abb. 6A).

Bei der ubiquitin-abhängigen Mitophagie wird in depolarisierten Mitochondrien *presenilin associated rhomboid-like protease* inaktiviert und somit *Phosphatase and Tensin homolog (PTEN)-induced kinase 1* (PINK1) nicht mehr degradiert. PINK1 akkumuliert in der äußeren mitochondrialen Membran [21, 89, 90]. Es wird stabilisiert und rekrutiert Parkin – eine E3-Ubiquitin-Ligase, die im Zytosol lokalisiert ist – zur äußeren Membran [21, 89, 90, 93]. Zudem phosphoryliert PINK1 Ubiquitin und Parkin. Dies hat den Zweck, die Aktivität der E3-Ubiquitin-Ligase sowie die Formation von Parkin-Ubiquitin-Thioesterintermediaten zu verstärken [89, 90, 94, 95]. Parkin ubiquitiniert bestimmte äußere mitochondriale Membranproteine wie MFN1/2 oder die Translokase der äußeren Membran 20 (TOM20). Diese werden von p62/*Sequestosome-1* erkannt und über Bindung an LC3B-II in das Autophagosom eingebunden [21, 96, 97] (Abb. 6B).

Für den Abbau von Mitochondrien können diese über Mikrotubuli zu den Autophagosomen transportiert werden [53, 98]. Die Inhibition von HDAC6 resultiert in höheren Mengen an acetyliertem K40 α -Tubulin (ac.K40 α -Tubulin), da HDAC6 NAD⁺-abhängig α -Tubulin deacetyliert [98-100]. Dadurch bindet das Motorprotein Kinesin1 besser an Mikrotubuli, sodass der Transport entlang dieser gefördert wird [98, 100]. Daher resultiert eine Inhibition von HDAC6 durch Tubacin in einem verstärkten mitochondrialen Transport [98]. Dabei inhibiert Tubacin ausschließlich die Deacetylase-Aktivität des über zwei katalytische Domänen verfügenden HDAC6 [101].

1.2.4 Induktion der Autophagie/Mitophagie durch CoCl₂-vermittelte Pseudohypoxie oder Hypoxie

Die Induktion der Autophagie und Mitophagie kann durch CoCl₂-vermittelte Pseudohypoxie oder Hypoxie erfolgen [102-105]. Bei geringen Sauerstoffkonzentrationen kommt es zu einer Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF-1 α). HIF-1 α wird unter normoxischen Bedingungen durch Prolylhydroxylasen (PHD) eisen- und sauerstoffabhängig hydroxyliert [106]. Dadurch bindet HIF-1 α an Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor Protein (pVHL). Dies besitzt eine E3-Ubiquitin-Ligase Aktivität und ubiquitiniert HIF-1 α [107]. HIF-1 α wird schließlich durch das Proteasom abgebaut [107]. Unter Hypoxie fehlt Sauerstoff für die Hydroxylierung, sodass HIF-1 α stabilisiert wird. Letzterer gelangt in den Zellkern, dimerisiert mit HIF-1 β und bewirkt durch Bindung an Hypoxie-responsive Elemente (HRE) die Transkription von hypoxieassoziierten Zielgenen [108, 109] (Abb. 7). Zudem verschiebt die Hypoxie das Gleichgewicht von Fusion und *Fission* der Mitochondrien zu einer vermehrten *Fission*. Dies fördert die Mitophagie, um beschädigte Mitochondrien abzubauen [110-112].

CoCl₂ hingegen induziert eine Pseudohypoxie durch die Stabilisierung von HIF-1α unter normoxischen Bedingungen [113-115]. Dadurch, dass das Co²⁺-Ion sehr effizient das Fe²⁺-Ion der PHD ersetzt, können PHD-Enzyme, welche für den sauerstoffabhängigen Abbau von HIF-1α notwendig sind, HIF-1α nicht mehr hydroxylieren. HIF-1α gelangt in den Zellkern und dimerisiert mit HIF-1β. Diese wirken dann zusammen als Transkriptionsfaktoren [113-115] (Abb. 7). Durch die Pseudohypoxie erfolgt ein Anstieg der rezeptor-abhängigen Mitophagie [104, 105]. Zudem wurde eine Reduktion mitochondrialer Marker wie TOM20 und Cytochrome-c-Oxidase IV sowie eine Zunahme von LC3B-II als Marker für die Autophagosomen beobachtet [104, 105].

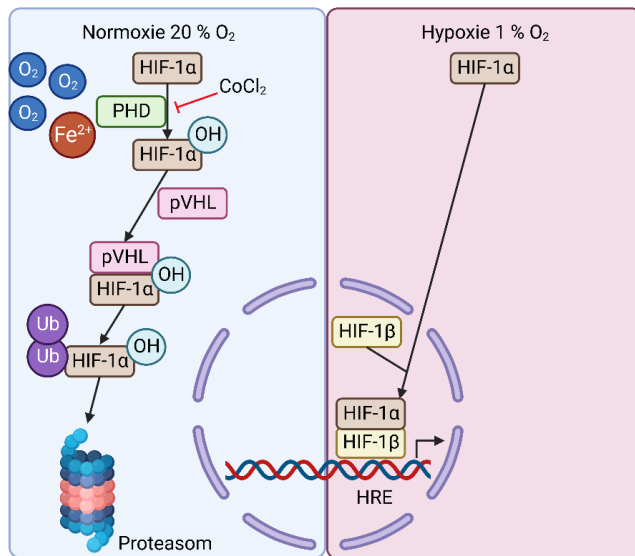


Abb. 7: HIF-1α Signalweg in der Hypoxie.

Aktivierung vom Hypoxie-induzierten Faktor (HIF-1α) durch Hypoxie und CoCl₂-vermittelte Pseudohypoxie. HRE: Hypoxie-responsive Elemente, PHD: Prolylhydroxylasen, pVHL: Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor Protein. Die Abbildung wurde mit biorender.com erstellt und modifiziert nach: Vito *et al.*, 2020 [109]. Hinsichtlich weiterer Erklärungen wird auf den Text verwiesen.

1.3 Mitochondriale Sirtuine

1.3.1 Funktion mitochondrialer Sirtuine

Die mitochondrialen Sirtuine – Sirtuine 3 bis 5 (SIRT3–5) – spielen eine bedeutende Rolle in der metabolischen Kontrolle in Mitochondrien [116]. Die Sirtuine SIRT3–5 sind hauptsächlich in der mitochondrialen Matrix lokalisiert [117, 118]. Sie besitzen eine katalytische Domäne mit einem Histidin, welches als Protonenakzeptor agiert und die enzymatische Aktivität bedingt (Abb. 8). Der N-Terminus der Sirtuine SIRT3–5 enthält eine Signalsequenz für die Translokation in das Mitochondrium und wird beim Import der SIRT-Proteine in die mitochondriale Matrix abgespalten [119-121]. Diese Signalsequenz besteht bei SIRT3 aus 24, bei SIRT4 aus 28 und bei SIRT5 aus 36 Aminosäuren [122].

Sirtuin	N-Terminus	Katalytische Domäne	C-Terminus	Länge (Aminosäuren)	Aktivität
SIRT3	126	248	385	399	Deacetylase, Decrotonylase
SIRT4	45	161	314	314	ADP-Ribosyltransferase, Deacetylase, Deacylase, Lipoamidase
SIRT5	41	158	309	310	Deacetylase, Desuccinylase, Demalonylase, Deglutarylase

Histidin

Abb. 8: Schematische Darstellung der mitochondrialen Sirtuine.

Gezeigt wird die schematische Darstellung der mitochondrialen Sirtuine und ihrer Funktionen. In der katalytischen Domäne, welche vom N- und C-Terminus umgeben ist, befindet sich ein Histidin, welches für die NAD^+ -abhängige Enzymaktivität notwendig ist. Die Abbildung wurde modifiziert nach: Lang, 2017 [123] und Bergmann, 2022 [124]. Hinsichtlich weiterer Erklärungen wird auf den Text verwiesen.

SIRT3 wirkt als NAD^+ -abhängige Deacetylase [125] und stellt die primäre und wichtigste mitochondriale Deacetylase dar. Das resultiert daraus, da sie eine höhere Deacetylierungsaktivität besitzt und mehr mitochondriale Deacetylierungssubstrate als SIRT4 und SIRT5 aufweist [126, 127]. SIRT3 deacetyliert unter anderem die Acetyl-CoA Synthetase 2 im Mitochondrium und aktiviert sie dadurch. Das bewirkt eine Produktion von Acetyl-CoA, welches in den Zitratzyklus gelangen kann [128]. Weiterhin fördert SIRT3 die β -Oxidation [129], aktiviert die Enzyme der Atmungskette [130] sowie die Parkin-Expression und damit die Mitophagie [127, 131]. Zudem entfernt SIRT3 als Decrotonylase Lysin-Acetylierungen von Histonen und reguliert somit die Genexpression [132]. SIRT3 kann zudem die Mikrotubulidynamik beeinflussen [133]. Des Weiteren ist SIRT3 im Nukleus und Zytoplasma nachgewiesen worden [119, 127, 134].

SIRT4 befindet sich in Mitochondrien, wurde aber auch im Zytoplasma – hauptsächlich an den Zentrosomen [99] – sowie im Nukleus nachgewiesen [135]. SIRT4 ist eine ADP-Ribosyltransferase, Lipoamidase, Deacetylase und Deacylase [120, 136, 137]. SIRT4 inhibiert (im Gegensatz zu SIRT3) die Insulin-Sekretion des Pankreas [138], die β -Oxidation [139] sowie – über Inhibition der Glutamatdehydrogenase und der Pyruvatdehydrogenase – den Zitratzyklus [120, 136, 140]. Eine Hochregulation von endogenem SIRT4 geht mit einer Inhibition des mitochondrialen Membranpotentials, erhöhten Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies und mitochondrialer Fusion einher [141]. Zudem wirkt SIRT4 als Tumorsuppressor, indem es den Glutamin-Metabolismus inhibiert und dadurch die Tumorzellproliferation reduziert [140]. Weiterhin inhibiert SIRT4, wahrscheinlich über die HDAC6-vermittelte Regulation des ac.K40 α -Tubulin (1.3.4), die mitotische Zellteilung und

Proliferation [99].

Als enzymatisch inaktive Mutante von SIRT4 wird SIRT4(H161Y) eingesetzt. Bei SIRT4(H161Y) ist das Histidin 161 in der katalytischen Domäne zu einem Tyrosin mutiert, sodass es nicht mehr als Protonenakzeptor fungieren kann [99, 142, 143].

SIRT5 befindet sich ebenfalls im Mitochondrium, ist aber auch im Zytosol und im Nukleus lokalisiert [144]. SIRT5 besitzt eine Deacetylase-, Demalonylase-, Deglutarylase- und Desuccinylase-Aktivität [116, 145]. Durch SIRT5 erfolgt beispielsweise eine Induktion der Glykolyse [146] und des Harnstoffzyklus [116, 147, 148]. Des Weiteren hemmt SIRT5 den Zitratzyklus [149], induziert jedoch die Atmungskette [116, 148, 150].

1.3.2 Die Rolle von SIRT4 in der Regulation von Autophagie und Mitophagie

Bisher ist die Regulation der Autophagie und Mitophagie durch SIRT4 nicht ausreichend erforscht worden. Durch Expression von SIRT4-eGFP erfolgt eine Inhibition der Mitophagie. Dies erfolgt einerseits durch eine Inhibition von Drp1 und damit eine Inhibition der *Fission* von Mitochondrien und andererseits durch die Stabilisierung von OPA1-L. Diese wiederum resultiert in einer erhöhten Fusion und Bildung von Mitochondriennetzwerken [151, 152]. Weiterhin wurde nach Behandlung mit Carbonyl Cyanide Chlorophenylhydrazone (CCCP) eine erhöhte mitochondriale Masse in SIRT4-eGFP-exprimierenden Zellen im Vergleich zu eGFP-exprimierenden Kontrollzellen beobachtet [152]. Das lässt auf einen verminderten Abbau von defekten Mitochondrien schließen [152]. Zudem scheint in SIRT4-exprimierenden Zellen die Parkin-abhängige Mitophagie reduziert zu sein [152]. Die Expression von SIRT4 führt zudem zu einem reduzierten mitochondrialen Membranpotential und damit zu einer Akkumulation von defekten Mitochondrien [141, 143, 152]. Weiterhin interagiert SIRT4 mit dem Leucin-reichen Protein 130 [99, 136, 153], welches mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein (MAP1S) interagiert. MAPs sind Regulatoren der Mikrotubulistabilität [99, 154]. MAP1S fördert dabei die Autophagie [155, 156]. Interessanterweise interagiert SIRT4 mit einem weiteren MAP – MAP1B – welches wiederum an LC3 bindet [157]. Eine Überexpression von MAP1B resultiert dabei in reduzierten LC3B-II-Mengen und reduzierter Autophagie. Hierbei konnte phosphoryliertes MAP1B, assoziiert mit LC3 in Autophagosomen, nachgewiesen werden [158, 159]. Ein weiterer Aspekt ist, dass mTORC1 die Funktion von SIRT4 als Tumorsuppressor inhibieren kann. Dadurch wird der Zitratzyklus vermehrt aktiviert und es kann zu einer erhöhten Proliferation von Zellen und zur Tumorprogression kommen [160]. Dahingegen wird unter nichtkanzerogenen Bedingungen mTORC1 durch SIRT4 bei nährstoffreichen Verhältnissen aktiviert und somit die Autophagie inhibiert [161, 162]. Des

Weiteren kann die erhöhte Expression von SIRT4 AMPK hemmen, sodass diese wiederum mTORC1 nicht phosphorylieren und inhibieren kann [161, 162]. Im Einklang damit wurde ein Abfall an LC3B-II in SIRT4-exprimierenden Zellen beobachtet [161, 162]. Im Gegensatz zu den oberen Befunden zeigten einige Studien, dass SIRT4 für die Autophagosomenbildung notwendig zu sein scheint. SIRT4 kann über AMPK die Autophagie aktivieren [163], aber auch die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen begünstigen [164]. Ebenfalls erfolgt bei Nährstoffmangel durch SIRT4 sowie durch die enzymatisch inaktive Mutante SIRT4(H161Y) eine Runterregulation von PTEN, die über das Insulin-degradierende Enzym (IDE) vermittelt wird. Daraus resultiert letztendlich eine Steigerung der Autophagie [165, 166]. PTEN fungiert als Antagonist des PI3K-Signalwegs und reguliert somit positiv die Autophagie [167].

1.3.3 Interaktion von SIRT4 mit OPA1

Durch eine Co-Immunpräzipitation unbehandelter und mit CCCP-behandelter Zellen wurde die Interaktion von SIRT4 mit sowohl OPA1-L als auch OPA1-S nachgewiesen. Dabei ist die Interaktion von OPA1 mit SIRT4(H161Y) schwächer ausgeprägt als mit SIRT4 [152]. SIRT4 induziert, vermutlich enzymatisch bedingt, die mitochondriale Fusion durch Stabilisierung der langen Form der GTPase OPA1-L. Dadurch werden die mitochondriale *Fission* sowie Mitophagie inhibiert und die mitochondriale Masse nimmt zu [143, 152]. Passend hierzu wurde beobachtet, dass SIRT4 durch die Inhibition der Phosphorylierung von Drp1 und dessen Rekrutierung zur mitochondrialen Membran die mitochondriale *Fission* inhibiert [151, 152].

1.3.4 Interaktion von SIRT4 mit HDAC6

SIRT4 wurde neben der Lokalisation im Mitochondrium auch im Zytosol, hauptsächlich am Zentrosom, nachgewiesen [99]. SIRT4 interagiert mit Mikrotubuli und hat Einfluss auf die Mikrotubulidynamik. Dabei bindet SIRT4 sowohl strukturelle Komponenten des Spindelapparats wie α -Tubulin als auch regulatorische Komponenten von Mikrotubuli wie HDAC6 [99]. Für die Stabilität der Mikrotubuli ist die Acetylierung des α -Tubulins an Lysin 40 (K40) relevant. Durch HDAC6, wie auch durch SIRT2, erfolgt NAD^+ -abhängig eine Deacetylierung, welche in einer heruntergesetzten Stabilität von Mikrotubuli resultiert [99, 168, 169]. Dabei ist die SIRT4-HDAC6-Interaktion mit einer geringeren Menge an ac.K40 α -Tubulin in SIRT4-überexprimierenden Zellen assoziiert. Dies wurde nicht in der enzymatisch inaktiven SIRT4-Mutante – SIRT4(H161Y) – nachgewiesen. Hierdurch lässt sich auf eine enzymatisch-abhängige Regulation durch SIRT4 schließen [99]. Diese Befunde betonen die zusätzliche extramitochondriale Tumorsuppressorfunktion von SIRT4 [99].

1.4 Ziele der Arbeit

Der Einfluss des mitochondrialen Sirtuins SIRT4 auf die Regulation der zellulären Autophagie ist bisher größtenteils unklar. Zu Beginn dieser Arbeit gab es Literaturbefunde, die sowohl eine inhibitorische als auch eine aktivierende Funktion von SIRT4 in der Regulation der Autophagie und Autophagosomenbildung zeigten. In diesem Zusammenhang war die Rolle von SIRT4 in der Hypoxie- oder CoCl₂/(Pseudohypoxie)-induzierten Autophagie jedoch unverstanden. Daher sollte in dieser Arbeit der Einfluss von SIRT4 und seiner enzymatisch inaktiven, potenziell dominant-negativ wirkenden Mutante SIRT4(H161Y) auf die CoCl₂-induzierte Autophagie charakterisiert werden. Die folgenden Fragen sollten beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss haben die Überexpression von SIRT4 und der Mutante SIRT4(H161Y) auf die CoCl₂-induzierte Zunahme von LC3B-II, einem zentralen Protein und Marker der Autophagosomenbildung und des *autophagic flux*?
2. Welche Rolle spielen hierbei die Interaktionen von SIRT4 mit HDAC6 und OPA1 in der Regulation der CoCl₂-induzierten Autophagie? Die Bedeutung von HDAC6 und OPA1 sollte mittels pharmakologischer Inhibition dieser putativen SIRT4-Effektoren untersucht werden.
3. Welchen Einfluss haben SIRT4 und SIRT4(H161Y) auf die frühe, ULK1-regulierte, vs. späte, BafA1-inhibierbare Autophagiephase?

Experimentell wurden neben HEK293 eGFP-Kontrollzellen HEK293-Zelllinien eingesetzt, die SIRT4 oder die enzymatisch inaktive Mutante SIRT4(H161Y) jeweils als C-terminale eGFP-Fusionsproteine stabil exprimieren. Mithilfe der Untersuchungen in dieser Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit SIRT4 eine fördernde oder hemmende Funktion in der Regulation der (Pseudo)hypoxie-induzierten Autophagie einnimmt.

2 Material

2.1 Antibiotika

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Antibiotika

Antibiotikum	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
G418 (Geneticin)	50 mg/ml	400 µg/ml	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	10.000 U Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
Puromycin	10 mg/ml	1,5 µg/ml	InvivoGen, Toulouse, Frankreich

2.2 Antikörper

2.2.1 Primärantikörper

Tabelle 2: Liste verwendeter Primärantikörper

Antikörper, Informationen, Ursprung	Stammkonzentration	Verdünnung	Hersteller	SDS-PAGE
α-acetyliertes α-Tubulin (6-11B-1) sc-23950 mAB, IgG _{2b} Maus	200 µg/ml	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Deutschland	8 %
α-ATG13 SAB4200100 Polyklonaler Antikörper Kaninchen	1,0 mg/ml	1:1.000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	8 %
α-α-Tubulin #11224-1-AP Polyklonaler Antikörper, IgG Kaninchen	400 µg/ml (Nanodrop); 287 µg/ml (Bradford)	1:5.000	Proteintech, Planegg-Martinsried, Deutschland	
α-α-Tubulin [EP1332Y] ab52866 mAB, IgG Kaninchen	648 µg/ml	1:1.000	Abcam, Berlin, Deutschland	
α-β-Actin #66009-1-Ig mAB, IgG _{2b} Maus	427 µg/ml	1:20.000	Proteintech, Planegg-Martinsried, Deutschland	
α-β-Actin sc-47778 mAB, IgG ₁ Maus	200 µg/ml	1:2.000	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Deutschland	
α-FIP200/RB1CC1 A301-574A Polyklonaler Antikörper Kaninchen	1.000 µg/ml	1:1.000	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, Texas	8 %

Material

α -GFP #11841460001 mAB, IgG _{1K} Maus	400 μ g/ml	1:1.000	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland	10 %
α -HDAC6 (D2E5) #7558 mAB, IgG Kaninchen	46 μ g/ml	1:1.000	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland	8 %
α -HIF-1 α (D1S7W) XP #36169 mAb, IgG Kaninchen	100 μ g/ml	1:1.000	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland	10 %
α -LC3B #2775 Polyklonaler Antikörper Kaninchen	52 μ g/ml	1:500	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland	13 %
α -OPA1 #612607 mAb, IgG Maus	250 μ g/ml	1:1.000	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	10 %
α -Phospho-ULK1 (Ser638) (D8K9O) #14205 mAb, IgG Kaninchen	100 μ g/ml	1:1.000	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland	8 %
α -Phospho-ULK1 (Ser757) #6888 Polyklonaler Antikörper Kaninchen	101 μ g/ml	1:1.000	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland	8 %
α -ULK1 (D8H5) #8054 mAb, IgG Kaninchen	313 μ g/ml	1:1.000	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland	8 %

2.2.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3: Liste verwendeter Sekundärantikörper

Antikörper, Informationen, Ursprung	Stamm- konzentration	Verdünnung	Hersteller
IRDye® 680RD <i>Donkey Anti-Mouse</i> #926-68072 Polyklonaler Antikörper, IgG	1,0 mg/ml	1:20.000	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland
IRDye® 800CW <i>Donkey Anti-Rabbit</i> #926-32213 Polyklonaler Antikörper, IgG	1,0 mg/ml	1:20.000	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Zusammenstellung verwendeter Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Acrylamid 30 % Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
antifect® extra	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Bafilomycin A1 (BafA1) #11038	Cayman Chemical, Michigan, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
CHAPS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
cOmplete™ Mini Proteasehemmer-Cocktail	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
1,4-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Desoxynukleosidtriphosphat(dNTP)-Gemisch (10 mM)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>DreamTaq™</i> Buffer (10 X)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>DreamTaq</i> DNA Polymerase (5 U/μL)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l)</i>	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)</i> , ohne Calcium, ohne Magnesium	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol euro <i>denatured</i> 70 %, TechniSolv®	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>GeneRuler Express DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>GeneRuler 1 kb DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>Gibco® fetal bovine serum (FCS)</i>	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>HDGreen Plus</i>	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Hydrogenchlorid (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kobalt (II)-chlorid Hexahydrat (CoCl ₂) ≥98 %, reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Loading-Dye Solution</i> (6 x)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

Material

Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver <i>Blotting Grade</i> , pulverisiert, fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MYLS22 (OPA1 Inhibitor) #HY-136446	MedChemExpress EU - MedChemTronica, Sollentuna, Schweden
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS Pellets)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumpyrophosphat (Na ₄ O ₇ P ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Oligo (dT) Primer (50 µM)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>PageRuler™ prestained Protein ladder</i>	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Phusion™ HF-Puffer (5 x)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Phusion™ <i>High-Fidelity</i> DNA-Polymerase (2 U/µl)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Phusion™ GC-Puffer (5 x)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Polyoxyethylen(20)-sorbitan Monolaurat –Lösung (Tween 20)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid Protease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>Reaction Buffer for RT</i> (5 x)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>RevertAid Reverse Transcriptase</i> (200 U/µL)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Roti®-Nanoquant	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Sterillium® classic pure</i>	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Trypan Blue Dye</i> , 0,4 %	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Trypsin	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
Tubacin #13691	Cayman Chemical, Michigan, USA

2.4 Kits

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Kits

Kit	Hersteller
<i>NucleoSpin® RNA</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
<i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

2.5 Laborgeräte

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage KERN AEJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Autoklav Systec VX150	Systec GmbH, Linden, Deutschland
BD FACSCanto™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Biorad PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
CO ₂ -Inkubator: HERAcell vios 250i	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Druckminderer FC2000 Stickstoff 200 bar/50 bar	Messer Cutting Systems GmbH, Groß Umstadt, Deutschland
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Gefrierschrank Premium NoFrost	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Hämatozytometer-Deckgläser	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Heizbad LAUDA Aqualine AL 12	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Heizblock Stuart Block Heater	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Heizrührer, Magnetrührer IKA COMBIMAG RET	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Hypoxiekammer: HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>INTAS Gel iX Imager</i>	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Intelli-Mixer™	ELMI SIA, Riga, Lettland
Invertiertes Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop	KEYENCE DEUTSCHLAND GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Kühlschrank ProfiLine	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Kryobehälter	KGW-Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk - Schieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kryo-Einfrierbehälter -1 °C	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
LABINCO L28 Test-Tube Rotator	Labinico BV, DG Breda, Niederlande
Labor-pH Meter inoLab® pH 7110	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
LI-COR ODYSSEY® XF	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Mikroskop Zeiss Primovert	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	Siemens AG, München, Deutschland
Milli-Q® EQ 7000 Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Mini-PROTEAN® Comb, 10-well, 1,0 mm, 44 µl</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<i>Mini-PROTEAN® Comb, 15-well, 1,0 mm, 26 µl</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<i>Mini-PROTEAN® Short Plates</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<i>Mini-PROTEAN® Spacer Plates with 1,0 mm Integrated Spacers</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<i>Mini-PROTEAN® Tetra Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Material

NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
neoVortex® Schüttler	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Neubauerzählkammer 0,1 mm Kammertiefe	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sonderheim vor der Rhön, Deutschland
Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage KERN EW	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Research® plus Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rollenmischer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Selbstjustierender Maulschlüssel Joker 6004 L	Wera Werkzeuge GmbH, Wuppertal, Deutschland
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Sterilbankpumpe N811KN.18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
<i>Tecan infinite M200 PRO Reader</i>	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Thermocycler peqStar	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Trans-Blot® Turbo™ Blotting-System</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Ultratiefkühlschrank Thermo Scientific™ Revco™ UxF	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
UV-Transilluminator	NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Deutschland
Wärmeschrank Modell 600	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge, MiniStar silverline	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge: Thermo Scientific™ Heraeus™ Labofuge™ 400 Tischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Zentrifuge: Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

2.6 Oligonukleotide

Tabelle 7: Übersicht verwendeter Oligonukleotide

Nummer	Oligonukleotid	Sequenz 5'–3'
	T7	TAATACGACTCACTATAG
DF7	Oligo dT (18mer)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
DF16	pcDNA3.1 <i>forward</i>	AAATTAATACGACTCACTATAGG
DF17	pcDNA3.1 <i>reverse</i>	AGGCACAGTCGAGGCTG
DF97	5' mGAPDH	GAAGGGCTCATGACCACAGT
DF98	3' mGAPDH	CATTGTCATACCAGGAAATGAGCT
DF510	cYFP1-Not1-RP	GATGCGGCCGCTTACTGCTTGTCGGCCATGATATAGACG

2.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 8: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
APS Lösung	10 % APS
Agarose	0,5–1,5 % Agarose in TAE
Blockierungs-Puffer für Westernblot	3 % BSA in TBS-T 5 % Milchpulver in TBS-T

Material

CHAPS-Lysepuffer	0,3 % CHAPS 50 mM Tris-HCL pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM Na ₃ VO ₄ 10 mM NaF 1 mM EDTA 1 mM EGTA 2,5 mM Na ₄ O ₇ P ₂ 1 μM 1,4-Dithiothreitol 1 x Protease Inhibitor Cocktail
Laemmli-Puffer (5 x)	8 % SDS 20 % β-Mercaptoethanol 40 % Glycerin 250 mM Tris pH 6,8 0,4 % Bromphenolblau
Orange G Ladepuffer (6 x)	30 % Glycerin 50 mM EDTA 0,25 % Orange G
SDS-PAGE Laufpuffer (10 x)	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1 % SDS Pellets
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	500 mM Tris 0,4 % SDS pH 6,8
SDS-PAGE Transferpuffer (1 x)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol 0,01 % SDS
SDS-PAGE Trenngelpuffer	1,5 M Tris 0,4 % SDS pH 8,8
TAE (50 x)	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA
TBS-T (<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween 20)	5 M NaCl 200 mM Tris pH 7,5 0,05 % Tween® 20

Die verwendeten Puffer wurden in destilliertem Wasser angesetzt, außer wenn anders angegeben.

2.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Aluminiumfolie	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
CRYOSPEED®MED	Linde AG, Pullach, Deutschland
Einmalhandschuhe Dermagrip	REMESCO Handelsges.m.b.H, Wien, Österreich
Falcon™ Einweg-Transferpipetten aus Kunststoff	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Glas Pasteur Pipetten	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland

Material

Mikroplatte 96-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Nitrozellulose Blotting Membran Amersham™Protran™ Supportes 0.45 µm NC	Cytiva Europe GmbH, Freiburg im Breisgau, Deutschland
Nunc™ Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
PCR-Tubes 8-Strip 0,2 ml	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1250 µl)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Polystyrene Round-Bottom Tube 5 ml	Corning Privacy Office, Corning, USA
Profiline© Handtuchpapier	Kurt Müller GmbH, Pulheim-Brauweiler, Deutschland
Roti®-PVDF, Porengröße 0,45 µM	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß (1,5 ml, 2 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Stickstoff, verdichtet	Linde AG, Pullach, Deutschland
Whatman™-Papier	Tisch Scientific, Cleves, USA
Zellkulturflasche T-75, Standard	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale 100 mm, Standard	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale 150 mm, Standard	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturtestplatte 6-well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

2.9 Zelllinien

Tabelle 10: Übersicht verwendeter Zelllinien

Zelllinie	Resistenz	Herkunft/Merkmale
HEK293		humane embryonale Nierenzellen DSMZ, Braunschweig, Deutschland ACC 305
HEK293 eGFP	Puromycin	humane embryonale Nierenzellen retroviraler Kontroll-Vektor puc2CL12IP-eGFP [99]
HEK293 SIRT4-eGFP	G418	humane embryonale Nierenzellen pcDNA3.1-SIRT4-eGFP [99]
HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP	G418	humane embryonale Nierenzellen pcDNA3.1-SIRT4(H161Y)-eGFP [99]

Zur Analyse der Funktion des SIRT4 wurden HEK293-Zellen, welche stabil SIRT4-eGFP überexprimieren, verwendet. Des Weiteren wurden HEK293-Zellen verwendet, welche SIRT4(H161Y)-eGFP, eine enzymatisch inaktive Mutante des SIRT4, exprimieren. Das Histidin 161 in der katalytischen Domäne ist hierbei zu einem Tyrosin mutiert, wodurch es nicht mehr als Protonenakzeptor fungieren kann [99, 142, 143]. Als Kontrollzellen wurden eGFP-exprimierende HEK293-Zellen eingesetzt.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Aufschluss der Zellen zwecks mRNA-Isolierung

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurden zunächst die Zellen aufgeschlossen. Dafür erfolgte zuerst die Absaugung des Kulturmediums aus der Zellkulturflasche. Nach dem Waschen der Zellen mit 2 ml PBS^{-/-} wurden die Zellen durch Behandlung mit 1,5 ml Trypsin vereinzelt. Nach Zugabe von 8 ml DMEM-Zellkulturmedium wurden die Zellen für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml PBS^{-/-} gewaschen und erneut für 2 min bei 1.200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, erfolgte der Aufschluss der Zellen durch Resuspendieren des Zellpellets in 350 µl RA1-Puffer des *NucleoSpin*® RNA-Kits und 3,5 µl β-Mercaptoethanol. Anschließend wurde das Zelllysate in einen *NucleoSpin*® Filter für die Isolierung und Aufreinigung der RNA gegeben (3.1.2).

3.1.2 Isolierung und Aufreinigung von mRNA

Für die Isolierung und Aufreinigung der RNA wurde das *NucleoSpin*® RNA-Kit verwendet. Die Lysate wurden durch den *NucleoSpin*® Filter für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert, um die Viskosität zu senken und das Lysat zu isolieren. Anschließend wurden 350 µl 70 % Ethanol hinzugegeben. Das Lysat wurde danach in ein *NucleoSpin*® RNA Column pipettiert, an dessen Membran die mRNA gebunden hat. Nach einer Zentrifugation bei 11.000 rpm für 30 sec wurde der Durchfluss verworfen. Im nächsten Schritt wurde die Silica-Membran durch Zugabe von 350 µl MDB und Zentrifugation bei 11.000 rpm für 1 min entsalzt. Schließlich wurde eine DNase Mischung aus 10 µl rekonstituierter DNase und 90 µl *Reaction Buffer for rDNase* hergestellt. Davon wurden nach dem Mischen 95 µl direkt auf die Silica-Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurden 200 µl RAW2-Puffer hinzugegeben und für 30 sec bei 11.000 rpm zentrifugiert, um die Membran zu waschen. Im zweiten Waschschrift wurde die Membran mit 600 µl RA3-Puffer gewaschen und erneut für 30 sec bei 11.000 rpm zentrifugiert. Im letzten Waschschrift wurden 250 µl RA3-Puffer hinzugegeben und für 2 min bei 11.000 rpm zentrifugiert, um die Membran komplett zu trocknen. Nach jedem Waschschrift wurde der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde in ein Nuklease-freies Sammelrohr gesetzt. Danach wurden 50 µl RNase freies H₂O hinzugegeben und bei 11.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Im Anschluss folgte eine Konzentrationsbestimmung der mRNA (3.1.3).

3.1.3 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentration von gelösten Nukleinsäuren wurde photometrisch über die Messung der optischen Dichte mit dem *NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer* quantifiziert. Dafür wurde eine Wellenlänge von 260 nm verwendet, die dem Absorptionsmaximum von DNA und RNA entspricht [170]. Für die Messung wurde 1 µl der in ddH₂O gelösten Proben aufgetragen. Die gemessene Konzentration der RNA wurde verwendet, um 2 µg der mRNA für die Synthese der cDNA zu verwenden (3.1.4).

3.1.4 Synthese von cDNA aus mRNA

Für die Synthese der cDNA aus mRNA wurden zunächst 2 µg der mRNA mit 1 µl Oligo (dT) Primern gemischt und mit H₂O auf 13 µl aufgefüllt. Die Oligo (dT) Primer hybridisieren an den Polyadenylschwanz der mRNA. Das gewährleistet, dass die gesamte mRNA als Matrize für die Synthese des Erststrangs dient [171]. Das Gemisch wurde zur Denaturierung der Sekundärstruktur für 5 min bei 70 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Im nächsten Schritt wurden 4 µl 5 x RT-Puffer, 2 µl dNTPs und 1 µl reverse Transkriptase (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche mRNA in cDNA umschreibt) hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Erhitzung auf 42 °C für 1 h. Währenddessen erfolgte die Synthese des Erststrangs. Durch ein 10-minütiges Erhitzen auf 72 °C kam es zu einer Inaktivierung der reversen Transkriptase. Im nächsten Schritt wurde die cDNA mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt (3.1.5).

3.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Vervielfältigung von DNA-Basenabfolgen wurde die PCR durchgeführt [172]. Dabei wurden in jedem Zyklus jeweils drei Reaktionsschritte durchlaufen. Im ersten Schritt wurde die DNA durch Erhitzen auf 98 °C denaturiert. Durch das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen entstanden DNA-Einzelstränge. Diese waren für den nächsten Schritt der Hybridisierung der Primer notwendig. Für die Bindung der Primer wurde die Temperatur auf 55–60 °C runtergekühlt. Dies erfolgte in Abhängigkeit von der Länge und Sequenz der Primer. Im letzten Schritt wurde das Gemisch auf 72 °C, dem Temperaturoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase, erhitzt, wodurch eine Amplifikation der Einzelstränge erfolgte. Die Einzelstränge wurden ausgehend vom 3' Ende des Primers mit den freien hinzugegebenen Nukleotiden durch die DNA-Polymerase aufgefüllt. Dieser Zyklus wurde 30-mal wiederholt. Vor dem ersten Zyklus erfolgte die initiale Denaturierung, damit sowohl DNA als auch Primer vollständig als Einzelstrang vorlagen. Durch die PCR kam es somit zu

einer Vervielfältigung der gewünschten DNA-Basenabfolge. Des Weiteren wurde zur Qualitätskontrolle der hergestellten cDNAs eine PCR von GAPDH durchgeführt. Die PCR der pcDNA3.1-SIRT4-eGFP und pcDNA3.1-SIRT4(H161Y)-eGFP-Konstrukte erfolgte zwecks Sequenzierung. Die PCR-Ansätze wurden wie folgt angesetzt:

<u>GAPDH PCR</u>	<u>PCR pcDNA3.1-SIRT4-eGFP oder pcDNA3.1-SIRT4(H161Y)-eGFP</u>
1 µl cDNA	1 µl cDNA
5 µl 10 x <i>DreamTaq</i> TM Puffer	10 µl GC oder HF Puffer
4 µl MgCl ₂	2,5 µl <i>forward</i> Primer (10 pmol/µl) DF16
2,5 µl <i>forward</i> Primer (10 pmol/µl) DF97	2,5 µl <i>reverse</i> Primer (10 pmol/µl) DF17/DF510
2,5 µl <i>reverse</i> Primer (10 pmol/µl) DF98	1 µl dNTPs (10 mM)
1 µl dNTPs (10mM)	0,5 µl <i>Phusion</i> Polymerase
0,2 µl <i>DreamTaq</i> Polymerase	32,5 µl ddH ₂ O
19,3 µl ddH ₂ O	

Anschließend wurde folgendes PCR-Programm für jeweils 30 Zyklen durchgeführt:

	<u>GAPDH PCR</u>	<u>PCR</u>	
Initiale Denaturierung	5 min 98 °C	30 sec 98 °C	
Denaturierung	30 sec 95 °C	10 sec 98 °C	
Hybridisierung	30 sec 55 °C	15 sec 60 °C	30 Zyklen
Elongation	30 sec 72 °C	45 sec 72 °C	
Finale Elongation	5 min 72 °C	5 min 72 °C	
Aufbewahrung	4 °C	4 °C	

Für die finale Elongation schloss sich an den letzten Zyklus eine 5-minütige Erhitzung auf 72 °C an. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt.

3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Eine Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mit der Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurde 1,5 %ige Agarose hergestellt, indem 4,5 g Agarosepulver in 300 ml TAE-Puffer (1 x) aufgekocht wurden [173]. Die Agarose wurde in horizontale Gelelektrophoresekammern gegossen. 0,001 % *HDGreen Plus*, welches für die Detektion von DNA/RNA unter UV-Licht notwendig ist, wurde hinzugegeben. Zur Ausbildung von Geltaschen wurde ein Gelkamm in die Agarose gesteckt. Nachdem das Agarosegel ausgehärtet war, wurde TAE-Puffer in die Gelkammer gegossen und der Gelkamm entfernt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Dieser ermöglicht die Zuordnung der aufgetrennten DNA-Fragmente zu definierten Längen in

Basenpaaren (bp). Den zu analysierenden Proben wurde *Orange G Ladepuffer* hinzugegeben, dann wurden sie ebenfalls in die Geltaschen gegeben. Durch die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte eine Trennung der Fragmente nach Größe bei einer konstanten Spannung von 120 V für circa 45 min. Anschließend wurde die Auftrennung der DNA-Fragmente mit dem *INTAS Gel iX Imager* detektiert.

3.1.7 Extraktion der DNA aus Agarosegelen

Mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.1.6) erfolgte eine Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe. Aufgrund der Zugabe von *HDGreen Plus* zur Agarose sind die Banden durch die Anregung mittels UV-Licht durch den *UV-Transilluminator* sichtbar geworden. Zur weiteren Verarbeitung wurde das gewünschte Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Anschließend wurde zur Extraktion der DNA das *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*-Kit verwendet. Das Gelfragment wurde gewogen. Pro 100 mg Agarosegel wurden 200 µl NTI-Puffer hinzugegeben. Das Gel wurde für 5–10 min auf 50 °C erhitzt und alle 2–3 min gemischt, bis es geschmolzen war. 700 µl des geschmolzenen Gels wurden dann in ein *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column* gegeben, um die DNA zu binden. Nach einer Zentrifugation von 30 sec bei 11.000 rpm wurde der Durchfluss verworfen und anschließend 700 µl NT3-Puffer zum Waschen der Silica-Membran hinzugegeben. Es erfolgte eine erneute zweimalige Zentrifugation für 30 sec bei 11.000 rpm zum Waschen der Membran. Zum Trocknen der Silica-Membran wurde eine Zentrifugation bei 11.000 rpm für 1 min durchgeführt. Als nächstes wurde das *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column* in ein neues 1,5 ml Röhrchen gesetzt. Es erfolgte die Zugabe von 15–30 µl NE-Puffer, wonach eine Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur erfolgte. Anschließend wurde für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert, um die DNA zu eluieren.

3.1.8 DNA-Sequenzierung

Von der bei der Gelextraktion (3.1.7) gewonnenen cDNA wurde zunächst die Konzentration mithilfe des *NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer* bestimmt. Das war notwendig, da je nach Basenpaaren der zu analysierenden Sequenz eine bestimmte Konzentration – hier 12–70 ng/µl – für die Sequenzierung benötigt wurde. Insgesamt wurden 12 µl der DNA-Matrizenlösung und 3 µl der Sequenzier-Primerlösung an die Firma *Microsynth Seqlab* (Microsynth Seqlab, Göttingen, Deutschland) geschickt. Diese hat die DNA-Sequenzierung zur Bestimmung der Basenabfolge der aus dem Gel extrahierten cDNA, durchgeführt. Dabei wurde der firmeneigene Primer T7 verwendet. Zur Analyse wurde das Programm *Clustal Omega*

(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) verwendet.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden zunächst die adhärenenten HEK293-Zelllinien geerntet. Dafür wurden sie mithilfe einer Pipette vorsichtig mittels des vorhandenen Mediums von der Zellkulturplatte abgelöst. Die Zellen wurden dann mit dem Medium in ein Falcon-Reaktionsgefäß überführt, auf Eis gestellt und 5 min lang bei 1.200 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt. Das verbleibende Zellpellet wurde dann in CHAPS-Lysepuffer resuspendiert, wodurch die Zellen lysiert wurden. Je nach Größe der Zellpellets wurden unterschiedliche Mengen an CHAPS-Lysepuffer hinzugegeben. Die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen wurde die Suspension gemischt und für 10 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Das Zelllysate wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Zelldebris verworfen. Anschließend wurde das Zelllysate zur Proteinbestimmung (3.1.3) verwendet und ein Teil davon für Westernblot-Analysen (3.2.2) mit Laemmli-Puffer versetzt. Das Zelllysate wurde zur weiteren Lagerung bei -20 °C eingefroren.

3.2.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Test durchgeführt [174]. Dieser beruht auf einer photometrischen Messung, das heißt der Änderung des Absorptionsmaximums des in der *ROTI®Nanoquant* Lösung enthaltenen Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue-G250*. Zuerst wurden in eine 96-well-Platte jeweils 10 µl BSA-Standardlösungen von 0, 100, 200, 300, 400, 500 und 600 µg/ml gegeben. Diese dienten zur Erstellung einer Standardkurve. Anschließend wurden 2 µl der zu analysierenden Zelllysate in 58 µl PBS gegeben. Jeweils 10 µl dieses Gemischs wurden auf die 96-well-Platte pipettiert. Schließlich wurden 200 µl der 1:5 in ddH₂O verdünnten *ROTI®Nanoquant*-Lösung zu jedem well hinzugegeben. Daraufhin folgte eine 7-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Während dieser bindet der Farbstoff an das Protein, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 470 nm (ungebundener Zustand) auf 595 nm (proteingebundener Zustand) verschiebt. Im ungebundenen Zustand erscheint der Farbstoff rot und im gebundenen Zustand blau [174]. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums wurde durch die Messung der optischen Dichte mit dem *Tecan infinite M200 PRO Reader* analysiert. Die Proben wurden zunächst für 4 sec geschüttelt und dann bei 450 nm und 595 nm gemessen. Da die Proben als Duplikate aufgetragen wurden, wurde zunächst der Mittelwert der Messwerte bestimmt. Anschließend erfolgte die Berechnung des

Quotienten aus den optischen Dichten von 595 nm und 450 nm. Aus den berechneten Werten der BSA-Standardproben wurde eine Eichgrade erstellt, deren Steigung und Y-Achsenabschnitt zur Berechnung der Proteinkonzentrationen verwendet wurden. Die Berechnung erfolgte mithilfe des Programmes *Microsoft Excel 2016*.

3.2.3 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, einem diskontinuierlichen System, wurden die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zur Verhinderung des Auslaufens des Gels wurde zunächst ein 0,5 %iger Agarosefuß gegossen. Anschließend wurden die Gele vorbereitet. Für die Auftrennung größerer Proteine wurden niedrigprozentige, für kleinere Proteine hingegen höherprozentige Gele verwendet. Dies ermöglichte eine optimale Auftrennung der Proteine im Bereich der zu analysierenden Molekülgröße [175]. Die Gele wurden wie folgt vorbereitet:

	Trenngel für 2 Gele				Sammelgel für 2 Gele
	8 %	10 %	13 %	15 %	5 %
Prozentualität	8 %	10 %	13 %	15 %	5 %
ddH ₂ O	9,2 ml	8,0 ml	6,0 ml	4,6 ml	3,4 ml
Acrylamid (30 %)	5,4 ml	6,6 ml	8,6 ml	10 ml	1 ml
Trenngel-Puffer	5,2 ml	5,2 ml	5,2 ml	5,2 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	-	-	-	1,5 ml
APS (10 %)	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	60 µl
TEMED	12 µl	8 µl	8 µl	8 µl	6 µl

Als Erstes wurde das circa 6 cm hohe Trenngel zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Unmittelbar danach wurden circa vier Tropfen Isopropanol auf das Gel aufgetragen, um Luftblasen zu entfernen und einen scharfen Übergang zwischen Trenngel und Sammelgel zu gewährleisten. Nach dem Aushärten des Gels wurde das Isopropanol abgegossen und die Überreste wurden mit *Whatman*TM-Papier entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. In das Sammelgel wurde ein 1,0 mm breiter Gelkamm für die Ausbildung der Geltaschen eingesetzt. Die Gele wurden in die Gelelektrophoresekammer gestellt, welche mit Laufpuffer aufgefüllt wurde. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde in die erste Geltasche der Proteingrößenstandard *PageRuler*TM *Prestained Protein Ladder* aufgetragen. In die weiteren Geltaschen wurden 75 µg der mit Laemmli-Puffer versetzten Proben pipettiert. Diese wurden zuvor, nach der Proteinbestimmung nach Bradford (3.2.2), mit Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Ziel war es, Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen und Proteine in ihre Primärstruktur zu überführen. Zusätzlich bewirkte der

Laemmli-Puffer die Spaltung von Disulfidbrücken. Nach Beladung der Gele mit den Proben wurde die Kammer geschlossen und an das *Biorad PowerPac™ HC* angeschlossen. Bei einer konstanten Spannung von 90 Volt migrierten die Proteine größenabhängig in Richtung der Anode und wurden entsprechend aufgetrennt. Nach 90–120 min erreichte die Laufmittelfront die Agarose und die Spannung wurde abgeschaltet. Danach wurden die Gele entnommen und für den Westernblot vorbereitet.

3.2.4 Westernblot

Nachdem die Proteine durch die Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurden, erfolgte der Westernblot, um die Proteine auf eine Membran zu übertragen und anschließend mit Antikörpern sichtbar zu machen [176]. Zuerst wurde dafür das Gel aus der Gelelektrophoresekammer entfernt, danach folgte die Entfernung des Sammelgels und der Agarose. Angewendet wurde im Folgenden der *Semi-Dry Blot*. Hierfür wurden die Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen sowie das *Whatman™*-Papier zurechtgeschnitten. Die Membranen und das *Whatman™*-Papier wurden in Transferpuffer eingelegt, wobei die PVDF-Membran zuvor für 2 min in Methanol aktiviert wurde. Für den *Semi-Dry Blot* wurden als Erstes vier *Whatman™*-Papiere und eine Membran in die Transferkammer gelegt. Das Gel wurde auf die Membran aufgelegt und anschließend vorsichtig überrollt, um Luftblasen vollständig zu entfernen. Auf das Gel wurden erneut vier *Whatman™*-Papiere gelegt. Nach dem Schließen der Transferkammer wurde diese in das *Trans-Blot® Turbo™ Blotting*-System eingesetzt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte bei 20 V und 1 A über 60 min. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte das Blockieren der Membran über Nacht bei 4 °C in 5 ml 3 % BSA. Dies hatte den Grund, unspezifische Proteinbindungsstellen der Antikörper zu blockieren [176]. Zur Analyse der Antikörper α -ATG13, α -FIP200, α -Phospho-ULK1 (Ser638), α -Phospho-ULK1 (Ser758) und α -ULK1 erfolgte das Blockieren der Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5 ml 5 % Trockenmilchpulver, welches in TBS-T gelöst wurde. Bei dieser Blockierungsmethode erfolgten vor und nach dem Blockieren der Membran jeweils drei Waschschrte der Membran mit 5 ml TBS-T.

3.2.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurde die Membran mit einem primären und in 5 ml TBS-T verdünnten Antikörper inkubiert, welcher spezifisch das zu analysierende Protein erkennt und bindet. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Membran entnommen und drei Mal für 5 min mit 5 ml TBS-T

gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper abzulösen. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden dem primären Antikörperbad 50 µl NaN₃ zugesetzt, sodass es bei 4 °C gelagert und mehrfach verwendet werden konnte. Schließlich wurde die Membran für 1 ½ h lichtgeschützt und unter Rotation mit dem in 5 ml TBS-T verdünnten fluoreszierenden Sekundärantikörper inkubiert. Dieser bindet an den primären Antikörper. Nach erneutem dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit 5 ml TBS-T erfolgte die Detektion der fluoreszierenden Sekundärantikörper. Die Messung wurde mit dem *LI-COR ODYSSEY® XF* durchgeführt. Dabei wurde je nach verwendetem Sekundärantikörper bei einer Wellenlänge von 700 nm oder 800 nm gemessen.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die eukaryotischen HEK293-Zelllinien wurden in T-75 Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem *HERAcell vios 250i* Inkubator kultiviert. Jeden dritten bis vierten Tag wurden die Zellen bei einer Konfluenz von circa 80–90 % passagiert. Für das Passagieren wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 2 ml PBS^{-/-} gewaschen. Anschließend wurde das PBS^{-/-} abgesaugt. Zum Ablösen von der Oberfläche und zum Vereinzeln wurden die Zellen für 6 min in 1,5 ml Trypsin in einem *HERAcell vios 250i* Inkubator inkubiert. Das Trypsin wurde neutralisiert, indem circa 7 ml des DMEM-Zellkulturmediums hinzugegeben wurden. Im Anschluss wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 *gesplittet*. Dafür wurde ein Teil des zellhaltigen Mediums abgesaugt oder zum Ansetzen von Experimenten in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Zu den in der Zellkulturflasche verbliebenen Zellen wurden 13 ml frisches Medium hinzugegeben. Zuletzt wurden zu den stabil-transfizierten Zelllinien zur Nachselektion 1,5 µg/ml Puromycin oder 400 µg/ml G418 hinzugegeben, je nach Antibiotikaresistenz (2.9).

3.3.2 Zellzählung mit der Neubauerzählkammer

Zum Ansetzen der Experimente erfolgte die Zellzählung mittels Neubauerzählkammer, um definierte Zellmengen auf Zellkulturplatten auszubringen. Hierfür wurde die Neubauerzählkammer mit 70 % Ethanol gesäubert und anschließend das Hämatozytometer-Deckglas draufgeschoben. Dieses hatte die richtige Position, wenn auf den Stegen Newton'sche Ringe sichtbar wurden. 20 µl Zellen-enthaltendes Medium wurden mit 20 µl Trypanblau gemischt. Von diesem Gemisch wurden dann 10 µl auf die Neubauerzählkammer aufgetragen. Anschließend wurden die Zellen in den Kästchen der

Neubauerzählkammer ausgezählt, inklusive der Zellen an der oberen und rechten Begrenzung von drei der vier Quadranten. Gezählt wurden nur weiße, lebendige Zellen. Durch Trypanblau angefärbte, tote Zellen hingegen haben keine intakte Membran, welche Trypanblau hinaus transportiert und erscheinen durch die Akkumulation von Trypanblau im Zellinneren blau [177]. Nach dem Zählen der lebendigen Zellen erfolgte eine Berechnung der Zellzahl. Hierzu wurde zuerst der Quotient aus allen drei Quadranten gebildet und mit dem Faktor zwei, dem Verdünnungsfaktor mit Trypanblau, multipliziert. Dadurch ergab sich die Zellzahl pro ml. Diese wurde benötigt, um eine genaue Zellzahl auf den Zellkulturplatten für Experimente auszubringen (3.3.3).

3.3.3 Aussaat eukaryotischer Zellen für Experimente

Für die Durchführung von Experimenten wurden die Zellen auf Zellkulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden zunächst mit Hilfe der Neubauerzählkammer gezählt (3.3.2). Anschließend wurde eine gleiche Anzahl an Zellen ausgesät, damit bei späterer Behandlung eine möglichst vergleichbare Zellkonfluenz resultierte. Dabei wurde je nach Zelllinie eine definierte Zellzahl gewählt, da sie unterschiedlich schnell proliferierten. Folgende Zellzahlen wurden daher ausgesät:

Tabelle 11: Übersicht der Anzahl an ausgesäten Zellen

Zelllinie	6-well Zellkulturplatte	10 cm Zellkulturplatte	15 cm Zellkulturplatte
HEK 293			1 x 10 ⁶ Zellen
HEK293 eGFP	0,06 x 10 ⁶ Zellen	0,44 x 10 ⁶ Zellen	1 x 10 ⁶ Zellen
HEK293 SIRT4-eGFP	0,09 x 10 ⁶ Zellen	0,66 x 10 ⁶ Zellen	1,5 x 10 ⁶ Zellen
HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP	0,09 x 10 ⁶ Zellen	0,66 x 10 ⁶ Zellen	1,5 x 10 ⁶ Zellen

Je nach Kulturplatte wurden unterschiedliche Mengen an DMEM-Zellkulturmedium verwendet:

Tabelle 12: Übersicht über das Volumen an verwendetem Medium pro Zellkulturplatte

Kulturplatte	Medium
6-well Zellkulturplatte	2 ml
10 cm Zellkulturplatte	10–13 ml
15 cm Zellkulturplatte	30 ml

3.3.4 Einfrieren, Lagern und Auftauen von Zelllinien

Um Zelllinien langfristig zu lagern, wurde ein Kryomedium aus 90 % FCS und 10 % DMSO angesetzt. Nach dem Trypsinisieren der Zellen (3.3.1) wurden den Zellen zuerst 10 ml Medium

hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen in ein 15 ml Falcon-Reagiergefäß überführt und für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Mediums wurde das Zellpellet in 2 ml Kryomedium resuspendiert. Davon wurden jeweils 1 ml in ein *Nunc*TM Kryoröhrchen gegeben. Die Kryoröhrchen wurden in einen mit Isopropanol gefüllten Kryo-Einfrierbehälter überführt. Dieser wurde dann in den -80 °C Gefrierschrank gestellt, was ein langsames Einfrieren der Zellen um circa 1 °C pro Minute ermöglichte. Nach 24 h wurden die Zellen entnommen und ohne den Kryo-Einfrierbehälter bei -80 °C gelagert.

Für das rasche Auftauen wurden die Kryoröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Die Zellen wurden in ein mit 5 ml Zellkulturmedium gefülltes 15 ml Falcon-Reagiergefäß überführt und danach bei 1.200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium in eine neue Zellkulturflasche überführt. Je nach Antibiotikaresistenz wurden dem Zellkulturmedium 1,5 µg/ml Puromycin oder 400 µg/ml G418 zugesetzt (2.9).

3.3.5 Behandlung von Zellen mit einem Induktor der Autophagie/Mitophagie und spezifischen Proteininhibitoren

Für die Experimente wurden die Zellen bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 40 % mit einem Induktor der Autophagie und spezifischen Proteininhibitoren behandelt, welche wie folgt eingesetzt wurden:

Tabelle 13: Auflistung verwendeter Substanzen zur Behandlung der Zellen

Substanz	Angesetzt in	Stamm-konzentration	Arbeitskonzentration	Dauer der Behandlung / Informationen
BafA1	DMSO	1 mM	500 nM	4 h [178]
CoCl ₂	ddH ₂ O	25 mM	400 µM	6 h / 24 h / 36 h [115, 179]
MYLS22	DMSO	10 mM	5 µM / 20 µM / 50 µM	24h [180]
Tubacin	DMSO	500 µM	2 µM	24 h [54]

Zur Behandlung der Zellen mit BafA1 wurde die BafA1 Stocklösung 1:10 in DMSO verdünnt und schließlich für die letzten 4 h der CoCl₂-Behandlung hinzugegeben. Die CoCl₂-Lösung wurde jeweils frisch in ddH₂O angesetzt.

3.3.6 Ernten von Zellen

Nach der Behandlung für die gekennzeichneten Zeiträume wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen mithilfe einer Pipette mit dem vorhandenen Medium von der Oberfläche der Zellkulturplatte abgespült und in ein Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine

Zentrifugation bei 1.200 rpm für 5 min. Nach dem Absaugen des Mediums erfolgte eine Zelllyse durch Resuspendieren des Zellpellets in CHAPS-Lysepuffer (2.7). Schließlich wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das Zelllysate hergestellt (3.2.1).

3.3.7 Zellkultur unter Hypoxie

Die Zellen wurden mit der Neubauerzählkammer gezählt (3.3.2) und anschließend auf Zellkulturplatten (3.3.3) ausgesät. Die Zellen wurden für zwei Tage wachsen gelassen, bis sie eine Konfluenz von 45 % erreichten. Im Anschluss wurden die Zellen in der Hypoxiekammer *HERAcell 150i* bei 37 °C, 5 % CO₂ und 1 % O₂ Sauerstoffgehalt inkubiert. Dabei wurde die niedrige O₂-Konzentration durch die Zufuhr von Stickstoff erreicht. Zu einem vorher festgelegten Zeitpunkt wurden die Zellen nach einzelner Entnahme der Zellkulturplatten unverzüglich geerntet (3.3.6). Anschließend wurde lediglich eine einzelne Zentrifugation von 4 min durchgeführt, um eine möglichst kurze Exposition der Zellen mit einer Normoxie zu gewährleisten. Die Gesamtzelllysate wurden anschließend auf dieselbe Weise gewonnen wie jene von Zellen, die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden (3.3.6).

3.3.8 Durchflusszytometrie

Regelmäßig wurde eine *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)-Analyse durchgeführt, um sicherzustellen, dass die untersuchten Zelllinien die transfizierten SIRT4-eGFP und SIRT4(H161Y)-eGFP-Proteine stabil exprimieren. Dafür wurden nach dem Trypsinisieren und nach der Zugabe von Medium (3.3.1) 2 ml der Zellen entnommen und in ein durchflusszytometrie-geeignetes *Polystyrene Round-Bottom Tube* überführt, welches auf Eis gestellt wurde. Anschließend erfolgte die Messung der eGFP-Fluoreszenz mittels des *BD FACSCanto™ II*-Durchflusszytometers.

3.4 Statistische Methoden

3.4.1 Westernblot

Für die Analyse von Westernblots wurde zunächst mit dem Programm *Image J* die Intensität der spezifischen Proteinbanden quantifiziert. Diese wurde dann auf die entsprechende Ladungskontrolle bezogen. Dafür wurden zunächst Rechtecke um die zu analysierenden Banden gezogen. Nach dem Setzen aller Rechtecke wurden Graphen berechnet, welche die relative Intensität der Banden widerspiegeln. Als Nächstes wurde eine Grundlinie gezogen, durch welche das Hintergrundsignal des Westernblots herausgerechnet wurde [181]. Schließlich wurden die Flächen unter den Kurven (*Area under the curve*) bestimmt, welche die

Intensität der Banden widerspiegeln und in optischer Dichte/mm² angegeben wurden. Zusätzlich wurde von jedem Immunoblot eine Ladungskontrolle durchgeführt, um den Einfluss der Ladungen unterschiedlicher Proteinmengen auf den Westernblot herauszurechnen. Hierfür wurde das relative Verhältnis der Intensität der Banden des zu analysierenden Proteins zu denen der Ladungskontrolle gebildet. Diese Werte wurden dann mittels *Microsoft Excel 2016* zusammengefasst. Zur statistischen Analyse wurde mittels *GraphPad Prism 9* ein *Two-Way-Anova*- oder *One-Way-Anova*-Test angewendet – abhängig von den zu analysierenden Werten. Anschließend erfolgte ein *Tukey's multiple comparisons*-Test, wodurch die Signifikanz geprüft wurde. Gezeigt wurde jeweils der Mittelwert \pm der Standardabweichung (SD). Dabei galt ein Signifikanzniveau von * $p < 0,05$. Des Weiteren galt ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

3.4.2 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der durchflusszytometrischen Messung des GFP-Signals wurden zunächst mit dem Programm *FlowJo* die lebenden Zellen markiert, welche analysiert werden sollten. Anschließend wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Signals des GFP-A-Kanals berechnet, indem der Median des Signals bestimmt wurde. Die Werte der durchflusszytometrischen Messungen wurden dann mittels *Microsoft Excel 2016* zusammengefasst. Zur statistischen Analyse wurde mittels *GraphPad Prism 9* – abhängig von den zu analysierenden Werten, ein *Two-Way-Anova*- oder *One-Way-Anova*-Test angewendet. Anschließend erfolgte ein *Tukey's multiple comparisons*-Test, wodurch die Signifikanz geprüft wurde. Gezeigt wurde jeweils der Median \pm der Standardabweichung (SD). Dabei galt ein Signifikanzniveau von * $p < 0,05$. Des Weiteren galt ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von SIRT4-eGFP und dessen dominant-negativer Mutante SIRT4(H161Y)-eGFP in stabil transfizierten HEK293-Zellen

In dieser Arbeit wurden stabil transfizierte und mittels G418 selektierte HEK293-Zelllinien verwendet, um Wildtyp- und mutiertes SIRT4 als C-terminales eGFP-Fusionsprotein zu exprimieren. Neben SIRT4-eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen wurden Zellen analysiert, die SIRT4(H161Y)-eGFP als enzymatisch inaktive Mutante von SIRT4 exprimieren (1.3.1). Es erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Expression von eGFP, SIRT4-eGFP sowie SIRT4(H161Y)-eGFP mittels Westernblot-Analysen und Durchflusszytometrie. Dadurch konnte eine konstante Expression sichergestellt und Veränderungen der Zelllinien ausgeschlossen werden. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten eine über die Zeit konstante Expression von eGFP, SIRT4-eGFP und SIRT4(H161Y)-eGFP in den analysierten HEK293-Zelllinien. Dabei war die Expression von SIRT4-eGFP und SIRT4(H161Y)-eGFP deutlich schwächer als die von eGFP. Des Weiteren zeigte SIRT4(H161Y)-eGFP eine deutlich geringere Expression im Vergleich zu Wildtyp SIRT4-eGFP (Abb. 9A,B). Vergleichbare Befunde ergaben sich bei der Analyse der SIRT4-eGFP-Expression im Vergleich zur SIRT4(H161Y)-Expression mittels der Immunoblotmethode. Dabei ließ sich ebenfalls eine geringere Expression an SIRT4(H161Y)-eGFP im Vergleich zu SIRT4-eGFP in HEK293-Zellen nachweisen (Abb. 9C,D). SIRT4(H161Y)-eGFP weist gegenüber SIRT4-eGFP zwar eine geringere Expression auf, jedoch war SIRT4(H161Y)-eGFP in dieser Arbeit primär und ursächlich mit den beobachteten Phänotypen assoziiert.

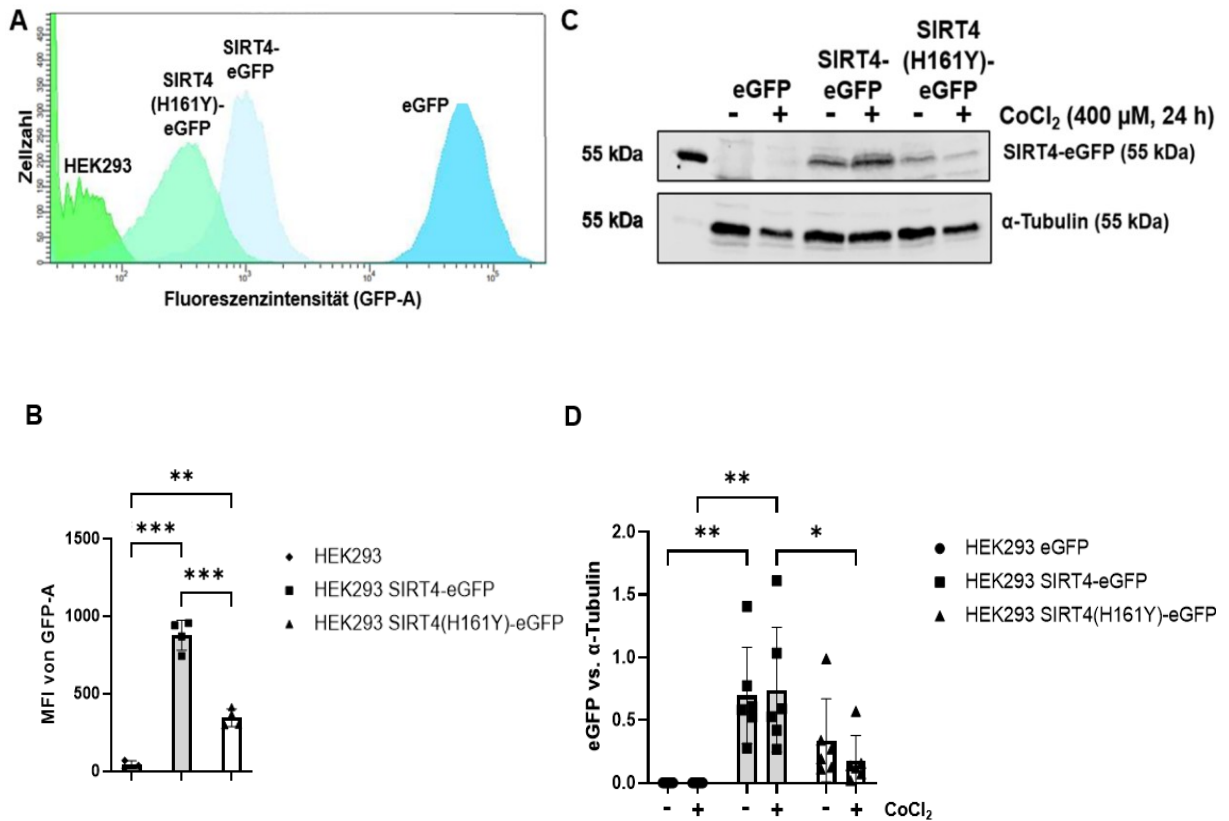


Abb. 9: FACS- und Immunoblot-basierte Messung der SIRT4-eGFP/SIRT4(H161Y)-Expression in stabilen HEK293-Zelllinien.

(A) Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität (Grün fluoreszierendes Protein (GFP-A), logarithmische Skala) der HEK293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen in Relation zu der gemessenen Zellzahl. Als GFP-Negativkontrolle wurden parallel Wildtyp HEK293-Zellen untersucht. (B) Gezeigt ist die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) entspricht dabei dem Median von GFP-A. Das eGFP Signal in HEK293 eGFP-Zellen wurde übersichtshalber aufgrund der starken Fluoreszenzintensität nicht aufgetragen. Die gezeigten Daten wurden mittels der *FlowJo* Software analysiert und mit *GraphPad Prism* statistisch ausgewertet. Die Daten repräsentieren den Median \pm Standardabweichung (SD). Für die statistische Auswertung wurde eine *One-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$; $N = 3-4$). (C) Darstellung einer Westernblot-Analyse von SIRT4-eGFP mit α -Tubulin als Ladungskontrolle nach der Behandlung der HEK293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen mit CoCl₂ (400 μ M). (D) Gezeigt ist die statistische Auswertung der SIRT4-eGFP/SIRT4(H161Y)-eGFP-Immunoblotsignale in Bezug auf die Ladungskontrolle α -Tubulin. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *Two-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (* $p < 0,05$; $N = 6$). Publikation der Ergebnisse als Preprint in Lehmkuhl, Amin *et al.*, 2025 [182].

Um die Identität der transfizierten Zelllinien zusätzlich zu überprüfen, wurde eine Sequenzierung der stabil exprimierenden SIRT4-cDNAs in HEK293 SIRT4-eGFP-Zellen und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zunächst aufgeschlossen (3.1.1) und mRNA isoliert (3.1.2). Schließlich erfolgte die Synthese von cDNA aus mRNA (3.1.4) sowie die Vervielfältigung der cDNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion

(3.1.5). Die DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt (3.1.6), gefolgt von der Extraktion der gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel (3.1.7). Zuletzt erfolgte die DNA-Sequenzierung mittels des Primers T7 (3.1.8) (Abb. 10).

SIRT4-eGFP	GCGCCTGACAGAGCTC	CACGGATGCATGGACAGGGTCCTGTGCTTGGATTGTGGGGAACA	534
pcDNA3.1-SIRT4-eGFP	GCGCCTGACAGAGCTC	CACGGATGCATGGACAGGGTCCTGTGCTTGGATTGTGGGGAACA	1440
SIRT4(H161Y)-eGFP	GCGCCTGACAGAGCTC	TACGGATGCATGGACAGGGTCCTGTGCTTGGATTGTGGGGAACA	502
	*****	*****	

Abb. 10: Ergebnis der Sequenzierung der SIRT4-eGFP und SIRT4(H161Y)-eGFP-Transkripte in stabil exprimierenden HEK293-Zellen.

Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung der SIRT4-cDNAs in stabil transfizierten HEK293-Zelllinien. Als Vergleich diente die Sequenz des pcDNA3.1-SIRT4-eGFP-Plasmids. Gelb markiert ist der nachgewiesene Nukleotidsequenz-Unterschied C → T bei der H161Y-Mutation. Mit * markiert sind übereinstimmende Basen. Das Sequenz-Alignment wurde mittels *Clustal Omega* erstellt. Basen: Guanin (G), Cytosin (C), Adenin (A) und Thymin (T).

Bei der Sequenzierung zeigte sich eine Übereinstimmung der Nukleotidsequenz der cDNA bei SIRT4-eGFP mit der Sequenz des Expressionsvektors pcDNA3.1-SIRT4-eGFP. Dies bestätigte die Identität der Zellen. Bei der cDNA von den SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen zeigte sich an Nukleotidposition 1397 der pcDNA3.1-SIRT4-eGFP ein Basenaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) (Abb. 10). Dies führte zu einer Änderung des Codons CAC zu TAC (Adenin (A)). Dabei kodiert das Codon CAC für die Aminosäure Histidin (H), welche der Aminosäurenposition 161 von SIRT4 entspricht. Das in SIRT4(H161Y)-eGFP nachgewiesene Codon TAC hingegen kodiert für die Aminosäure Tyrosin (Y). Somit wurde der Austausch der Aminosäure Histidin gegen Tyrosin bei den HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen bestätigt.

4.2 Aktivierung von HIF-1 α durch die CoCl₂-vermittelte Pseudohypoxie

In dieser Arbeit wurde die Rolle von SIRT4 und seinen Interaktionspartnern OPA1 und HDAC6 in der CoCl₂-induzierten Autophagie untersucht. CoCl₂ und Hypoxie sind als Stimulatoren der Autophagie bekannt (1.2.4). CoCl₂ induziert eine Pseudohypoxie durch die Inhibition des Abbaus von HIF-1 α , wodurch eine Hypoxie simuliert wird (1.2.4). Um die HIF-1 α -Aktivierung durch CoCl₂-Behandlung nachzuweisen, wurden zunächst die zu analysierenden Zellen ausgesät und bei einer Konfluenz von 40–50 % mit 400 μ M CoCl₂ behandelt. Die Zellen wurden schließlich nach einer Inkubationsdauer von 24 h geerntet. Um das Ansprechen der Zellen auf die CoCl₂-Behandlung zu überprüfen, wurde die Stabilisierung von HIF-1 α mittels der Westernblot-Methode analysiert (Abb. 11).

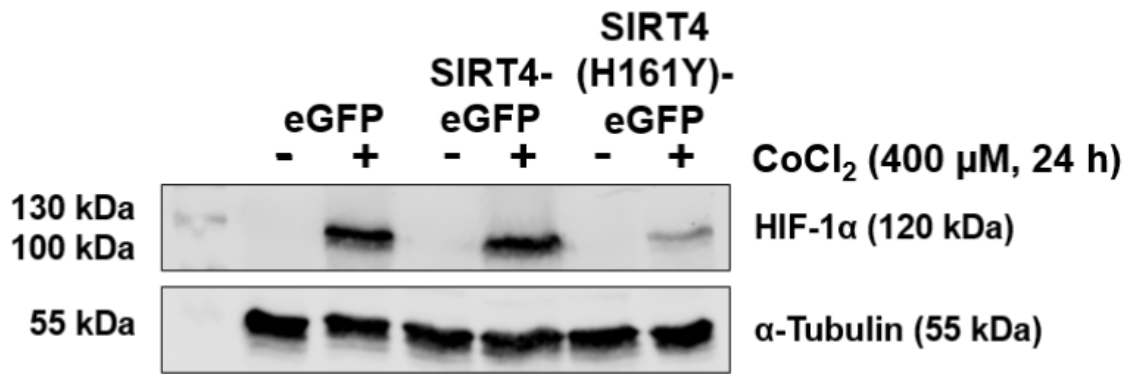


Abb. 11: Aktivierung von HIF-1 α durch CoCl₂ in SIRT4/SIRT4(H161Y)-exprimierenden HEK293-Zellen.

Gezeigt ist eine Westernblot-Analyse der Aktivierung von HIF-1 α sowie die Ladungskontrolle (α -Tubulin) nach CoCl₂-Behandlung von stabilen HEK293 eGFP-Zellen, HEK293 SIRT4-eGFP-Zellen und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen. Publikation der Ergebnisse als Preprint in Lehmkuhl, Amin *et al.*, 2025 [182].

Nach der Induktion einer Pseudohypoxie durch Behandlung mittels CoCl₂ ließ sich dabei in den drei analysierten Zelllinien ein Anstieg der HIF-1 α -Proteinmengen nachweisen (Abb. 11). Somit konnte die CoCl₂-Behandlung in den folgenden Experimenten für die Induktion einer Pseudohypoxie verwendet werden. Hierbei schien der Anstieg der HIF-1 α -Proteinmengen in SIRT4(H161Y)-eGFP geringer auszufallen. Jedoch zeigte sich wie in Lehmkuhl, Amin *et al.* [182] veröffentlicht, dass in HEK293 SIRT4(H161Y)-myc-Flag-Zellen der Anstieg der HIF-1 α -Proteinmengen vergleichbar zu den anderen analysierten Zelllinien ausfiel. Daher schien der in diesem Westernblot (Abb. 11) beobachtete verringerte Anstieg von HIF-1 α keinen Einfluss auf die Ergebnisse zu haben. Im Einklang damit konnte die reduzierte LC3B-Aktivierung nach CoCl₂-Behandlung ebenfalls mittels der LC3eGFP/RFP-Methode in HEK293 SIRT4(H161Y)-myc-Flag-Zellen bestätigt werden [182].

Zudem wurde die Morphologie der Zellen nach der Behandlung mit CoCl₂ mittels eines invertierten Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskops beurteilt (Abb. 12, Abb. 13 und Abb. 14).

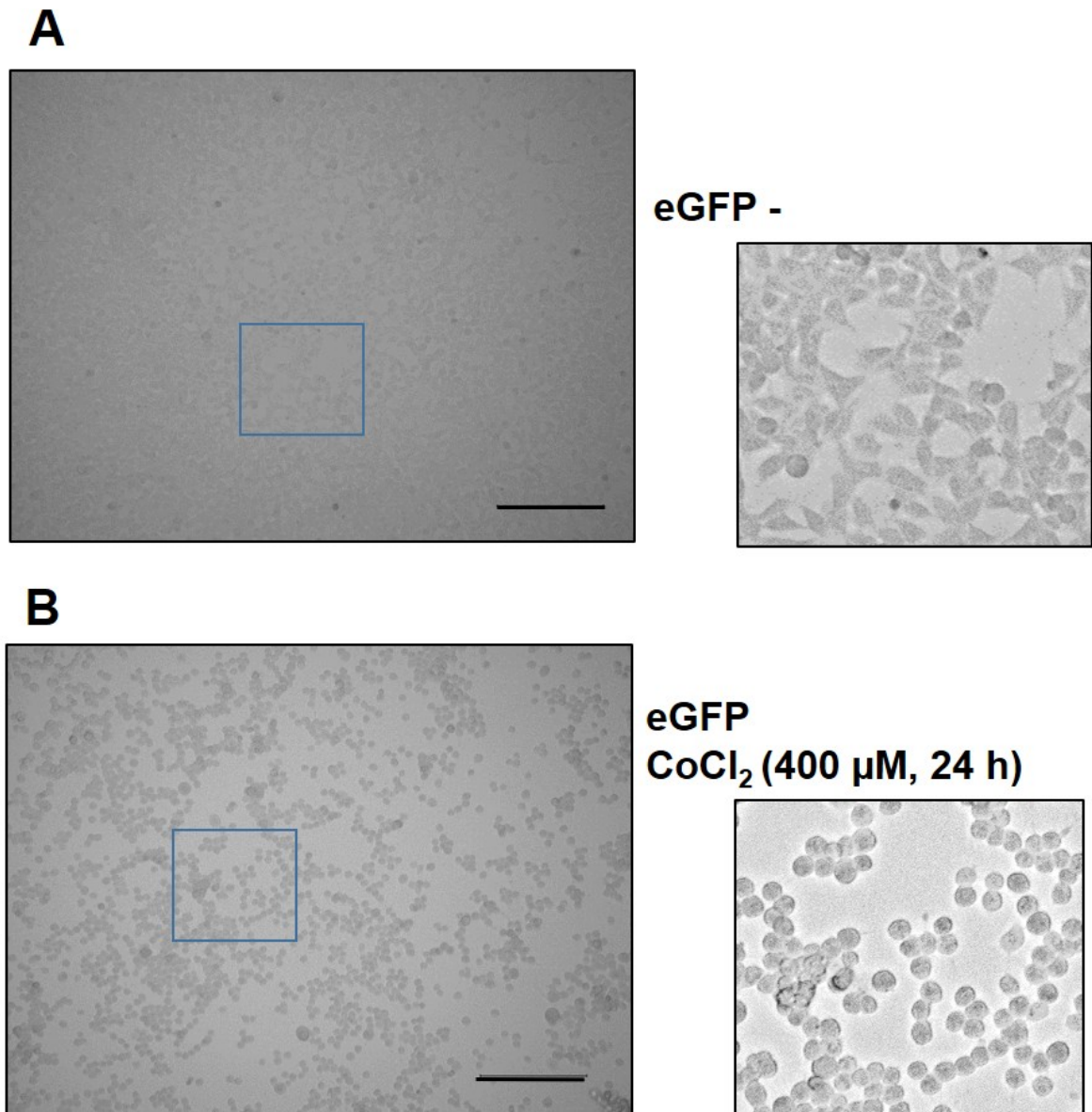


Abb. 12: Mikroskopische Aufnahmen der HEK293 eGFP-Zellen.

(A) Mikroskopische Aufnahmen unbehandelter HEK293 eGFP-Kontrollzellen. (B) Mikroskopische Aufnahme von HEK293 eGFP-Zellen nach CoCl_2 -Behandlung. Die Aufnahmen wurden mit einem invertierten Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop und einer 10 x Vergrößerung (*Brightfield*) aufgenommen. Dabei entspricht der Größenstandard 250 μm . Die Ausschnitte sind um 200 % vergrößert. Weiterhin ist die Schärfe der Ausschnitte um 100 % erhöht, sowie die Helligkeit und der Kontrast um 15 %. Diese Anpassungen ermöglichen eine optimierte Darstellbarkeit der Zellen.

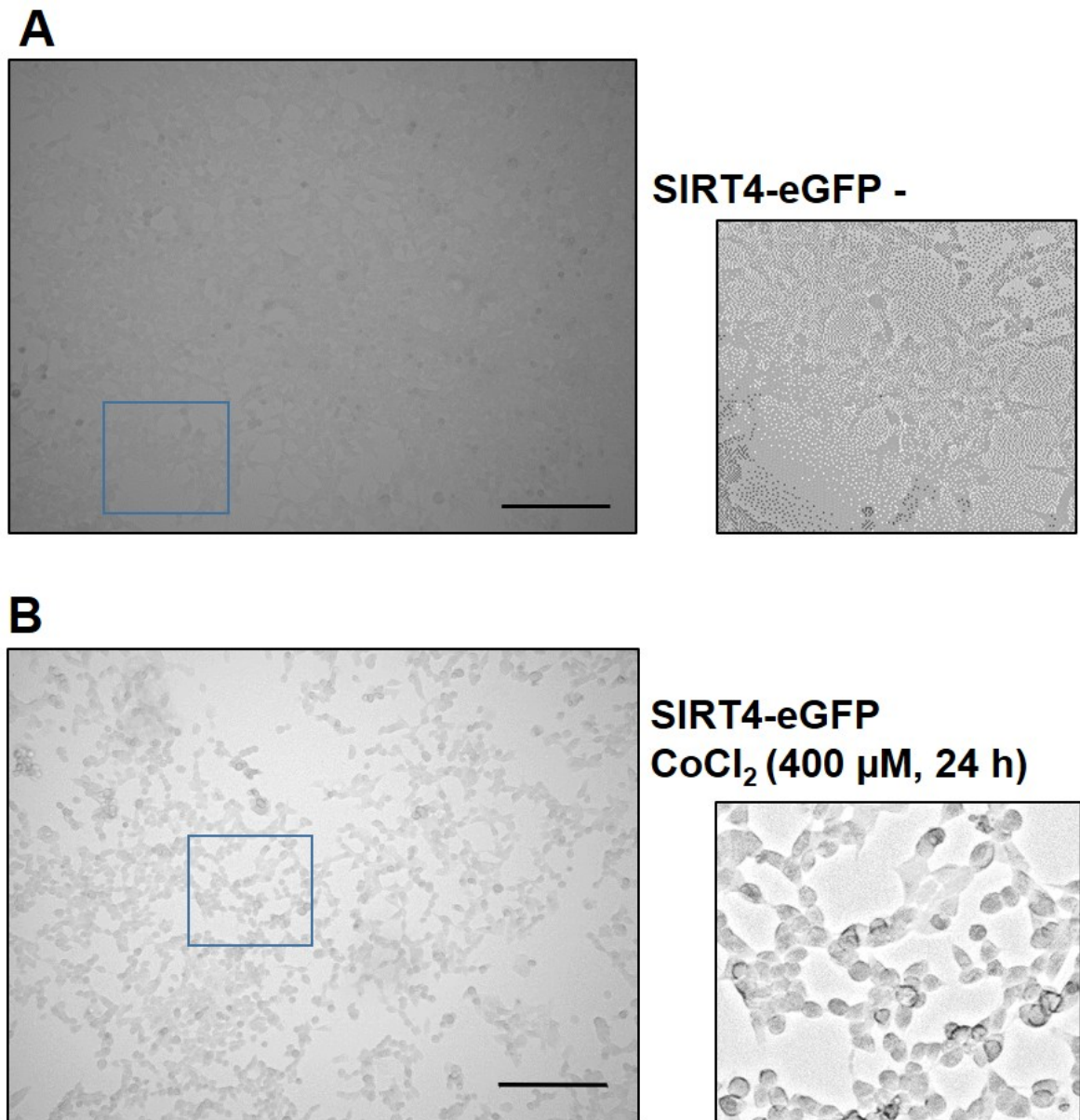


Abb. 13: Mikroskopische Aufnahmen der HEK293 SIRT4-eGFP-Zellen.

(A) Mikroskopische Aufnahmen unbehandelter HEK293 SIRT4-eGFP-Zellen. (B) Mikroskopische Aufnahme von HEK293 SIRT4-eGFP-Zellen nach CoCl_2 -Behandlung. Die Aufnahmen wurden mit einem invertierten Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop mit einer 10 x Vergrößerung (*Brightfield*) aufgenommen. Dabei entspricht der Größenstandard 250 μm . Die Ausschnitte sind um 200 % vergrößert. Weiterhin ist die Schärfe der Ausschnitte um 100 % erhöht, sowie die Helligkeit und der Kontrast um 15 %. Diese Anpassungen ermöglichen eine optimierte Darstellbarkeit der Zellen.

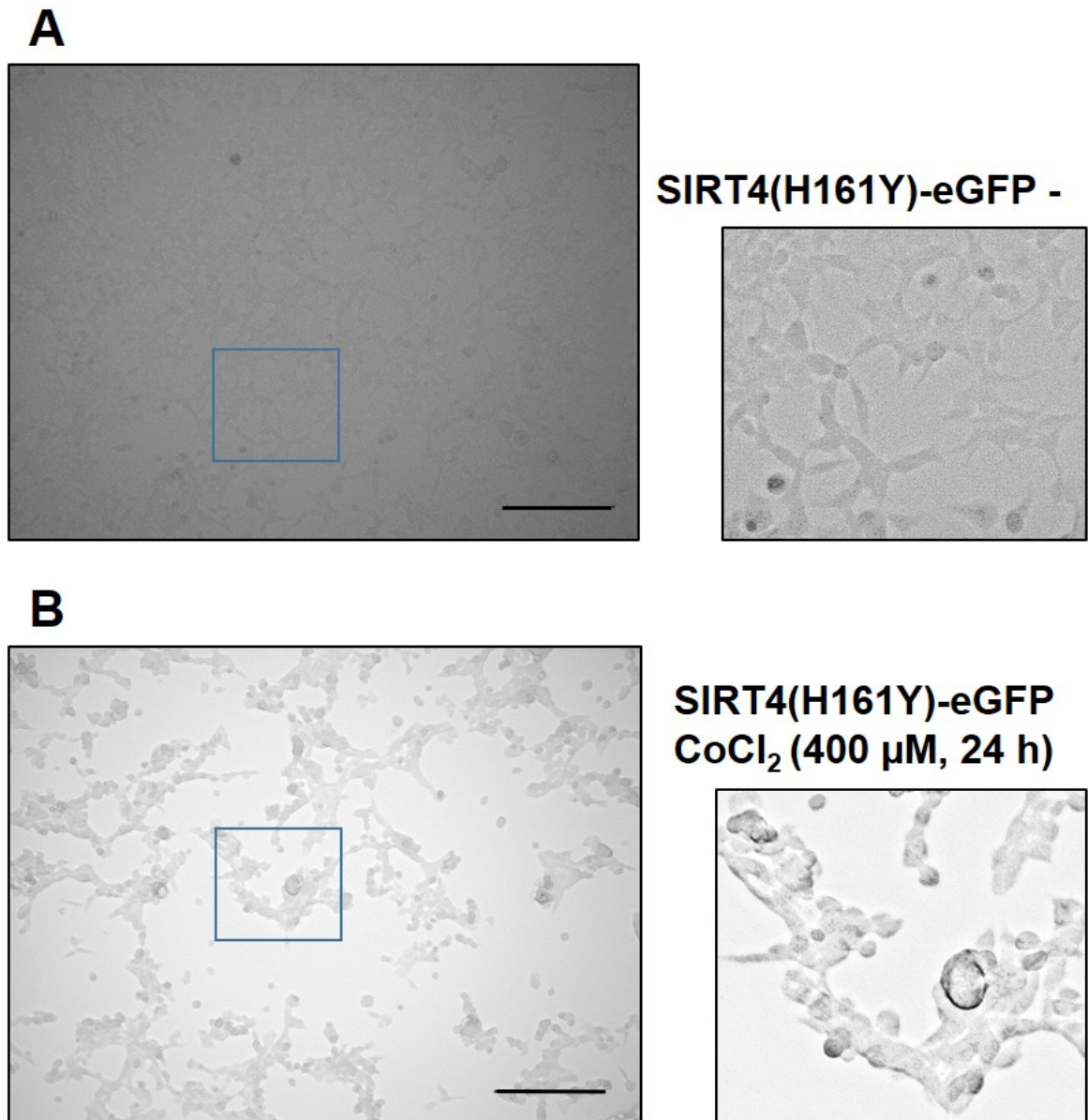


Abb. 14: Mikroskopische Aufnahmen der HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen.

(A) Mikroskopische Aufnahmen unbehandelter HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen. (B) Mikroskopische Aufnahme der HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen nach CoCl₂-Behandlung. Die Aufnahmen wurden mit einem invertierten Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop mit einer 10 x Vergrößerung (*Brightfield*) aufgenommen. Dabei entspricht der Größenstandard 250 µm. Die Ausschnitte sind um 200 % vergrößert. Weiterhin ist die Schärfe der Ausschnitte um 100 % erhöht, sowie die Helligkeit und der Kontrast um 15 %. Diese Anpassungen ermöglichen eine optimierte Darstellbarkeit der Zellen.

Bei den mikroskopischen Aufnahmen ließ sich bei allen drei analysierten und unbehandelten Zelllinien eine Konfluenz von etwa 90 % nachweisen (Abb. 12A, Abb. 13A und Abb. 14A). Bei den CoCl₂-behandelten Zellen zeigte sich hingegen eine Abrundung der Zelloberfläche (Abb. 12B, Abb. 13B und Abb. 14B). Hierbei war die Abrundung der Zelloberfläche bei den HEK293 eGFP-Zellen am deutlichsten ausgeprägt (Abb. 12B). Die gleichzeitig beobachtete

geringere Wachstumskonfluenz in allen analysierten Zelllinien (45–55 %) war vermutlich auf eine reduzierte Proliferation zurückzuführen (Abb. 12B, Abb. 13B und Abb. 14B). Zusammenfassend zeigte sich eine Abrundung und verringerte Konfluenz der Zellen nach CoCl₂-Behandlung. Im Gegensatz zu einer Proliferationshemmung konnte mikroskopisch kein Anhalt auf eine erhöhte Apoptoserate in allen CoCl₂-behandelten Zellen beobachtet werden.

4.3 Einfluss einer erhöhten Expression von SIRT4 und SIRT4(H161Y) auf die CoCl₂-induzierte Autophagie

4.3.1 Die ektopische Expression von SIRT4(H161Y) inhibiert den Anstieg von LC3B-II unter Pseudohypoxie

SIRT4 hat einen positiven wie auch negativen regulatorischen Einfluss auf die Autophagie, sodass nach SIRT4-Expression in verschiedenen Studien erhöhte wie auch erniedrigte LC3B-II-Proteinmengen beobachtet wurden (1.3.2). In dieser Arbeit erfolgte die Analyse der Wirkung von SIRT4 auf die Autophagie nach Induktion einer Pseudohypoxie durch die Behandlung mit CoCl₂ (1.2.4). Das Ansprechen auf die CoCl₂-induzierte Pseudohypoxie konnte durch einen Anstieg an HIF-1 α nachgewiesen werden (4.2). Für die Experimente wurden HEK293 eGFP-Zellen als Kontrollzellen sowie HEK293 SIRT4-eGFP-Zellen und die enzymatisch inaktive Mutante HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP verwendet. Die Zellen wurden je nach Größe der Zellkulturplatten mit einer definierten Zellzahl ausgebracht (3.3.3) und schließlich bis zu einer Konfluenz von 40–50 % wachsen gelassen. Zur Induktion der Pseudohypoxie wurden die Zellen mit 400 μ M CoCl₂ für 24 h oder 36 h behandelt. Danach wurden die behandelten Zelllinien geerntet, Zelllysate isoliert und anschließend Westernblot-Analysen (75 μ g Protein/Ansatz) und densitometrischer Auswertung unterzogen, um die Proteinmengen des Autophagiemarkers LC3B-II zu bestimmen (Abb. 15 und Abb. 16).

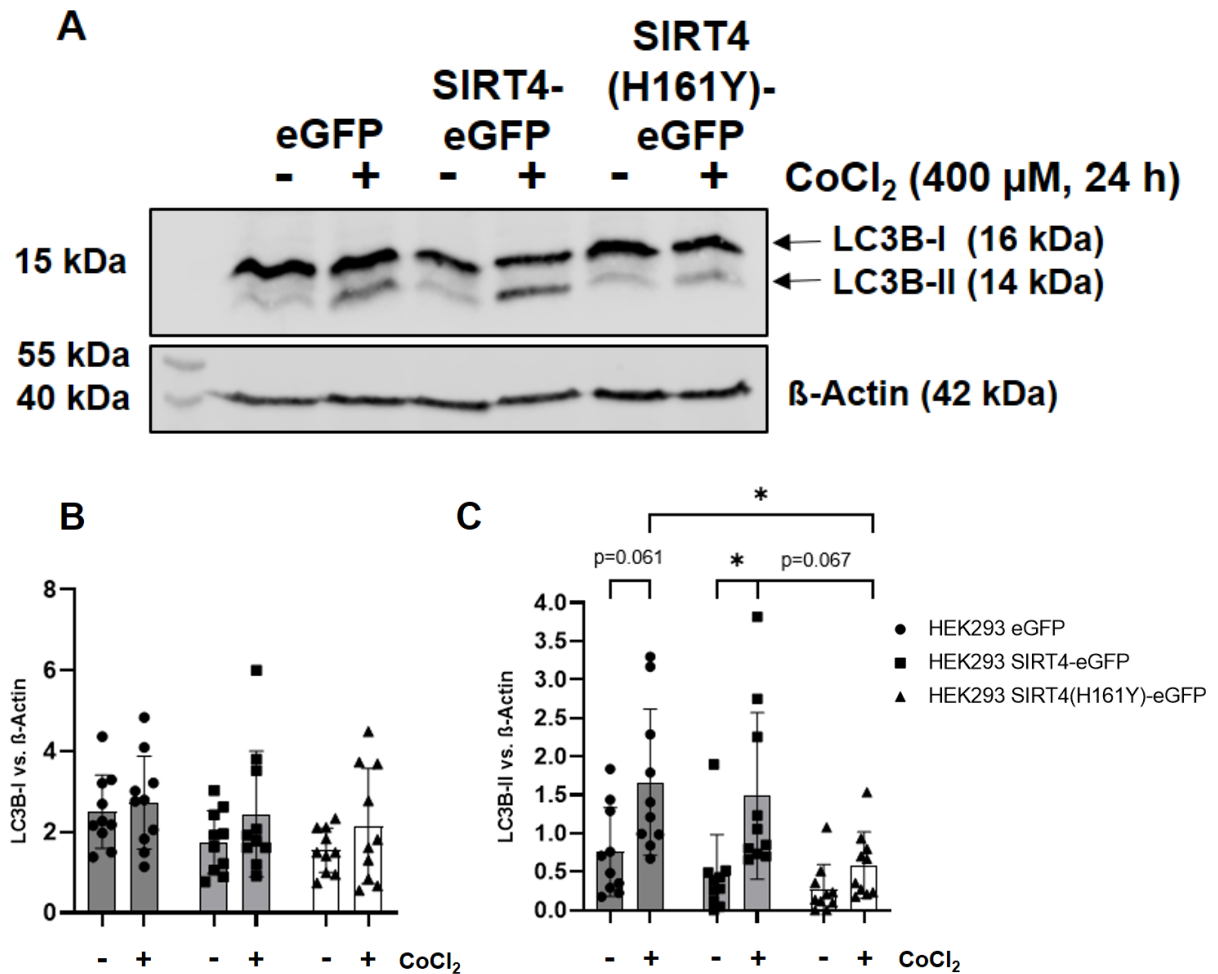


Abb. 15: SIRT4(H161Y)-exprimierende HEK293-Zellen zeigen eine deutlich reduzierte LC3B-II-Bildung nach CoCl₂-Behandlung für 24 h.

(A) Darstellung einer Westernblot-Analyse von LC3B-I und LC3B-II mit β -Actin als Ladungskontrolle nach CoCl₂-Behandlung (400 μ M) von HEK293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen. (B, C) Gezeigt ist die statistische Auswertung der LC3B-I- und LC3B-II-Signale in Bezug auf die Ladungskontrolle β -Actin. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *Two-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (* $p < 0,05$; $N = 10$). Publikation der Ergebnisse als Preprint in Lehmkuhl, Amin *et al.*, 2025 [182].

Interessanterweise zeigte sich im Gegensatz zu HEK293 eGFP und HEK293 SIRT4-eGFP in SIRT4(H161Y)-eGFP exprimierenden HEK293-Zellen ein deutlich und signifikant reduzierter Anstieg von LC3B-II nach der Behandlung mit CoCl₂ für 24 h (Abb. 15A,C). Dahingegen ließen sich bei allen drei Zelllinien keine signifikanten Veränderungen der LC3B-I-Proteinmengen beobachten (Abb. 15A,B) [182].

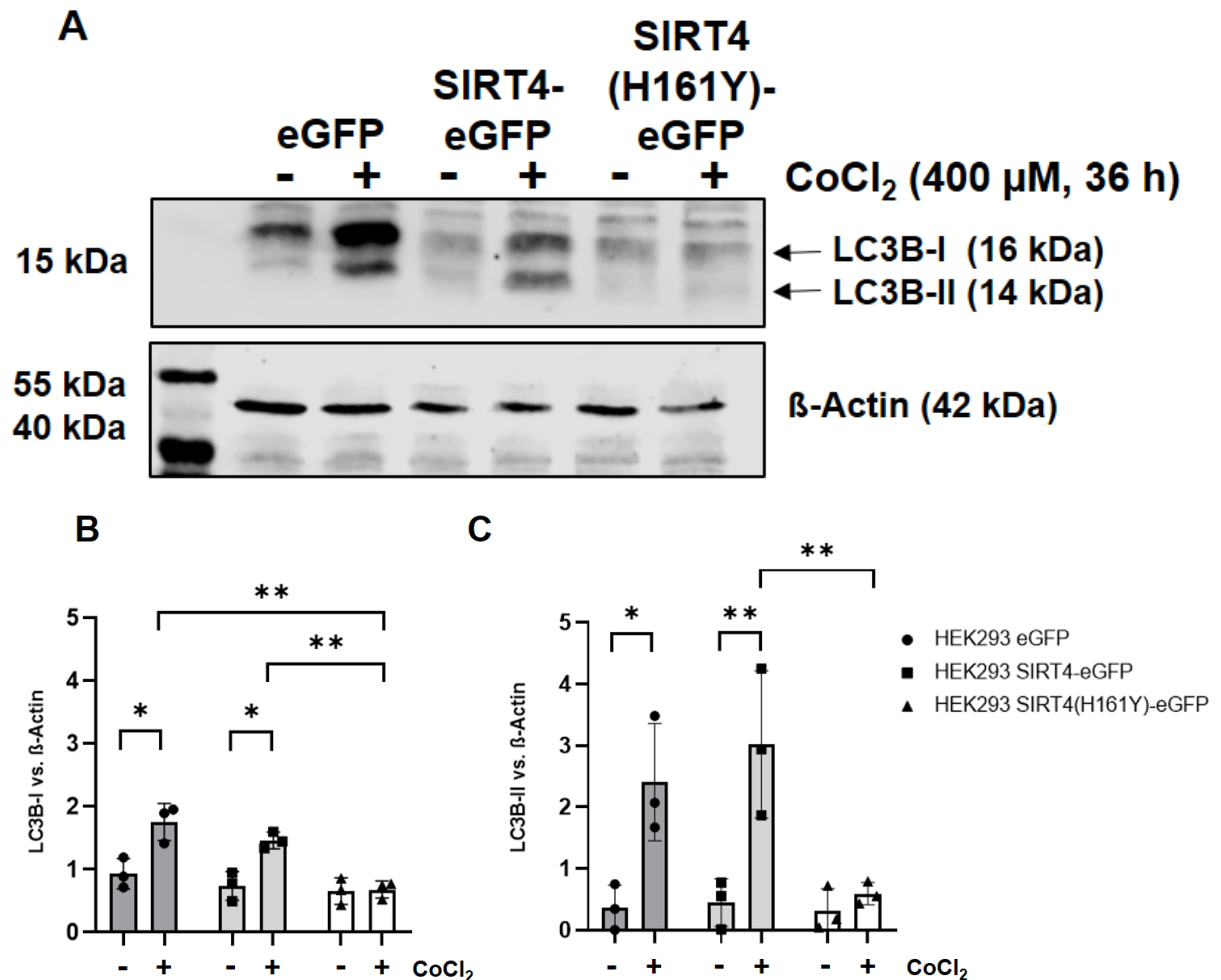


Abb. 16: SIRT4(H161Y)-exprimierende HEK293-Zellen zeigen eine deutlich reduzierte LC3B-II-Bildung nach CoCl₂-Behandlung für 36 h.

(A) Darstellung einer Westernblot-Analyse von LC3B-I und LC3B-II mit β -Actin als Ladungskontrolle nach CoCl₂-Behandlung (400 μ M) von HEK293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen. (B, C) Gezeigt ist die statistische Auswertung der LC3B-I- und LC3B-II-Signale in Bezug auf die Ladungskontrolle β -Actin. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *Two-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (* $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$; $N = 3$). Publikation der Ergebnisse als Preprint in Lehmkuhl, Amin *et al.*, 2025 [182].

Analog zu den Ergebnissen nach CoCl₂-Behandlung für 24 h ließ sich nach einer längeren Inkubation mit CoCl₂ für 36 h ebenfalls nur in den HEK293 eGFP und HEK293 SIRT4-eGFP-Zellen ein Anstieg an LC3B-II nachweisen. Ebenso zeigte sich nach CoCl₂-Behandlung für 36 h ein verringerter LC3B-II-Anstieg in SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen (Abb. 16A,C). Zusammenfassend zeigte sich ein signifikant reduzierter Anstieg von LC3B-II in SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen bei CoCl₂-induzierter Pseudohypoxie [182]. Diese Befunde lassen somit vermuten, dass die Expression der SIRT4-Mutante H161Y die Autophagieantwort nach CoCl₂-Behandlung hemmt.

4.3.2 Der verringerte LC3B-II-Anstieg in SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen ist nicht bedingt durch erhöhte HDAC6-Proteinmengen

Um die Ursache des verringerten Anstiegs an LC3B-II in SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierenden Zellen zu analysieren, wurde zunächst der SIRT4-Interaktor HDAC6 (1.3.4) sowie das über HDAC6 regulierte ac.K40 α -Tubulin analysiert. HDAC6 fördert die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen über Regulation der Deacetylierung von Cortactin und hat somit einen Einfluss auf die Autophagie (1.1.1). Zudem reguliert HDAC6 über die Deacetylierung von ac.K40 α -Tubulin den Transport von Autophagosomen oder Organellen wie Mitochondrien entlang der Mikrotubuli und hat somit einen weiteren Einfluss auf die Autophagie und Mitophagie (1.2.3). Bekannt ist zudem, dass SIRT4 mit HDAC6 interagiert (1.3.4). Aufgrund dieser genannten Aspekte erfolgte die Analyse der HDAC6-Proteinmengen und deren Einfluss auf die LC3B-II-Bildung. Die folgenden Experimente wurden analog zu Abschnitt 4.3.1 durchgeführt, um die Proteinmengen des SIRT4-Interaktors HDAC6 und dessen Substrat, ac.K40 α -Tubulin, zu bestimmen.

Interessanterweise ließen sich in HEK293 SIRT4-eGFP- und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen schon basal signifikant höhere Proteinmengen an HDAC6 nachweisen als in den HEK293 eGFP-Kontrollzellen (Abb. 17A,B). Zudem zeigte sich in den eGFP-exprimierenden Zellen im Gegensatz zu den SIRT4 und SIRT4(H161Y)-exprimierenden HEK293-Zelllinien ein signifikanter Abfall der HDAC6-Proteinmengen nach Behandlung mit CoCl₂ (Abb. 17A,C). Im Einklang damit wiesen SIRT4 und SIRT4(H161Y)-exprimierende Zellen basal sowie nach CoCl₂-Behandlung erniedrigte Proteinmengen an ac.K40 α -Tubulin auf (Abb. 17A,D), welches von HDAC6 deacetyliert wird (1.1.1) [182]. Diese Befunde sowie die stark reduzierte LC3B-II-Antwort nach SIRT4(H161Y)-Überexpression (Abb. 15 und Abb. 16) ließen vermuten, dass SIRT4(H161Y) über eine erhöhte HDAC6-Proteinmenge und enzymatische Aktivität von HDAC6 die für den autophagischen Prozess notwendigen Mikrotubulifunktionen hemmt. Möglicherweise wäre so der Transport der abzubauenen Substrate zum Autophagosom und der Autophagosomentransport verringert.

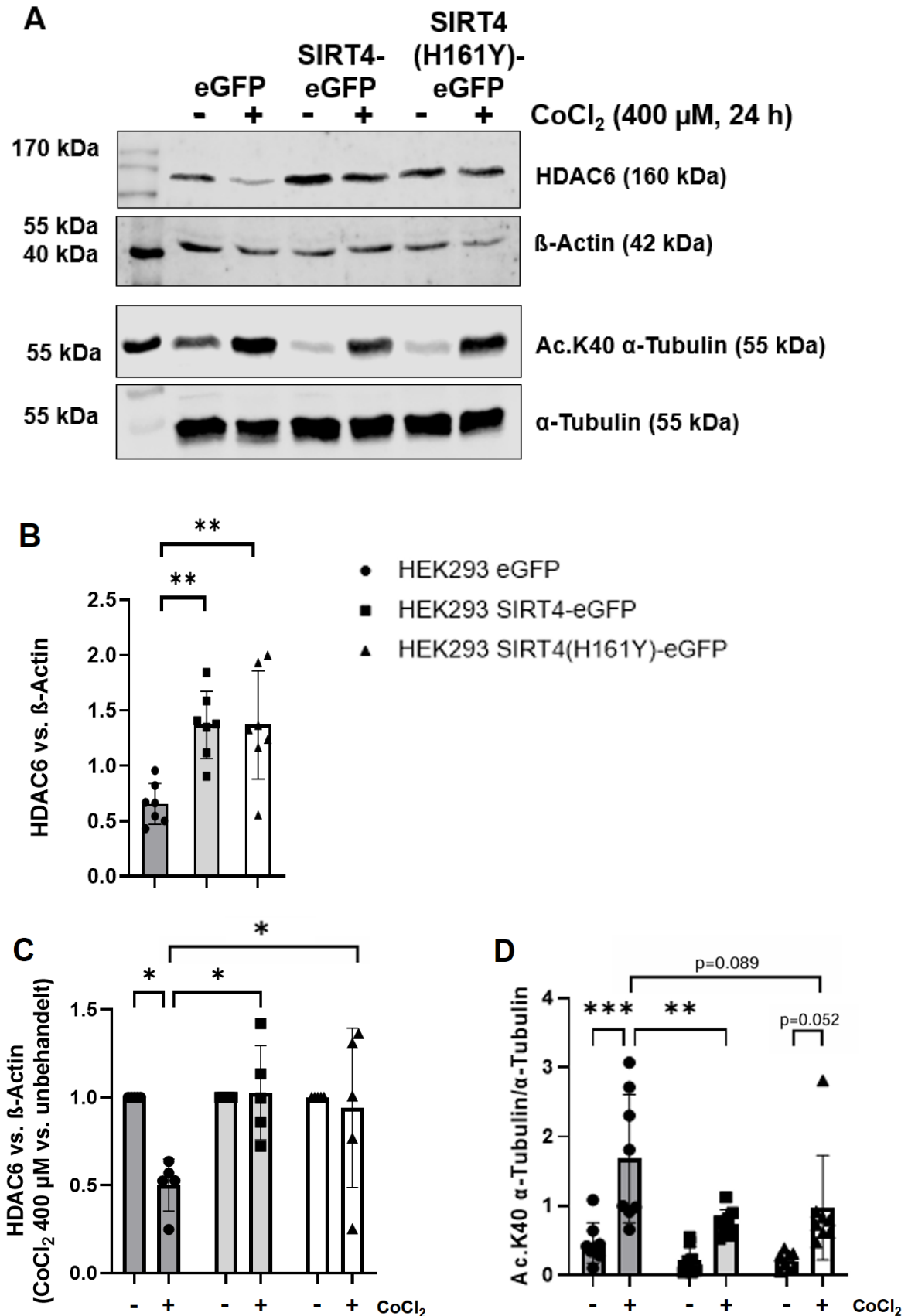


Abb. 17: Erhöhte HDAC6-Proteinmengen und erniedrigte acetylierte K40 α -Tubulin-Proteinmengen in SIRT4- und SIRT4(H161Y)-exprimierenden HEK293-Zellen.

(A) Darstellung einer Westernblot-Analyse von HDAC6 und vom acetylierten K40 α -Tubulin mit β -Actin und α -Tubulin als Ladungskontrolle nach CoCl₂-Behandlung (400 μ M) von HEK293 eGFP,

HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen. **(B)** Gezeigt ist die statistische Auswertung der HDAC6-Signale in Bezug auf die Ladungskontrolle β -Actin. **(C)** Gezeigt ist die relative statistische Auswertung der HDAC6-Signale in Bezug auf die Ladungskontrolle β -Actin sowie auf unbehandelte Zellen. **(D)** Gezeigt ist die statistische Auswertung der acetylierten K40 α -Tubulin-Signale in Bezug auf die Ladungskontrolle α -Tubulin. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *Two-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$; B: N = 7, C: N = 5, D: N = 8). Publikation der Ergebnisse als Preprint in Lehmkuhl, Amin *et al.*, 2025 [182].

Um zu klären, ob die erhöhten HDAC6-Proteinmengen in SIRT4(H161Y)-exprimierenden HEK293-Zellen (Abb. 17) die reduzierte LC3B-II-Antwort nach CoCl_2 -Behandlung bewirken, erfolgte eine pharmakologische Inhibition von HDAC6 mittels Tubacin. Tubacin ist ein bekannter Inhibitor der Deacetylase-Aktivität von HDAC6 (1.1.1). Für diese Experimente wurden die Zelllinien, zusätzlich zum in 4.3.1 beschriebenen Vorgehen, mit Tubacin in der Abwesenheit und Anwesenheit von CoCl_2 behandelt. Schließlich erfolgten Westernblot-Analysen, um die Proteinmengen des Autophagiemarkers LC3B-II nach Inhibition von HDAC6 durch Tubacin zu bestimmen. Um sicherzustellen, dass die Zellen auf die Tubacin-Behandlung ansprechen, wurden zunächst die ac.K40 α -Tubulin-Proteinmengen analysiert. Hierbei ließ sich nach der Behandlung mittels Tubacin in allen drei untersuchten Zelllinien ein deutlicher Anstieg des ac.K40 α -Tubulin nachweisen (Abb. 18A,B). Damit wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Tubacin die Deacetylase-Aktivität von HDAC6 hemmte. Interessanterweise ließ sich jedoch durch die Behandlung mit Tubacin der Anstieg von LC3B-II nicht wiederherstellen (Abb. 18A,C). Somit scheint die Interaktion von SIRT4 mit HDAC6 keinen Einfluss auf die verringerten Proteinmengen von LC3B-II nach CoCl_2 -Behandlung in HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen zu haben [182].

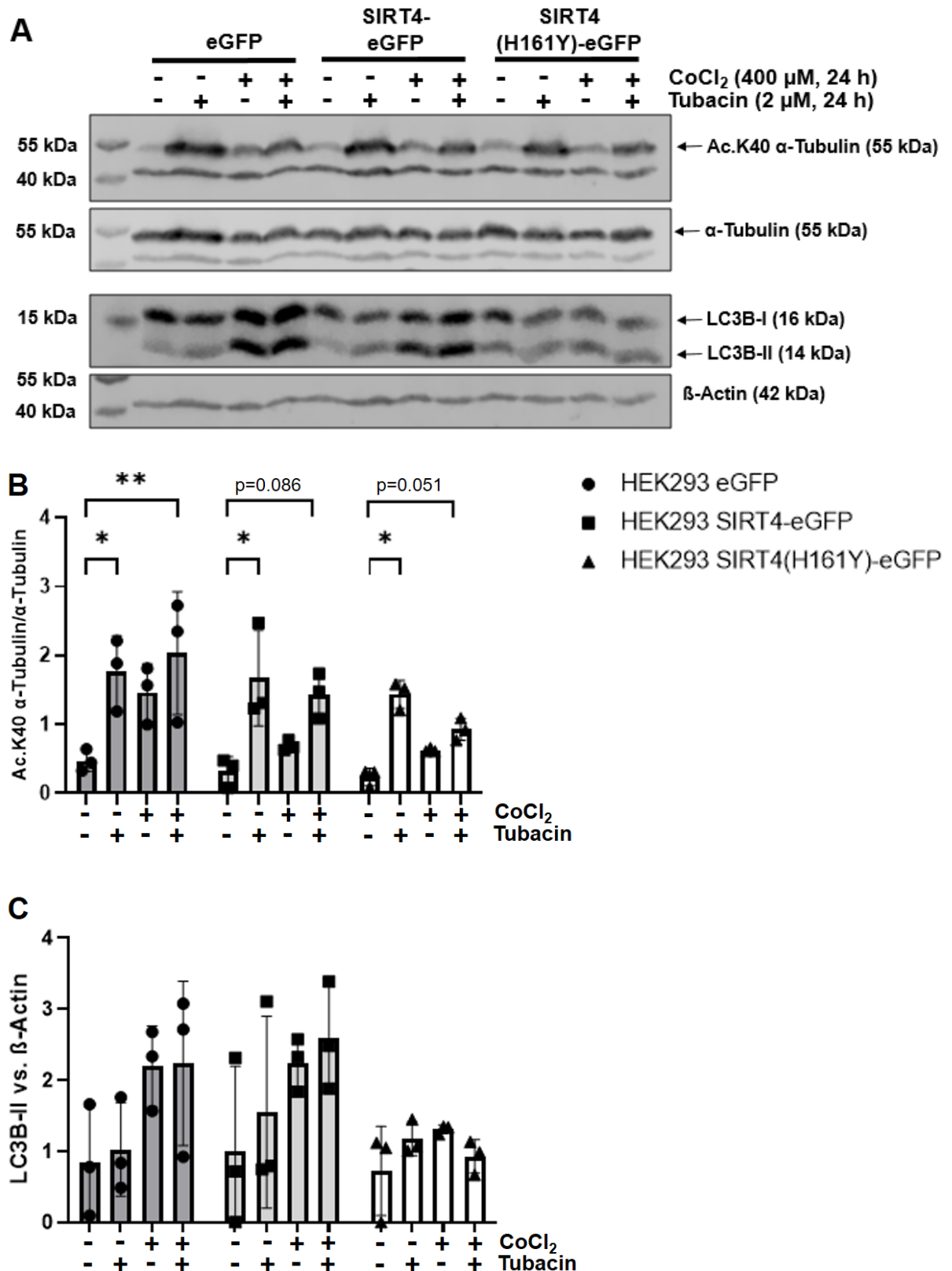


Abb. 18: Tubacin vermittelte Hemmung von HDAC6 hat keinen positiven Einfluss auf die LC3B-II-Proteinmengen in CoCl₂-behandelten HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen.

(A) Westernblot-Analyse vom acetylierten K40 α-Tubulin und von LC3B-I und LC3B-II mit α-Tubulin und β-Actin als Ladungskontrolle von HEK293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen nach der Behandlung mit CoCl₂ (400 μM) und Tubacin (2 μM). (B) Gezeigt ist die statistische Auswertung der acetylierten K40 α-Tubulin-Signale in Bezug auf die

Ladungskontrolle α -Tubulin. (C) Gezeigt ist die statistische Auswertung der LC3B-II-Signale in Bezug auf die Ladungskontrolle β -Actin. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *Two-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $N = 3$). Der Übersichtlichkeit halber wurden lediglich Signifikanzen innerhalb einzelner Zelllinien angegeben. Die Signifikanzen zwischen den Zelllinien für CoCl_2 sind in Abb. 15 und Abb. 17 sichtbar. Publikation der Ergebnisse als Preprint in Lehmkuhl, Amin *et al.*, 2025 [182].

4.3.3 Der fehlende LC3B-II-Anstieg in SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierenden Zellen nach CoCl_2 -Behandlung ist nicht bedingt durch erhöhte OPA1-L-Proteinmengen

OPA1 ist als Interaktor von SIRT4 bekannt. Dabei stabilisiert SIRT4 OPA1-L, wodurch es zu einer Steigerung der Fusion von Mitochondrien kommt (1.3.3). OPA1 hat über die Regulation von Fusion und *Fission* von Mitochondrien einen Einfluss auf die mitochondriale Dynamik und die mitochondriale Autophagie, die Mitophagie (1.2.2). Daher erfolgte die Analyse der OPA1-L/OPA1-S-Proteinmengen in den untersuchten Zelllinien, um einen möglichen Einfluss auf die verringerten LC3B-II-Proteinmengen zu analysieren. Dafür wurden die Experimente wie unter Abschnitt 4.3.1 beschrieben angesetzt und analysiert, wobei die Zelllinien für 6, 24 und 36 h mit CoCl_2 behandelt wurden. Hierbei zeigte sich im zeitlichen Verlauf von 6 bis 36 h der CoCl_2 -Behandlung eine deutliche Abnahme des Verhältnisses von OPA1-L zu OPA1-S in eGFP- und SIRT4-eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen (Abb. 19 A,B). Im Gegensatz hierzu konnte in SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen über alle analysierten Zeiträume eine vermehrte Stabilisierung von OPA1-L beobachtet werden (Abb. 19) [182]. Diese ist assoziiert mit einer vermehrten Fusion von Mitochondrien. Zusammenfassend zeigte sich nach CoCl_2 -Behandlung neben der reduzierten LC3B-II-Antwort (Abb. 15 und Abb. 16) eine vermehrte Stabilisierung von OPA1-L in SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen.

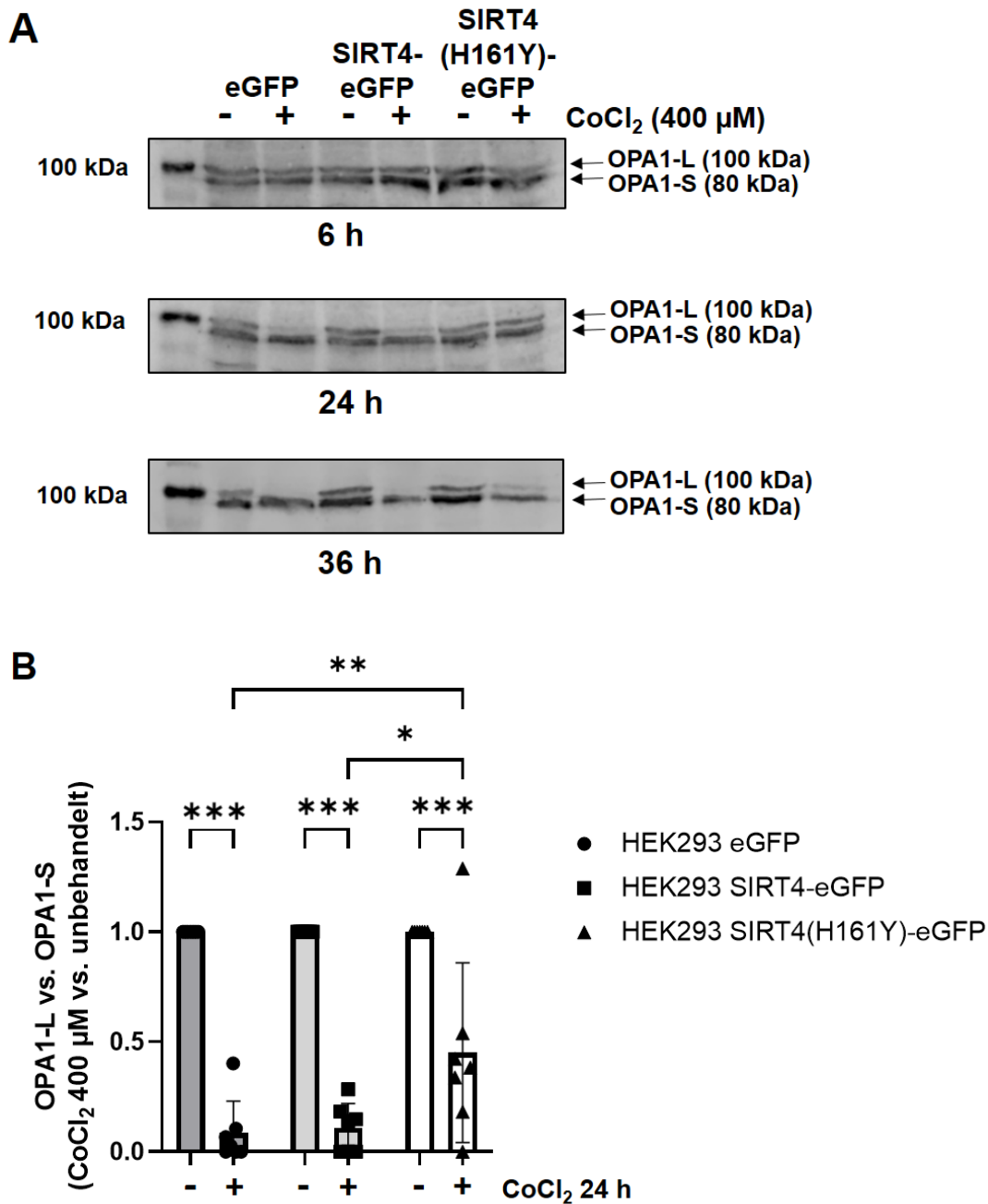


Abb. 19: SIRT4(H161Y) stabilisiert OPA1-L unter CoCl₂-induzierter Pseudohypoxie.

(A) Westernblot-Analyse von OPA1 nach CoCl₂-Behandlung (400 μM) der HEK 293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen für 6, 24 und 36 h. (B) Gezeigt ist die relative statistische Auswertung der OPA1-L-Signale nach CoCl₂-Behandlung für 24 h in Bezug auf die OPA1-S-Signale sowie auf unbehandelte Zellen. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *Two-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; N = 7). Publikation der Ergebnisse als Preprint in Lehmkuhl, Amin *et al.*, 2025 [182].

Im nächsten Schritt wurde die Rolle von OPA1 in der Autophagieantwort von SIRT4(H161Y)-exprimierenden HEK293-Zellen durch Einsatz des OPA1-spezifischen Inhibitors MYLS22 (1.2.2) getestet. Der OPA1 Inhibitor MYLS22 wurde bisher als mögliches Therapeutikum in

der Krebstherapie vorgestellt (1.2.2). Zum Zeitpunkt der Experimente dieser Arbeit wurden noch keine Untersuchungen an HEK293-Zellen mit MYLS22 veröffentlicht und somit die Wirkung auf die OPA1-Mengen nicht beschrieben. Daher wurden zunächst verschiedene Konzentrationen an MYLS22 und deren Wirkung auf die OPA1-L/S-Proteinmengen in HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen analysiert. Dabei waren die Konzentrationen angelehnt an die Untersuchungen von Zamberlan *et al.* [85] in Brustkrebszellen. Für diese Experimente wurden die Zellen entsprechend 4.3.1 ausgebracht und einer Westernblot-Analyse unterworfen. Die Zellen wurden mit MYLS22-Konzentrationen von 5, 20 oder 50 μM für 24 h behandelt. Bei der Konzentration von 50 μM MYLS22 ließ sich im Vergleich zu den anderen verwendeten Konzentrationen ein deutlicher Abfall des OPA1-L/OPA1-S-Verhältnisses erkennen (Abb. 20A,B). Aufgrund dieses Befundes wurde für die weiteren Experimente eine Konzentration von 50 μM MYLS22 eingesetzt. Ein reduziertes OPA1-L/OPA1-S-Verhältnis ist assoziiert mit vermehrter Fission von Mitochondrien und entsprechender Begünstigung der Mitophagie.

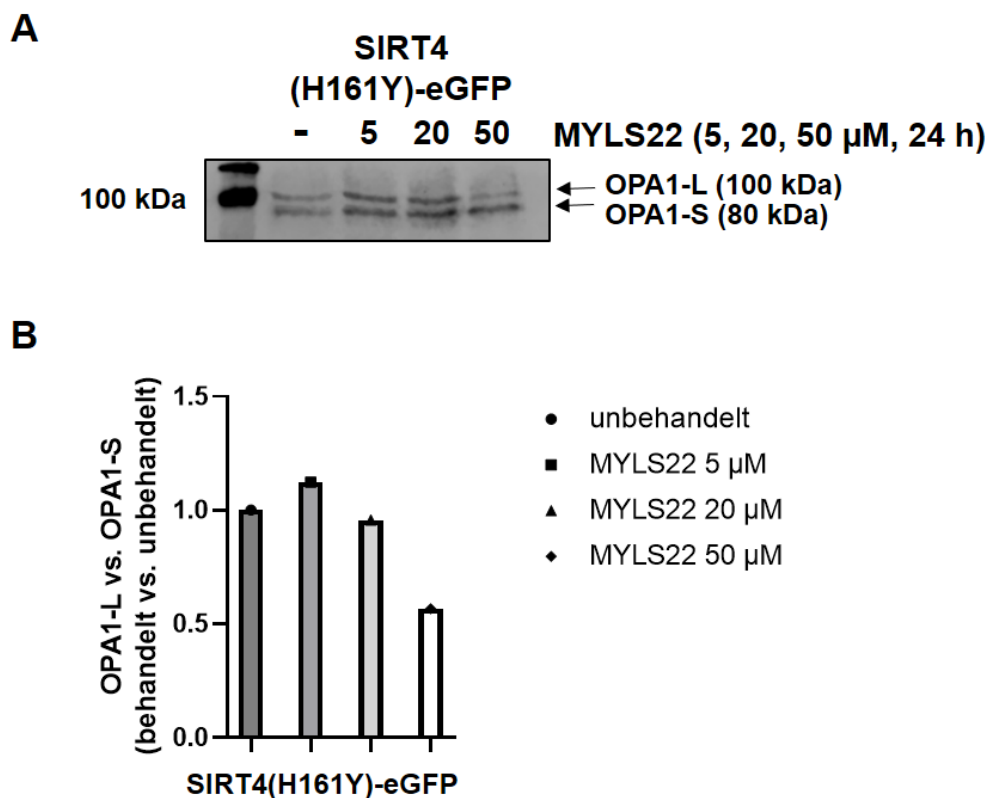


Abb. 20: Der OPA1-Inhibitor MYLS22 senkt bei einer Konzentration von 50 μM das OPA1-L/OPA1-S-Proteinverhältnis in HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen.

(A) Dargestellt ist eine Westernblot-Analyse von OPA1 bei HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP unter Behandlung mit 5, 20 oder 50 μM MYLS22 für 24 h. (B) Gezeigt ist eine relative graphische Darstellung der OPA1-L-Signale in Bezug auf die OPA1-S-Signale sowie auf unbehandelte Zellen (N = 1). Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer graphischen Darstellung mittels *GraphPad Prism*.

HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen wurden entsprechend 4.3.1 ausgebracht, behandelt und analysiert. Es erfolgte eine Behandlung der Zellen mit 50 μ M MYLS22 in Anwesenheit und Abwesenheit von CoCl_2 für 24 h. Vor diesem Hintergrund erfolgte die Analyse der OPA1-L/OPA1-S- und LC3B-II-Proteinmengen (Abb. 21).

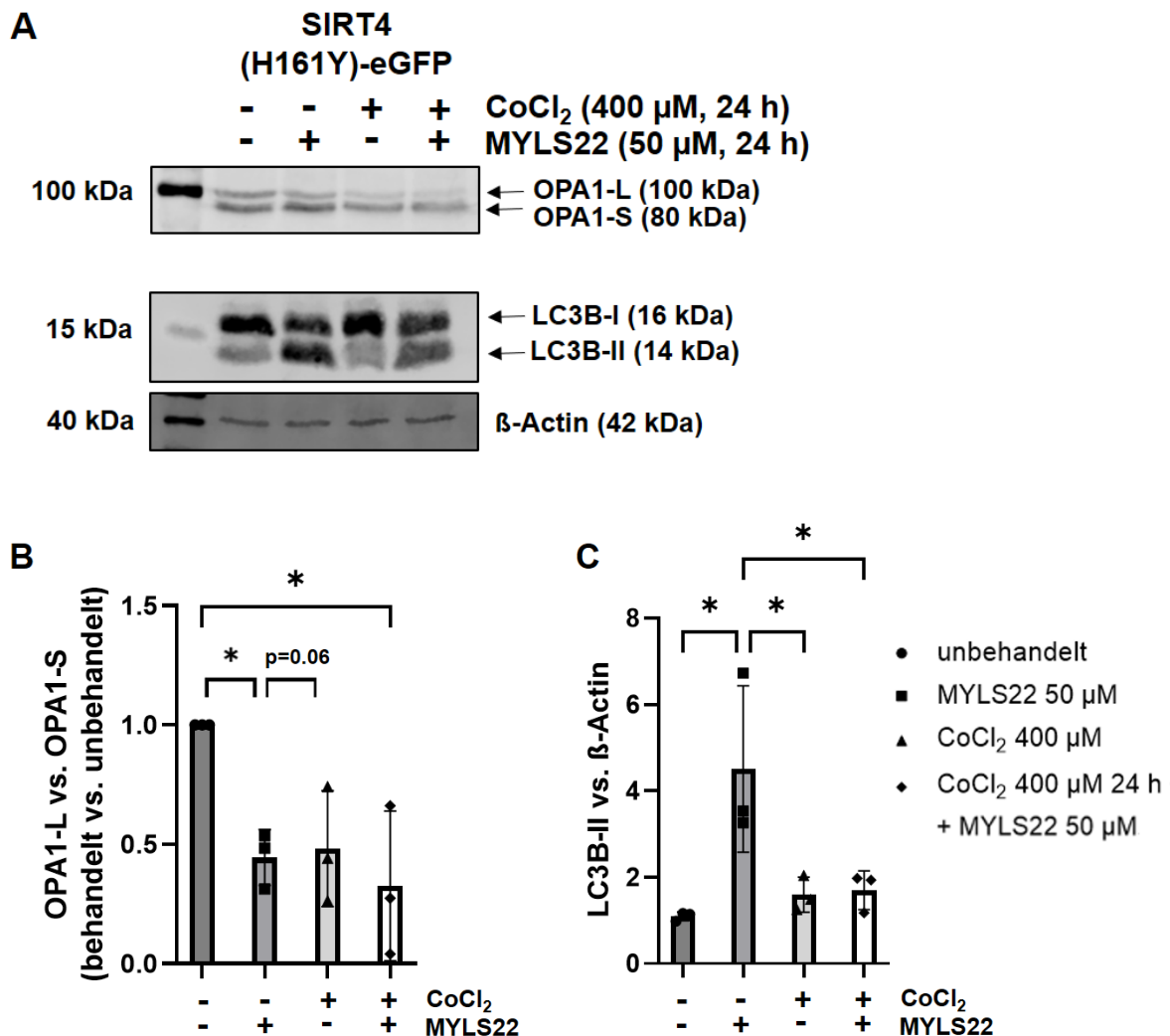


Abb. 21: MYLS22-vermittelte Inhibition von OPA1 führt nicht zu erhöhten LC3B-II-Proteinmengen in CoCl_2 -behandelten HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen.

(A) Westernblot-Analyse von OPA1, LC3B-I und LC3B-II mit β -Actin als Ladungskontrolle nach Behandlung von HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen mit MYLS22 (50 μ M) und CoCl_2 (400 μ M). (B) Gezeigt ist eine relative statistische Auswertung der OPA1-L-Signale in Bezug auf die OPA1-S-Signale sowie auf unbehandelte Zellen. (C) Gezeigt ist eine statistische Auswertung der LC3B-II-Signale in Bezug auf die Ladungskontrolle β -Actin. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *One-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (* $p < 0,05$; $N = 3$). Publikation der Ergebnisse als Preprint in Lehmkühl, Amin *et al.*, 2025 [182].

Nach der Behandlung mit MYLS22 zeigte sich wie erwartet analog zu Abb. 20 ein Abfall des Verhältnisses von OPA1-L zu OPA1-S (Abb. 21A,B). Interessanterweise zeigte sich durch die alleinige Behandlung mit MYLS22 ein Anstieg an LC3B-II. Jedoch konnte kein signifikanter

Anstieg von LC3B-II und somit der Autophagie nach Kombinationsbehandlung mit MYLS22 und CoCl₂ erreicht werden (Abb. 21A,C). Zusammenfassend zeigte sich nach der Behandlung mit MYLS22 und CoCl₂ ein Abfall des OPA1-L/OPA1-S-Verhältnisses, nicht jedoch ein Anstieg von LC3B-II. Diese Befunde sprechen dafür, dass die erhöhten OPA1-L-Proteinmengen – sowie die damit assoziierte vermehrte mitochondriale Fusion – keinen ausschlaggebenden Effekt auf die reduzierten LC3B-II-Proteinmengen haben. Somit scheint die Autophagie/Mitophagie nach CoCl₂-Behandlung in SIRT4(H161Y)-exprimierenden Zellen nicht maßgeblich davon beeinflusst zu werden [182].

4.4 BafA1 hat keinen Einfluss auf die LC3B-II-Proteinmengen in SIRT4(H161Y)-exprimierenden Zellen nach Behandlung mit CoCl₂

Um den unerwartet geringen Anstieg an LC3B-II in HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen nach CoCl₂-Behandlung auch in Bezug auf den *autophagic flux*, das heißt das Maß für Autophagosomenabbau (1.1.2) zu untersuchen, wurden HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen mit BafA1 behandelt. BafA1 ist ein Inhibitor der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen sowie der vakuolären H⁺-ATPase und inhibiert somit den Abbau durch die Lysosomen. Durch die Behandlung mit BafA1 kann zwischen einer verminderten Rate an Autophagie und somit einer verringerten Umwandlung von LC3B-I zu LC3B-II sowie einem erhöhten Abbau von LC3B-II über eine gesteigerte Autophagosomen-Lysosomen Fusion differenziert werden (1.1.1). Für diese Experimente wurden HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen wie in 4.3.1 beschrieben ausgebracht, behandelt und die LC3B-II-Proteinmengen nach entsprechender Behandlung mittels Western-Blot und anschließender densitometrischer Auswertung analysiert. Zusätzlich zur Behandlung mit 400 µM CoCl₂ für 24 h erfolgte die Zugabe von 500 nM BafA1 für die letzten 4 h der Behandlungsdauer. Dadurch sollte die Frage beantwortet werden, ob der fehlende Anstieg an LC3B-II durch eine Inhibition der Autophagie oder einen schnellen Abbau der Autophagosomen erfolgte (Abb. 22).

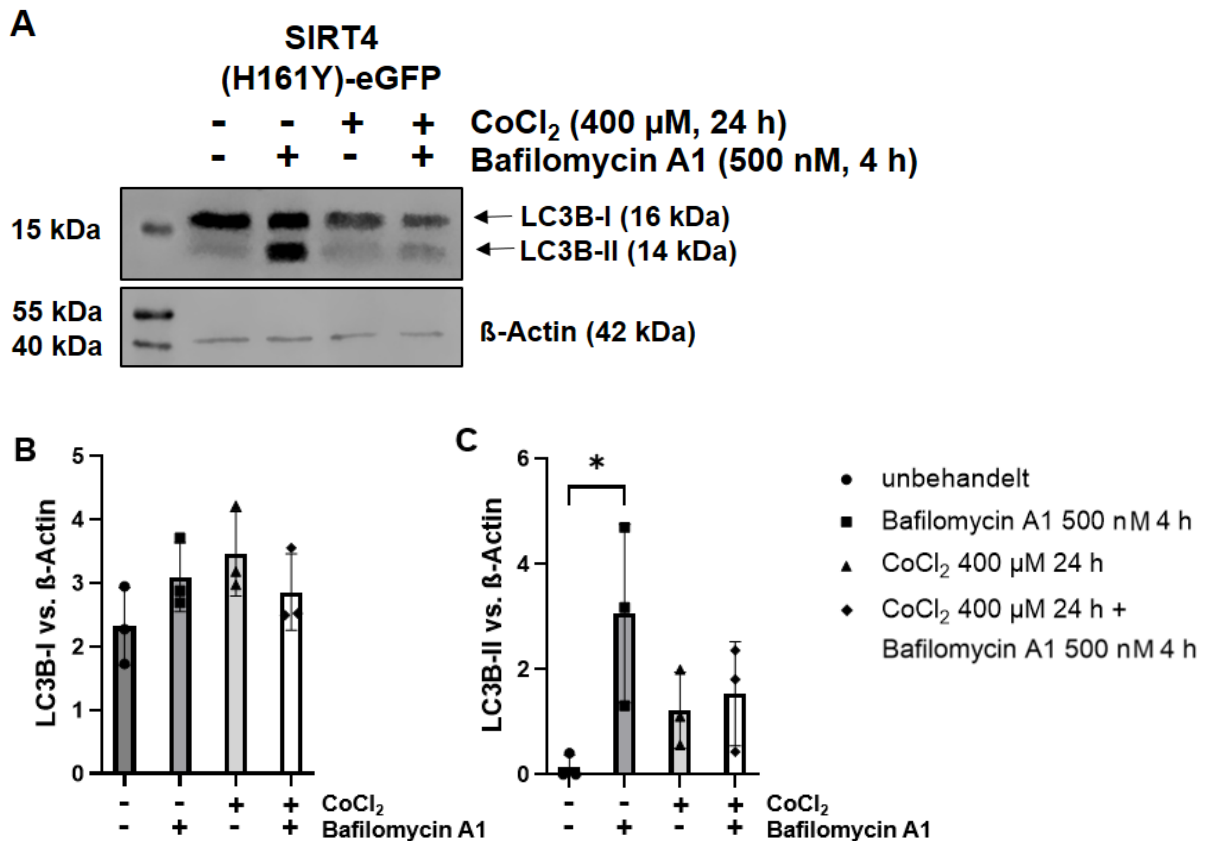


Abb. 22: Die kombinierte Behandlung mit BafA1 führt nicht zu erhöhten LC3B-II-Proteinmengen in CoCl₂-behandelten HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen.

(A) Darstellung einer Westernblot-Analyse von LC3B-I und LC3B-II mit β-Actin als Ladungskontrolle nach Behandlung mit CoCl₂ (400 μM) für 24 h und BafA1 (500 nM) für 4 h. (B) Gezeigt ist die statistische Auswertung der LC3B-I-Signale in Bezug auf die Ladungskontrolle β-Actin. (C) Gezeigt ist die statistische Auswertung der LC3B-II-Signale in Bezug auf die Ladungskontrolle β-Actin. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *One-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (**p* < 0,05; *N* = 3). Publikation der Ergebnisse als Preprint in Lehmkühl, Amin *et al.*, 2025 [182].

Interessanterweise resultierte die alleinige Behandlung von SIRT4(H161Y)-eGFP-HEK293-Zellen mit BafA1 in einem etwa dreifachen Anstieg von LC3B-II (Abb. 22A,C). Im Gegensatz hierzu ließ sich in BafA1- und CoCl₂-kbehandelten Zellen kein Anstieg der LC3B-II-Proteinmengen detektieren (Abb. 22A,C). Zusammenfassend schien in SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen die Zunahme von LC3B-II unter Pseudohypoxie inhibiert zu sein, da sich kein Anstieg an LC3B-II-Proteinmengen nach Inhibition der Autophagosomen-Lysosomen-Fusion erreichen ließ. Somit konnte kein gesteigerter Abbau von LC3B-II als Ursache für die verringerten LC3B-II-Proteinmengen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Inhibition des LC3B-II-Anstieges in SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen in der frühen Phase der Autophagie erfolgte, beispielsweise während der Autophagieinitiation oder der Konversion von LC3B-I zu LC3B-II [182].

4.5 SIRT4(H161Y) stabilisiert die auf die frühe Autophagie inhibitorisch wirkenden Phosphorylierungen von ULK1 an Serin 758 und 638

Die bisherigen Befunde, im Besonderen die BafA1-Daten (4.4), ließen vermuten, dass die fehlende Hochregulation von LC3B-II in pseudohypoxischen HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen auf eine gestörte frühe Phase der Autophagie zurückzuführen ist. Dabei könnte möglicherweise die Autophagieinduktion betroffen sein. Um den Einfluss von SIRT4(H161Y) auf die frühe Autophagie zu analysieren, wurde die für die Initiation der Autophagie zentrale regulatorische Kinase ULK1 analysiert. Deren Aktivierung oder Inhibition bezüglich der Autophagieinduktion wird durch die mTORC1- und AMPK-vermittelte beziehungsweise AMPK-regulierte Phosphorylierung von ULK1 reguliert. Im Besonderen erfolgt eine Inhibition der Autophagieinduktion durch mTORC1-vermittelte Phosphorylierungen von ULK1 an den Serinen 758 und 638, wodurch die AMPK-vermittelte Aktivierung von ULK1 verhindert wird (1.1.1). Im Folgenden wurde daher ein möglicher Einfluss von SIRT4(H161Y) auf diese autophagieinhibitorischen ULK1-Phosphorylierungen untersucht. Für diese Experimente wurden HEK293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen wie in 4.3.1 beschrieben ausgebracht, behandelt und analysiert. Zusätzlich zur Behandlung mit 400 μ M CoCl₂ für 24 h erfolgte die Zugabe von 500 nM BafA1 für die letzten 4 h der Behandlungsdauer (Abb. 23 und Abb. 24).

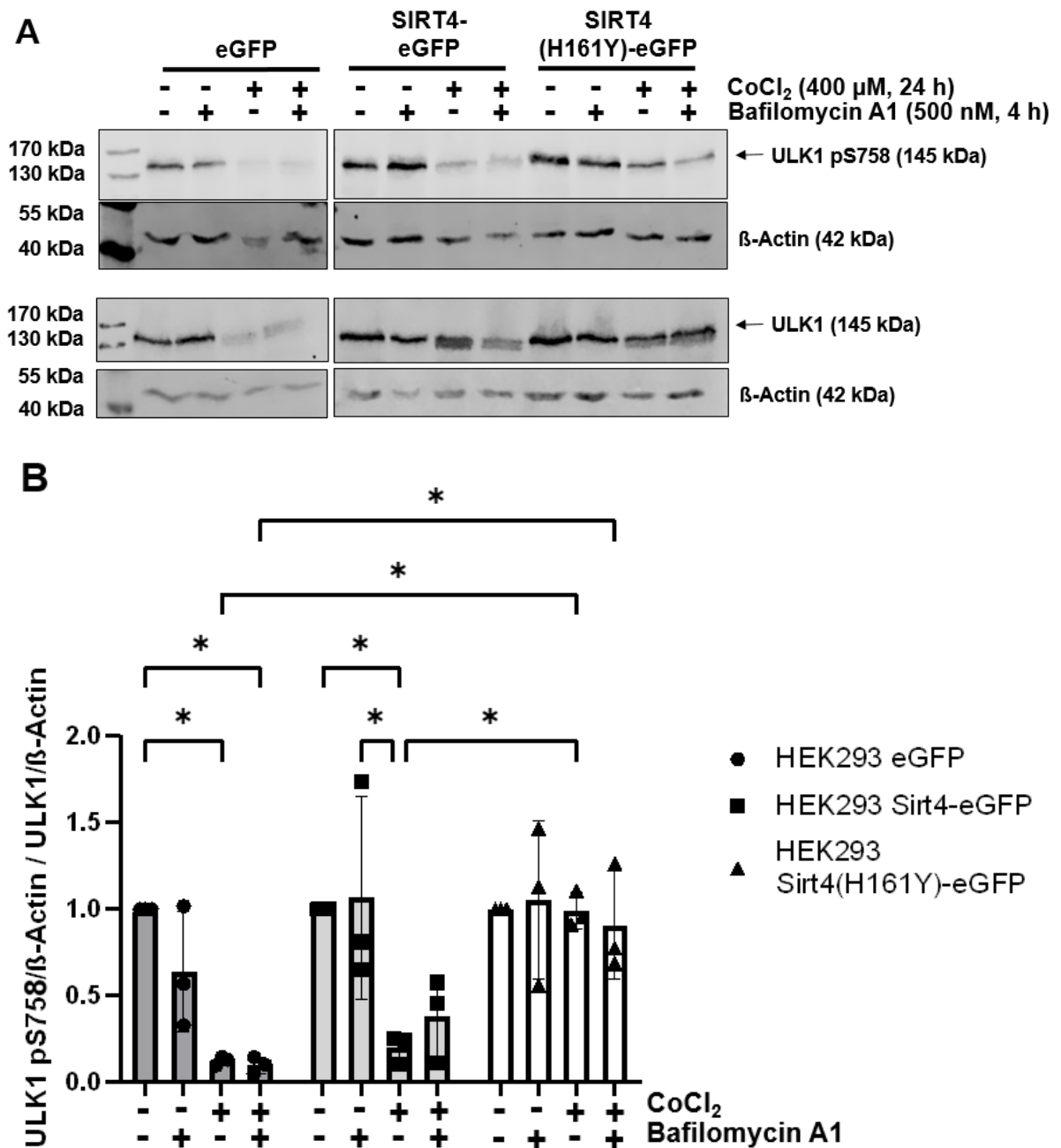


Abb. 23: Stabilisierung von ULK1 pS758 durch SIRT4(H161Y)-Expression unter Pseudohypoxie. (A) Darstellung einer Westernblot-Analyse von ULK1 pS758 und ULK1 mit β -Actin als jeweilige Ladungskontrolle nach Behandlung von HEK293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen mit CoCl₂ (400 μ M) für 24 h. BafA1 (500 nM) wurde für die letzten 4 h der CoCl₂-Behandlung zugegeben. (B) Gezeigt ist die statistische Auswertung der ULK1 pS758-Signale in Bezug auf ULK1 und die jeweiligen β -Actin Ladungskontrollen. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *Two-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (* $p < 0,05$; $N = 3$). Publikation der Ergebnisse als Preprint in Lehmkuhl, Amin *et al.*, 2025 [182].

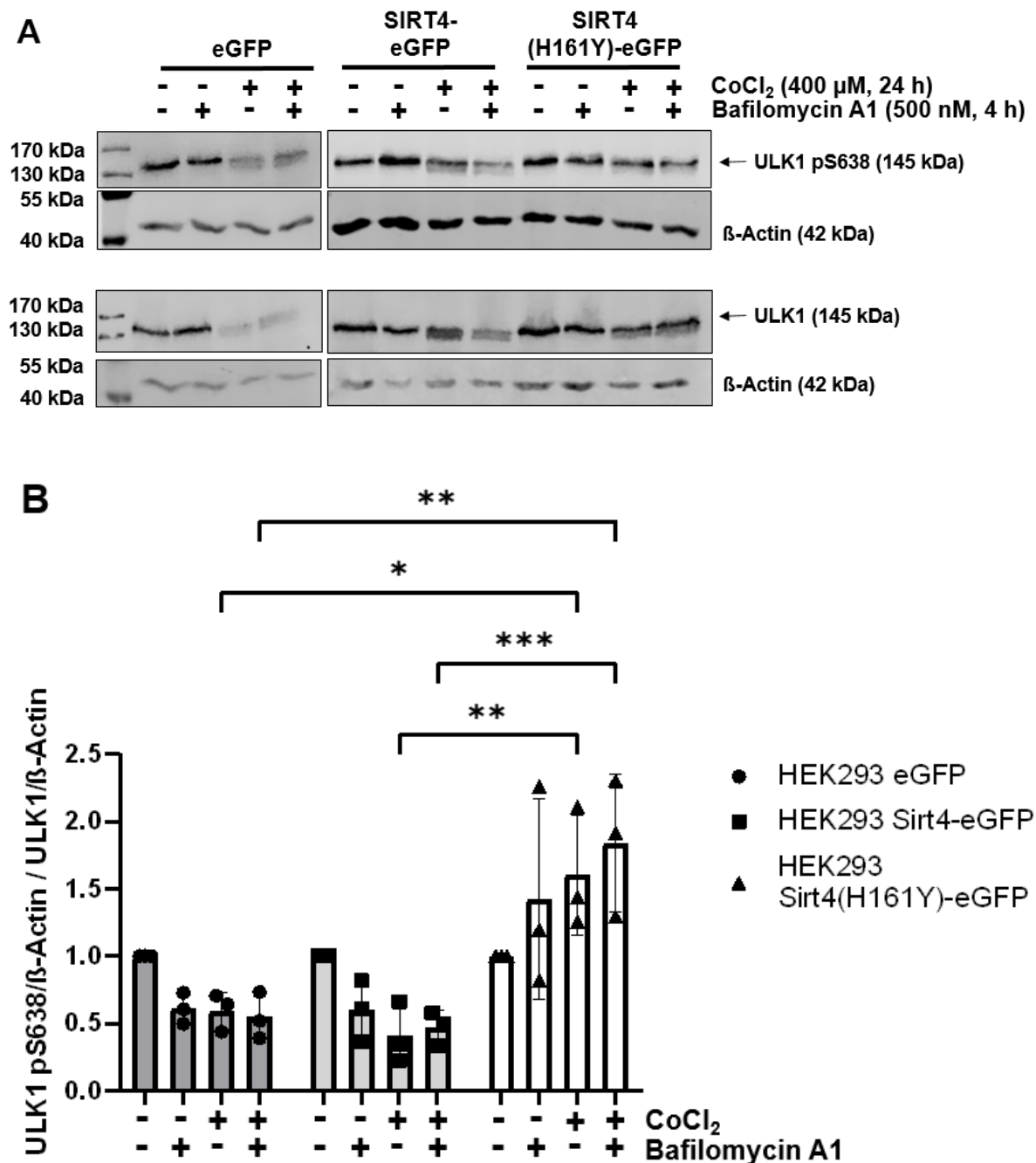


Abb. 24: Stabilisierung von ULK1 pS638 durch SIRT4(H161Y)-Expression unter Pseudohypoxie. (A) Darstellung einer Westernblot-Analyse von ULK1 pS638 und ULK1 mit β-Actin als jeweilige Ladungskontrolle nach Behandlung von HEK293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen mit CoCl₂ (400 μM) für 24 h. BafA1 (500 nM) wurde für die letzten 4 h der CoCl₂-Behandlung zugegeben. (B) Gezeigt ist die statistische Auswertung der ULK1 pS638-Signale in Bezug auf ULK1 und die jeweiligen β-Actin Ladungskontrollen. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *Two-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; N = 3). Publikation der Ergebnisse als Preprint in Lehmkuhl, Amin *et al.*, 2025 [182].

Interessanterweise zeigten SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierende HEK293-Zellen trotz Pseudohypoxie durch CoCl₂-Behandlung weiterhin signifikant erhöhte Proteinmengen von

ULK1 pS758 (Abb. 23) und ULK1 pS638 (Abb. 24). Im Gegensatz hierzu konnte in HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 eGFP-Zellen ein deutlicher Abfall der ULK1 pS758- und ULK1 pS638-Proteinmengen nachgewiesen werden (Abb. 23 und Abb. 24). Bezüglich der Behandlungen mit CoCl_2 vs. CoCl_2 und BafA1 wurden keine Unterschiede in den ULK1 pS758- und ULK1 pS638-Proteinmengen zwischen den drei untersuchten Zelllinien beobachtet [182]. Dies ist im Einklang damit, dass BafA1 die späte Phase der Autophagie inhibiert (1.1.1).

Zur weiteren Analyse von frühen Markern der Autophagie erfolgte eine erste Untersuchung der Autophagiefaktoren ATG13 und FIP200 (Abb. 25 und Abb. 26). Diese werden während der Autophagieinitiation phosphoryliert und sind maßgeblich an den frühen Prozessen der Autophagie beteiligt (1.1.1). In der vorliegenden Arbeit wurden die Marker in ihrem unphosphorylierten Zustand analysiert.

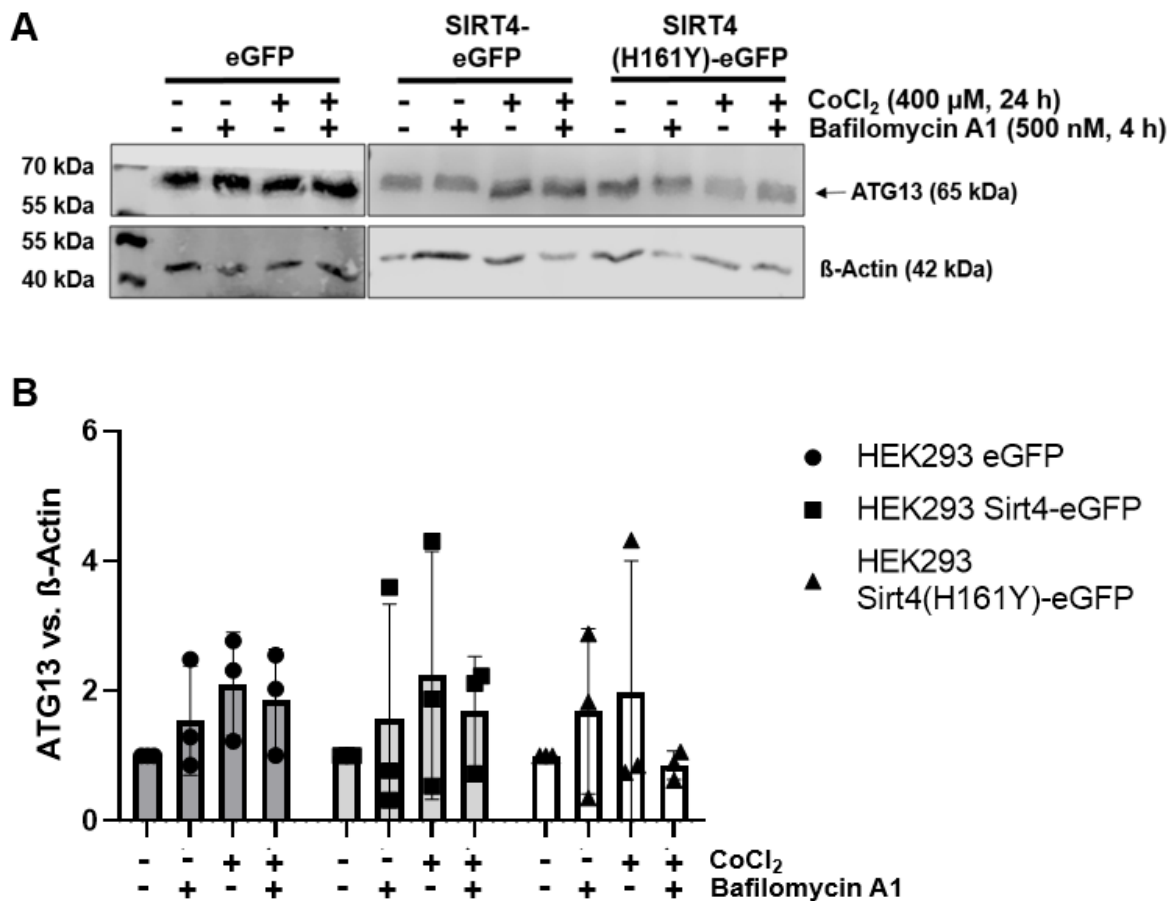


Abb. 25: Die ATG13-Proteinmengen werden in den drei analysierten Zelllinien unter Pseudohypoxie nicht signifikant beeinflusst.

(A) Darstellung einer Westernblot-Analyse von ATG13 mit β -Actin als Ladungskontrolle. HEK293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen wurden einer Behandlung mit CoCl_2 (400 μM) für 24 h unterzogen. BafA1 (500 nM) wurde für die letzten 4 h der CoCl_2 -Behandlung zugegeben. (B) Gezeigt ist die statistische Auswertung der ATG13-Signale in Bezug auf die Ladungskontrolle β -Actin. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm

Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *Two-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (N = 3).

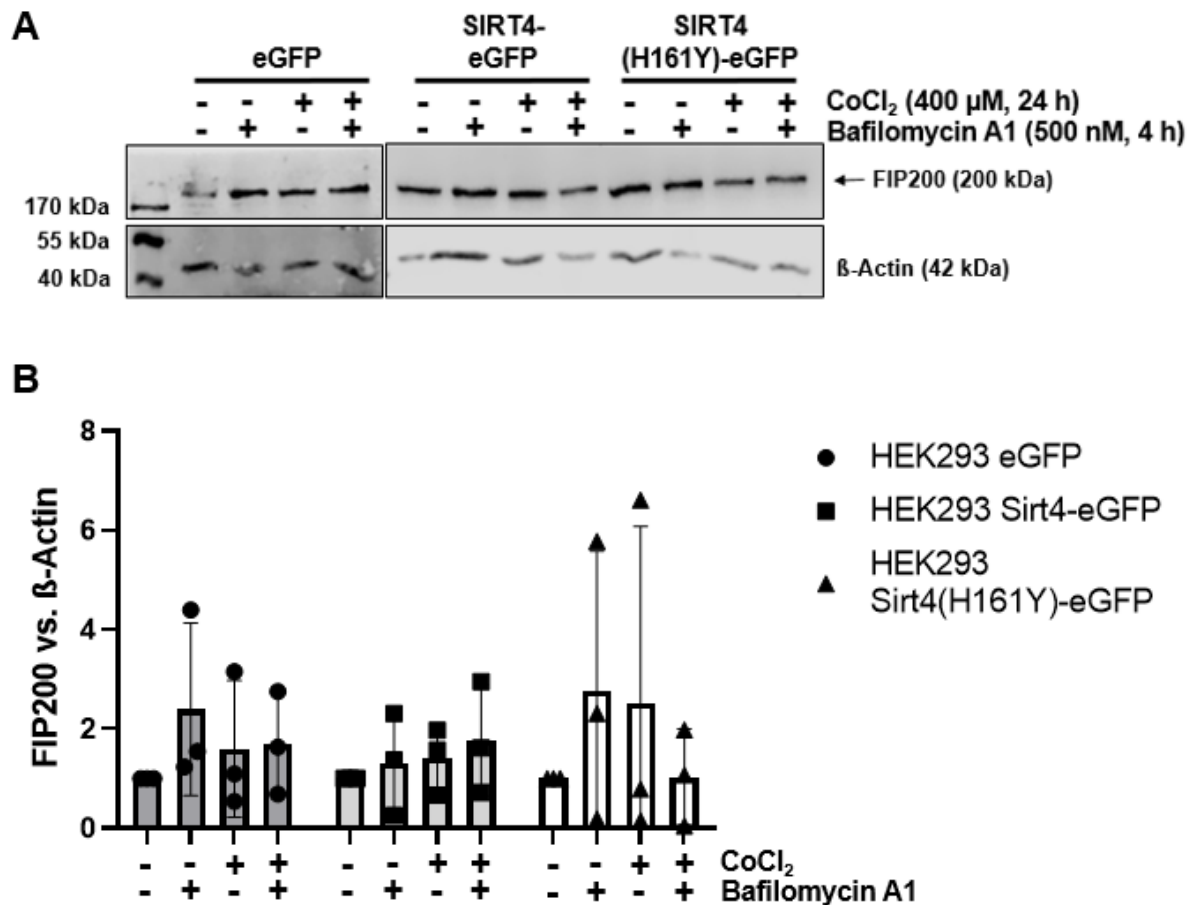


Abb. 26: Die FIP200-Proteinmengen werden in den drei analysierten Zelllinien unter Pseudohypoxie nicht signifikant beeinflusst.

(A) Darstellung einer Westernblot-Analyse von FIP200 mit β -Actin als Ladungskontrolle. HEK293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen wurden einer Behandlung mit CoCl_2 (400 μM) für 24 h unterzogen. BafA1 (500 nM) wurde für die letzten 4 h der CoCl_2 -Behandlung zugegeben. (B) Gezeigt ist die statistische Auswertung der FIP200-Signale in Bezug auf die Ladungskontrolle β -Actin. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *Two-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (N = 3).

HEK293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen zeigten hierbei vergleichbare Proteinmengen von ATG13 und FIP200. Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Proteinmengen sowohl basal als auch nach CoCl_2 -Behandlung (Abb. 25 und Abb. 26). Inwieweit die Überexpression von SIRT4 auch einen Einfluss auf den Phosphorylierungszustand von ATG13 und FIP200 nimmt, müsste in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Zusammenfassend zeigte sich nach CoCl_2 -Behandlung eine Stabilisierung der Phosphorylierung von ULK1 an Ser758 (Abb. 23) und Ser638 (Abb. 24) in SIRT4(H161Y)-

exprimierenden Zellen einhergehend mit einer inhibierten LC3B-II-Antwort (Abb. 15 und Abb. 16). Diese Befunde lassen somit vermuten, dass die Überexpression der dominant-negativ wirkenden SIRT4-Mutante H161Y die Autophagieantwort in der frühen Phase der Autophagie beziehungsweise der Autophagieinduktion über den mTORC1-ULK1 Ser758/Ser638-Signalweg negativ reguliert [182].

4.6 Die Expression von SIRT4 und SIRT4(H161Y) stabilisiert OPA1-L ebenfalls unter klassisch hypoxischen Bedingungen (1 % O₂)

Neben der CoCl₂-Behandlung von Zellen als Zellkulturmodell der Pseudohypoxie kann die zelluläre Hypoxieantwort klassisch durch eine Reduktion des O₂-Partialdrucks (entsprechend einem Sauerstoffgehalt von 1 % O₂ in der Atmosphäre) induziert werden (1.2.4). Im Rahmen erster Experimente sollte der Einfluss der Hypoxie (1 % O₂) auf die OPA1-L/OPA1-S-Proteinmengen in HEK293 eGFP, HEK293 SIRT4-eGFP und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP unter Zuhilfenahme der Hypoxiekammer des Instituts für Molekulare Kardiologie untersucht und mit den Befunden in Abb. 19 verglichen werden. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.3.7 beschrieben, in Zellkulturinkubatoren einer hypoxischen Umgebung ausgesetzt. Zu definierten Zeitpunkten erfolgte die einzelne Entnahme der Zellen aus der Hypoxiekammer. Nach der Zellernte wurden die OPA1-Proteinmengen mithilfe einer Westernblot-Analyse quantifiziert. Wie in Abb. 27 dargestellt, ließ sich auch unter klassischer Hypoxie eine Verschiebung des Verhältnisses von OPA1-L zu OPA1-S in einer zeitlichen Dynamik nachweisen. Hierbei war eine Abnahme von OPA1-L zugunsten von OPA1-S erkennbar. Analog zu den Befunden der Pseudohypoxieinduktion durch CoCl₂-Behandlung (Abb. 19) zeigten hypoxische SIRT4- und insbesondere die SIRT4(H161Y)-überexprimierenden Zellen ebenfalls ein deutlich erhöhtes OPA1-L/OPA1-S-Proteinverhältnis. In HEK293 eGFP-Zellen hingegen war dies stark reduziert. Somit erfolgte bei Überexpression von SIRT4 oder SIRT4(H161Y) sowohl unter pseudohypoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen eine Stabilisierung von OPA1-L und somit wahrscheinlich auch eine verringerte Umwandlung von OPA1-L zu OPA1-S. Diese Befunde würden für eine verstärkte Fusion von Mitochondrien in Zellen mit Überexpression von SIRT4 und vor allem SIRT4(H161Y) sprechen. Jedoch konnte die pharmakologische Hemmung von OPA1 nicht die autophagieassoziierte fehlende LC3B-II-Antwort in HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen wiederherstellen.

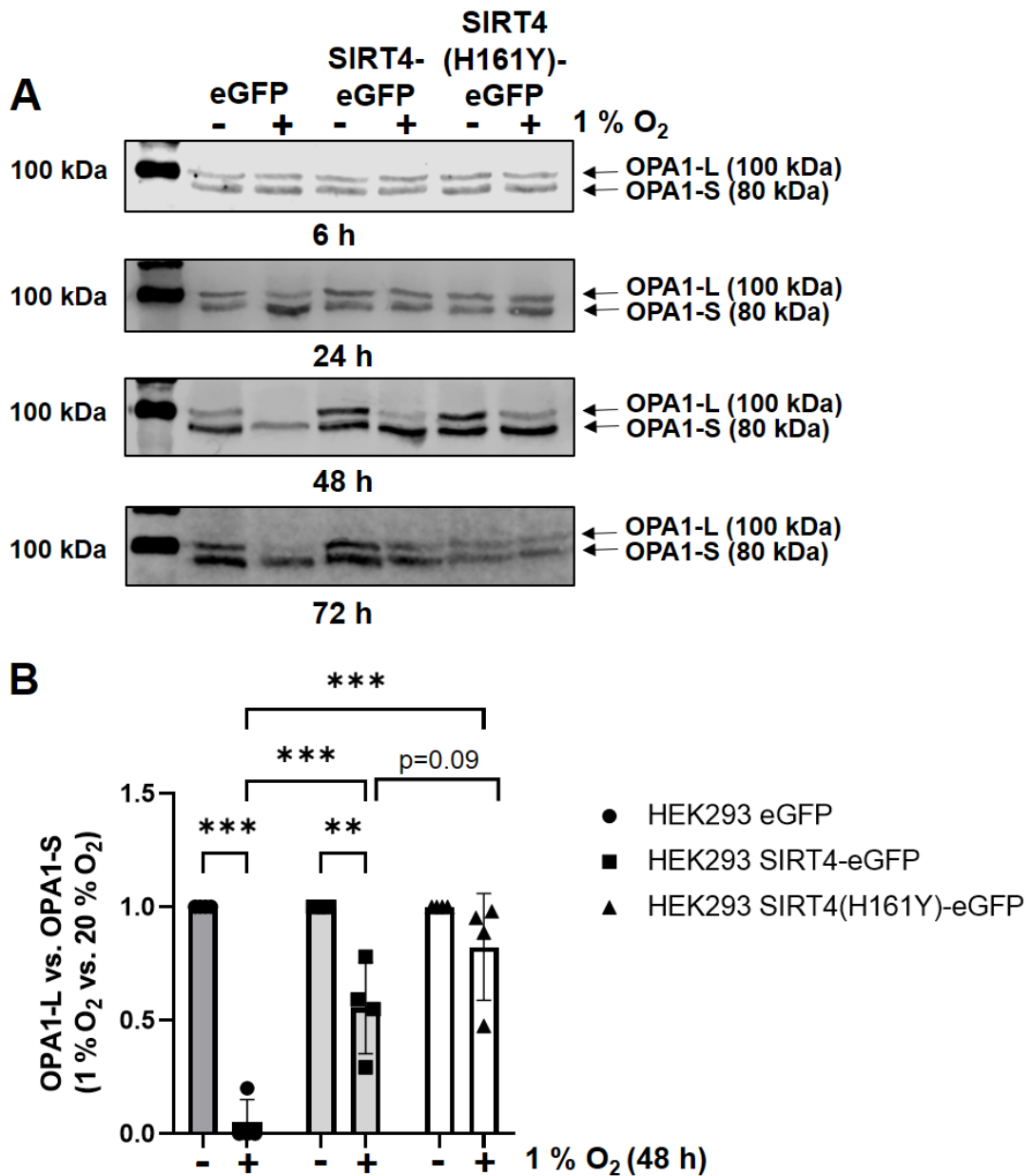


Abb. 27: SIRT4 und SIRT4(H161Y) vermitteln eine starke Stabilisierung von OPA1-L unter klassischer Hypoxie (1 % O₂ Sauerstoffgehalt).

(A) Dargestellt ist eine Westernblot-Analyse von OPA1 in HEK293 eGFP-, HEK293 SIRT4-eGFP- und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen nach Behandlung mit 1 % O₂ für 6, 24, 48 und 72 h. (B) Gezeigt ist die relative statistische Auswertung der OPA1-L-Signale in Bezug auf die OPA1-S-Signale sowie auf unbehandelte Zellen nach Behandlung der Zellen mit 1 % O₂ für 48 h. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mittels *ImageJ* gefolgt von einer statistischen Analyse mittels *GraphPad Prism*. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse wurde eine *Two-Way-Anova*, gefolgt vom *Tukey's-Test*, verwendet (**p < 0,01, ***p < 0,001; N = 4).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der regulative Einfluss des metabolischen Tumorsuppressors SIRT4 (1.3.1) auf die Autophagie analysiert. Hierbei wurde insbesondere untersucht, ob sich die Interaktion von SIRT4 mit HDAC6 und OPA1 [99, 152] auf die Regulation der Autophagie unter CoCl₂-induzierter Pseudohypoxie auswirkt. Dafür wurden HEK293-Zellen verwendet, welche ektopisch SIRT4-eGFP oder die enzymatisch inaktive Mutante SIRT4(H161Y)-eGFP, exprimieren (2.9). Hierbei zeigten HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen nach CoCl₂-Behandlung nur einen marginalen, signifikant reduzierten Anstieg des Autophagiemarkers LC3B-II. Dagegen ließ sich in SIRT4-eGFP- und eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen ein deutlicher Anstieg an LC3B-II nachweisen (Abb. 15 und Abb. 16). Diese Befunde deuten auf eine reduzierte Autophagieantwort nach CoCl₂-induzierter Pseudohypoxie durch die dominant-negativ wirkende Mutante SIRT4(H161Y) hin. Als mögliche Ursachen der reduzierten LC3B-II-Proteinmengen wurden die SIRT4-HDAC6- und SIRT4-OPA1-Interaktionen und -Signalwege vermutet und untersucht (Abb. 28). Dabei konnten in HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen auffallend erhöhte HDAC6-Proteinmengen – und dementsprechend erniedrigte Mengen an ac.K40 α -Tubulin – nachgewiesen werden (Abb. 17). Des Weiteren waren auch die OPA1-L/OPA1-S-Proteinverhältnisse durch SIRT4(H161Y)-Expression deutlich erhöht (Abb. 19). Dies deutet auf eine gesteigerte mitochondriale Fusion und infolgedessen auf eine reduzierte mitochondriale Autophagie (Mitophagie) hin. Basierend auf diesen Befunden erfolgten Inhibitorexperimente mittels Tubacin (HDAC6) und MYLS22 (OPA1). Diese führten jedoch nicht zu einer wiederhergestellten, normalen Zunahme der LC3B-II-Proteinmengen in CoCl₂-behandelten HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen (Abb. 18 und Abb. 21). Somit schienen die SIRT4-HDAC6- und SIRT4-OPA1-Interaktionen und -Signalwege keinen ursächlichen Einfluss auf die Deregulation der CoCl₂-induzierten Autophagie in HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen zu haben. Interessanterweise konnte der beobachtete fehlende Anstieg an LC3B-II/Autophagie unter CoCl₂-Behandlung von HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen nicht durch BafA1, einem Inhibitor der Autophagosom-Lysosom-Fusion, beeinflusst werden (Abb. 22). Daraus ergab sich die weitere Arbeitshypothese, dass SIRT4(H161Y) die frühe Phase der Autophagie, möglicherweise die Autophagieinitiation, durch einen bisher ungeklärten Mechanismus inhibiert. Deshalb erfolgte anschließend eine Analyse der Proteine ULK1, ATG13 und FIP200, da diese für die Initiation der Autophagie von Bedeutung sind (1.1.1). Dabei zeigten sich interessanterweise erhöhte Proteinmengen an phosphoryliertem ULK1 pS758 und ULK1 pS638

in HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen (Abb. 23 und Abb. 24). In diesem Kontext ist hervorzuheben, dass die ULK1-Serinpositionen 758 und 638 durch mTORC1 phosphoryliert werden, wodurch die Autophagieinitiation inhibiert wird (1.1.1). Somit könnte die beobachtete Inhibition des CoCl₂-induzierten LC3B-II-Anstieges in HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen über die Stabilisierung der mTORC1-vermittelten Phosphorylierung von ULK1 an Ser758 und Ser638 erfolgen. Zusammenfassend spricht dieses Arbeitsmodell (Abb. 30) für eine kritische Funktion von SIRT4 in der ULK1-vermittelten Initiation der Autophagie.

5.2 Die Rolle von SIRT4 in der Autophagieregulation

Bisher ist der molekulare Mechanismus der SIRT4-vermittelten Autophagieregulation unklar. Im Gegensatz zu eGFP-Kontrollzellen und SIRT4-exprimierenden Zellen führte die Überexpression von SIRT4(H161Y) zu einer deutlich reduzierten LC3B-II-Antwort nach CoCl₂-induzierter Pseudohypoxie (Abb. 15 und Abb. 16). Dieser Befund könnte darauf schließen lassen, dass die enzymatische Aktivität von SIRT4 notwendig für die LC3B-II-Bildung ist. Somit ist SIRT4 möglicherweise in der Regulation des *autophagic flux* involviert. Der Effekt der reduzierten LC3B-II-Bildung unter Pseudohypoxie trat ausschließlich in SIRT4(H161Y)-exprimierenden Zellen auf – trotz der deutlich geringeren Expression von SIRT4(H161Y)-eGFP im Vergleich zu SIRT4-eGFP in den stabilen HEK293-Zelllinien (Abb. 9). Ebenso fiel der Anstieg der HIF-1 α -Proteinmengen in SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen nach CoCl₂-Behandlung geringer aus, als dies bei eGFP- und SIRT4-eGFP-exprimierenden Zellen der Fall war (Abb. 11). Dies beeinflusste die Ergebnisse wahrscheinlich jedoch nicht, da in CoCl₂-behandelten HEK293 SIRT4(H161Y)-myc-Flag-Zellen ein normaler Anstieg der HIF-1 α -Proteinmengen sowie eine nach CoCl₂-Behandlung ebenfalls reduzierte LC3B-II-Aktivierung beobachtet wurde [182, 183]. Letztere wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe des GFP-LC3-RFP-LC3 Δ G/*autophagic flux*-Systems [184] in HEK293 myc-Flag-, HEK293 SIRT4-myc-Flag- und HEK293 SIRT4(H161Y)-myc-Flag-Zellen gemessen [182, 183].

Verschiedene Studien assoziierten SIRT4 mit der positiven wie auch negativen Regulation der Autophagie (Tabelle 14). Eine Studie zeigte, dass in duktaalen Adenokarzinomzellen des Pankreas SIRT4 offenbar das Tumorwachstum inhibiert und die Autophagie steigert [163]. Dabei erfolgte die Regulation der Autophagie über AMPK α und eine Phosphorylierung von p53. In SIRT4-überexprimierenden Zellen konnte hierbei eine vermehrte Bildung von Autophagosomen nachgewiesen werden [163]. Dies wurde ebenfalls in anderen Adenokarzinomen nachgewiesen [163]. Insgesamt kam die Studie zu dem Ergebnis, dass die

SIRT4-vermittelte Autophagie in duktaalen Adenokarzinomzellen des Pankreas durch den p53-Tumorsuppressorweg vermittelt wurde. Dabei wiesen Patienten mit einer geringeren SIRT4-Expression eine ungünstigere Prognose auf [163]. Des Weiteren zeigten Lang *et al.* [152], dass in SIRT4-überexprimierenden HEK293-Zellen die LC3B-II-Proteinmengen nach Störung des mitochondrialen Membranpotentials durch Behandlung mit CCCP (10 μ M / 2h) anstiegen. Dies könnte somit wahrscheinlich einen erhöhten *autophagic flux* bedingen. Im Vergleich dazu konnten die Autoren den Anstieg an LC3B-II in HEK293 eGFP- und HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen nicht nachweisen [152].

Dem entgegengesetzt wurden Studien durchgeführt, welche eine verringerte Autophagie und LC3B-II-Aktivierung in SIRT4-exprimierenden Zellen beschrieben. Beispielsweise wurde in einer Studie gezeigt, dass SIRT4 über TORC1 die Autophagie inhibiert [161]. Dies erfolgte insbesondere bei hohem Nährstoffangebot, das heißt im anabolen Zustand. Geringere Mengen an LC3B-II in SIRT4-überexprimierenden HEK293T-Zellen gingen hier mit höheren LC3B-II-Proteinmengen in SIRT4-*knockdown*-Zellen einher [161]. Da umgekehrt mTORC1 ebenfalls SIRT4 inhibieren kann, wurde dahingegen spekuliert, dass mTORC1 gleichermaßen über SIRT4-Inhibition die Autophagie inhibieren kann. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass SIRT4 für die Autophagosomenbildung notwendig ist [160]. Weiterhin konnte verzeichnet werden, dass SIRT4 über AKT und mTOR die Autophagie in Kardiomyozyten inhibiert und damit protektiv gegen eine Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität wirkt [185]. Schließlich konnte in Müller-Zellen, den Gliazellen der Retina von Ratten, der Befund erhoben werden, dass ein SIRT4-*knockdown* die Bildung von Autophagosomen steigert. Diese Effekte wurden auf den AMPK-mTOR-Signalweg zurückgeführt [162]. Die folgende Tabelle 14 stellt verschiedene Studien zu der Rolle von SIRT4 in der Autophagie dar.

Tabelle 14: Die Rolle von SIRT4 in der Autophagieregulation

Pro-Autophagie	Anti-Autophagie
SIRT4 induziert die Autophagie über AMPK und p53 in duktalem Adenokarzinomzellen des Pankreas [163]	SIRT4 inhibiert über mTORC1 die Autophagie in Hepatozyten [161]
Anstieg von LC3B-II nach CCCP-Behandlung in SIRT4-exprimierenden HEK293-Zellen [152]	SIRT4 inhibiert die Autophagie über AKT und mTOR in Kardiomyozyten [185]
SIRT4 hemmt PTEN und fördert dadurch die Autophagie in HK-2-Zellen bei akutem Nierenversagen [186]	SIRT4- <i>knockdown</i> steigert die Autophagosomenbildung in Gliazellen über den AMPK-mTOR-Signalweg [162]
SIRT4 hemmt PTEN und fördert die Autophagie in MCF-7-Zellen [165]	SIRT4 inhibiert das Wachstum von Blasenkarzinomen durch Inhibition der Autophagie [187]
SIRT4 fördert über den SNARE-Komplex die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen in HEK293T-Zellen [164]	SIRT4 inhibiert die Mitophagie über Inhibition von Extrazellulär-signal-regulierte Kinase und Drp1 in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzellen [151]

5.3 CoCl₂-induzierte Pseudohypoxie als Modell der Hypoxie

In dieser Arbeit wurde CoCl₂ als etablierter Induktor der Pseudohypoxie und Autophagie [102, 103, 114, 188] eingesetzt. Hierbei ließ sich ein typischer Anstieg der HIF-1 α -Proteinmengen nach Behandlung mit CoCl₂ nachweisen (Abb. 11) [182, 183]. In ersten Experimenten zwecks Etablierung der klassischen Hypoxiemethode (1 % O₂ Sauerstoffgehalt) erfolgte ebenfalls die Analyse der OPA1-L- und OPA1-S-Proteinmengen in den behandelten HEK293-Zelllinien. Dabei erfolgte der Vergleich der CoCl₂-Behandlung zur klassischen Hypoxie. Hierbei konnte unter beiden Bedingungen übereinstimmend die stärkste Stabilisierung von OPA1-L in HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 19 und Abb. 27).

Obwohl durch klassische Hypoxie und Pseudohypoxie eine Aktivierung von HIF-1 α erfolgt, geschieht dies durch jeweils unterschiedliche molekulare Mechanismen (1.2.4). Ein möglicher Nachteil der CoCl₂-Behandlung ist, dass diese Methode zwar eine Pseudohypoxie induziert, die Zellen aber weiterhin unter Normoxie inkubiert werden. Dadurch könnten HIF-1 α -unabhängige zelluläre Effekte, einschließlich durch O₂-Mangel hervorgerufene Genexpressionsveränderungen, im Rahmen der CoCl₂-Methode möglicherweise nicht in gleicher Weise auftreten. Zudem bestand ein mögliches Problem darin, dass nicht alle Zellen während der Inkubationsphase von 24 oder 36 h gleichmäßig mit CoCl₂ beladen wurden. Hier musste streng auf die CoCl₂-Konzentration (die entsprechende Stocklösung wurde für jedes Experiment frisch angesetzt) und eine vergleichbare Zelldichte zum Zeitpunkt der Behandlung

geachtet werden. Dies sollte sicherstellen, dass jedes Mal annähernd gleich viel CoCl_2 pro Zelle aufgenommen wurde. Ein weiterer Faktor der Behandlung mit CoCl_2 besteht darin, dass Kobalt chemische Ähnlichkeiten zu Eisen und Nickel aufweist und für die Cobalamin-Bildung unabdingbar ist [114]. Somit muss beachtet werden, welche Nebeneffekte Kobalt in den Zellen haben könnte [114]. Durch Behandlung mit CoCl_2 entstehen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies, wodurch das mitochondriale Membranpotential schneller sinken kann [189]. Zudem kommt es zur Aktivierung proapoptotischer Faktoren [189]. In diesem Zusammenhang zeigten die mikroskopischen Bilder der analysierten HEK293-Zelllinien eine morphologische Veränderung (Abrundung der Zellen), jedoch ließ sich mikroskopisch keine deutlich erhöhte Apoptoserate nachweisen (Abb. 12, Abb. 13 und Abb. 14). Nachteile beziehungsweise methodische Schwierigkeiten der klassischen Hypoxie hingegen waren, dass die Zellen nach Beendigung der hypoxischen Behandlung bis hin zur Zellyse unter normoxischen Bedingungen geerntet wurden, sodass sie ungefähr 6 bis 10 min lang nach dem Beenden der Hypoxie einer Normoxie ausgesetzt waren. Zudem erhöhte sich die Sauerstoffkonzentration bei jedem Öffnen der Inkubatortür kurzzeitig, sodass der angestrebte Sauerstoffgehalt von 1 % O_2 nicht konstant gehalten werden konnte. Eine weitere Schwierigkeit, die sich im Rahmen erster Experimente ergab, war die Abhängigkeit der Hypoxieeffekte vom Zellkulturmedium, insbesondere der Glukosekonzentration (Dr. rer. nat. Julia Hesse, Institut für Molekulare Kardiologie, persönliche Mitteilung). Somit müsste für die Analyse zukünftiger Experimente zunächst die Methodik der klassischen Hypoxie weitergehend etabliert und verbessert werden. Zusammenfassend stellt die Behandlung mit CoCl_2 jedoch ein etabliertes und reproduzierbares Pseudohypoxiemodell [114] dar, weshalb diese Methode in dieser Arbeit zur Anwendung kam.

5.4 Die Inhibition des LC3B-II-Anstiegs durch SIRT4(H161Y) in der CoCl_2 -induzierten Autophagie ist unabhängig von HDAC6 und OPA1 und lässt sich nicht durch BafA1-Behandlung aufheben

Um mögliche Angriffspunkte von SIRT4 in der Regulation der Autophagie zu charakterisieren, erfolgte eine Analyse und anschließend eine pharmakologische Inhibition der SIRT4-Interaktoren HDAC6 [99] und OPA1 [152] (Abb. 28).

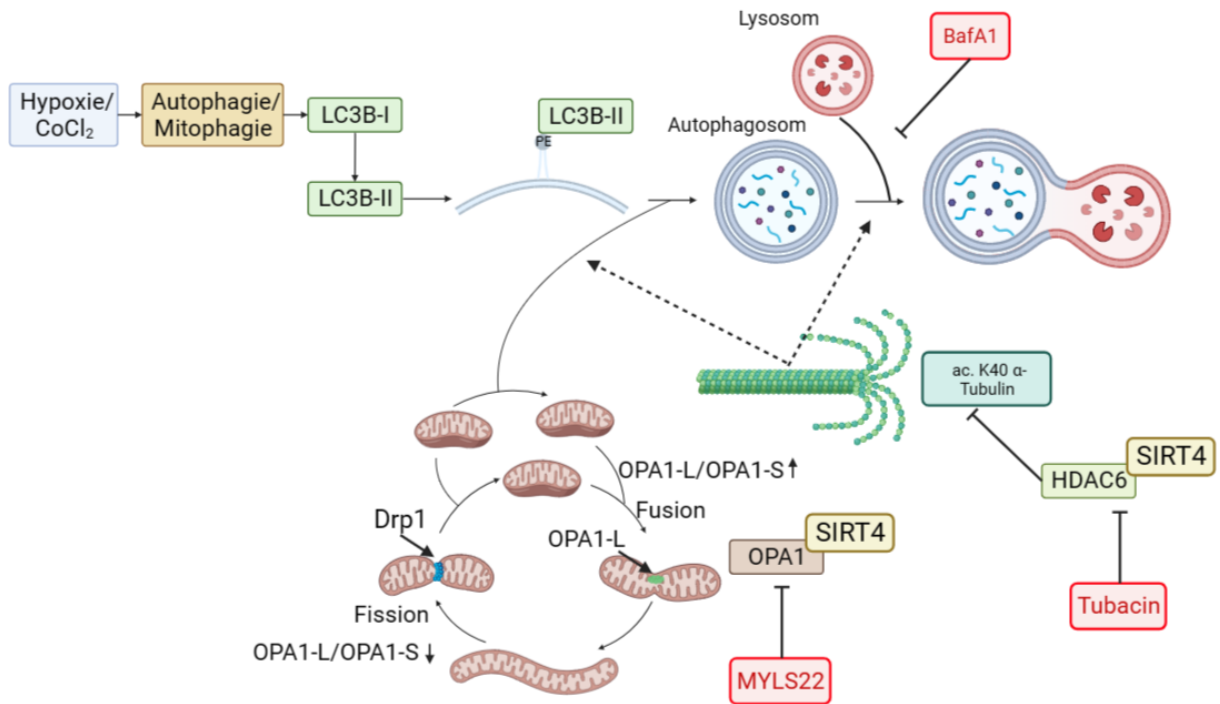


Abb. 28: Mögliche Ansatzpunkte von SIRT4 in der Regulation der Autophagie.

Dargestellt sind die möglichen und in dieser Arbeit analysierten Rollen von SIRT4 bei der Regulation der Autophagie. Ein kritisches funktionelles Merkmal der Autophagie ist die Umwandlung von *Microtubule-associated protein 1B-light chain 3 I* (LC3B-I) zu LC3B-II. Das Verhältnis von *Optic atrophy 1* (OPA1-L) zu der kurzen Form OPA1-S bestimmt die mitochondriale Dynamik. Hierbei interagiert SIRT4 mit OPA1 und reguliert die Umwandlung von OPA1-L zu OPA1-S [152]. MYLS22 ist ein Inhibitor von OPA1. Über die Histondeacetylase 6 (HDAC6), welche ebenfalls mit SIRT4 interagiert [99], wird der autophagische Transport über Mikrotubuli reguliert. Tubacin ist ein Inhibitor von HDAC6 [98]. Der Abbau der Autophagosomen kann durch Bafilomycin A1 (BafA1) inhibiert werden [47, 50]. Drp1: *dynamain related protein 1*. Die Abbildung wurde mit biorender.com erstellt.

Als Interaktionspartner von SIRT4 und Regulator der Mikrotubulifunktion wurden die Proteinmengen von HDAC6 und dessen Deacetylierungssubstrat ac.K40 α -Tubulin in Bezug auf die Pseudohypoxie-induzierte Autophagie analysiert (1.1.1, 1.3.4). SIRT4-eGFP- und SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierende HEK293-Zellen wiesen höhere Mengen an HDAC6 sowie entsprechend niedrigere ac.K40 α -Tubulin-Proteinmengen auf, letztere vor allem nach CoCl₂-Behandlung (Abb. 17). Bereits Bergmann *et al.* [99] wiesen eine Interaktion von SIRT4 mit HDAC6 sowie daraus resultierende geringere Mengen an ac.K40 α -Tubulin während der mitotischen Zellteilung nach. Dieser Befund war mit einer signifikant verlangsamten Mitose und reduzierten Zellproliferation assoziiert, was die Funktion von SIRT4 als Tumorsuppressor verstärken könnte [99]. Da die ac.K40 α -Tubulin-Proteinmengen in mitotischen HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen im Gegensatz zu SIRT4 nicht erniedrigt waren, schlossen die Autoren auf eine enzymatisch-abhängige Tumorsuppressorfunktion von SIRT4, um die mitotischen ac.K40 α -Tubulin-Proteinmengen zu reduzieren [99]. Dabei war unklar, ob SIRT4

direkt über eine Interaktion mit ac.K40 α -Tubulin als Deacetylase wirkt oder ob SIRT4 indirekt über die Interaktion mit HDAC6 die ac.K40 α -Tubulin-Mengen beeinflusst [99].

Im Rahmen der Autophagie hat sich gezeigt, dass HDAC6 LC3B-II deacetyliert. Die vermehrte Deacetylierung von LC3B-II wiederum resultiert in einem Anstieg der Autophagie in Zervixkarzinomzellen [54]. Nach Behandlung der Zellen mit dem HDAC6-Inhibitor Tubacin wurden erhöhte Mengen an acetyliertem LC3B-II und eine Zunahme von Autophagosomen bei einem blockierten Autophagosomenabbau detektiert [54]. Interessanterweise war unter nährstoffreichen Bedingungen die Deacetylierung von LC3B-II nur partiell durch Tubacin supprimiert. Daher kamen die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass LC3B-II nicht nur durch HDAC6, sondern möglicherweise ebenso durch ein weiteres Enzym deacetyliert wurde [54]. Die Deacetylierung von LC3B-II stand jedoch nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit und wurde daher nicht analysiert. Ein weiterer Regulationsmechanismus, über den HDAC6 auf die Autophagie wirkt, ist die Deacetylierung von Cortactin. Dieses ist Actin-abhängig in der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen involviert [51, 52]. Der Mechanismus der Deacetylierung von Cortactin wurde nur in der Autophagie zwecks Qualitätskontrolle von Zellorganellen, nicht jedoch in der Autophagie unter Nährstoffmangel beobachtet [51, 52]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass HDAC6 zwar durch diesen Mechanismus die Autophagie steigerte, jedoch keinen Einfluss auf die Bildung der Autophagosomen hatte [51, 52]. Übereinstimmend wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass die pharmakologische Inhibition von HDAC6 die Autophagie fördern beziehungsweise bei definierten Defekten wiederherstellen kann [190-193].

Basierend auf dieser Literaturlage wären somit mögliche Einflüsse von HDAC6 auf die LC3B-II-Proteinmengen in SIRT4(H161Y)-exprimierenden Zellen denkbar gewesen. Diese hätten über Deacetylierung des α -Tubulins und somit einen reduzierten mikrotubulären Transport von Autophagosomen und Mitochondrien vermittelt werden können [99] (Abb. 28). In der vorliegenden Arbeit und den untersuchten Zelllinien konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede der LC3B-II-Proteinmengen in den pseudohypoxischen HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen nach Behandlung mit Tubacin beobachtet werden (Abb. 18). Dies spricht dafür, dass die Regulation der LC3B-II-Proteinmengen in der CoCl₂-induzierten Autophagie größtenteils von HDAC6 unabhängig ist (Abb. 28). Ebenfalls konnten diese Ergebnisse in FACS-basierten Messungen mit Hilfe des GFP-LC3-RFP-LC3 Δ G-Systems reproduziert werden, wobei ebenso kein Effekt durch eine Tubacin-vermittelte HDAC6-Inhibition auf den *autophagic flux* beobachtet wurde [182, 183].

Als zweiter funktioneller Interaktor von SIRT4 wurde in dieser Arbeit OPA1 untersucht (Abb.

28). Die von Lang *et al.* [152] beschriebene SIRT4-vermittelte Erhöhung des OPA1-L/OPA1-S-Verhältnisses konnte auch in der vorliegenden Arbeit in CoCl₂-behandelten SIRT4-eGFP-exprimierenden und insbesondere in SIRT4(H161Y)-exprimierenden Zellen beobachtet werden (Abb. 19 und Abb. 27). Inwiefern dies in einer vermehrten mitochondrialen Fusion und reduzierten Autophagie von Mitochondrien resultiert, ist noch unklar. Bekannt ist, dass OPA1 über Stabilisierung von OPA1-L und vermehrte Fusion von Mitochondrien die Mitophagie verringert [152]. Um zu überprüfen, ob die erhöhten OPA1-L-Proteinmengen einen Einfluss auf den fehlenden LC3B-II-Anstieg in pseudohypoxischen SIRT4(H161Y)-exprimierenden Zellen hatten, wurden diese zusätzlich mit dem OPA1 Inhibitor MYLS22 behandelt [84]. MYLS22 blockiert hierbei die OPA1-L-abhängige mitochondriale Fusion [194] und wurde inzwischen bereits in ersten veröffentlichten Studien aufgrund seiner tumorinhibierenden Wirkung als Chemotherapeutikum eingesetzt [84, 85, 195, 196]. Beim gleichzeitigen Einsatz von CoCl₂ und MYLS22 zeigte sich jedoch kein signifikanter Anstieg der LC3B-II-Proteinmengen (Abb. 21). Daher scheinen die erhöhten OPA1-L-Mengen nicht ursächlich verantwortlich für den fehlenden LC3B-II-Anstieg in HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen zu sein. Des Weiteren wurde auch in FACS-basierten Messungen mit Hilfe des GFP-LC3-RFP-LC3ΔG-Systems kein signifikanter Effekt der MYLS22-vermittelten Hemmung von OPA1 auf den *autophagic flux* nach CoCl₂-induzierter Pseudohypoxie beobachtet [182, 183]. Somit scheint OPA1 keinen signifikanten, fördernden Einfluss auf den *autophagic flux* unter Pseudohypoxie zu haben.

Im Gegensatz zu den Befunden dieser Arbeit wurde in Lang *et al.* [152] eine zunehmende mitochondriale Länge (Fusion) und Stabilisierung von OPA1-L in SIRT4-überexprimierenden, nicht jedoch in HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen beobachtet, sodass die Autoren auf eine SIRT4-enzymatisch abhängige Regulation von OPA1-L schlossen. Während Lang *et al.* [152] die OPA1-L/OPA1-S-Proteinmengen jedoch unter basalen Bedingungen gemessen hatten, wurde in dieser Arbeit das OPA1-L/OPA1-S-Verhältnis nach CoCl₂-Behandlung zeitlich verfolgt und relativ quantifiziert (Abb. 19). In Coimmunopräzipitations-Experimenten fällt die Interaktion von OPA1 mit SIRT4(H161Y) geringer aus als mit SIRT4 [152]. Interessanterweise war in dieser Arbeit aber die Stabilisierung von OPA1-L sowohl unter CoCl₂-Behandlung, als auch unter Hypoxie (1 % O₂) in SIRT4(H161Y)-exprimierenden Zellen am stärksten (Abb. 27), trotz deutlich geringerer transgener Expression von SIRT4(H161Y) im Vergleich zu SIRT4 (Abb. 9). Diese Befunde sprechen somit dafür, dass SIRT4(H161Y) über eine dominant-negative Wirkung das OPA1-L/OPA1-S-Verhältnis beeinflusst, wobei der zugrundeliegende molekulare Mechanismus noch unklar ist.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die SIRT4-HDAC6- und SIRT4-OPA1-Interaktionen und -Signalwege (Abb. 28) nicht ursächlich mit der Deregulation der CoCl₂-induzierten Autophagie in HEK293 SIRT4(H161Y)-Zellen zusammenhängen. Somit schien SIRT4(H161Y) andere Regulatoren der LC3B-II-Antwort im Rahmen der frühen Autophagie zu beeinflussen.

Da eine Erhöhung der LC3B-II-Proteinmengen entweder eine erhöhte Autophagie widerspiegelt oder auf eine Inhibition der Autophagosomen-Lysosomen-Funktion – und somit einen reduzierten Abbau von LC3B-II – zurückzuführen ist [57], erfolgte die Behandlung der Zelllinien mit BafA1. Nimmt LC3B-II nach BafA1-Behandlung nicht weiter zu, spricht dies für eine eingeschränkte Bildung von Autophagosomen [57]. Niedrige LC3B-II-Proteinmengen ohne Anstieg trotz BafA1-Behandlung sprechen somit für eine supprimierte Autophagie [57]. In dieser Arbeit konnte der Einsatz von BafA1 den Anstieg von LC3B-II in CoCl₂-behandelten HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen nicht wiederherstellen. Daher schien hier die Bildung der Autophagosomen reduziert und somit die frühe Phase der Autophagie betroffen zu sein (Abb. 22). Damit schien die enzymatische Aktivität von SIRT4 für die Bildung von LC3B-II unter Pseudohypoxie notwendig zu sein. Die fehlenden Unterschiede der LC3B-I-Proteinmengen zwischen den Genotypen (Abb. 15B) lassen auch auf eine Regulation bezüglich der Entstehung von LC3B-II aus LC3B-I hindeuten. Somit schienen die in Abb. 28 vermuteten regulatorischen Einflüsse von SIRT4 über seine Interaktoren HDAC6 und OPA1 keinen signifikanten Einfluss auf die LC3B-II-Dynamik zu haben. Daher betraf die mögliche Dysregulation der Autophagie in SIRT4(H161Y)-exprimierenden HEK293-Zellen am ehesten die Autophagieinitiation.

5.5 SIRT4(H161Y) scheint über Stabilisierung von ULK1 pS758 und pS638 die Autophagie zu inhibieren

Es gibt verschiedene molekulare Ansätze, an denen SIRT4 die Autophagie in der Initiation und frühen Phase regulieren könnte (Abb. 29A).

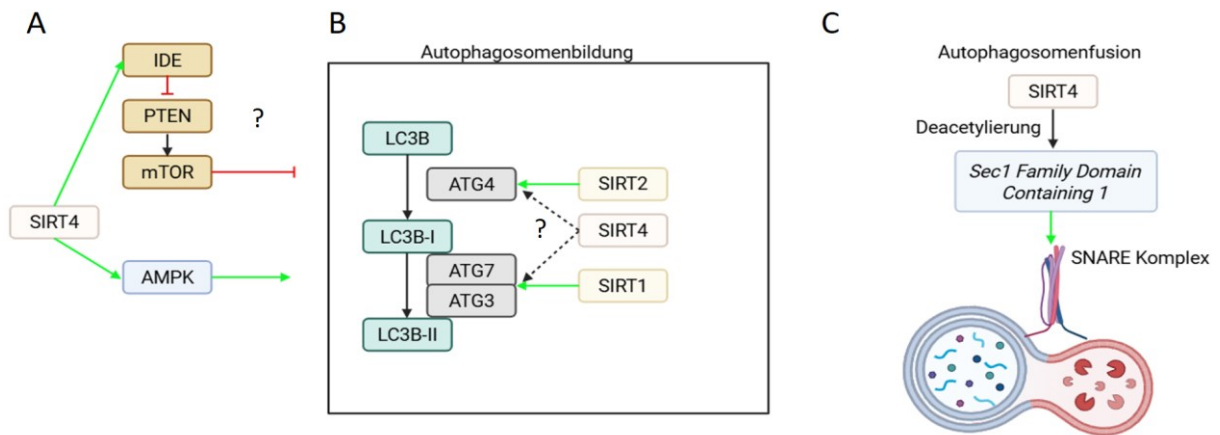


Abb. 29: Mögliche Ansatzpunkte, an denen SIRT4 die Autophagie-Initiation und den *autophagic flux* regulieren könnte und dessen Funktion hierbei möglicherweise durch Überexpression von SIRT4(H161Y) dominant-negativ beeinflusst wird.

Gezeigt sind mögliche Ansatzpunkte, an welchen SIRT4 auf die Autophagosomenbildung wirken könnte. **(A)** SIRT4 hat einen positiven Einfluss auf die Autophagie durch Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierten-Proteinkinase (AMPK) [163, 197]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von SIRT4 oder die stressinduzierte Hochregulation von endogenem SIRT4 *via* Aktivierung des Insulin-degradierenden Enzyms (IDE) *Phosphatase and Tensin homolog* (PTEN) abbaut und hierbei die Autophagie steigert [165]. **(B)** Bekannterweise begünstigen auch SIRT2 über ATG4 [198] und SIRT1 über ATG7 [199] die Autophagie. Möglicherweise wäre dieses ebenso ein Angriffspunkt von SIRT4, was derzeit jedoch noch unbekannt ist. **(C)** SIRT4 erhöht über Deacetylierung von *Sec1 Family Domain Containing 1* und Bildung des *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor* (SNARE)-Komplexes die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen [164]. Die Abbildung wurde mit Hilfe von biorender.com erstellt.

Liu *et al.* [165] beschrieben einen Mechanismus, durch welchen SIRT4 *via* Interaktion mit dem Insulin-degradierenden Enzym (IDE) eine Degradierung von PTEN bewirkt. Darüber hinaus fördert SIRT4 hierbei augenscheinlich über Inhibition von mTORC1 – über einen bisher unklaren Mechanismus – die Autophagie (Abb. 29A). Da dieser Mechanismus jedoch auch in SIRT4(H161Y)-exprimierenden Zellen nachgewiesen wurde, spielt es mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit keine Rolle in dem in dieser Arbeit analysierten Pseudohyoxiemodell. Diese Annahme müsste in einem wichtigen Brückenexperiment durch Analyse der PTEN-Proteinmengen in SIRT4-eGFP- *vs.* SIRT4(H161Y)-eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen nach CoCl₂-Behandlung überprüft werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass SIRT4 die AMPK-Aktivität erhöht [163, 197]. Dabei ist bekannt, dass AMPK als Aktivator der Autophagie fungiert, indem es unter anderem den kritischen ULK-Komplex aktiviert [166, 200] (1.1.1). Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Inhibition der AMPK-Expression die Umwandlung von LC3B-I zu LC3B-II hemmt [201]. Somit könnten die erniedrigten LC3B-II-Proteinmengen in den SIRT4(H161Y)-exprimierenden Zellen auf eine verminderte Aktivierung von AMPK hinweisen. Dadurch wäre die Autophagie-Initiation über ULK1 und Umwandlung von LC3B-I zu LC3B-II

eingeschränkt. Ebenfalls sind weitere Sirtuine dafür bekannt, über den AMPK-Signalweg die Autophagie zu beeinflussen. Beispielsweise zeigte sich in mehreren Studien, dass SIRT3 über AMPK die Autophagie positiv reguliert [202, 203]. Des Weiteren wurde eine Aktivierung von AMPK durch SIRT5 nachgewiesen [204]. Ebenfalls wurde gezeigt, dass SIRT1 über den Leberkinase B1-AMPK-Signalweg die Autophagie aktiviert [205, 206] (Abb. 29B).

SIRT1 kann zusätzlich über eine direkte Interaktion mit LC3B sowie Interaktion mit ATG7 und ATG5 die Autophagie regulieren [178] (Abb. 29B). Durch SIRT1-vermittelte Deacetylierung von LC3B wird dessen Transport aus dem Nukleus und somit die Bildung von Autophagosomen begünstigt [207]. Die Deacetylierung von LC3B ist notwendig für die Konjugation an ATG7 [207], wobei ATG7 an der Bildung von LC3B-II aus LC3B-I beteiligt ist [199] (1.1.1; Abb. 29B). SIRT1 kann zudem auch direkt ATG7 und ATG5 deacetylieren [199]. Interessanterweise führte die Expression der SIRT1(HY)-Mutante, welche enzymatisch inaktiv ist, zu einer Inhibition der Umwandlung von LC3B-I zu LC3B-II. Das betont die dominant-negative Wirkung dieser Mutante [199] analog zu SIRT4(H161Y). Da SIRT4 auch partiell im Nukleus lokalisiert ist [99, 135], könnte SIRT4 ebenfalls den Transport von LC3B aus dem Nukleus fördern und so analog zu SIRT1 die Entstehung von LC3B-II aus LC3B-I regulieren. Insgesamt zeigen sich somit mögliche Parallelen in der Regulation der Autophagie durch SIRT1 und SIRT4 (Abb. 29B).

Als ein weiteres Sirtuin mit einem Einfluss auf die Autophagosomenbildung wurde SIRT2 beschrieben, welches ATG4B deacetyliert [198]. ATG4B ist essentiell für die Spaltung von LC3B zu LC3B-I [46]. Im Falle von SIRT4 scheint eine Regulation über ATG4B jedoch unwahrscheinlich zu sein, da bei Überexpression von SIRT4 oder SIRT4(H161Y) und erfolgter CoCl₂-Behandlung keine signifikanten Unterschiede in den LC3B-I-Proteinmengen zwischen den untersuchten Genotypen beobachtet wurden (Abb. 15 und 16). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die SIRT4-vermittelte Regulation von LC3B zwischen LC3B-I und LC3B-II in der frühen Autophagie auftritt (Abb. 29A).

Neuere Literaturbefunde identifizierten *Sec1 Family Domain Containing 1* (SCFD1) als neues Zielprotein und Substrat von SIRT4. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die SIRT4-vermittelte Deacetylierung von SCFD1 die Autophagie durch Steigerung der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen über eine vermehrte Bildung des SNARE-Komplexes erhöht [164] (Abb. 29C). Da die Behandlung mit BafA1 in SIRT4(H161Y)-exprimierenden HEK293-Zellen jedoch unter pseudohypoxischen Bedingungen keinen Anstieg an LC3B-II-Proteinmengen bewirkte, scheint eine gestörte SIRT4-SCFD1-Interaktion/-Funktion und somit Autophagosom-Lysosom-Fusion als Hauptregulationsmechanismus der Autophagie durch die enzymatische Aktivität von SIRT4

eher unwahrscheinlich zu sein.

Als Ursache für die fehlende Zunahme von LC3B-II in CoCl₂-behandelten HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen konnten keine Hinweise auf Defekte in der späten Phase der Autophagie gewonnen werden, insbesondere durch Einsatz von BafA1 (Abb. 22). Deshalb wurde der Einfluss von SIRT4 und SIRT4(H161Y) auf die Regulation der frühen Phase der Autophagie, also die für die Autophagie-Initiation kritische Kinase ULK1, untersucht. Interessanterweise konnte bei Überexpression von SIRT4(H161Y)-eGFP im Gegensatz zu den eGFP- und SIRT4-eGFP-exprimierenden Zellen keine Herunterregulation der ULK1 pS758- und ULK1 pS638-Proteinmengen nach CoCl₂-Behandlung beobachtet werden (Abb. 23 und Abb. 24). Bekannt ist, dass ULK1 an Ser758 und Ser638 durch mTORC1 phosphoryliert wird und dadurch die Autophagie inhibiert wird [15-20]. AMPK hingegen phosphoryliert ULK1 an Ser317, Ser638 und Ser777 und aktiviert die Autophagie [20, 23]. Diese Phosphorylierung kann durch mTORC1-vermittelte Phosphorylierung von ULK1 verhindert werden [20, 23]. Zudem wurde gezeigt, dass SIRT4 die AMPK-Aktivität erhöht [163, 197]. Somit schien in HEK293 eGFP- und HEK293 SIRT4-eGFP-Zellen, in welchen die ULK1 pS638- und pS758-Proteinmengen nach CoCl₂-Behandlung abnahmen, eine verringerte Phosphorylierung durch mTORC1 zu erfolgen und somit die Autophagie erhöht zu sein. In HEK293 SIRT4(H161Y)-eGFP-Zellen hingegen schienen die inhibierenden Phosphorylierungen von ULK1 an Ser638 und Ser758 zu überwiegen, sodass dort die Initiation der Autophagie wahrscheinlich inhibiert war. Diese Befunde sprechen insgesamt dafür, dass die enzymatische Aktivität von SIRT4 für die verringerte Phosphorylierung von ULK1 an Ser638 und Ser758 und die Initiation der Autophagosomenbildung notwendig zu sein schien (hypothetisches Modell bezüglich der Rolle von SIRT4 in Abb. 30). Bei der Aktivierung von ULK1 und der Initiation der Autophagie erfolgt eine Bildung des ULK1-Komplexes, bestehend aus ULK1, ATG13, FIP200 und ATG101 [27]. Dabei konnten zwischen den untersuchten Genotypen keine Unterschiede der ATG13- und FIP200-Proteinmengen nachgewiesen werden (Abb. 25 und Abb. 26). Allerdings wurden dabei die Proteinmengen analysiert, nicht jedoch die Phosphorylierung und somit die Regulation dieser Proteine des ULK1-Komplexes.

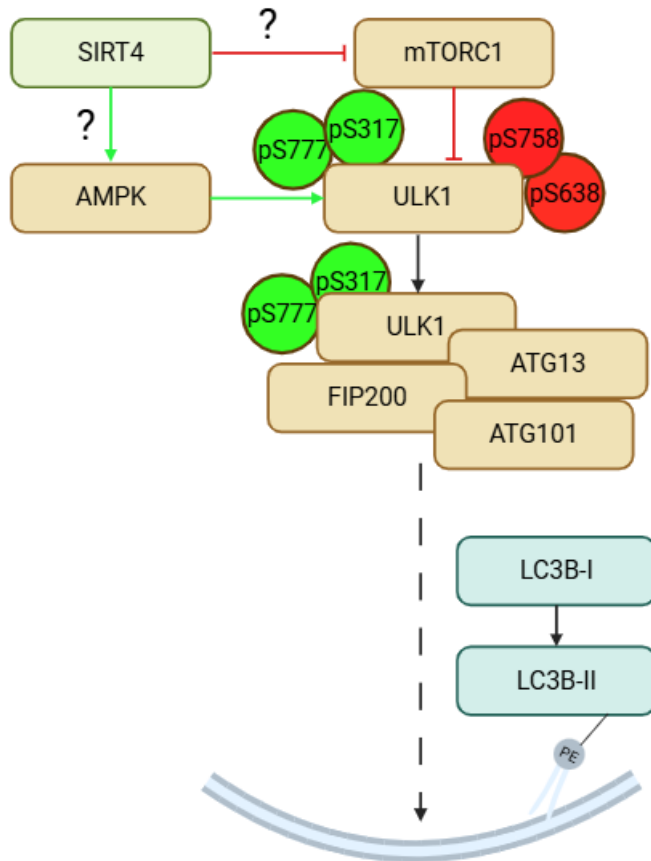


Abb. 30: Mögliche Rolle von SIRT4 in der ULK1-abhängigen Regulation der Autophagieinitiation.

Dargestellt ist eine mögliche Rolle von SIRT4 in der ULK1-vermittelten Regulation der Autophagosomenbildung. Ein möglicher Ansatz ist, dass die enzymatische Aktivität von SIRT4 eine Inhibition von *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) bewirkt [165]. Durch mTORC1 wird *Unc-51 like autophagy activating kinase 1* (ULK1) an Serin 638 und Serin 758 phosphoryliert (pS638, pS758) und dadurch inhibiert, sodass keine Autophagieinitiation stattfindet [15-20, 22, 24]. Ein weiterer Mechanismus könnte die Aktivierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte-Proteinkinase (AMPK) durch SIRT4 sein. Dadurch würde ULK1 durch Phosphorylierung an Serin 777 und Serin 317 aktiviert und die Autophagie initiiert werden [16, 20, 22, 23, 163]. Der ULK1-Komplex aus ULK1, Autophagie regulierender Protease 13 (ATG13), ATG101 und *focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa* (FIP200) bewirkt hierbei die Initiation der Autophagie [28, 29]. PE, Phosphatidylethanolamin-Anker. Die Abbildung wurde mit biorender.com erstellt und modifiziert nach: Zhang, 2015 [21] und Dodson *et al.*, 2013 [16]. Publikation der Abbildung als Preprint in Lehmkuhl, Amin *et al.*, 2025 [182].

Zusammenfassend ergeben sich verschiedene Ansatzmöglichkeiten, über welche SIRT4 positiv auf die Autophagieregulation wirken könnte (Abb. 29, Abb. 30). Hervorzuheben ist, dass SIRT4 insbesondere für die Umwandlung von LC3B-I zu LC3B-II wichtig zu sein scheint. Die genaue molekulare Wirkung von SIRT4 auf die frühe Autophagieregulation und die hier notwendige enzymatische Aktivität (zum Beispiel Deacetylierung oder ADP-Ribosylierung; [208]) ist jedoch bisher unbekannt und kann in weiteren Analysen genauer erforscht werden.

5.6 Ausblick

In zukünftigen Forschungsarbeiten sollte genauer analysiert werden, welche Rolle SIRT4 in der frühen Autophagiephase und möglicherweise in der Bildung von Autophagosomen molekular einnimmt. Hier sollte insbesondere der Einfluss von SIRT4 auf die LC3B-II-Antwort erforscht werden, da sich diese in der vorliegenden Arbeit als kritischer Punkt in der Regulation der Autophagie durch SIRT4 herauskristallisiert hat. Damit verbunden ist auch die beobachtete Fehlregulation durch SIRT4(H161Y). Hierbei steht die weitere Untersuchung der Regulation der Autophagieinitiation im Vordergrund. Dabei liegt der Fokus auf der Regulation des ULK1-Komplexes durch SIRT4, mTORC1 und AMPK.

Ein weiteres Ziel ist es, durch *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)/Cas-vermittelte Punktmutation im Sirt4-Genlocus endogen SIRT4(H161Y)-exprimierende Zellmodelle zu generieren. Diese würden es ermöglichen, die Rolle von endogenem SIRT4 und seiner enzymatischen Aktivität in der Autophagieregulation zu charakterisieren und hierbei mögliche Überexpressionseffekte zu vermeiden. Ein weiterer Aspekt wäre die Etablierung stabiler SIRT4-*knock-out*-Zellen, die ebenfalls mittels der CRISPR/Cas-Methodik generiert werden sollten. Dadurch wäre es möglich, den Einfluss einer SIRT4-Defizienz auf die (pseudo)hypoxische Autophagie-/Mitophagieantwort zu analysieren. Des Weiteren sollten die im Modell der CoCl₂-Behandlung/Pseudohypoxie gewonnenen Befunde unter Bedingungen der klassischen Hypoxie verifiziert beziehungsweise bestätigt werden. In diesem Zusammenhang wäre eine weitere Optimierung der Zellkulturbedingungen im Rahmen der Hypoxiemethode (1 % O₂) notwendig.

Schließlich wäre die Übertragung der in dieser Arbeit in HEK293-Zellen erhobenen Befunde auf ein Zellmodell mit mehr beziehungsweise direkter klinischer Relevanz wichtig. Neuere Daten legen nahe, dass SIRT4 als Tumorsuppressor durch Induktion der Autophagie und Aktivierung des p53-Signalwegs die Tumorgenese und Progression duktaler Adenokarzinome des Pankreas inhibieren kann [163]. Bisher ist jedoch noch unbekannt, inwiefern diese SIRT4-p53-Autophagie-Achse in Adenokarzinomen des Pankreas [163] auch über eine Regulation der mTORC1-AMPK-ULK1-Achse und somit der Autophagieinitiation verläuft. Dies sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Interessanterweise kann eine chemo- oder radiotherapieinduzierte Autophagie auch eine tumorprotektive Wirkung aufweisen [209-212]. Beispielsweise zeigt die bestrahlungsinduzierte Zunahme der zellulären Autophagie einen protektiven Überlebenseffekt auf Zervixkarzinomzellen und hepatozelluläre Karzinome [213, 214]. Somit wäre zu klären, ob in Anlehnung an Li *et al.* [163] die Hemmung von SIRT4 beziehungsweise die Überexpression von SIRT4(H161Y) eine p53- und

tumorwachstumshemmende Wirkung nach sich zieht.

5.7 Schlussfolgerung

Die Untersuchungen dieser Arbeit sowie das daraus resultierende Manuskript Lehmkuhl, Amin *et al.* [182] kommen zu dem Entschluss, dass SIRT4 aufgrund des Phänotyps der dominant-negativen, enzymatisch inaktiven Mutante SIRT4(H161Y) die LC3B-II-Bildung und somit möglicherweise die Autophagosomenbildung und Autophagie positiv reguliert. Diese Regulation scheint unabhängig von der Histondeacetylase HDAC6 und dem mitochondrialen Fusionsregulator OPA1 zu sein, aber abhängig von der zentralen, autophagieinitiierenden Kinase ULK1. Somit scheint die Initiationsphase/frühe Phase der Autophagie betroffen zu sein. In dieser Phase beeinflusst SIRT4(H161Y) das mTORC1-AMPK-ULK1-Netzwerk dahingehend, dass inhibitorische ULK1-Phosphorylierungen stabilisiert werden und somit die Autophagieinitiation und/oder LC3B-II-Antwort gehemmt wird. Zusammenfassend sprechen die Befunde dieser Arbeit dafür, dass SIRT4 und seine enzymatische Aktivität über eine Aktivierung von ULK1 für den *autophagic flux* und somit für die frühe Autophagie notwendig sind.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. De Duve, C., *The lysosome*. Sci Am, 1963. **208**: p. 64-72.
2. De Duve, C. and R. Wattiaux, *Functions of lysosomes*. Annu Rev Physiol, 1966. **28**: p. 435-92.
3. Kawabata, T. and T. Yoshimori, *Autophagosome biogenesis and human health*. Cell Discov, 2020. **6**(1): p. 33.
4. Yorimitsu, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy: molecular machinery for self-eating*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1542-52.
5. Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine, *Methods in mammalian autophagy research*. Cell, 2010. **140**(3): p. 313-26.
6. Sica, V., et al., *Organelle-Specific Initiation of Autophagy*. Mol Cell, 2015. **59**(4): p. 522-39.
7. Okamoto, K., *Organellophagy: eliminating cellular building blocks via selective autophagy*. J Cell Biol, 2014. **205**(4): p. 435-45.
8. Hayashi-Nishino, M., et al., *A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(12): p. 1433-7.
9. Hailey, D.W., et al., *Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation*. Cell, 2010. **141**(4): p. 656-67.
10. Reggiori, F., et al., *Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts*. Autophagy, 2005. **1**(2): p. 101-9.
11. Ravikumar, B., et al., *Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(8): p. 747-57.
12. Locke, M. and A.K. Sykes, *The role of the Golgi complex in the isolation and digestion of organelles*. Tissue Cell, 1975. **7**(1): p. 143-58.
13. Fujita, N., et al., *An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(11): p. 4651-9.
14. Deter, R.L., P. Baudhuin, and C. De Duve, *Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon*. J Cell Biol, 1967. **35**(2): p. C11-6.
15. He, C. and D.J. Klionsky, *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 67-93.
16. Dodson, M., V. Darley-Usmar, and J. Zhang, *Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling*. Free Radic Biol Med, 2013. **63**: p. 207-21.
17. Jung, C.H., et al., *ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(7): p. 1992-2003.
18. Wang, X., et al., *Docosahexaenoic acid-acylated astaxanthin monoester ameliorates chronic high-fat diet-induced autophagy dysfunction via ULK1 pathway in the hypothalamus of mice*. J Sci Food Agric, 2023. **103**(5): p. 2378-2388.
19. Orsini, M., et al., *Sphingolipid-mediated inflammatory signaling leading to autophagy inhibition converts erythropoiesis to myelopoiesis in human hematopoietic stem/progenitor cells*. Cell Death Differ, 2019. **26**(9): p. 1796-1812.
20. Shang, L., et al., *Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 4788-93.
21. Zhang, J., *Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists--mechanisms and experimental approaches*. Redox Biol, 2015. **4**: p. 242-59.
22. Bar-Peled, L., et al., *Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1196-208.
23. Kim, J., et al., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(2): p. 132-41.
24. Hay, N., *The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p.

- 179-83.
25. Florez-McClure, M.L., et al., *Decreased insulin-receptor signaling promotes the autophagic degradation of beta-amyloid peptide in C. elegans*. *Autophagy*, 2007. **3**(6): p. 569-80.
 26. Sabers, C.J., et al., *Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(2): p. 815-22.
 27. Mercer, C.A., A. Kaliappan, and P.B. Dennis, *A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy*. *Autophagy*, 2009. **5**(5): p. 649-62.
 28. Ganley, I.G., et al., *ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(18): p. 12297-305.
 29. Hara, T., et al., *FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells*. *J Cell Biol*, 2008. **181**(3): p. 497-510.
 30. Birgisdottir, A.B., et al., *Members of the autophagy class III phosphatidylinositol 3-kinase complex I interact with GABARAP and GABARAPL1 via LIR motifs*. *Autophagy*, 2019. **15**(8): p. 1333-1355.
 31. Park, J.M., et al., *The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14*. *Autophagy*, 2016. **12**(3): p. 547-64.
 32. Tooze, S.A., et al., *Trafficking and signaling in mammalian autophagy*. *IUBMB Life*, 2010. **62**(7): p. 503-8.
 33. Kang, R., et al., *The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2011. **18**(4): p. 571-80.
 34. Lu, G., et al., *Autophagy in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic target*. *MedComm* (2020), 2022. **3**(3): p. e150.
 35. McEwan, D.G. and K.M. Ryan, *ATG2 and VPS13 proteins: molecular highways transporting lipids to drive membrane expansion and organelle communication*. *FEBS J*, 2021. **290**(7): p. 1752–1770.
 36. Saikia, R. and J. Joseph, *AMPK: a key regulator of energy stress and calcium-induced autophagy*. *J Mol Med (Berl)*, 2021. **99**(11): p. 1539-1551.
 37. van Vliet, A.R., et al., *ATG9A and ATG2A form a heteromeric complex essential for autophagosome formation*. *Mol Cell*, 2022. **82**(22): p. 4324-4339 e8.
 38. Bozic, M., et al., *A conserved ATG2-GABARAP family interaction is critical for phagophore formation*. *EMBO Rep*, 2020. **21**(3): p. e48412.
 39. Maeda, S., C. Otomo, and T. Otomo, *The autophagic membrane tether ATG2A transfers lipids between membranes*. *Elife*, 2019. **8**: p. e45777.
 40. Ohsumi, Y. and N. Mizushima, *Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy*. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. **15**(2): p. 231-6.
 41. Mizushima, N., et al., *Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells*. *J Cell Biol*, 2001. **152**(4): p. 657-68.
 42. Mizushima, N., T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, *The role of Atg proteins in autophagosome formation*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. **27**: p. 107-32.
 43. Mizushima, N., et al., *Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 9): p. 1679-88.
 44. Maruyama, T. and N.N. Noda, *Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition*. *J Antibiot (Tokyo)*, 2017. **71**(1): p. 72–8.
 45. Ichimura, Y., et al., *A ubiquitin-like system mediates protein lipidation*. *Nature*, 2000. **408**(6811): p. 488-92.
 46. Park, N.Y., D.S. Jo, and D.H. Cho, *Post-Translational Modifications of ATG4B in the*

- Regulation of Autophagy*. Cells, 2022. **11**(8): p. 1330.
47. Lorincz, P. and G. Juhasz, *Autophagosome-Lysosome Fusion*. J Mol Biol, 2020. **432**(8): p. 2462-2482.
 48. Itakura, E., C. Kishi-Itakura, and N. Mizushima, *The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes*. Cell, 2012. **151**(6): p. 1256-69.
 49. Yoshimori, T., et al., *Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells*. J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17707-12.
 50. Yamamoto, A., et al., *Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells*. Cell Struct Funct, 1998. **23**(1): p. 33-42.
 51. Lee, J.Y., et al., *HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy*. EMBO J, 2010. **29**(5): p. 969-80.
 52. Lee, J.Y. and T.P. Yao, *Quality control autophagy: a joint effort of ubiquitin, protein deacetylase and actin cytoskeleton*. Autophagy, 2010. **6**(4): p. 555-7.
 53. Chang, P., et al., *The Role of HDAC6 in Autophagy and NLRP3 Inflammasome*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 763831.
 54. Liu, K.P., et al., *LC3B-II deacetylation by histone deacetylase 6 is involved in serum-starvation-induced autophagic degradation*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **441**(4): p. 970-5.
 55. Koeneke, E., O. Witt, and I. Oehme, *HDAC Family Members Intertwined in the Regulation of Autophagy: A Druggable Vulnerability in Aggressive Tumor Entities*. Cells, 2015. **4**(2): p. 135-68.
 56. Li, Z., et al., *Microtubule destabilization caused by silicate via HDAC6 activation contributes to autophagic dysfunction in bone mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther, 2019. **10**(1): p. 351.
 57. Yoshii, S.R. and N. Mizushima, *Monitoring and Measuring Autophagy*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(9): p. 1865.
 58. Nelson, D.A., et al., *Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis*. Genes Dev, 2004. **18**(17): p. 2095-107.
 59. Degenhardt, K., et al., *Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis*. Cancer Cell, 2006. **10**(1): p. 51-64.
 60. Mathew, R., et al., *Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability*. Genes Dev, 2007. **21**(11): p. 1367-81.
 61. Marino, G., et al., *Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3*. J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18573-18583.
 62. Frey, T.G. and C.A. Mannella, *The internal structure of mitochondria*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(7): p. 319-24.
 63. Annesley, S.J. and P.R. Fisher, *Mitochondria in Health and Disease*. Cells, 2019. **8**(7): p. 1171.
 64. Nunnari, J. and A. Suomalainen, *Mitochondria: in sickness and in health*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1145-59.
 65. De Stefani, D., et al., *A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter*. Nature, 2011. **476**(7360): p. 336-40.
 66. van der Bliek, A.M., M.M. Sedensky, and P.G. Morgan, *Cell Biology of the Mitochondrion*. Genetics, 2017. **207**(3): p. 843-871.
 67. Lewis, M.R. and W.H. Lewis, *Mitochondria in Tissue Culture*. Science, 1914. **39**(1000): p. 330-3.
 68. van der Bliek, A.M., Q. Shen, and S. Kawajiri, *Mechanisms of mitochondrial fission*

- and fusion*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(6): p. a011072.
69. Yoneda, M., T. Miyatake, and G. Attardi, *Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct organelles*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(4): p. 2699-712.
70. Youle, R.J. and A.M. van der Bliek, *Mitochondrial fission, fusion, and stress*. Science, 2012. **337**(6098): p. 1062-5.
71. Schafer, A. and A.S. Reichert, *Emerging roles of mitochondrial membrane dynamics in health and disease*. Biol Chem, 2009. **390**(8): p. 707-15.
72. Gao, S. and J. Hu, *Mitochondrial Fusion: The Machineries In and Out*. Trends Cell Biol, 2021. **31**(1): p. 62-74.
73. Giacomello, M., et al., *The cell biology of mitochondrial membrane dynamics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(4): p. 204-224.
74. Olichon, A., et al., *The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space*. FEBS Lett, 2002. **523**(1-3): p. 171-6.
75. McBride, H. and V. Soubannier, *Mitochondrial function: OMA1 and OPA1, the grandmasters of mitochondrial health*. Curr Biol, 2010. **20**(6): p. R274-6.
76. Lee, H. and Y. Yoon, *Mitochondrial fission and fusion*. Biochem Soc Trans, 2016. **44**(6): p. 1725-1735.
77. Kaser, M., et al., *Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46414-23.
78. Song, Z., et al., *OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L*. J Cell Biol, 2007. **178**(5): p. 749-55.
79. Zorov, D.B., et al., *Lessons from the Discovery of Mitochondrial Fragmentation (Fission): A Review and Update*. Cells, 2019. **8**(2): p. 175.
80. Cho, B., et al., *Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15754.
81. Twig, G. and O.S. Shirihai, *The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(10): p. 1939-51.
82. Lee, Y.H., et al., *Targeting Mitochondrial Metabolism as a Strategy to Treat Senescence*. Cells, 2021. **10**(11): p. 3057.
83. Figge, M.T., et al., *Deceleration of fusion-fission cycles improves mitochondrial quality control during aging*. PLoS Comput Biol, 2012. **8**(6): p. e1002576.
84. Herkenne, S., et al., *Developmental and Tumor Angiogenesis Requires the Mitochondria-Shaping Protein Opa1*. Cell Metab, 2020. **31**(5): p. 987-1003 e8.
85. Zamberlan, M., et al., *Inhibition of the mitochondrial protein Opa1 curtails breast cancer growth*. J Exp Clin Cancer Res, 2022. **41**(1): p. 95.
86. Lemasters, J.J., *Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging*. Rejuvenation Res, 2005. **8**(1): p. 3-5.
87. Twig, G., et al., *Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy*. EMBO J, 2008. **27**(2): p. 433-46.
88. Frank, M., et al., *Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(12): p. 2297-310.
89. Tan, T., M. Zimmermann, and A.S. Reichert, *Controlling quality and amount of mitochondria by mitophagy: insights into the role of ubiquitination and deubiquitination*. Biol Chem, 2016. **397**(7): p. 637-47.
90. Guo, J. and W.C. Chiang, *Mitophagy in aging and longevity*. IUBMB Life, 2022. **74**(4):

- p. 296-316.
91. Chinnadurai, G., S. Vijayalingam, and S.B. Gibson, *BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions*. *Oncogene*, 2008. **27 Suppl 1**: p. S114-27.
 92. Liu, L., et al., *Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells*. *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(2): p. 177-85.
 93. Narendra, D., et al., *Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy*. *J Cell Biol*, 2008. **183**(5): p. 795-803.
 94. Pickrell, A.M. and R.J. Youle, *The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease*. *Neuron*, 2015. **85**(2): p. 257-73.
 95. Lazarou, M., et al., *PINK1 drives Parkin self-association and HECT-like E3 activity upstream of mitochondrial binding*. *J Cell Biol*, 2013. **200**(2): p. 163-72.
 96. Onishi, M., et al., *Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy*. *EMBO J*, 2021. **40**(3): p. e104705.
 97. Yoshii, S.R. and N. Mizushima, *Autophagy machinery in the context of mammalian mitophagy*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1853**(10 Pt B): p. 2797-801.
 98. Chen, S., et al., *HDAC6 regulates mitochondrial transport in hippocampal neurons*. *PLoS One*, 2010. **5**(5): p. e10848.
 99. Bergmann, L., et al., *Subcellular Localization and Mitotic Interactome Analyses Identify SIRT4 as a Centrosomally Localized and Microtubule Associated Protein*. *Cells*, 2020. **9**(9): p. 1950.
 100. Reed, N.A., et al., *Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport*. *Curr Biol*, 2006. **16**(21): p. 2166-72.
 101. Haggarty, S.J., et al., *Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(8): p. 4389-94.
 102. Lee, Y.W., et al., *Hypoxia Induced by Cobalt Chloride Triggers Autophagic Apoptosis of Human and Mouse Drug-Resistant Glioblastoma Cells through Targeting the PI3K-AKT-mTOR Signaling Pathway*. *Oxid Med Cell Longev*, 2021. **2021**: p. 5558618.
 103. Chen, R., et al., *Effects of Cobalt Chloride, a Hypoxia-Mimetic Agent, on Autophagy and Atrophy in Skeletal C2C12 Myotubes*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 7097580.
 104. Sulkshane, P., et al., *Ubiquitination and receptor-mediated mitophagy converge to eliminate oxidation-damaged mitochondria during hypoxia*. *Redox Biol*, 2021. **45**: p. 102047.
 105. Marinkovic, M., M. Sprung, and I. Novak, *Dimerization of mitophagy receptor BNIP3L/NIX is essential for recruitment of autophagic machinery*. *Autophagy*, 2021. **17**(5): p. 1232-1243.
 106. Masson, N. and P.J. Ratcliffe, *HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 15): p. 3041-9.
 107. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. *Nature*, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
 108. Zimna, A. and M. Kurpisz, *Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 549412.
 109. Vito, A., N. El-Sayes, and K. Mossman, *Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment*. *Cells*, 2020. **9**(4): p. 992.
 110. Wu, W., et al., *FUNDC1 is a novel mitochondrial-associated-membrane (MAM) protein required for hypoxia-induced mitochondrial fission and mitophagy*. *Autophagy*, 2016. **12**(9): p. 1675-6.

111. Zhang, H., et al., *Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia*. J Biol Chem, 2008. **283**(16): p. 10892-903.
112. Fuhrmann, D.C. and B. Brune, *Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia*. Redox Biol, 2017. **12**: p. 208-215.
113. Goldberg, M.A., S.P. Dunning, and H.F. Bunn, *Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein*. Science, 1988. **242**(4884): p. 1412-5.
114. Munoz-Sanchez, J. and M.E. Chanez-Cardenas, *The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model*. J Appl Toxicol, 2019. **39**(4): p. 556-570.
115. Hampel, N., et al., *CoCl(2) -triggered pseudohypoxic stress induces proteasomal degradation of SIRT4 via polyubiquitination of lysines K78 and K299*. FEBS Open Bio, 2023. **13**(12): p. 2187-2199.
116. Ji, Z., G.H. Liu, and J. Qu, *Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging*. J Genet Genomics, 2022. **49**(4): p. 287-298.
117. 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.
118. Kumar, S. and D.B. Lombard, *Mitochondrial sirtuins and their relationships with metabolic disease and cancer*. Antioxid Redox Signal, 2015. **22**(12): p. 1060-77.
119. Scher, M.B., A. Vaquero, and D. Reinberg, *Sirt3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress*. Genes Dev, 2007. **21**(8): p. 920-8.
120. 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.
121. Tang, X., et al., *Mitochondrial Sirtuins in cardiometabolic diseases*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(16): p. 2063-2078.
122. Jaiswal, A., et al., *Mitochondrial sirtuins in stem cells and cancer*. FEBS J, 2022. **289**(12): p. 3393-3415.
123. Lang, A., *Die Rolle des Sirtuins SIRT4 in mitochondrialer Funktion und Qualitätskontrolle, zellulärer Seneszenz und Alterung*, in *Institut für Biochemie und Molekularbiologie II*. 2017, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/>.
124. Bergmann, L., *Die Rolle des Sirtuins SIRT4 in der Zellzyklusprogression und mitotischen Zellteilung*, in *Institut für Biochemie und Molekularbiologie II*. 2022, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/>.
125. Frye, R.A., *Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(1): p. 273-9.
126. Lombard, D.B., et al., *Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(24): p. 8807-14.
127. Schwer, B. and E. Verdin, *Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins*. Cell Metab, 2008. **7**(2): p. 104-12.
128. Schwer, B., et al., *Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10224-10229.
129. Hirschey, M.D., et al., *SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 121-5.
130. Ahn, B.H., et al., *A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14447-52.
131. Yu, W., et al., *Sirt3 deficiency exacerbates diabetic cardiac dysfunction: Role of Foxo3A-Parkin-mediated mitophagy*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017.

- 1863**(8): p. 1973-1983.
132. Bao, X., et al., *Identification of 'erasers' for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach*. *Elife*, 2014. **3**: p. e02999.
133. Harkcom, W.T., et al., *NAD⁺ and SIRT3 control microtubule dynamics and reduce susceptibility to antimicrotubule agents*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(24): p. E2443-52.
134. Sun, W., et al., *SIRT3: A New Regulator of Cardiovascular Diseases*. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. **2018**: p. 7293861.
135. 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): p. 1583.
136. Mathias, R.A., et al., *Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity*. *Cell*, 2014. **159**(7): p. 1615-25.
137. Min, Z., J. Gao, and Y. Yu, *The Roles of Mitochondrial SIRT4 in Cellular Metabolism*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 783.
138. Arghmann, C. and J. Auwerx, *Insulin secretion: SIRT4 gets in on the act*. *Cell*, 2006. **126**(5): p. 837-9.
139. Guo, L., et al., *Acetylation of Mitochondrial Trifunctional Protein alpha-Subunit Enhances Its Stability To Promote Fatty Acid Oxidation and Is Decreased in Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Mol Cell Biol*, 2016. **36**(20): p. 2553-67.
140. 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. 450-463.
141. Lang, A., et al., *MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4*. *Aging-U.S.*, 2016. **8**(3): p. 484-509.
142. Ahuja, N., et al., *Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(46): p. 33583-33592.
143. Lang, A. and R.P. Piekorz, *Novel role of the SIRT4-OPAI axis in mitochondrial quality control*. *Cell Stress*, 2017. **2**(1): p. 1-3.
144. Matsushita, N., et al., *Distinct regulation of mitochondrial localization and stability of two human Sirt5 isoforms*. *Genes Cells*, 2011. **16**(2): p. 190-202.
145. Du, J., et al., *Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase*. *Science*, 2011. **334**(6057): p. 806-9.
146. Nishida, Y., et al., *SIRT5 Regulates both Cytosolic and Mitochondrial Protein Malonylation with Glycolysis as a Major Target*. *Mol Cell*, 2015. **59**(2): p. 321-32.
147. Tan, M., et al., *Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5*. *Cell Metab*, 2014. **19**(4): p. 605-17.
148. Kumar, S. and D.B. Lombard, *Functions of the sirtuin deacylase SIRT5 in normal physiology and pathobiology*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2018. **53**(3): p. 311-334.
149. Park, J., et al., *SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways*. *Mol Cell*, 2013. **50**(6): p. 919-30.
150. Zhang, Y., et al., *Lysine desuccinylase SIRT5 binds to cardiolipin and regulates the electron transport chain*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(24): p. 10239-10249.
151. Fu, L., et al., *SIRT4 inhibits malignancy progression of NSCLCs, through mitochondrial dynamics mediated by the ERK-Drp1 pathway*. *Oncogene*, 2017. **36**(19): p. 2724-2736.
152. Lang, A., et al., *SIRT4 interacts with OPA1 and regulates mitochondrial quality control and mitophagy*. *Aging (Albany NY)*, 2017. **9**(10): p. 2163-2189.
153. Yang, W., et al., *Mitochondrial Sirtuin Network Reveals Dynamic SIRT3-Dependent Deacetylation in Response to Membrane Depolarization*. *Cell*, 2016. **167**(4): p. 985-

- 1000 e21.
154. Liu, L., et al., *Dual function microtubule- and mitochondria-associated proteins mediate mitotic cell death*. Cell Oncol, 2009. **31**(5): p. 393-405.
155. Liu, L., et al., *MAP1S enhances autophagy to suppress tumorigenesis*. Autophagy, 2012. **8**(2): p. 278-80.
156. 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.
157. Behrends, C., et al., *Network organization of the human autophagy system*. Nature, 2010. **466**(7302): p. 68-76.
158. Wang, Q.J., et al., *Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration*. J Neurosci, 2006. **26**(31): p. 8057-68.
159. Yue, Z., *Regulation of neuronal autophagy in axon: implication of autophagy in axonal function and dysfunction/degeneration*. Autophagy, 2007. **3**(2): p. 139-41.
160. Csibi, A., et al., *The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4*. Cell, 2013. **153**(4): p. 840-54.
161. Shaw, E., et al., *Anabolic SIRT4 Exerts Retrograde Control over TORC1 Signaling by Glutamine Sparing in the Mitochondria*. Mol Cell Biol, 2020. **40**(2): p. e00212-19.
162. Qin, M., et al., *Autophagy in Rat Muller Glial Cells Is Modulated by the Sirtuin 4/AMPK/mTOR Pathway and Induces Apoptosis under Oxidative Stress*. Cells, 2022. **11**(17): p. 2645.
163. Li, J., et al., *Sirtuin 4 activates autophagy and inhibits tumorigenesis by upregulating the p53 signaling pathway*. Cell Death Differ, 2022. **30**(2): p. 313-326.
164. Huang, H., et al., *Acetylation of SCFD1 regulates SNARE complex formation and autophagosome-lysosome fusion*. Autophagy, 2023. **19**(1): p. 189-203.
165. Liu, M., et al., *SIRT4 regulates PTEN stability through IDE in response to cellular stresses*. FASEB J, 2019. **33**(4): p. 5535-5547.
166. He, L., F. Liu, and J. Li, *Mitochondrial Sirtuins and Doxorubicin-induced Cardiotoxicity*. Cardiovasc Toxicol, 2021. **21**(3): p. 179-191.
167. Chen, J.H., et al., *ATM-mediated PTEN phosphorylation promotes PTEN nuclear translocation and autophagy in response to DNA-damaging agents in cancer cells*. Autophagy, 2015. **11**(2): p. 239-52.
168. Skoge, R.H., C. Dolle, and M. Ziegler, *Regulation of SIRT2-dependent alpha-tubulin deacetylation by cellular NAD levels*. DNA Repair (Amst), 2014. **23**: p. 33-8.
169. Li, L. and X.J. Yang, *Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(22): p. 4237-55.
170. Garcia-Alegria, A.M., et al., *Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA*. Int J Anal Chem, 2020. **2020**: p. 8896738.
171. Nam, D.K., et al., *Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6152-6.
172. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
173. Johansson, B.G., *Agarose gel electrophoresis*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1972. **124**: p. 7-19.
174. 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.
175. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of*

- bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
176. Burnette, W.N., "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
177. Strober, W., Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
178. Baeken, M.W., et al., The selective degradation of sirtuins via macroautophagy in the MPP(+) model of Parkinson's disease is promoted by conserved oxidation sites. Cell Death Discov, 2021. **7**(1): p. 286.
179. Marin, J.J.G., E. Lozano, and M.J. Perez, Lack of mitochondrial DNA impairs chemical hypoxia-induced autophagy in liver tumor cells through ROS-AMPK-ULK1 signaling dysregulation independently of HIF-1alpha. Free Radic Biol Med, 2016. **101**: p. 71-84.
180. Corrado, M., et al., Deletion of the mitochondria-shaping protein Opa1 during early thymocyte maturation impacts mature memory T cell metabolism. Cell Death Differ, 2021. **28**(7): p. 2194-2206.
181. Gallo-Oller, G., R. Ordonez, and J. Dotor, A new background subtraction method for Western blot densitometry band quantification through image analysis software. J Immunol Methods, 2018. **457**: p. 1-5.
182. Lehmkuhl, I., et al., SIRT4 positively regulates autophagy via ULK1, but independently of HDAC6 and OPA1. bioRxiv, 2025: p. 2025.04.29.649368.
183. Amin, K., Analysis of SIRT4 regulated mitophagy by flow cytometry based methods, in Masterarbeit - Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. 2022, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
184. Kaizuka, T., et al., An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. Mol Cell, 2016. **64**(4): p. 835-849.
185. He, L., et al., SIRT4 Suppresses Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Regulating the AKT/mTOR/Autophagy Pathway. Toxicology, 2022. **469**: p. 153119.
186. Liu, Y.F., et al., SETDB1 recruits CBX3 to regulate the SIRT4/PTEN axis, inhibiting autophagy and promoting ischemia-reperfusion-induced kidney injury. Faseb j, 2025. **39**(7): p. e70509.
187. Yin, J., et al., SIRT4 is an independent prognostic factor in bladder cancer and inhibits bladder cancer growth by suppressing autophagy. Cell Div, 2023. **18**(1): p. 9.
188. Tong, X.X., et al., Ghrelin protects against cobalt chloride-induced hypoxic injury in cardiac H9c2 cells by inhibiting oxidative stress and inducing autophagy. Peptides, 2012. **38**(2): p. 217-27.
189. Tripathi, V.K., S.A. Subramaniyan, and I. Hwang, Molecular and Cellular Response of Co-cultured Cells toward Cobalt Chloride (CoCl(2))-Induced Hypoxia. ACS Omega, 2019. **4**(25): p. 20882-20893.
190. Agrawal, A., et al., Histone deacetylase 6 inhibition promotes microtubule acetylation and facilitates autophagosome-lysosome fusion in dystrophin-deficient mdx mice. Acta Physiol (Oxf), 2025. **241**(1): p. e14243.
191. Shen, Z., et al., Inhibition of HDAC6 by Tubastatin A reduces chondrocyte oxidative stress in chondrocytes and ameliorates mouse osteoarthritis by activating autophagy. Aging (Albany NY), 2021. **13**(7): p. 9820-9837.
192. Liang, T., et al., HDAC6-mediated α -tubulin deacetylation suppresses autophagy and enhances motility of podocytes in diabetic nephropathy. J Cell Mol Med, 2020. **24**(19): p. 11558-11572.
193. Guedes-Dias, P., et al., HDAC6 inhibition induces mitochondrial fusion, autophagic flux and reduces diffuse mutant huntingtin in striatal neurons. Biochim Biophys Acta,

2015. **1852**(11): p. 2484-93.
194. Murata, D., et al., *mCAUSE: Prioritizing mitochondrial targets that alleviate pancreatic cancer cell phenotypes*. *iScience*, 2024. **27**(9): p. 110880.
195. Baek, M.L., et al., *Mitochondrial structure and function adaptation in residual triple negative breast cancer cells surviving chemotherapy treatment*. *Oncogene*, 2023. **42**(14): p. 1117-1131.
196. Larrue, C., et al., *Mitochondrial fusion is a therapeutic vulnerability of acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2023. **36**: p. 1982–1994.
197. Wang, Y.S., et al., *Sirtuin 4 Depletion Promotes Hepatocellular Carcinoma Tumorigenesis Through Regulating Adenosine-Monophosphate-Activated Protein Kinase Alpha/Mammalian Target of Rapamycin Axis in Mice*. *Hepatology*, 2019. **69**(4): p. 1614-1631.
198. Sun, L., et al., *Deacetylation of ATG4B promotes autophagy initiation under starvation*. *Sci Adv*, 2022. **8**(31): p. eabo0412.
199. Lee, I.H., et al., *A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(9): p. 3374-9.
200. Meley, D., et al., *AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(46): p. 34870-9.
201. Yin, H., et al., *Impaired Cellular Energy Metabolism Contributes to Duck-Enteritis-Virus-Induced Autophagy via the AMPK-TSC2-MTOR Signaling Pathway*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 423.
202. Li, S., et al., *SIRT3 Enhances the Protective Role of Propofol in Postoperative Cognitive Dysfunction via Activating Autophagy Mediated by AMPK/mTOR Pathway*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2022. **27**(11): p. 303.
203. Dai, S.H., et al., *Sirt3 confers protection against neuronal ischemia by inducing autophagy: Involvement of the AMPK-mTOR pathway*. *Free Radic Biol Med*, 2017. **108**: p. 345-353.
204. Hong, J., et al., *SIRT5 inhibits bovine preadipocyte differentiation and lipid deposition by activating AMPK and repressing MAPK signal pathways*. *Genomics*, 2020. **112**(2): p. 1065-1076.
205. Lan, F., et al., *SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(41): p. 27628-27635.
206. Jin, D., et al., *Jiedu Tongluo Baoshen formula enhances renal tubular epithelial cell autophagy to prevent renal fibrosis by activating SIRT1/LKB1/AMPK pathway*. *Biomed Pharmacother*, 2023. **160**: p. 114340.
207. Huang, R., et al., *Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation*. *Mol Cell*, 2015. **57**(3): p. 456-66.
208. Tomaselli, D., et al., *Sirt4: A Multifaceted Enzyme at the Crossroads of Mitochondrial Metabolism and Cancer*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 474.
209. Yamamoto, K., et al., *Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I*. *Nature*, 2020. **581**(7806): p. 100-105.
210. Debnath, J., N. Gammoh, and K.M. Ryan, *Autophagy and autophagy-related pathways in cancer*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023. **24**(8): p. 1-16.
211. Kenific, C.M. and J. Debnath, *Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells*. *Trends Cell Biol*, 2015. **25**(1): p. 37-45.
212. Yang, X., et al., *The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer*. *Cell Biosci*, 2015. **5**: p. 14.
213. Yoo, J.G., Y.K. Lee, and K.H. Lee, *Enhancing autophagy leads to increased cell death in radiation-treated cervical cancer cells*. *J Obstet Gynaecol*, 2023. **43**(1): p. 2171281.

214. Xiao, Y., et al., *(125)I Radioactive Particles Drive Protective Autophagy in Hepatocellular Carcinoma by Upregulating ATG9B*. J Clin Transl Hepatol, 2023. **11**(2): p. 360-368.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Danken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jürgen Scheller für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Biochemie II durchführen zu können.

Ich danke meinen Doktorvätern Prof. Dr. Reza Ahmadian und Prof. Dr. Andreas Reichert für die Übernahme der Betreuung und die Begleitung meines Promotionsvorhabens.

Mein aufrichtiger Dank gilt vor allem Dr. Roland Piekorz, der mich während meiner gesamten Promotionszeit als direkter Betreuer begleitet hat. Für seine kontinuierliche fachliche Unterstützung, seine stetige Motivation und die zahlreichen wertvollen Diskussionen. Seine Tür stand immer für Fragen und Anregungen offen, was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ebenso danke ich dem gesamten Laborteam für die freundliche Aufnahme, die angenehme Zusammenarbeit und Unterstützung im Alltag des Forschungsbetriebs.

Ein weiterer Dank gilt dem Institut für Molekulare Kardiologie für die Möglichkeit, die Hypoxiekammer im Rahmen meiner experimentellen Arbeiten nutzen zu dürfen. Besonders danke ich Dr. Julia Hesse, die mir die Handhabung der Hypoxiekammer ausführlich erklärt und mich durch ihre fachkundige Unterstützung unterstützt hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Geduld, ihre unerschütterliche Unterstützung und ihren festen Glauben an mich während dieser Promotion bedanken. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich danke Allen, die mich auf diesem Weg durch Gespräche, Motivation, Ratschläge oder durch ihre Präsenz begleitet haben und somit einen Beitrag zu der Erstellung dieser Dissertation beigetragen haben.