

Diplomarbeit

**SIRT4-Überexpression in nicht-kleinzelligen  
Lungenkarzinomzellen**

**Auswirkungen einer SIRT4-Überexpression in nicht-kleinzelligen  
Lungenkarzinomzellen auf deren Sensibilität gegenüber Cisplatin**

eingereicht von

**Andreas Hofer**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**klinischen Abteilung für Pulmonologie**

unter der Anleitung von

**Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Anđelko Hrzenjak**

Graz, am 6. Jänner 2017

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 6. Jänner 2017*

*Andreas Hofer eh.*

## Danksagungen

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Anđelko Hrzenjak für die hervorragende Betreuung dieser Diplomarbeit. Im Falle von Fragen oder Unklarheiten war er jedes Mal ausnahmslos zur Stelle und nahm sich sehr viel Zeit für alle meine Anliegen. Seine Betreuung war von Beginn an von Wohlwollen, Hilfsbereitschaft, Ausführlichkeit und Geduld gekennzeichnet.

Mein besonderer Dank gilt auch Alexandra Bertsch, BSc, die mir sämtliche Labormethoden in der Praxis beigebracht hat. Die Anschaulichkeit und hohe Qualität ihrer Unterweisungen waren Vorbedingung für das Zustandekommen dieser Arbeit. Geduldig sah sie stets über meine Anfängerfehler hinweg und war für alle Fragen die Laborarbeit betreffend stets eine hilfsbereite und kompetente Ansprechperson.

Ich bedanke mich außerdem bei Dr. Katharina Leithner, PhD, und bei Bettina Schwemberger, BSc, für die kooperative Zusammenarbeit im Pulmo-Team am ZMF.

Weiters bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des LBI Graz am ZMF, die mir ebenfalls mehrere Male mit Rat und Tat zur Seite standen.

## Zusammenfassung

**Einleitung.** Lungenkrebs ist in Österreich die häufigste Krebstodesursache bei Männern und mittlerweile die zweithäufigste Krebstodesursache bei Frauen. Achtzig Prozent aller Lungenkarzinome sind nicht-kleinzellige Lungenkarzinome. Die Prognose ist mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 15% schlecht. Cisplatin ist das Fundament der Chemotherapie bei NSCLC, ein Problem ist hierbei die Chemotherapieresistenz. Sirtuin 4 (SIRT4) wurde in zahlreichen Studien bereits als Tumorsuppressor nachgewiesen, jüngere Untersuchungen räumen ihm allerdings auch eine Rolle in Chemoresistenzmechanismen ein. SIRT4 inhibiert die Glutaminolyse und hat wichtige Funktionen in der DNA-damage-response (DDR).

**Ziele.** In dieser Arbeit überexprimieren wir SIRT4 in A549/PAR-Zellen (kultivierte Lungenkrebszellen) mittels Transfektion von Plasmid-DNA und untersuchen die Auswirkungen dieser Überexpression auf die Cisplatin-Resistenz.

**Ergebnisse.** Wir zeigten mittels qRT-PCR und Western-Blot, dass die SIRT4-Überexpression 24 Stunden nach Transfektion mit 0,5 µg Plasmid-DNA pro Well einer 6-Well-Platte bereits nahezu maximal ist. Auf Basis dieser Ergebnisse zeigten wir im Western-Blot für aktivierte Caspase 3 und 7 und mittels Durchflusszytometrie nach Markierung apoptotischer Zellen, dass in Zellen mit SIRT4-Überexpression nach Cisplatin-Behandlung weniger Apoptose nachweisbar ist, als in Leerplasmid-Kontrollen. Colony assays zeigten, dass SIRT4-Überexpression das Kolonienwachstum der Zellen nicht verbessert.

**Diskussion.** Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion mit 0,5 µg Plasmid-DNA ist die SIRT4-Überexpression optimal für weitere Versuche. Höhere Plasmid-Mengen und längere Dauer bis zur Weiterbehandlung erhöhen die SIRT4-Expression nicht mehr, niedrigere Plasmid-Mengen führen zu keiner ausreichenden SIRT4-Überexpression. SIRT4-Überexpression scheint A549-Zellen tatsächlich weniger empfindlich gegenüber Cisplatin-Behandlung zu machen. Das schlechtere Kolonienwachstum in den Colony assays unterstützt die These von der „dualen“ Rolle des SIRT4 als Tumorsuppressor einerseits und als Vermittlerprotein von Chemoresistenz andererseits. Die Aussagekraft unserer Ergebnisse wird durch die geringen Versuchsanzahlen und die hohen notwendigen Cisplatin-Konzentrationen limitiert.

## Abstract

**Introduction.** In Austria lung cancer is the most frequent cancer-related cause of death among men and the second most frequent cancer-related cause of death among women. Eighty percent of all lung cancers are non-small cellular lung cancers (NSCLC). With 15% 5-year-survival rate the prognosis of NSCLC is poor. Cisplatin is frequently the basis of combined chemotherapy in NSCLC, however a common problem is chemoresistance. In various studies sirtuin 4 (SIRT4) has been shown to work as a tumorsuppressor. However recent investigations indicate that SIRT4 also plays a role in chemoresistance mechanisms. SIRT4 inhibits glutaminolysis and participates in DNA-damage-response (DDR).

**Aims.** In this study we overexpressed SIRT4 in A549/PAR cells (cultivated lung cancer cells) with transfection of plasmid-DNA and investigated the effects of this overexpression concerning cisplatin-sensitivity.

**Results.** By qRT-PCR and western blot we showed that 24 hours after transfection with 0.5 µg plasmid-DNA/well in a six-well-plate SIRT4-overexpression reaches almost the maximum level. Based on these results we showed lower cisplatin-induced apoptotic rate in SIRT4-overexpressing cells compared to empty plasmid - controls, by using western blot for activated caspase 3 and 7 and flow cytometry. Colony assays showed, that cells with SIRT4-overexpression have lower colony-forming ability than control cells transfected with empty plasmid.

**Discussion.** Cell transfection with 0.5 µg of SIRT4-plasmid DNA for 24 hours delivered the best SIRT4 expression level for further investigations. Higher amounts of plasmid-DNA and later cell harvesting time do not further increase SIRT4-expression. Lower amounts of plasmid-DNA aren't capable of inducing sufficient SIRT4-overexpression. We show here that SIRT4-overexpression seems to reduce sensitivity against cisplatin in A549 cells. Slightly decreased colony formation upon SIRT4-overexpression supports the hypothesis of the "dual role" of SIRT4. Thus, in cancer cells SIRT4 could act both as a tumorsuppressor and as a mediator in chemoresistance. The significance of our results is limited by low number of experiments and high cisplatin-concentrations used for apoptosis induction.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	8
1 Einleitung.....	9
2 Ziele .....	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Ausgangslösungen und –produkte.....	23
3.2 Puffer und angefertigte Lösungen .....	24
3.3 Antikörper.....	25
3.4 Geräte .....	25
3.5 Plasmidisolierung .....	26
3.5.1 Anzucht von Bakterien .....	26
3.5.2. Plasmidisolierung.....	26
3.5.3 Qualitätskontrolle des Plasmids mittels Restriktionsanalyse (Not1) und Agarosegelelektrophorese .....	27
3.6 Zellkultur .....	28
3.6.1 Zellen auftauen .....	29
3.6.2 Zellen splitten.....	29
3.6.3 Zellzahlbestimmung am CASY .....	30
3.6.4 Ausplattieren auf 6-Well-Platten .....	31
3.6.5 Transfektion mittels jetPRIME® .....	31
3.6.6 Bereiten von Cisplatin-Medium .....	32
3.6.7 Zellernte für RNA-Analytik (6-Well-Platten).....	33
3.6.8 Zellernte für Proteinanalytik (6-Well-Platten) .....	33
3.6.9 Colony assay .....	33
3.7 Proteinanalytik mittels Western-Blot.....	34
3.7.1 Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins mittels BCA-Kit .....	34

3.7.2 Herstellung von SDS-PA -Gelen.....	35
3.7.3 Durchführen eines Western-Blot.....	37
3.8 RNA -Analytik mittels qPCR.....	41
3.8.1 RNA -Isolierung.....	41
3.8.2 cDNA -Synthese .....	41
3.8.3 qRT-PCR-Pipettieren .....	42
3.9 Durchflusszytometrie (FACS).....	44
4 Ergebnisse .....	46
4.1 Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse .....	46
4.2 SIRT4-Überexpression.....	46
4.2.1 qRT-PCR .....	46
4.2.2 Western-Blot - Ergebnisse .....	48
4.3 Colony assay.....	51
4.4 Cisplatin-Versuche .....	51
4.4.1 Western-Blot für Caspase 3 und 7 .....	51
4.4.2 Durchflusszytometrie (FACS) .....	52
5 Diskussion.....	55
5.1 SIRT4-Überexpression .....	55
5.2 Auswirkungen einer SIRT4-Überexpression in A549/PAR auf die Cisplatin-Resistenz.....	58
Literaturverzeichnis .....	62

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schnittstellen von Not1 .....	28
Abb. 2: Verwendete Primersequenzen für humanes SIRT4 .....	42
Abb. 3: Restriktionsanalyse nach Plasmidisolierung mit Not1 .....	46
Abb. 4: Realtime-PCR von transfizierten A549/PAR .....	47
Abb. 5: Western-Blot-Analyse der Zelllysate von A549/PAR-Zellen, transfiziert mit unterschiedlichen Plasmid-Mengen.....	48
Abb. 6: Western-Blot-Analyse der Zelllysate transfizierter A549/PAR –Zellen nach unterschiedlichen Erntezeitpunkten.....	49
Abb. 7: Western-Blot-Analyse der Zelllysate von A549/PAR-Zellen nach Transfektion mit großen Mengen an Plasmid-DNA .....	50
Abb. 8: Western-Blot mit Lysaten aus humanen Geweben und SIRT4-transfizierten Proben .....	50
Abb. 9: Colony assay mit pCDNA3.1- und pCDNA3.1-/SIRT4-transfizierten A549/PAR-Zellen.....	51
Abb. 10: Western-Blots für Caspase 3 und 7 nach Cisplatin-Behandlung von transfizierten A549/PAR-Zellen .....	52
Abb. 11: FACS-Histogramme von transfizierten A549/PAR nach 24 und 48 Stunden Cisplatin-Behandlung (11,6 $\mu$ M).....	53
Abb. 12: FACS-Analyse von transfizierten A549/PAR nach 24 und 48 Stunden Cisplatin-Behandlung (11,6 $\mu$ M).....	54

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Ausgangslösungen und –produkte .....	23
Tab. 2: Angefertigte Lösungen .....	24
Tab. 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper .....	25
Tab. 4: Verwendete Geräte .....	25
Tab. 5: Plasmidisolierung .....	46

## 1 Einleitung

In Österreich erkranken jedes Jahr etwa 39.000 Menschen an Krebs, wobei 12 Prozent dieser Neuerkrankungen auf Lungenkrebs entfallen. Während also zirka 4500 Menschen jedes Jahr an Lungenkrebs erkranken, sterben im selben Zeitraum 3600 daran, was einen Anteil von 18 Prozent an der Krebsmortalität insgesamt ausmacht. (1) Damit ist Lungenkrebs nach wie vor die häufigste Krebstodesursache bei Männern (gefolgt vom Prostata- und Kolonkarzinom) und mittlerweile die zweithäufigste Todesursache bei Frauen (nach dem Mammakarzinom). Für zirka 85 Prozent aller Karzinome der Lunge bzw. der unteren Atemwege wird inhalatives Tabakrauchen verantwortlich gemacht. (2)

Histologisch unterteilt man Lungenkarzinome grob in kleinzellige (SCLC = small cell lung cancer) und nicht-kleinzellige (NSCLC = non small cell lung cancer). Der Anteil der NSCLC an der Gesamtinzidenz des Bronchialkarzinoms beträgt zirka 80 Prozent. Diese Unterscheidung ist insbesondere im Hinblick auf die Therapieplanung von entscheidender Bedeutung. Während operatives Vorgehen bei SCLC die Ausnahme darstellt, wird eine onkologische Resektion mit primär kurativem Therapieansatz und adjuvanter Radiochemotherapie bei NSCLC angestrebt. Die 5-Jahres-Überlebensraten (5-JÜR) schwanken hierbei stark in Abhängigkeit vom Tumorstadium bei Diagnosestellung, wobei bei den mittleren Tumorstadien IIIA- IIIB 5-JÜR von zirka 30 Prozent erzielt werden. (2) Die Gesamtüberlebensrate aller Stadien zusammen ist mit etwa 15 Prozent allerdings sehr niedrig. (3)

Das Fundament der Chemotherapie bei NSCLC ist eine auf Cisplatin basierende Kombinationstherapie (z.B. zusammen mit Etoposid oder Pemetrexed). Cisplatin ist eine alkylierende Substanz, die über eine Quervernetzung von DNA-Strängen (bevorzugt von Guanin und Adenin) zu DNA-Strangbrüchen und somit zum Zelltod führt. (4) Zusätzlich hemmt es DNA-Reparaturmechanismen und die Telomerase-Aktivität. Neueste Studien bestätigen die Unabdingbarkeit von Cisplatin in der NSCLC-Therapie, dessen Wirksamkeit in der Krebstherapie trotz teils starker Nebenwirkungen (Emesis/Nausea, Knochenmarksuppression, Immunsuppression, Haarverlust, metallischer Mundgeschmack, Nierenschäden u.a. - insbesondere die hohe Emetogenität wird von PatientInnen als sehr belastend empfunden) deutlich über der anderer Chemotherapeutika liegt. (4, 5) In Zusammenschau mit den oben genannten epidemiologischen Daten, die die schlechte Prognose von NSCLC ver-

anschaulichen, kommt der Frage nach den molekularbiologischen Mechanismen von Chemoresistenz einige Bedeutung zu. Zu verstehen, welche zellulären Mechanismen die einen Tumorzellen vor Cisplatin schützen und andere nicht, könnte letztendlich den Weg für gezieltere Krebsbehandlungen bereiten und die gegenwärtig im Allgemeinen schlechte Prognose von Bronchialkarzinomen verbessern. (6)

Die intensive Erforschung von Chemoresistenzmechanismen wurde insbesondere interessant, seit die Erfolgsraten von platinbasierten Kombinationstherapien auch durch die Optimierung von Wirkstoffkombinationen und zeitlicher Stufenschemata in der Verabreichung von Medikamenten und Radiotherapien scheinbar ein Plateau erreicht haben. (6) Die Erkenntnis, dass die weitere Verbesserung bestehender Krebstherapien ein tieferes Verständnis des zellulären Toxinmetabolismus und der molekularbiologischen Mechanismen, mit denen eine Tumorzelle sich vor Chemotherapeutika schützen kann, bedingt, führte bereits zur Entdeckung verschiedener Moleküle, denen in diesen Vorgängen womöglich Schlüsselfunktionen zukommen könnten.

Eine nahe liegende Möglichkeit, wie sich eine Zelle vor einem Toxin schützen kann, ist, dass sie die intrazelluläre Konzentration durch Permeabilitätsänderungen ihrer Membran möglichst weit absenkt. Möglich wäre dies entweder dadurch, dass das Toxin von vorneherein die Zellmembran nicht passieren kann, oder dass es sehr effizient aus der Zelle wieder ausgeschleust wird. Dies ist ein möglicher Ansatz, der allerdings in seinen Grundlagen noch sehr wenig erforscht und verstanden ist. Die Absenkung der intrazellulären Konzentration durch gesteigerten Abbau ist ebenfalls eine Möglichkeit. Hinweise verdichten sich, dass Thioalkohole wie Glutathion, ein Tripeptid aus Cystein, Glutaminsäure und Glycin, das für Zellen insbesondere in der Abwehr freier Sauerstoffradikale (ROS) von Bedeutung ist, hier eine Rolle spielen. Glutathion ist in der Lage, sich kovalent an Cisplatin zu binden und Komplexe zu bilden, die von der Zelle wieder ausgeschleust werden können. Darüber hinaus scheint es die Quervernetzung von DNA-Strängen zu verhindern und die Funktionsfähigkeit gewisser Reparaturenzyme erhalten zu können. (7)

Die Expression von regulatorischen Proteinen des Zellzyklus – Onkogene und Tumorsuppressorgene - wurde ebenfalls bereits in Verbindung mit Cisplatin-Resistenz gebracht. Onkogene bezeichnen Genprodukte, deren Funktion eine

Zelle zur malignen Entartung bringen kann. Zumeist handelt es sich bei Onkogenen um Proteine, die die Zellproliferation und das Zellwachstum fördern, Apoptose verhindern oder regulatorische Funktion bei der Expression anderer Proteine haben. Entsprechende Korrelationen in Bezug auf Cisplatin-Resistenz wurden zum Beispiel bei den bekannten Onkogenen c-fos und c-myc gefunden (7); bei beiden handelt es sich um Gene für Transkriptionsfaktoren, die die Expression einer Vielzahl von Genen steuern und deren Fehlfunktion eine Zelle deshalb maligne entarten lassen kann (8, 9). Deregulation von Myc-Genen wurde bereits in einer Vielzahl an Malignomen verschiedenster Lokalisation beobachtet, so weisen etwa Ovarial-, Pankreas-, Kolonkarzinome und noch viele andere eine Überexpression an Myc-Proteinen auf. (10) In Bezug auf Chemoresistenz konnte auch bereits ein Zusammenhang mit der c-myc-Expression in Melanomzellen aufgezeigt werden. (11) Überdies zeigt sich in Cisplatin-resistenten Zellen im Vergleich zu Cisplatin-sensiblen auch eine vermehrte Expression von c-fos, sowie eine Umkehrung der Cisplatin-Resistenz bei Downregulation der c-fos-Expression. Eine Überexpression von C-abl, einer Tyrosinkinase ohne Rezeptorfunktion, erhöht ebenfalls die Sensitivität gegenüber Cisplatin, weshalb dem Enzym eine Bedeutung im Signaltransduktionsweg der Apoptose zugeschrieben wird. (7)

Im Vergleich zu Onkogenen sind Tumorsuppressorgene Gene, welche die Zelle vor maligner Entartung schützen, indem sie zum Beispiel Schlüsselfunktionen bei der DNA-Reparatur oder bei der Induktion von Apoptose übernehmen. Bekannte Tumorsuppressorgene sind etwa das Retinoblastom-Gen oder p27 und p53. Der Zusammenhang zwischen Expressionsunterschieden von Tumorsuppressorgenen in Krebszellen und deren Suszeptibilität für Cisplatin ist weniger deutlich als bei den Onkogenen. Untersuchungen an verschiedenen Krebsentitäten bezüglich eines Zusammenhangs zwischen p53-Expression und Cisplatinresistenz lieferten widersprüchliche Ergebnisse. (7)

Eine weitere Stoßrichtung in der Chemoresistenzforschung ist die DNA-Reparatur. Nachdem Cisplatin die DNA durch Quervernetzung von Adenin und Guanin zerstört, wäre es einer Zelle durch effiziente Reparaturmechanismen theoretisch möglich, die Schäden durch das Cisplatin zu kompensieren. Tatsächlich wurden bereits mehrere Reparaturenzyme entdeckt, die eine Rolle in der Reparatur von durch Cisplatin entstandenen DNA-Schäden spielen. Insbesondere die Beschäftigung mit einer Endonuklease namens ERCC1 lieferte bereits einige hoffnungsvol-

le Ergebnisse. So zeigt sich eine deutliche Korrelation zwischen hoher ERCC1-Expression in Tumorzellen und deren Resistenz gegenüber platinhaltigen Medikamenten. Dieser Zusammenhang erscheint manchen Forschern als so gesichert und relevant, dass sie sogar die ERCC1-Bestimmung bei Tumoren, die mit Cisplatin behandelt werden sollen, als Routineuntersuchung vorschlagen. (12, 13)

Beta-III-Tubulin ist Bestandteil des Zytoskeletts und wurde ebenfalls bereits intensiv bezüglich seiner Rolle in der Tumorbio­logie erforscht. TBAs (tubulin binding agents) sind eine weitere Gruppe von Zytostatika, deren Wirksamkeit darauf beruht, dass sie den Aufbau des Spindelapparats während der Mitose hemmen. Vertreter der Gruppe sind Taxane (wie etwa Paclitaxel, Docetaxel), Vinca-Alkaloide (das bekannteste darunter ist Vincristin) und Colchicin. (14) Ihre Wirksamkeit beruht auf der Verhinderung des Aufbaus von Mikrotubuli, die ja Polymere aus einzelnen Tubulin-Monomeren darstellen, und aus denen der Spindelapparat während der Mitose aufgebaut ist. Eine hohe Expression von  $\beta$ III-Tubulin in Tumorzellen wird generell mit schlechterer Krankheitsprognose assoziiert, insbesondere was die Resistenz gegenüber TBAs und die Metastasierungsrate anbelangt. Dies ist in klinischer Hinsicht in Bezug auf platinhaltige Krebstherapien deshalb interessant, weil die gemeinsame Verabreichung von Cisplatin mit TBAs, vor allem zusammen mit Paclitaxel, eine häufig angewandte Wirkstoffkombination darstellt. Eine neue Generation von TBAs, die sogenannten Epothilone scheinen durch hohe  $\beta$ III-Tubulin-Werte weniger in ihrer Wirksamkeit abgeschwächt zu werden und könnten deshalb in zukünftigen Therapieschemata vermehrt eingesetzt werden. (15)

Ein großes, enorm vielfältiges und intensiv beforschtes Thema in der Chemoresistenzforschung ist auch das Thema microRNAs. MicroRNAs sind eine Gruppe nicht-kodierender kurzkettiger RNA-Moleküle (im Mittel umfassen sie zirka 22 Nukleotide), die die Expression einer Vielzahl an Genen regulieren. Ebenfalls ist bekannt, dass es sich bei den durch miRNAs regulierten Genen zu einem großen Teil um mit Krebs assoziierte Gene handelt. MicroRNAs regulieren die Genexpression, indem sie an homologe Areale in nicht-kodierenden Abschnitten von messengerRNA binden und somit die Translation der mRNA unterbinden. Sie regulieren die Genexpression also auf post-transkriptionaler Ebene, indem sie die Umschreibung der mRNA in ein Protein (Translation) verhindern. Immer mehr Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen deregulierten oder mutierten

miRNAs in Lungenkrebszellen auf, was sie als wichtige Regulatoren der Expression von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und anderen Genen mit Bedeutung in der Tumorentstehung und eben auch in der Chemoresistenzentwicklung ins Gespräch bringt. (3) Der Zusammenhang zwischen miRNA-Expressionsmuster in Tumorzellen und Chemotherapiesensitivität wurde auch bereits in einigen Studien nachgewiesen. (16) Alle diese vielversprechenden Erkenntnisse bezüglich miRNAs bringen diese vielfältige Molekülgruppe auch als zukünftige Biomarker zum Abschätzen der Wirksamkeit bestimmter Chemotherapieformen ins Gespräch. (3) Neben den oben genannten Molekülgruppen gibt es noch zahlreiche andere Biomoleküle, deren Bedeutung in der Tumorbio­logie noch nicht klar ist und deren Erforschung noch in den Kinderschuhen steckt. Zu ausführlich über sie zu berichten würde den Rahmen dieser Arbeit naturgemäß sprengen, die oben angeführten Forschungsergebnisse markieren vielmehr die Hauptstoßrichtungen der Chemoresistenzforschung, die den Umfangreichtum und die Komplexität dieses noch in weiten Teilen unverstandenen Themas aufzeigen. Für diese Arbeit unerlässlich ist allerdings die Beschäftigung mit einer weiteren Molekülgruppe, der Bedeutung in (wie so häufig) vielfältigsten zellulären Mechanismen zugesprochen wird: den Histondeacetylasen.

Histondeacetylasen (HDACs) sind eine Gruppe hochkonservierter Enzyme, die auch in Tieren, Pflanzen, Pilzen und Archaeobakterien vorkommen. Es existieren 18 humane Histondeacetylasen, die umfangreiche Sequenzhomologien mit fungalen und prokaryontischen HDACs aufweisen. Die Aufgabe von HDACs ist – ihr Name legt es nahe – die Deacetylierung von Histonen (ihr Substrat sind hierbei Lysinreste). Histone sind große Proteine, auf denen die DNA im Zellkern aufgewickelt ist und deren Modifikation wichtig ist, um DNA aus dem Verband mit dem Histon freizulegen, damit sie transkribiert werden kann. HDACs funktionieren als Teil großer Multiproteinkomplexe in Zusammenarbeit mit anderen Enzymen wie etwa Histonacetyltransferasen. Diese Multiproteinkomplexe modifizieren Histone um die Transkription von Genen zu regulieren. HDACs sind also epigenetische Regulatoren der Transkription. (17, 18) Als Enzyme, die die Transkription von Genen steuern, liegt deren Beteiligung in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen nahe, insbesondere der Tumorentstehung. (19) Eine Fehlfunktion von HDACs wird aber auch mit anderen Krankheitsbildern in Zusammenhang gebracht, etwa mit viralen Infektionen, Herzleiden oder epigenetischen Anpassungen

bei Drogenmissbrauch. Seit längerem ist auch bereits bekannt, dass HDACs in der Lage sind, andere Proteine als Histone zu modifizieren, was eine (patho-) physiologische Funktion von HDACs jenseits der bisherigen Erkenntnisse möglich erscheinen lässt. (17, 18)

Wie bereits erwähnt existieren 18 humane Histondeacetylasen, von denen 11 einfach als HDAC1 bis HDAC11 bezeichnet werden. Anhand von Sequenzhomologien werden die 18 humanen Histondeacetylasen in 4 Klassen eingeteilt. Die Klassen 1 und 2 umfassen die HDACs 1 bis 10. Die Klasse 4 beinhaltet HDAC11 und mit ihm verwandte Moleküle, die selbst allerdings nicht als HDACs bezeichnet werden. Die Klasse 3 der humanen HDACs repräsentiert eine Gruppe von Molekülen, die keine Sequenzhomologien mit den übrigen elf humanen HDACs aufweisen: die Sirtuine. (18)

Entdeckt und als eigene Gruppe klassifiziert wurden die Sirtuine aufgrund ihrer Homologie zum Sir2-Protein des Backhefepilzes (*Saccharomyces cerevisiae*). (20) Auch bei ihnen handelt es sich um hochkonservierte Moleküle, die unter anderem in eukaryontischen Einzellern und Würmern vorkommen. Es existieren sieben humane Sirtuine, die sich von den übrigen HDACs in ihrer Wirkweise dadurch unterscheiden, dass ihre Deacetylasefunktion  $\text{NAD}^+$  (Nikotinamiddinukleotid)-abhängig ist. Sirtuine deacetylieren  $\text{NAD}^+$ -abhängig Lysinreste, wobei Nikotinamidmononukleotid (NAM) entsteht und der Acetylrest vom Lysin auf ADP-ribose übertragen wird. (21)

Einer breiteren Öffentlichkeit wurden Sirtuine vor allem als „anti-aging“-Moleküle bekannt. Das Sir2-Protein der Backhefe hat sich diese Bezeichnung auch redlich verdient, es wirkt in den Einzellern in der Tat als Regulator der Lebenszeitspanne. (22) Aber auch humane Sirtuine haben Funktionen, die die Langlebigkeit einer Zelle betreffen. So erfüllen sie Aufgaben in der DNA-Reparatur, in der Apoptose, Autophagie und besonders entscheidende Funktionen in metabolischer Homöostase und im transcriptional silencing. (21, 23) Versuche am Mausmodell bestätigten den Zusammenhang zwischen Säugetier-Sirtuinen und Langlebigkeit. So zeigten Mäuse mit kalorienreduzierter Diät (KRD – die simpelste Methode zur Lebensverlängerung) eine erhöhte Expression von SIRT1 und SIRT3, jedoch eine Verminderung von SIRT4. Durch eine zwanzig bis vierzig prozentige Kalorienreduktion in der Nahrung konnten am Mausmodell sogar zahlreiche Tumorentstehungen verhindert werden, selbst bei Knockout-Mäusen für Tumorsuppressorgene

oder bei artifizieller Überexpression von Onkogenen. In welchem Umfang die tumor-suppressive Funktion von KRD den Sirtuinen zuzuschreiben ist bleibt hierbei jedoch unklar. Sehr wahrscheinlich spielt die Stressreduktion, die durch KR auf zellulärer Ebene im allgemeinen entsteht, ebenfalls eine Rolle. (24) Dass Sirtuine in Tumoren dereguliert sind und bestimmte Aufgaben in deren Stoffwechsel haben, zeigte sich auch bereits in der Untersuchung von Basalzellkarzinomen und Endometriumkarzinomen. (25, 26)

Die sieben humanen Sirtuine kommen nicht ubiquitär in der ganzen Zelle vor, sondern sind auf gewisse Zellkompartimente beschränkt. Die Sirtuine 6 und 7 kommen ausschließlich im Zellkern vor. Sirtuin 2 findet sich ausschließlich im Zytosol, Sirtuin 1 vor allem im Zellkern aber auch im Zytosol. Die Sirtuine 3, 4 und 5 finden sich ausschließlich in Mitochondrien. (27)

Mitochondrien sind die mit Abstand bedeutendsten Organellen zur Energieproduktion und metabolischen Homöostase einer Zelle. (28) Nahezu alle hochenergetischen Vorgänge – ATP-Synthese, oxidative Phosphorylierung,  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, Entgiftungsvorgänge u.a. – finden in den Mitochondrien statt. Zusätzlich beinhalten sie eigene mitochondriale DNA, die einen Anteil der Proteine kodieren, die für die enzymatischen Vorgänge im Inneren von Mitochondrien notwendig sind. Aufgrund dessen kommen insbesondere den mitochondrialen Sirtuinen (in Zusammenwirken mit SIRT1) Schlüsselrollen in der metabolischen Homöostase zu. Sie steuern diese sowohl durch direkte Aktivierung oder Inaktivierung von Enzymen, als auch durch Beeinflussung der Expression mitochondrialer DNA, sowie der posttranslationalen Modifikation (PTM) mitochondrialer Proteine. (29)

Von den mitochondrialen Sirtuinen ist SIRT3 das bisher am besten erforschte, und das am eindeutigsten mit Langlebigkeit assoziierte Sirtuin. (22) Auf zellbiologischer Ebene zeichnet es sich durch seine wirkungsvolle Deacetylase-Aktivität aus. So zeigten Untersuchungen bereits, dass SIRT3 wahrscheinlich einen Großteil der Lysin-deacetylierungen innerhalb der Mitochondrien bewerkstelligt. Die vermehrte Produktion von SIRT3 kann (wie oben bereits beschrieben) durch Fasten und körperliches Training angeregt werden. Da SIRT3 eine der wichtigsten Deacetylasen in Mitochondrien ist und somit wesentlich an der Regulation mitochondrialer Proteine beteiligt, konnte bereits vielfach ein Zusammenhang zwischen SIRT3-Dysfunktion und metabolischen Erkrankungen hergestellt werden. So entwickelten SIRT3-ko-Mäuse (knockout) Störungen in der Glucose-Toleranz, eine Fettleber

und ein metabolisches Syndrom. (30) In anderen Studien konnten ebenfalls Zusammenhänge zwischen SIRT3 und  $\beta$ -Zell-Dysfunktion bei Typ-II-Diabetes mellitus und Herzerkrankungen hergestellt werden. (31, 32) Darüber hinaus konnte SIRT3 auch zuverlässig mit Krebsentstehung aus verschiedensten Ursprungsgeweben (Prostata, B-Zellen, Leber, St.p. Radiatio) in Verbindung gebracht werden. (34–38) Der Beitrag von SIRT3 zur Tumorsuppression wird auf seine potente Fähigkeit zum Schutz der Zelle vor freien Sauerstoffradikalen (ROS – engl.: reactive oxygen species) zurückgeführt, wodurch es einen wesentlichen Beitrag zur genomischen Stabilität leisten dürfte. (33)

Die genauen Funktionen von SIRT5 sind noch weniger klar, im Vergleich zu SIRT1 oder SIRT3 zeigt SIRT5 allerdings eine erheblich geringere Deacetylase-Aktivität. Neuere Forschungen schreiben SIRT5 allerdings eine Rolle in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen zu, wo es demalonylierend und desuccinylierend wirkt. Lange Zeit konnte auch kein Zusammenhang zwischen SIRT5 und Krebs gefunden werden, neuere Forschungen an Ovarialkarzinomen legen einen solchen Zusammenhang allerdings nahe. (29)

Im Gegensatz zu den übrigen sechs humanen Sirtuinen, die alle eine stärker oder schwächer ausgeprägte Deacetylasefunktion besitzen, fehlt diese bei SIRT4. (39) SIRT4 funktioniert als Mono-ADP-Ribosyltransferase. Mono-ADP-Ribosylierung findet sowohl in bakteriellen wie auch in menschlichen Zellen in hochkonservierter Weise statt. Von einem  $\text{NAD}^+$ -Molekül wird hierbei eine ADP-Ribose auf ein acetyliertes Zielprotein übertragen. ADP-Ribosylierung wird von verschiedenen Enzymen katalysiert und ist eine Methode zu Aktivierung oder Inaktivierung von anderen Enzymen beziehungsweise Proteinen. Mono-ADP-ribosylierte Proteine in Zellen umfassen zum Beispiel Histone, Aktin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin und die Glutamatdehydrogenase (GDH). Die wesentliche Aufgabe von SIRT4 ist die Inaktivierung der Glutamatdehydrogenase über ADP-Ribosylierung (24), wodurch ihm eine wichtige Rolle in der Regulation des Glutamin-Metabolismus zukommt. (40)

Auf biochemischer Ebene wird aus Glutamin über die Glutaminase unter Abspaltung von Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) Glutamat. Glutamat kann dann unter Abspaltung eines weiteren Ammoniums und Reduzierung eines  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADPH}$  zu  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ -KG) umgesetzt werden, was von der Glutamatdehydrogenase bewerkstelligt wird. (41)

Glutamin spielt eine zentrale Rolle in der Biochemie des Menschen, es ist an verschiedenen für das Überleben von Zellen zentralen Stoffwechselfvorgängen essenziell beteiligt. Da Glutamin zwei Aminogruppen trägt, eignet es sich hervorragend als Vehikel um Stickstoff aus der Peripherie des Körpers zu Endorganen des Stickstoffmetabolismus zu transportieren, nämlich zur Leber und zur Niere. Dort wird der Stickstoff entweder im Harnstoffzyklus in der Leber zu Harnstoff verarbeitet und dadurch über die Nieren ausscheidungsfähig gemacht oder direkt in der Niere über Abspaltung zweier Ammonium-Moleküle ausgeschieden, wodurch wiederum  $\alpha$ -KG als Endprodukt übrigbleibt. Stickstoffentgiftung ist also eine wesentliche Aufgabe des Glutamins. (42)

Zusätzlich ist Glutamin ein wichtiges Substrat im Energiestoffwechsel. Über die Alanin-Aminotransferase (ALT) kann Glutamat durch Übertragen einer Aminogruppe auf Pyruvat L-Alanin bilden. Aus Glutamat wird dabei wiederum  $\alpha$ -KG, das als anaplerotisches Molekül in den Citratzyklus (TCA) eingehen kann. Alanin wiederum ist die wichtigste Aminosäure im Energiestoffwechsel, da sie über Desaminierung (durch ALT oder Alanin-Dehydrogenase) als Pyruvat in den TCA eingehen kann. Alanin stellt deshalb neben Lactat auch ein wesentliches Substrat der Glukoneogenese in der Leber dar. In der Niere ist Glutamin selbst das Hauptsubstrat der Glukoneogenese, weil die Ammoniumreste nach der Umwandlung in  $\alpha$ -KG praktischerweise im Harn gleich ausgeschieden werden können, wodurch Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) zur pH-Homöostase gespart werden kann. (42) Und nicht zuletzt ist Glutamat als desaminierte Glutaminsäure der wichtigste excitatorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem. (43) Aufgrund der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Glutamin und Alanin verwundert es deshalb auch nicht, dass die beiden jene Aminosäuren mit der höchsten Konzentration im Blut sind. (44)

Eine besondere Rolle spielt Glutamin im Metabolismus von Tumorzellen. Manche Tumorzellen können in Abwesenheit von Glutamin überhaupt nicht wachsen. Um ihre Zellproliferation und eine möglichst anabole Stoffwechsellage aufrechtzuerhalten gewinnen Tumorzellen einen Großteil ihrer Energie aus anaerober Glykolyse, die zwar weniger effizient, jedoch schneller mehr Energie liefert als der Citratzyklus (TCA). Überdies verwendet die Tumorzelle End- und Zwischenprodukte der Glykolyse als Substrate für proliferationsrelevante Biosynthesen wie den Pentosephosphatweg. Das Problem hierbei ist allerdings, dass die Endprodukte der Glykolyse, Pyruvat und Lactat, sofern sie nicht im TCA weiterverarbeitet werden,

den pH-Wert in der Tumorzelle saurer machen. Bei der Glutaminolyse wird, wie bereits beschrieben, Glutamin durch die Glutaminase (GLS) zu Glutamat und dieses über die Glutamatdehydrogenase (GDH) weiter zu  $\alpha$ -KG abgebaut, wobei bei jeder dieser Katalysen ein Ammonium-Ion abgespalten wird. Diese abgespaltenen Ammonium-Ionen wirken der Übersäuerung der Zelle infolge der Glykolyse entgegen und ist von essentieller Bedeutung, da die molekularbiologischen Funktionen in einer Zelle nur unter relativ konstanten pH-Wert-Bedingungen ablaufen können. Ein leistungsfähiger Glutaminmetabolismus ist für eine Tumorzelle also in zweifacher Hinsicht wichtig: Zum einen zur Aufrechterhaltung der pH-Wert-Stabilität und zum anderen zur Energiegewinnung, da ja  $\alpha$ -KG wiederum ein Substrat des TCA ist. (45) So wurde bereits gezeigt, dass die Inhibierung von GLS das Zellwachstum einschränkt und Zellen vor maligner Entartung schützt. (46, 47)

Nun hemmt SIRT4 durch ADP-Ribosylierung die GDH und inhibiert somit insgesamt die Glutaminolyse. In der Tat weisen bereits einige Studien die tumor-suppressive Funktion des SIRT4 *in vitro* und *in vivo* nach. Demnach spielt SIRT4 über seine inhibierende Wirkung auf den Glutaminstoffwechsel auch eine wichtige Rolle bezüglich genomischer Stabilität und DNA-damage-response (DDR). Dieser Zusammenhang kann dahingehend vermutet werden, dass SIRT4 über Inhibierung des Glutaminstoffwechsels das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus hemmt und die Proliferation stoppt, damit die Zelle ihre DNA-Schäden reparieren kann. SIRT4 gewährleistet somit, dass sich Zellen mit geschädigter DNA nicht weiter vermehren und verhindert dadurch die Tumorentstehung. Der Zusammenhang zwischen SIRT4-Verlust in einer Zelle, genomischer Instabilität und verändertem Glutaminstoffwechsel konnte auch bereits gezeigt werden. SIRT4-ko-Mäuse entwickelten spontan verschiedene Arten von Krebs, vor allem Lungenkrebs. (40) Die Verbindung zwischen Zellwachstum, gesteigerter Glutaminolyse und erniedrigtem SIRT4 konnte auch in einer Untersuchung des mTORC1 (mammalian Target of Rapamycin Complex 1), eines regulatorischen Multienzymkomplexes aktiviert von Aminosäuren, Wachstumsfaktoren und für den Energiehaushalt einer Zelle relevanten Parametern, gezeigt werden. mTORC1 steigert die Glutaminolyse und dadurch die Zellproliferation indem es die SIRT4-Expression hemmt. (48)

Auch in vielen menschlichen Malignomen konnte SIRT4 bereits als wichtiger Tumorsuppressor identifiziert werden. So konnte eine deutliche Downregulation von SIRT4 in Brustkrebszellen gezeigt werden. (49) Ebenfalls führte eine artifizielle

SIRT4-Überexpression in Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* zu verzögertem Zell- und Tumorwachstum. (41) Untersuchungen von Magen-Adenokarzinomzellen zeigten eine signifikante Downregulation von SIRT4 im Tumorgewebe, darüber hinaus korrelierte der Grad der SIRT4-Depletion mit Invasionstiefe des Karzinoms, der Anzahl positiver Lymphknoten und dem UICC-Stadium, woraus die Autoren schließen, dass SIRT4-Deregulation wesentlich an der Entstehung des Magenkarzinoms beteiligt ist. (50) Ein ähnlicher Zusammenhang konnte auch beim Kolonkarzinom beobachtet werden. Auch hier korrelierte die SIRT4-Expression negativ mit Progression von Invasion und Metastasierung des Karzinoms. Generell zeigte sich bei der Untersuchung von menschlichen Kolonkarzinomen eine Assoziation zwischen niedriger SIRT4-Expression und schlechter Prognose. SIRT4-Überexpression in Kolonkarzinom-Zellen zeigte eine vermehrte Produktion von E-Cadherin sowie eine Reduzierung von Zellproliferation, Migration und Invasion. (51) Bedeutung in der epithelial-mesenchymalen-Transformation (EMT), die Grundvoraussetzung eines Tumors für Invasion und Metastasierung ist, konnte auch für das C-terminal-binding-protein (CtBP), einem wichtigen Regulatorprotein für Transkriptionsfaktoren wie HDACs und eben auch für SIRT4, gezeigt werden. (45) Ein herausragender Zusammenhang zwischen SIRT4-Expression und Tumorsuppression konnte auch in Myc-induzierten B-Zell-Lymphomen gefunden werden. Durch SIRT4-Überexpression konnte das Wachstum von B-Zell-Lymphomen durch Inhibierung der Glutaminolyse gestoppt werden. Sogar in Burkitt-Lymphom-Zellen (einem hochaggressiven Lymphom mit besonders starker Proliferationsrate) konnte die Glutamin-Verwertung durch SIRT4-Überexpression so stark abgeschwächt werden, dass die Kombination von SIRT4-Überexpression und Glykolyse-Inhibitoren sogar zum Zelltod führte. (52) Sämtliche der im letzten Absatz genannten Autoren sehen aufgrund ihrer Forschungsergebnisse in SIRT4 ein mögliches Zielprotein für zukünftige Therapiemethoden.

SIRT4 hat also eine bedeutende Rolle als Tumorsuppressor indem es über Modulation des Glutaminstoffwechsels in den Zellzyklus eingreift und die DNA-Reparatur ermöglicht. Generell spielt SIRT4, wie auch andere Tumorsuppressoren, eine wichtige Rolle um die Integrität und Unversehrtheit der Zelle und ihrer Komponenten (DNA, Proteine, Lipide) aufrechtzuerhalten. Schäden an einer Zelle oder ihren Bestandteilen werden durch so genannte Stressoren ausgelöst. „Zellstress“ subsumiert alle schädigenden Einflüsse, die eine Zelle in ihrer Integrität

bedrohen können, die sie also „stressen“. Prominente Vertreter sind ROS, aber auch andere toxische Metabolite oder Toxine (wie eben Chemotherapeutika), pH-Wert- oder Temperaturalterationen u.v.m. Viele humanpathologische Vorgänge lassen sich durch eine ungenügende Stressantwort durch die Zelle erklären, wie etwa neurodegenerative Erkrankungen,  $\beta$ -Zell-Dysfunktion und Diabetes mellitus 2, Herz- und Gefäßerkrankungen und Krebs, letztendlich auch das Altern. (53)

SIRT4 ist ein wesentlicher Träger der zellulären Stressantwort und Garant für die Unversehrtheit einer Zelle. Nicht-maligne Zellen werden durch SIRT4-Verlust deutlich anfälliger für alle möglichen Schäden, vor allem die DNA betreffend, aber auch zum Beispiel ER-Stress. (53) Nun gibt es allerdings Hinweise darauf, dass was gesunden humanen Zellen beim Überleben hilft, dieselbe Funktion auch in Tumorzellen ausüben könnte. (24, 54) Eine jüngst publizierte Studie (53) untermauert diese These. In ihr konnte anhand von MEF- (mouse embryonic fibroblast) und HepG2-Zellen (humane Leberkarzinomzellen) mittels retroviraler SIRT4-Transfektion die ambivalente Natur des SIRT4 dargestellt werden. Es zeigten sich mehrere bemerkenswerte Zusammenhänge. Zum einen schützte SIRT4 die Zellen vor DNA-Schäden und ER-Stress, die durch Behandlung mit Camptothecin (Topoisomerase-Inhibitor, der zu DNA-Doppelstrangbrüchen führt) und Tunicamycin (verursacht ER-Stress durch Fehlfaltung von Proteinen) hervorgerufen wurden. Verlust von SIRT4 führte im Gegenzug zu höherer Empfindlichkeit gegenüber diesen Substanzen. Neben dem Nachweis, dass SIRT4 Tumorzellen vor Stress durch DNA-Schäden und andere Bedrohungen schützt, konnte auch gezeigt werden, dass SIRT4 Zellen während der Onkogen-Aktivierung und malignen Transformation schützt. Im Zuge der Onkogen-Aktivierung steigt die Replikationsrate in einer Zelle plötzlich stark an, was zu DNA-Schäden und wiederum ER-Stress führt. Dem wirkt SIRT4 entgegen. (53)

Während also die Rolle von SIRT4 als Tumorsuppressor in zahlreichen Studien bestätigt werden konnte, gibt es auch unwiderlegliche Hinweise darauf, dass SIRT4 für bereits entartete Zellen ein wichtiger Überlebensfaktor sein könnte. SIRT4 kann also nicht nur als Tumorsuppressor gesehen werden, sondern erfüllt seine Funktion in Abhängigkeit von Tumorentität und Grad der Dedifferenzierung. (53)

In dieser Arbeit versuchten wir SIRT4 mittels Plasmid-basierter Transfektion in parentalen NSCLC-Zellen (A549/PAR) zu überexprimieren und die Auswirkungen

dieser Überexpression auf die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber Cisplatin zu untersuchen.

## 2 Ziele

Die Forschungsziele dieser Arbeit sind:

- Erarbeiten der optimalen Transfektionsbedingungen für eine SIRT4-Überexpression in A549/PAR (mittels SIRT4-Nachweis in Western-Blot und qRT-PCR).
- Zu untersuchen, ob eine SIRT4-Überexpression eine verringerte Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Cisplatin-Behandlung bewirkt (Apoptose-Untersuchungen, Colony assay).

Besondere Bedeutung hat neben den wissenschaftlich-theoretischen Inhalten das Erlernen und selbstständige Durchführen grundlegender Labormethoden, wie sie sowohl für Grundlagenforschung als auch für die Arbeit im klinischen Alltag unerlässlich sind. Die wesentlichsten hiervon sind:

- qRT-PCR
- Western-Blot
- Arbeiten in Zellkultur
- Durchflusszytometrie

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Ausgangslösungen und –produkte

Tab. 1: Verwendete Ausgangslösungen und -produkte

Produkt	Hersteller
Acrylamid 30%	Merck, Darmstadt, DE
Agarose	BioRad Industries, Hercules, CA, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Wien, AUT
Bicinchononic Acid Protein Assay Kit (BCA)	Novagen, Madison, WI, USA
Bovines Serum-Albumin	Roth, Karlsruhe, DE
Bromophenolblau	Sigma Aldrich, Wien, AUT
CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent Kit	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
Cisplatin Accord 1mg/ml	Accord Healthcare GmbH, Freilassing, DE
DMEM/F12	Gibco, Paisley, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Wien, AUT
Eisessigsäure	Sigma Aldrich, Wien, AUT
Ethanol 70%	Merck, Darmstadt, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	Biowest, Nuaille, F
Glycerol	Sigma Aldrich, Wien, AUT
Glycin	Sigma Aldrich, Wien, AUT
Hefeextrakt	Sigma Aldrich, Wien, AUT
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad Industries, Hercules, CA, USA
Jet Prime® Transfection Kit	Polyplus-transfection, Illkirch-Graffenstaden, F
L-Glutamine 200mM	Gibco, Paisley, UK
MassRuler DNA Loading Dye (6 x)	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
MassRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, DE
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, DE
Nitrozellulose-Membran	BioRad Industries, Hercules, CA, USA
Not1 High Fidelity Restriction Enzyme	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
pCDNA3.1- (Invitrogen)	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
peqGOLD® Total RNA Kit	Peqlab, Erlangen, DE
peqGOLD® XChange Plasmid Midi Kit	Peqlab, Erlangen, DE
PeqGreen	VWR, Radnor, PA, USA
Phosphat buffered saline (PBS) pH 7,4	LKH Graz, Apotheke
Ponceau-S	Merck, Darmstadt, DE
Protease-Inhibitor Mini Tablets	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
Protein™ Standard Dual Color	BioRad Industries, Hercules, CA, USA
Propidiumiodid 1 mg/ml	Sigma Aldrich, Wien, AUT
QuantiFast SYBR PCR Kit	Quiagen, Venlo, NLD
Restore PLUS Western Blot stripping Buff-	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA

er	
RIPA-Puffer	Sigma Aldrich, Wien, AUT
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma Aldrich, Wien, AUT
Super Signal WesternPico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
TAE	LKH Graz, Apotheke
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, Wien, AUT
Trizma base	Sigma Aldrich, Wien, AUT
Trizma HCl	Sigma Aldrich, Wien, AUT
Trypton	Sigma Aldrich, Wien, AUT
Tween 20	Sigma Aldrich, Wien, AUT
0,25% Trypsin-EDTA	Gibco, Paisley, UK
100 U/ml Penicillin	Gibco, Paisley, UK
100 µg/ml Streptomycin	Gibco, Paisley, UK
50 µg/µl Ampicillin	Gibco, Paisley, UK

### 3.2 Puffer und angefertigte Lösungen

Tab. 2: Angefertigte Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
10 x TBS	31,5 g Trizma HCl 80 g NaCl mit A. dest. auf 1 l auffüllen →pH 7,5
TBS-T	100 ml 10 x TBS 900 ml A. dest. 2 ml Tween 20
10 x Laufpuffer	30 g Trizma base 144 g Glycin 100 ml SDS mit A. dest. auf 1 l auffüllen
1 x Laufpuffer	100 ml 10 x Laufpuffer 900 ml A. dest.
10 x Transferpuffer	56 g Trizma base 286 g Glycin mit A. dest. auf 1 l auffüllen
1 x Transferpuffer	100 ml 10 x Transferpuffer 200 ml Methanol 700 ml A. dest.
5 x Laemmli-Puffer	30 mM Tris HCl pH 6.8 2% SDS 10% Glycerol 5% β-Mercaptoethanol 0,01% Bromophenolblau

Ponceau-S-Rot	0,5 g Ponceau-S 98,5 ml A. dest. 1 ml Eisessigsäure 10 ml RIPA buffer
DMEM/F12 complete	DMEM/F12 10% FCS 1% Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin
RIPA + PI	10 ml RIPA 1 Tablette PI
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl mit A. dest. auf 1 l auffüllen

### 3.3 Antikörper

Tab. 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
β-Aktin	1:5000	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA
Caspase 3	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Caspase 7	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
hSIRT4	1:500	Sigma Aldrich, Wien, AUT
Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
anti-goat-HRP	1:2000	Sigma Aldrich, Wien, AUT
anti-mouse-HRP	1:10000	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA
anti-rabbit-HRP	1:2000	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

### 3.4 Geräte

Tab. 4: Verwendete Geräte

Produkt	Hersteller
CASY cell counter	Roche, Basel, CH
CFX384 Touch	BioRad Industries, Hercules, CA, USA
ChemiDoc™ Touch	BioRad Industries, Hercules, CA, USA
CytoFLEX	Beckman Coulter, Wien, AUT
GelDox™ XR	BioRad Industries, Hercules, CA, USA
LightCycler® 480	Roche, Basel, CH
MyCycler™ Thermal Cycler	BioRad Industries, Hercules, CA, USA
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
Spectramax® Plus 384	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

## 3.5 Plasmidisolierung

### 3.5.1 Anzucht von Bakterien

Das Plasmid (pCDNA3.1-/SIRT4) wurde in kompetenten *E.coli*-Zellen geliefert und bei -80°C gelagert. Vor der Plasmidisolierung muss man eine *E.coli*-Kultur ansetzen. Hierzu entnimmt man mit der Pipettenspitze vorsichtig eine kleine Menge *E.coli* aus dem -80°C-Stock. Diese löst man dann in einem 250 ml-Kolben in 30 ml LB-Medium, das 50 µg/ml Ampicillin enthält. Im Plasmid befindet sich ein Resistenzgen gegen Ampicillin, das das Überleben der plasmidtragenden *E.coli* gewährleistet. Der 30 ml-Ansatz kommt für 12 bis 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm (rounds per minute) in den Schüttelinkubator (Übernachtskultur). Danach erfolgt die Pelletierung der *E.coli* durch Zentrifugation für 15 min mit 5000 x g bei 4°C. Der Überstand wird verworfen, das Bakterienpellet wird laut Protokoll zu Plasmidisolierung weiterverwendet.

Man kann auch eine zeitlich variable Zwischenkultur anlegen, bevor man die eigentliche Übernachtskultur ansetzt. Hierzu löst man die tiefgefrorenen *E.coli* zunächst in LB-Medium + Ampicillin in einem Eppendorf-Gefäß, einem 15 ml-Tube oder irgendeinem anderen Behältnis und inkubiert sie am Shaker bei 37°C. Dies kann aus zeitlichen Gründen notwendig werden. Es ist nämlich wichtig, dass die Übernachtskultur nicht länger als 16 Stunden dauert. Durch längere Inkubation verbrauchen die Bakterien nämlich das ganze Medium und erreichen in ihrer Wachstumskurve eine Plateauphase, was mit Veränderungen im Zellzyklus und im Stoffwechsel einhergeht und die Plasmid-Qualität und -Menge beeinflussen kann. Für optimale Ergebnisse muss man die *E.coli* in ihrer exponentiellen Wachstumsphase pelletieren und lysieren, was bei 30 ml Medium nach etwa 12 bis 16 Stunden der Fall ist. Durch größere Mengen an Medium sind längere Inkubationszeiten und eine größere Menge an Bakterienkultur möglich, das exponentielle Wachstum ist dabei aber zu berücksichtigen.

### 3.5.2. Plasmidisolierung

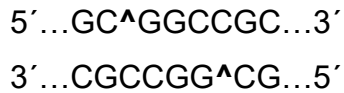
Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem peqGold XChange Plasmid Midi Kit der Firma PEQLAB. Das ist ein vorgefertigtes Kit zur Isolierung von 20-100 µg Plasmid-DNA aus 30 ml einer *E.coli*-Kultur. Die Isolierung funktioniert nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Deren Wirkmechanismus beruht auf der schnelleren Re-

naturierung der kleineren Plasmid-DNA nach pH-Wert-Änderungen im Vergleich zur viel größeren genomischen DNA. Die Zellen werden in alkalischem Milieu lysiert, wodurch sich die komplementären Basenpaarungen sowohl von Plasmid- als auch von genomischer DNA auflösen. Durch Zugabe eines sauren Agens (im Regelfall Acetat) wird der pH-Wert wieder auf neutrale Werte abgesenkt und die DNA renaturiert, was bei der sperrigen genomischen DNA länger dauert als bei der Plasmid-DNA. Durch zeitgerechtes Zentrifugieren und Bewahren des Überstandes kann somit Plasmid-DNA isoliert werden. Zusätzlich wird dieser Überstand auf eine Anionenaustauscher-Matrix (eine Fritte in der XChange Midi-Säule) aufgebracht, die beim Durchfließen der Lösung Plasmid-DNA bindet, die dann nach einem Waschschrift eluiert werden kann. Danach erfolgt die Präzipitation der DNA. Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol wird die Plasmid-DNA aus dem Eluat gefällt und anschließend für 30 min bei 15000 x g bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Plasmid-Pellet wird laut Protokoll mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet, bevor es in deionisiertem H<sub>2</sub>O gelöst wird.

Das genaue Protokoll und der Großteil der gebrauchten Lösungen sind im Kit enthalten. Die Konzentration und das 260/280-Verhältnis der isolierten Plasmid-DNA wurde nach Lösen in H<sub>2</sub>O am NanoDrop 2000 vermessen. Der Nanodrop 2000 ist ein Spektralphotometer, das die reflektierten Wellenlängen der zu messenden Probe detektiert. Das Verhältnis der Lichtintensitäten bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge gibt hierbei die Reinheit der isolierten DNA an. Die 260/280-ratio bei reinen DNA-Proben liegt zwischen 1,8 und 2,0.

### 3.5.3 Qualitätskontrolle des Plasmids mittels Restriktionsanalyse (Not1) und Agarosegelelektrophorese

Um zu überprüfen ob das gelieferte SIRT4-Plasmid auch den Herstellerangaben entspricht, führten wir eine Restriktionsanalyse mit Not1 und anschließend eine Agarosegelelektrophorese auf einem 3%-Gel durch. Not1 ist eine Endonuklease, die spezifisch die Sequenz GCGGCCGC erkennt und an dieser Stelle den komplementären DNA-Strang schneidet (Abb. 1). Möglich wird die Restriktionsanalyse mit Not1 dadurch, dass die Hersteller das SIRT4-Gen über diese Sequenz in das Plasmid eingebaut haben.



**Abb. 1: Schnittstellen von Not1.** Palindromsequenzen als Schnittstellen sind typisch für Restriktionsenzyme.

Um ein dreiprozentiges Agarosegel herzustellen wiegt man zunächst 3 g Agarose in einen Kolben ein füllt (unter Kontrolle auf der Waage) mit TAE auf 100 g auf. Die Agarosesuspension kommt bei 800 Watt in die Mikrowelle. Sobald die Lösung zu kochen beginnt, wird sie aus der Mikrowelle genommen und geschwenkt. Dieser Vorgang des Aufkochens wird so lange wiederholt, bis in der Lösung keine Agaroseklümpchen mehr zu sehen sind. Der verdunstete TAE-Puffer wird wieder zugesetzt (auf der Waage). Danach werden 5 µg PeqGreen dazugegeben. Die fertige Agaroselösung wird in die Gießkammer mit eingelegtem Kamm für die Proben slots gegossen (je nach Probenvolumen überragen die Kämmen die Gelfläche um 0,5 bis 1 cm). Nach etwa 20 min ist das Agarosegel ausgehärtet.

Vor der Elektrophorese wurde zu den Proben – je nach Probenvolumen – die entsprechende Menge sechsfach konzentrierter DNA Loading Dye Puffer hinzugefügt. Die Proben und der Marker (DNA Ladder Mix) werden am Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese läuft bei 100 V und ist zirka nach 15 min abgeschlossen. Die Gelfotos wurden am GelDoc XR der Firma Biorad gemacht.

Um ganz sicher zu gehen wurde das mutmaßliche SIRT4 aus dem Plasmid danach auch noch sequenziert. Sowohl Restriktionsanalyse als auch Sequenzierung bestätigten, dass es sich beim gelieferten Gen um humanes SIRT4 handelte.

### 3.6 Zellkultur

In der Zellkultur arbeiteten wir mit parentalen A549-Zellen (A549/PAR), das sind für Laborzwecke gezüchtete NSCLC-Zellen, die sensibel gegenüber Cisplatin sind. Kurzzeitig arbeiteten wir auch mit HEK293-Zellen, was allerdings nur der Qualitätskontrolle diente und mit dem eigentlichen Forschungsgegenstand nichts zu tun hatte. A549 und HEK293 benötigen DMEM/F12-Medium mit 10% FCS (fetales Kälberserum), 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin.

### 3.6.1 Zellen auftauen

Die Zell-Stocks werden in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert. Die Zellen werden in Wachstumsmedium mit 10%-DMSO tiefgefroren. DMSO ist eine wichtige Komponente des Kryomediums, da es die Bildung von Eiskristallen im Zellinneren während des Gefrierprozesses und somit Schäden an der Zelle verhindert. In Konzentrationen höher als 10% wirkt DMSO als Zellgift.

Um mit den Zellen zu arbeiten, muss man sie zunächst aus diesem Gefrierzustand in Kultur bringen:

- 10 ml Medium in eine Kulturflasche vorlegen und im Brutschrank (37°C) aufwärmen
- Zellen aus flüssigem Stickstoff holen und im Wasserbad (37°C) aufwärmen
- Zentrifugieren bei 400 x g für 5 min
- DMSO-Medium absaugen, Zellpellet in vorgewärmtem Medium resuspendieren und in vorbereitete Kulturflasche überführen

### 3.6.2 Zellen splitten

Ist der beschichtete Boden einer Kulturflasche vollständig mit Zellen bedeckt (100% Konfluenz) muss ein Teil der Zellen in eine neue Kulturflasche überführt werden, damit die Zellen dort ungestört weiterwachsen können. Neben dem einfachen Platzmangel für weiteres Wachstum und dem Verbrauch von Nährmedium kann es bei 100% Konfluenz auch zu Veränderungen im Zellzyklus kommen, was die Zellen für nachfolgende Versuche unbrauchbar machen kann. Dieses Phänomen der „Kontaktinhibierung“ spielt insbesondere bei nicht-malignen Zellen eine Bedeutung, weniger bei Zellkultur mit Tumorzellen.

- Medium aus Kulturflasche absaugen
- Waschen der Zellen mit 5 ml sterilem PBS
- Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA
- Inkubieren im Brutschrank für zirka 5 min
- Finales Ablösen der Zellen vom Untergrund durch leichtes Beklopfen der Kulturflasche – Zellen schwimmen makroskopisch sichtbar in der Trypsin-EDTA-Lösung
- Zugabe von 5 ml Medium (fetales Kälberserum als Bestandteil des Mediums enthält Antitrypsin, das den Trypsinverdau stoppt)

- Überführen der Zellsuspension in 15 ml-Röhrchen
- Zentrifugieren bei 400 x g für 5 min – währenddessen vorlegen von 10 ml vorgewärmtem Medium in neuer Kulturflasche
- Absaugen des Überstandes
- Resuspendieren des Zellpellets in vorher berechneter Menge vorgewärmtem Medium
- Überführen eines vorher bestimmten Anteils an Zellsuspension in die Kulturflasche
- Kontrolle unter dem Mikroskop, ob schwimmende Zellen sichtbar sind

Bei A549/PAR geht man davon aus, dass sich ihre Zellzahl in etwa alle 24 h verdoppelt. Um zu bestimmen, wann wieder Konfluenz erreicht wird, muss man also die Zahl 2 mit der Anzahl an Tagen bis zum neuerlichen Splitten potenzieren, um Aufschluss über die weiterzuzüchtende Fraktion an Zellsuspension zu erhalten.

*Beispiel:* Bei 100% Konfluenz sollen die Zellen an einem Montag so gesplittet werden, dass am darauf folgenden Freitag neuerlich 100% Konfluenz erreicht wird. Zwischen Montag und Freitag vergehen 4 volle Tage  $\rightarrow 2^4=16$ . Da die Zellverdoppelungszeit etwas unter 24 h liegt gehen wir von einem Splittverhältnis von 1:20 aus. D.h. nach dem Zentrifugieren wird das Pellet in 2 ml Medium resuspendiert und 0,1 ml dieser Zellsuspension in die vorbereitete Kulturflasche zur weiteren Zucht überführt. Die restlichen Zellen werden – sofern sie nicht anderweitig gebraucht werden – verworfen.

Neben dem Splitten muss das Medium in einer Kulturflasche zirka jeden dritten Tag erneuert werden. Hierbei wird einfach das alte Medium abgesaugt, und 10 ml neues, vorgewärmtes Medium zugegeben.

### 3.6.3 Zellzahlbestimmung am CASY

Die genaue Zellzahlbestimmung am CASY ist vor allem beim Ausplattieren notwendig, wo man in jedem Well einer Platte die gleiche Anzahl an Zellen ausgebracht werden muss. Die Zellzahlbestimmung am CASY erfolgt im Zuge des Splittens.

- Nach dem Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes erfolgt das Resuspendieren des Zellpellets in 10 ml Medium

- Zugabe von 50 µl Zellsuspension in 10 ml Casyton (=isotonischer Puffer für Zellzählung am CASY) – die Verdünnung entspricht nun 1:200
- Vermessen der Probe am CASY (Cave: Richtiges Setup auswählen)
- Notieren von Aggregationsfactor und Viable cell number

Der Aggregationsfactor gibt die Güte des Resuspendierens nach dem Zentrifugieren an. Ist er zu hoch (>2) müssen die Zellen besser resuspendiert werden. Die Zellzahl wird auf Zellen pro ml Zellsuspension berechnet.

#### 3.6.4 Ausplattieren auf 6-Well-Platten

Um mit aliquoten Anteilen einer Zellkulturgeneration gleichzeitig unterschiedliche Versuche zu machen, ist die Ausbringung auf Well-Platten nötig. Wir arbeiteten mit 6-Well-Platten, es gibt aber auch andere Formate.

6-Well-Platten eignen sich gut zum Ausplattieren von 200.000 Zellen pro Well in 2 ml Medium. Beim Ausplattieren muss zunächst die Zellzahl am CASY bestimmt werden. Anschließend wird anhand der CASY-Ergebnisse berechnet, wie viel Volumen an Zellsuspension die nötige Anzahl an Zellen fürs Ausplattieren beinhaltet. Dieses Volumen löst man in der Menge an benötigtem Medium. Bei diesen Berechnungen ist ein Reservewell mitzuberechnen.

*Beispiel:* Ausplattieren von 3 Platten A549/PAR mit je 200.000/Well  
 CASY: viable cells  $1,606 \cdot 10^6$ /ml  
 Benötigte Zellzahl =  $0,2 \cdot 10^6 \cdot 19$  (1 Reservewell) =  $3,8 \cdot 10^6$   
 $3,8 \cdot 10^6 / 1,606 \cdot 10^6 = 2,37$  ml Zellsuspension  
 Benötigte Menge Medium =  $2 \cdot 19 = 38 - 2,37 = 35,63$  ml  
 → Lösen von 2,37 ml Zellsuspension in 35,63 ml vorgewärmtem Medium (in 50 ml-Röhrchen)  
 Aufbringen von 2 ml der bereiteten Lösung in jedes Well

#### 3.6.5 Transfektion mittels jetPRIME®

JetPRIME ist ein Transfektionsreagens der Firma Polyplus-transfection, das zur Plasmidtransfektion dient. Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryontische Zellen. Die genaue Funktionsweise von jet-PRIME ist Firmengeheimnis.

Für 6-Well-Platten mit 200.000 Zellen pro Well empfiehlt das jetPRIME-Protokoll 200 µl jetPRIME-Buffer pro Well und die Transfektion mit 2 µg Plasmid-DNA, wofür 4 µg jetPRIME-Reagens notwendig sind. Wir experimentierten mit verschiedenen Plasmid-Konzentrationen, wobei wir pro µl Plasmid-DNA 2 µl jetPRIME zur Transfektion verwendeten.

Um Pipettierfehler bei sehr kleinen Volumina (wie sie etwa bei 0,5 µg Plasmid-DNA entstehen) zu vermeiden, bereiteten wir jeweils für alle Wells gleicher Plasmid-Konzentration die Transfektionslösung gemeinsam zu – im Regelfall in 2 ml-Eppendorf-Gefäßen. Die entsprechenden Volumina an Puffer, jetPRIME-Reagens und Plasmid-DNA müssen im Vorhinein (unter Berücksichtigung eines Reservewells) berechnet werden.

*Beispiel:* Transfektion von 6 Wells mit 2 µg Plasmid-DNA pro Well  
Benötigte Menge an Puffer =  $200 * (6+1) = 1400 \mu\text{l}$   
Benötigte Menge an jetPRIME-Reagens =  $4 * (6+1) = 28 \mu\text{l}$   
Plasmid-Konzentration =  $1,14 \mu\text{g}/\mu\text{l}$   
benötigte Menge an Plasmid =  $(2 * (6+1))/1,14 = 12,3 \mu\text{l}$   
 $1400 + 28 + 12,3 = 1440,3 / 7 = 205,8 \mu\text{l}$  Transfektionslösung/Well

Im obigen Beispiel pipettiert man dann einfach 205,8 µl der fertigen Transfektionslösung ins Medium der 24 h zuvor ausplattierten Zellen. Die Zubereitung der Lösung ist überdies sehr einfach. Nach Vermischen von Plasmid-DNA und Puffer wird kurz gevortext und heruntergespinn. Danach erfolgt die Zugabe des jetPRIME-Reagens und erneutes Vortexen und Herunterspinnen mit anschließender 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur.

### 3.6.6 Bereiten von Cisplatin-Medium

Bei den Cisplatin-Versuchen wurde 24 Stunden nach der Transfektion, das jetPRIME-Medium entfernt und durch Medium mit variabler Cisplatin-Konzentration ersetzt. Die notwendige Menge an Cisplatin aus dem 1 mM-Stock, um die gewünschte Konzentration im Medium zu erreichen wurde im Vorhinein berechnet. Das neue Medium wurde vor dem Einbringen in die Wells mit Cisplatin versetzt um gleiche Konzentrationen in den Vergleichsproben sicherzustellen.

### 3.6.7 Zellernte für RNA-Analytik (6-Well-Platten)

- 1,5 ml sterile Eppendorf-Gefäße beschriften
- Absaugen des Mediums
- Waschen mit sterilem PBS (1 ml pro Well)
- Lysieren der Zellen mit 350 µl RNA-Lysis-Buffer (RLT-Puffer)
- Abkratzen des Zellmaterials vom Well-Boden mit Pipettenspitze und Überführen in beschriftetes Eppendorf-Gefäß
- Lagerung bei -20°C (oder kurzfristig auf Eis) bis zur Weiterverarbeitung

### 3.6.8 Zellernte für Proteinanalytik (6-Well-Platten)

- unsterile 0,5 ml Eppendorf-Gefäße beschriften
- alle folgenden Schritte finden auf Eis statt!
- Absaugen des Mediums
- Waschen mit unsterilem PBS (1 ml pro Well)
- Zugabe von 150 – 200 µl RIPA-Puffer + Protease-Inhibitor
- Abschaben der Zellen vom Well-Boden mittels Cell-Scraper
- Überführen der Zellsuspension in beschriftete Eppendorf-Gefäße
- Lagerung bei -20°C (oder kurzfristig auf Eis) bis zur Weiterverarbeitung

Falls viele Zellen schwimmen (z.B. bei Cisplatin-Versuchen oder für nachfolgende Apoptose-Untersuchungen) muss man anders vorgehen und auch die schwimmenden Zellen miternten. In diesem Fall wird das Medium mit apoptotischen Zellen gesammelt, die Zellen am Well-Boden mittels Trypsin abgelöst und zu dem gesammelten Medium hinzugegeben. Nun wird mit 6000 rpm für 1 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Danach erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen und Resuspendieren des Pellets in RIPA-Puffer + Protease-Inhibitor.

### 3.6.9 Colony assay

In einem Colony assay will man die Widerstandsfähigkeit von Zellen untersuchen. Im Wesentlichen wird einfach nur eine sehr geringe Zahl an Zellen (z.B. 250) pro Well einer 6-Well-Platte ausplattiert. Diese Platte wird 10-14 Tage in Ruhe gelassen und anschließend werden die Zellen gefärbt, um zu sehen, ob einzelne Zellen, die sich am Wellboden angeheftet haben, sich weiter vermehrt und Kolonien ge-

bildet haben. Dies erfordert ein hohes Maß an Widerstandsfähigkeit, nicht-maligne Zellen sind dazu nicht in der Lage. Die Fähigkeit, bei sehr geringer Zellzahl effizient Kolonien zu bilden, weist auf einen hohen Grad an „Malignität“ hin.

Die Zellen in den Colony assays wurden mit Cristalviolett gefärbt. Zunächst werden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit PBS gespült und durch Zugabe von 1 ml Methanol:Essigsäure (3:1) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Methanol:Essigsäure -Lösung wird abgesaugt und die Wells werden unter dem Abzug getrocknet. Pro Well wurden anschließend 800 µl Cristalviolett-Lösung (8 ml A. dest. + 0,032 g Cristalviolett-Pulver) zugegeben und die Platten für 10 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Das Cristalviolett wurde gesammelt (wiederverwendbar!) und jedes Well drei Mal mit A. dest. gewaschen. Anschließend wurden die Wells wiederum unter dem Abzug getrocknet. Die gefärbten Kolonien wurden makroskopisch und im Falle von Unklarheiten mikroskopisch ausgezählt.

### **3.7 Proteinanalytik mittels Western-Blot**

#### 3.7.1 Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins mittels BCA-Kit

Bicinchoninsäure (BCA) reagiert zusammen mit einwertigen Kupferionen zu einer Komplexverbindung mit violetter Farbe. Bei der Proteinanalytik reagieren zweiwertige Kupferionen (aus der Kupfersulfat-Lösung) mit den Proteinen in der zu bestimmenden Lösung, wodurch sie zu einwertigem Kupfer reduziert werden. Dieses einwertige Kupfer bildet dann mit BCA einen violetten Kupferkomplex. Durch photometrische Vermessung kann dann anhand der Absorption bei 562 nm die Gesamtproteinkonzentration in der Probe ermittelt werden. (Anm.: Die Validität der Messung ist abhängig von der Reaktionszeit. Die Inkubationsdauer von 30 min sollte nicht zu stark ausgedehnt werden.)

- Zentrifuge auf 4°C vorkühlen
- Proteinproben mit Ultraschallprozessor 2 x 2 s lang beschallen → Zellyse
- Zentrifugieren bei 4°C bei 13000 rpm für 10 min
- während Zentrifugieren neue kleine Eppendorf-Gefäße beschriften
- Überstand abheben und in neues Eppi überführen (bei Resuspension des Pellets erneutes Zentrifugieren)

- Pipettieren der Proben auf 96-Well-Platte im Doppelansatz:

	1	2	3	4
A	25 µl RIPA + 25 µl Proteinstandard	25 µl RIPA + 25 µl Proteinstandard	20 µl RIPA + 5 µl Probe 1	20 µl RIPA + 5 µl Probe 1
B	25 µl RIPA + 25 µl aus 1. Well	25 µl RIPA + 25 µl aus 1. Well	20 µl RIPA + 5 µl Probe 2	20 µl RIPA + 5 µl Probe 2
C	25 µl RIPA + 25 µl aus 2. Well	25 µl RIPA + 25 µl aus 2. Well	....	....
D	.....	.....		
E				
F				
G				
H	25µl RIPA (Blank)	25µl RIPA (Blank)		

Anm.: Der Proteinstandard ist BSA (bovines Serumalbumin), Ausgangskonzentration ist 2 µg/µl

- Zusammenmischen von BCA-Lösung und Kupfersulfat im Verhältnis 1:50  
→200 µl fertiges Gemisch pro Well (5 Reservewells bei Berechnung berücksichtigen)
- Hinzufügen von 200 µl BCA + CuSO<sub>4</sub> pro Well
- Inkubieren bei 37°C für 30 min
- Photometrische Vermessung am Spectramax Plus der Firma Molecular Devices

Bei der Vermessung am Spectramax ist von entscheidender Bedeutung, dass keine Luftblasen in den Wells die Messung stören. Bei Vorhandensein großer Luftblasen müssen diese vor der Messung mit einer Nadelspitze aufgestochen werden.

Am Spectramax selbst ist wichtig, dem Programm mitzuteilen, wo Standards, Blank und Proben aufgetragen wurden, ebenso wie die Ausgangskonzentration des Standards und die Arithmetik der durchgeführten Verdünnungsreihe.

### 3.7.2 Herstellung von SDS-PA -Gelen

Wir verwendeten 8, 10, 12 und 15%-SDS-PA -Gele. Die Gele werden in einem speziellen Gießstand mittels zweier Glasplatten pro Gel und einem dazu passenden Plastikamm für die Probenslots angefertigt. Die Geldicke beträgt 1,5 mm mit 10 Probenslots. Die Gele können 4-5 Tage vor der Elektrophorese angefertigt wer-

den, in diesem Fall werden sie mit feuchtem Zellstoff umwickelt in einem Plastiksackerl im Kühlschrank (4°C) gelagert.

Ein SDS-PA-Gel besteht aus einem Trenngel, in dem die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe stattfindet, und einem Sammelgel. Das Sammelgel ist zirka 1,5 cm hoch und liegt über dem Trenngel. In das noch flüssige Sammelgel wird beim Herstellen eines SDS-PA-Gels der Plastikkamm eingelegt, wodurch die Probenlots geformt werden. Es weist mit 4,5% PA eine wesentlich niedrigere Dichte als das Trenngel auf und dient dazu, dass sich alle Proteine zu Beginn der Elektrophorese an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel aufreihen, damit sie dann gleichzeitig ins Trenngel übergehen – die Auftrennung für alle Proteine gleichzeitig startet – und eine über alle Slots hinweg gleichmäßige Farbfront (aufgrund des Bromphenolblauzusatzes) bilden.

Das Prinzip der SDS-PAGE beruht auf der Auftrennung von anionisierten Proteinen entsprechend ihrer Größe (näherungsweise ihrem Molekulargewicht) in einer Polyacrylamidmatrix. Kleine Proteine können einfacher durch die Matrix wandern als große und befinden sich am Gel „weiter unten“, also in der Nähe der Farbfront.

#### **Trenngel (Mengenangaben für 2 Gele)**

	8%-Gel	10%-Gel	12%-Gel	15%-Gel
Aqua dest. (ml)	9,2	9,75	6,4	4,4
Acrylamid stock 30% (ml)	5,2	6,65	8,0	10
Trenngel-Puffer ph 8.8 (ml)	5,2	5,00	5,2	5,3

- Zusammenmischen der oben stehenden drei Komponenten in 50 ml-Röhrchen
- Zugabe von:
  - 200 µl SDS (10%)
  - 200 µl (10, 12, 15%) / 300 µl (8%) APS
  - 8 µl (10, 12, 15%) / 12 µl (8%) TEMED
- Vermischen der Komponenten durch mehrmaliges vorsichtiges Invertieren  
→ Ab Zugabe von TEMED beginnt die Polymerisation, Dauer zirka eine halbe Stunde
- Überführen mittels Stripette zwischen Glasplatten → Luftblasen vermeiden!
- Bedecken des Gels mit zirka 500 µl 70%-Ethanol
- Nach Aushärten des Gels Entfernen des Ethanols, Ausspülen mit Wasser und Trocknen der Geloberfläche mit Filterpapier

### **Sammelgel (Mengenangaben für 2 Gele, immer 4,5%)**

Aqua dest. (ml)	4,1
Acrylamid stock 30% (ml)	0,75
Sammelgel-Puffer pH 6.8 (ml)	1,0

- Zusammenmischen der oben stehenden drei Komponenten in 15 ml-Röhrchen
- Zugabe von:
  - 60 µl SDS (10%)
  - 60 µl APS
  - 10-30 µl Bromophenolblau
  - 6 µl TEMED
- Vermischen der Komponenten durch mehrmaliges vorsichtiges Invertieren  
→ Ab Zugabe von Temed beginnt die Polymerisation, Dauer zirka eine halbe Stunde
- Überführen des Sammelgels mit Pipette in Glasplatten mit ausgehärtetem Trenngel → Luftblasen vermeiden!
- Einlegen der Plastikkämme → Luftblasen vermeiden!
- Nach Aushärten Elektrophorese oder Lagerung im Kühlschrank

#### 3.7.3 Durchführen eines Western-Blot

##### **1) Gesamtproteinmenge berechnen (am Computer)**

##### **2) Gele herstellen**

##### **3) Probenaufbereitung**

In jeden Slot muss, um ein valides Ergebnis zu erhalten, dieselbe Menge an Gesamtprotein aufgetragen werden. Das Volumen der jeweiligen Proben, das dieselbe Menge an Protein enthält, wird anhand der aus der BCA-Analyse bekannten Konzentrationen errechnet. Jede Probe wird dann durch Zugabe von RIPA-Puffer auf ein einheitliches Volumen gebracht. Ein einheitliches Volumen ist theoretisch irrelevant, in der Praxis aber von Vorteil, da hierdurch die gleiche Menge fünffach konzentrierten Lämmli-Puffers zu jeder Probe zugegeben werden kann. Der Lämmli-Puffer enthält als wichtige Bestandteile Bromophenolblau, das während der Elektrophorese eine sichtbare Farbfront erzeugt, SDS, das die Proteine denaturiert und mit negativen Ladungen versieht, und Glycerol, das die Proben dichter und das Auftragen einfacher macht.

Nach dem Zusammenpipettieren von RIPA-Puffer, Lämmli-Puffer und Probe wird bei 95°C im Thermomixer für zehn Minuten inkubiert, um die Proteine zu denaturieren, was für die korrekte Auftrennung entsprechend des Molekulargewichts im PA-Gel notwendig ist.

#### **4) Elektrophorese**

Die vorbereiteten Gele werden in die Halterung eingespannt und durch Einfüllen von vorgekühltem Laufpuffer auf Dichtigkeit überprüft. Anschließend wird die gesamte Elektrophoresekammer mit Laufpuffer aufgefüllt. Vorsichtig werden dann die Plastikkämme entfernt um die Probenslots freizulegen. Die Slots werden dann mittels einer Spritze und Laufpuffer ausgespült um sie von etwaigen Gelresten, die die Elektrophorese stören könnten zu reinigen. Anschließend erfolgt die Probenladung, entweder mittels Pipette oder Hamilton-Spritze. Neben den Proben werden 5 µg Proteinmarker und – falls nötig – eine Positivkontrolle für das entsprechende Protein aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte immer mit 180 Volt. Die Dauer variiert je nach Acrylamidgehalt des Gels (hochprozentige Gele haben einen höheren elektrischen Widerstand, die Elektrophorese dauert entsprechend länger).

#### **5) Membrantransfer („Blotting“)**

Der Begriff „Blotting“ meint das Übertragen der im PA-Gel aufgetrennten Proteinfractionen auf eine Membran, auf der dann mittels Antikörpern und Chemolumineszenz-Farbstoffen die Proteinbanden sichtbar gemacht werden können. Auch das Blotting funktioniert mittels Anlegen eines Stromkreises. Vorgegangen wird dabei mit der sogenannten „Sandwich“-Methode. In eine Halterung mit zwei Deckplatten werden nacheinander ein flächiger Schwamm, Filterpapier, das PA-Gel mit den Proteinen, eine Nitrozellulosemembran (diese weist hohe Proteinbindungskapazität auf – nicht ohne Handschuhe und am besten nur mit Pinzette anfassen!) wieder Filterpapier und ein Schwamm „eingequetscht“. Wichtig ist dann, dass man das Sandwich in der richtigen Orientierung in die Halterung für den Membrantransfer einspannt. Das PA-Gel mit den anionischen Proteinen muss zur Kathode, die Membran zur Anode hin orientiert sein, damit die Proteine auf die Membran „gezogen“ werden.

Der Puffer für den Membrantransfer enthält 20% Methanol und wird während des Blottings sehr warm. Deshalb werden in die Transferkammer eine Kühlkomresse und ein Magnetrührknochen eingelegt. Der Transfer findet bei konstanten 400mA

im Kühlraum bei 4°C statt und dauert in etwa eineinhalb Stunden, wobei die Dauer des Membrantransfers von der Größe des Zielproteins abhängt.

### **6) Färben der Membran mit Ponceau S-Rot**

Das Färben nach dem Blotting zeigt, ob der Membrantransfer funktioniert hat. Ponceau S-Rot bindet unspezifisch und schwach an Proteine und zeigt, ob auf die Membran Proteinbanden übertragen wurden oder nicht. Die Färbung dauert zirka eine Minute. Entsprechend der durch die Ponceau-Färbung sichtbaren Banden kann die Membran dann auf den gewünschten Bereich zugeschnitten werden. Das überschüssige Ponceau S-Rot wird aufbewahrt und wiederverwendet. Die Membranen werden mit Leitungswasser und gegebenenfalls mit TBS-T rein gewaschen.

### **7) Blockierung**

Die Blockierung erfolgt entweder mit 5%-BSA-TBS-T (bovines Serumalbumin) oder mit 5% -Milchlösung (Milchpulver in TBS-T). Das Albumin bzw. das Kasein in der Milch binden überall dort an die Nitrozellulosemembran, wo keine Proteine übertragen wurden. Würde man die Membran nicht blockieren, würde später der Antikörper, der ja auch ein Protein ist, aufgrund deren hoher Proteinbindungskapazität überall auf der Nitrozellulosemembran anhaften und deswegen kein brauchbares Bild erzeugen. Blockiert wird bei Raumtemperatur mittels langsamen Schwenkens am Shaker für die Dauer von mindestens einer Stunde.

### **8) Primärantikörper**

Der Primärantikörper wird in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung (1:500, 1:1000, 1:2000 etc.) in 1% MTBS-T oder 1% BSA-TBS-T-Lösung auf die Membran gegeben. Wir arbeiteten mit der „Sackerl-Technik“: Dabei wird die Membran mit dem gewünschten Volumen an Antikörper-Verdünnung (meist zirka 4 ml) zwischen zwei Plastikfolien eingeschweißt. Danach erfolgt unter permanenter Drehung eine Übernachtinkubation im Kühlraum bei 4°C.

Der Primärantikörper bindet direkt an das zu detektierende Protein.

### **9) Sekundärantikörper**

Die Membranen werden zuerst 3 x 10 min in TBS-T gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Unter permanenter Drehung erfolgt die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Primärantikörper werden in verschiedenen Tieren (klassischerweise in Ziegen, Kaninchen und Mäusen) gezüchtet. Die Sekundärantikörper erkennen das speziesspezifische Fc-Fragment der Primärantikörper und binden daran. Das heißt, dass ein und derselbe Sekundärantikörper für verschiedene Primärantikörper verwendet werden kann, sofern diese aus dem selben Tier stammen.

#### **10) Entwicklung mittels West-Pico**

West-Pico ist ein Kit, das aus zwei Substanzen besteht, die zu gleichen Teilen vermischt werden, um verwendet werden zu können. Zunächst wird die Membran 3 x 15 min in TBS-T gewaschen. Anschließend wird das zusammengemischte West-Pico daraufpipettiert. Die Menge variiert je nach Membrangröße, jedenfalls muss die gesamte Membran mit West-Pico bedeckt sein. Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min und anschließende Betrachtung der Resultate am ChemiDoc. Die von uns verwendeten Sekundärantikörper tragen ein Enzym namens HRP (horseradish peroxidase - auf Deutsch Meerrettichperoxidase). HRP spaltet das West-Pico-Substrat und erzeugt dadurch ein Chemolumineszenz-Signal. West-Pico detektiert also allgemein alle Sekundärantikörper, die mit HRP markiert sind. Es gibt auch andere Systeme zum Western-Blot-Imaging.

#### **11) Membran stripfen**

Auf ein und derselben Membran können mehrere Proteine nachgewiesen werden. Dazu muss sie gestrippt werden. Mittels der Stripping-Lösung - auch sie ist wiederverwendbar - werden Primär- und Sekundärantikörper von einer Membran entfernt. Zunächst wird die Membran 2 x 5 min in TBS-T, danach für 8 min in 10 ml Stripping-Lösung, zuletzt 2 x 5 min in PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die neuerliche Blockierung.

Als Qualitätskontrolle zu jedem Blot wird auch  $\beta$ -Aktin, ein Zytoskelett-Bestandteil, sichtbar gemacht. Anhand des  $\beta$ -Aktins sieht man, ob man von jeder Proteinprobe gleich viel aufgetragen hat. Gleiche Intensitäten der  $\beta$ -Aktin-Banden in allen Proben sind Grundvoraussetzung für die Validität eines Blots.

## 3.8 RNA-Analytik mittels qPCR

### 3.8.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem peqGold Total RNA Kit der Firma Peqlab. Das Kit enthält sämtliche Reagenzien und Protokolle die für die RNA-Isolierung notwendig sind. Die Elution der RNA im letzten Schritt erfolgte mit 30 bis 50 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O. Vermessen wurden die Proben am NanoDrop 2000. Die optimale 260/280-ratio für RNA liegt zwischen 2,0 und 2,2.

### 3.8.2 cDNA -Synthese

Um eine qRT-PCR durchführen zu können braucht man DNA. Die cDNA-Synthese (complementary DNA) erfolgte mittels dem iScript cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad. Das ist ein Kit zur cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase, die anhand eines RNA-Stranges eine komplementäre DNA synthetisiert.

Das Zusammenpipettieren der Kit-Bestandteile und RNA-Proben erfolgt an einem RNase-dekontaminierten Arbeitsplatz. Im ersten Schritt berechnet man am Computer anhand der bekannten RNA-Konzentrationen der Proben, wie viel cDNA man synthetisieren kann, in der Regel sind zwischen 250 und 1000 ng möglich. Auf das Endvolumen jeder Probe für die cDNA-Synthese von 20 µl entfallen 15 µl auf die mit RNase-freiem Wasser verdünnte Probe und 5 µl auf den Mastermix. Es wird berechnet, in welchem Volumen an RNA-Probe die gewünschte Menge an RNA enthalten ist, die Differenz auf 15 µl mit Wasser aufgefüllt und dann der Mastermix, bestehend aus 4 µl Nukleotiden und 1 µl Reverser Transkriptase (beides stammt aus dem iScript-Kit), hinzugegeben. Pipettiert wird in PCR-stripes.

Bei jeder cDNA-Synthese wird eine RT-minus-Probe und eine NTC-Probe dazugemacht. Dies dient der Qualitätskontrolle. Die RT-minus-Probe besteht aus einer beliebigen RNA-Probe des Probenumfangs, zu der keine Reverse Transkriptase hinzugegeben wird. Hier darf im Endprodukt also keine cDNA enthalten sein. Positive qPCR-Ergebnisse bei der RT-minus-Probe weisen auf eine fehlerhafte RNA-Isolierung hin. Die NTC-Probe enthält den vollen Mastermix, aber keine RNA-Probe, sondern nur RNase-freies Wasser. Positive qPCR-Ergebnisse bei der NTC-Probe weisen auf Kontamination des zur Verdünnung dienenden Wassers oder anderer Komponenten hin.

Die cDNA-Synthese erfolgte am Thermocycler unter Verwendung des iScript-Protokolls. Laut diesem Protokoll wird zuerst 5 min auf 25°C aufgeheizt, danach 30 min auf 42°C und im letzten Schritt 5 min auf 85°C. Die Proben werden bis zum Herausnehmen im Thermocycler auf 4°C gehalten.

### 3.8.3 qRT-PCR -Pipettieren

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR – engl. polymerase chain reaction) ist ein Verfahren zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten. Mittels Primer, die an komplementäre Abschnitte einer DNA-Probe binden und die als Angriffspunkt für die DNA-Polymerase dienen, können ausgewählte DNA-Abschnitte, zumeist spezifische Gene, gezielt vermehrt werden. Bei qRT-PCR (engl. quantitative real-time polymerase chain reaction) kann diese Vermehrung mittels des Signals eines im Mastermix enthaltenen Farbstoffes, der in die replizierte DNA eingebaut wird, in Echtzeit detektiert werden. Da die Vermehrungsrate pro Zyklus bekannt ist, kann mittels qRT-PCR anhand des erstmaligen Auftretens eines detektierbaren Farbsignals während einer PCR, die im Regelfall zwischen 40 bis 45 Zyklen umfasst, auf die Ausgangsmenge des entsprechenden Gens in der Probe geschlossen werden. Die PCR und qRT-PCR sind aus Forschung und klinischer Praxis (molekularer Erregernachweis, humangenetische Anwendungen, Pränataldiagnostik u.v.m.) nicht mehr wegzudenken.

Die Primer für eine qRT-PCR werden je nach Bedarf designt und gefriergetrocknet geliefert. Zunächst müssen sie in einer definierten Menge Wasser (vom Hersteller angegeben) gelöst werden. Ein Primerpaar besteht jeweils aus einem forward- und einem reverse-Primer. Dies ist notwendig, damit während eines Zyklus beide komplementären DNA-Stränge synthetisiert werden. Anschließend wird eine 1:10-Verdünnung des Primerpaares hergestellt (=80 µl DNase -freies Wasser + 10 µl reverse -Primer + 10 µl forward -Primer). Unsere Primersequenzen für SIRT4 stammen aus der Publikation von Jeong et al, 2016 (53) (Abb. 2).

SIRT4-f3	TCGGAAAGCTGTACTGGTTG
SIRT4-r3	TCTGTTCCCCACAATCCAAG

**Abb. 2: Verwendete Primersequenzen für humanes SIRT4**

Die Probenverdünnung richtet sich im Wesentlichen nach der Spezifität des Primers, die vor Verwendung jedes Primers in einer Verdünnungsreihe mit einer Pro-

be, die das zu detektierende Gen mit Sicherheit enthält, ausgetestet wird. Für unsere Primer stellte sich zumeist eine cDNA-Konzentration von 6,25 ng/ $\mu$ l als optimal heraus. Die entsprechenden Verdünnungen müssen anhand der bekannten cDNA-Konzentrationen der Proben vor dem eigentlichen PCR-Pipettieren berechnet und angefertigt werden. Ebenfalls muss die notwendige Menge an Mastermix berechnet werden. Als Farbsignal verwendeten wir das gebräuchliche SyberGreen. Der Mastermix besteht pro Duplikat aus 4  $\mu$ l SyberGreen (+Nukleotide und Polymerase) und 1  $\mu$ l Primer. Eine Reservemenge von zirka 5 Duplikaten empfiehlt sich.

Die PCR wird in 384-well-PCR-plates auf Eis pipettiert. Für jede Probe benötigt man im Endeffekt 4 Wells auf der PCR-Platte: jeweils ein Duplikat (=2 Wells) für den dem Forschungsgegenstand dienenden Primer und jenem für  $\beta$ -Aktin. Beta-Aktin dient als Kontrolle ob die PCR richtig pipettiert wurde, gleich bleibende  $\beta$ -Aktin-Werte in allen Proben sind Grundvoraussetzung für die Validität der PCR. Außerdem erfolgt bei der Auswertung der PCR-Daten die Normalisierung der Ct-Werte des Zielgens in Bezug auf die Ct-Werte des Housekeeping-Gens (in unserem Falle des Beta-Aktins). Diese Normalisierung ist notwendig um kleine Unterschiede in der Probenkonzentration bei der Auswertung auszugleichen. Pro Duplikat legt man sich in einem PCR-stripe 6  $\mu$ l Mastermix (MM), also pro Probe ein Stripe mit 6  $\mu$ l  $\beta$ -Aktin-MM und ein Stripe mit 6  $\mu$ l vom MM mit dem Primer des Zielgens. In jede MM-Vorlage pipettiert man nun 4  $\mu$ l cDNA-Verdünnung, vermischt cDNA und MM darin durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren und überträgt direkt daraus 4  $\mu$ l des cDNA-MM-Gemischs in ein Well auf der 384-Well-Platte. Das macht man für jede MM-Vorlage zwei Mal, so dass auf der PCR-Platte jede Probe + Primer zweimal, also im Duplikat, aufgetragen ist.

Nachdem alle Proben aufgetragen wurden, wird die Platte sorgfältig mit einer Spezialfolie zugeklebt. Vor der qRT-PCR am LightCycler® 480/Biorad CFX384 wird die Platte noch bei 900 rpm für 2 min zentrifugiert. Am LC480 kann man dann diverse Einstellungen, was Anzahl der Zyklen, Temperatur und Parameter der Schmelzkurven betrifft, vornehmen, sowie die Probenzusammengehörigkeit auf der Platte festlegen. Ein Zyklus bestand bei uns 10 s bei 95°C und anschließenden 30 s bei 60°C. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen.

Bei der Probenauswertung sind neben Anzahl der Zyklen bis zur detektierbaren Amplifikation (Ct-Werte) auch die Schmelzkurven wichtig. Die Schmelzkurve zeigt

die Anzahl und Menge der PCR-Produkte. Im Idealfall sollte der LC480 für jede Probe nur eine Schmelztemperatur feststellen, nämlich jene des PCR-Produkts, das durch den Primer amplifiziert werden soll. Wie entsteht aber nun eine Schmelzkurve? Unser Farbstoff, das SyberGreen, liefert dem LC480 nur ein detektierbares Signal wenn die amplifizierte DNA komplementär gebunden ist. Denaturiert die DNA und löst sich die komplementäre Bindung verschwindet auch das Farbsignal. Der LC480 heizt bei der Erstellung der Schmelzkurven die Platte kontinuierlich auf einen bestimmten, einstellbaren Wert auf und überprüft laufend das Farbsignal. Im Idealfall verschwindet das gesamte Farbsignal bei einem einheitlichen Temperaturwert, nämlich dem Wert, bei dem das PCR-Produkt denaturiert. Zwei oder mehrere Peaks in der Schmelzkurve weisen also auf unspezifische PCR-Produkte hin. Wesentlich ist hierbei allerdings auch die korrekte Interpretation der Kurve und nicht allein der Schmelztemperaturen. Ein kleiner Peak neben einem sehr großen, eindeutigen Peak kann z.B. auf Primerdimere mit eigener Schmelztemperatur hinweisen und muss eine Probe nicht automatisch invalide machen.

### **3.9 Durchflusszytometrie (FACS)**

FACS (engl. fluorescence activated cell sorting) ist eine Variante der Durchflusszytometrie, bei der Zellen, die durch bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe markiert wurden, detektiert werden. Wir arbeiteten hierbei mit dem CytoFLEX der Firma Beckman Coulter.

Wir führten FACS mit Propidiumiodid-Markierung für nekrotische Zellen und mit CellEvent für apoptotische Zellen durch. Für FACS-Versuche muss der Überstand aus den Wells sowie das PBS aller Waschschriffe mitgeerntet werden. Die Zellen am Well-Boden werden anschließend trypsiniert. Die geerntete Zellsuspension wird bei 400 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Für das Propidiumiodid-staining werden 200 µl dieser Suspension in ein FACS-Röhrchen überführt und vorerst nicht weiterverwendet. Die restlichen 800 µl werden für das CellEvent-staining verwendet. In diesen 800 µl dürfen allerdings maximal 500.000 Zellen enthalten sein, bei einer größeren Zahl funktioniert die CellEvent-Markierung nur bedingt! Falls wahrscheinlich ist, dass diese Zahl in der restlichen Suspension überschritten wird, nimmt man einfach nur einen Anteil (z.B. 500 µl). Die Zellsuspension für CellEvent wird ebenfalls in ein FACS-

Röhrchen überführt und bei 400 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig verworfen um das Zellpellet nicht zu beschädigen. Das Pellet im FACS-Röhrchen wird in 62,5 µl CellEvent-Medium (CellEvent 1:125 in vorgewärmtem Medium) resuspendiert und 45 min bei 37°C inkubiert. Bei sämtlichen Arbeitsschritten ist zu beachten, dass CellEvent lichtempfindlich ist! Das Licht sollte während dem Arbeiten mit CellEvent abgedreht werden. Der CellEvent-Farbstoff wird von aktivierter Caspase 3 und 7 gespalten. Das gespaltene CellEvent kann an DNA binden und emittiert ein Fluoreszenzsignal bei zirka 530 nm, wodurch das Ausmaß der Apoptose bestimmt werden kann.

Während die Zellen mit CellEvent inkubiert werden, vermisst man die Propidiumiodid-Proben. Propidiumiodid wird mit PBS auf 50 µg/ml verdünnt. In jedes FACS-Röhrchen kommen 6 µl dieser Verdünnung. Die Proben werden kurz gevortext (nicht mehr als 1800 rpm!) und anschließend in einer Schublade für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert (auch Propidiumiodid ist lichtempfindlich!). Propidiumiodid interkaliert in die DNA. Nekrotische Zellen weisen eine beschädigte Zellmembran auf, wodurch Propidiumiodid in den Zellkern gelangen und die DNA nekrotischer Zellen markieren kann. Lebende oder apoptotische Zellen werden von Propidiumiodid nicht markiert.

Unmittelbar vor dem Vermessen am CytoFLEX muss jede einzelne Probe (Propidiumiodid und CellEvent) kurz gevortext werden, damit die Zellsuspension möglichst homogen und das Messergebnis dadurch repräsentativ ist.

## 4 Ergebnisse

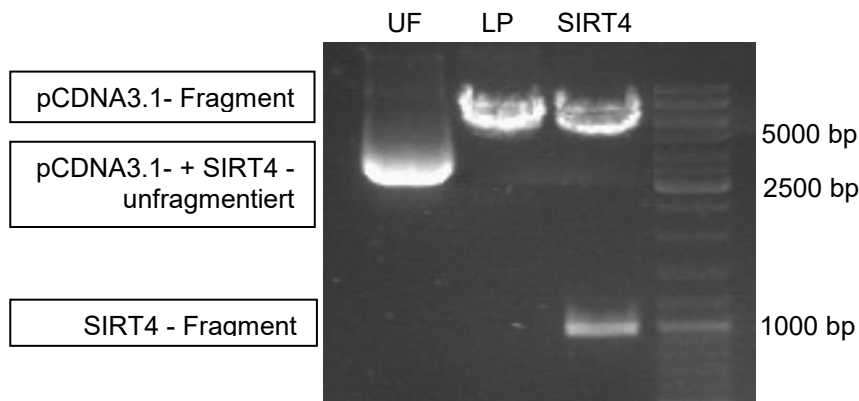
### 4.1 Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse

Tab. 5: Plasmidisolierung.

Plasmid	260/280	Konzentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
pCDNA3.1-/SIRT4	1,89	1,706
pCDNA3.1-/LP	1,89	1,231

LP = Leerplasmid

Die Korrektheit beider Plasmide (pCDNA3.1- und pCDNA3.1-/SIRT4) wurde mittels Restriktionsanalyse (Not1) überprüft (Abb. 3).



**Abb. 3: Restriktionsanalyse nach Plasmidisolierung mit Not1.** Agarosegelelektrophorese auf 3%-Gel. Die Größe der Restriktionsfragmente stimmt mit den Herstellerangaben überein (~5428 bp für pCDNA3.1-, 944 bp für humane SIRT4-DNA-Sequenz). Das geschnittene Leerplasmid erscheint bei zirka 5500 bp, das SIRT4-Fragment bei zirka 950 bp. Das unfragmentierte SIRT4-Plasmid erscheint aufgrund seiner zirkulären Struktur bei zirka 3000 bp. UF = unfragmentiert, LP = Leerplasmid, SIRT4 = pCDNA3.1- mit SIRT4.

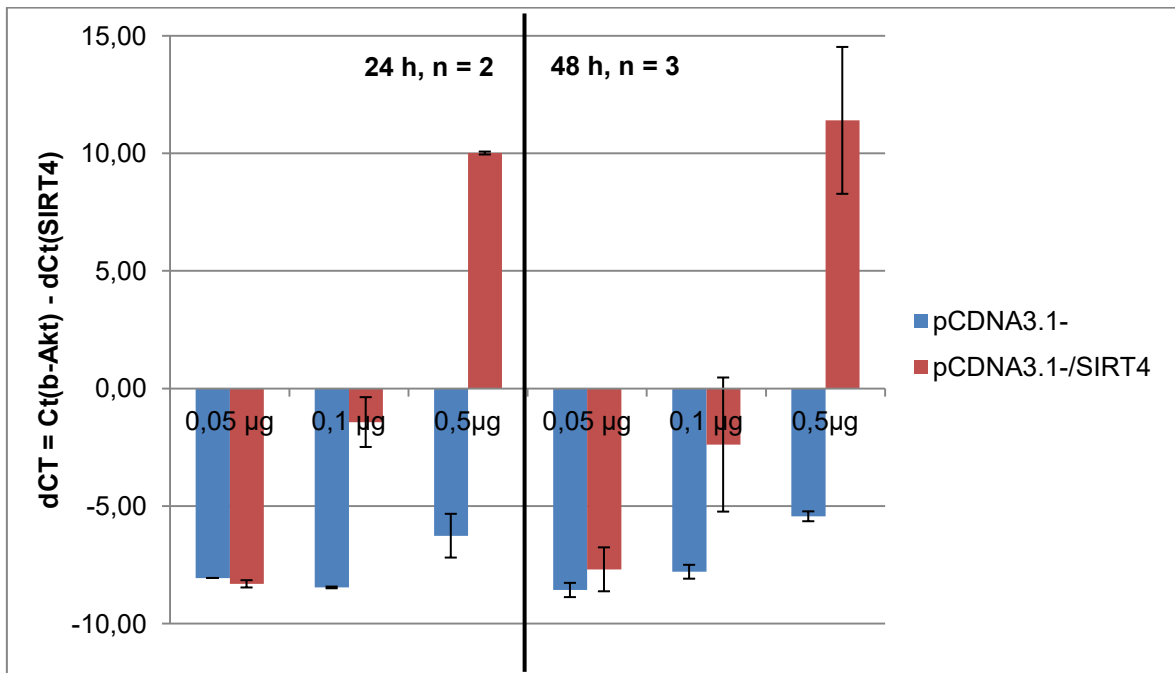
Eine anschließende Sequenzierung des Plasmids bestätigte, dass es sich dabei um pCDNA3.1- mit humanem SIRT4 handelte. Die Sequenzierung wurde in der „Core facility für Molekularbiologie“ am ZMF (Meduni Graz) durchgeführt.

### 4.2 SIRT4-Überexpression

#### 4.2.1 qRT-PCR

Zunächst galt es, die optimalen Bedingungen für eine SIRT4-Überexpression herauszufinden. Die wesentlichen Parameter sind hierbei die Menge an Plasmid, mit der die Zellen transfiziert werden, und der Zellerntezeitpunkt.

Wir begannen unsere Versuche mit 0,05 µg, 0,1 µg und 0,5 µg pro Well, ernteten nach 24 und 48 Stunden und führten eine qRT-PCR durch (Abb. 4).



**Abb. 4: Realtime-PCR von transfizierten A549/PAR.** Dargestellt sind die auf  $\beta$ -Aktin normalisierten durchschnittlichen Ct-Werte ( $dCt = Ct[\beta\text{-Akt}] - Ct[\text{SIRT4}]$ ) sowie deren Standardabweichungen. Nach Transfektion mit 0,05 µg Plasmid-DNA zeigt sich noch keine Überexpression auf mRNA-Ebene, bei 0,1 µg wird sie aber bereits deutlich sichtbar. Bei den mit 0,5 µg pCDNA3.1-/SIRT4-transfizierten Zellen befindet sich die Überexpression numerisch im Bereich des 100.000-fachen.

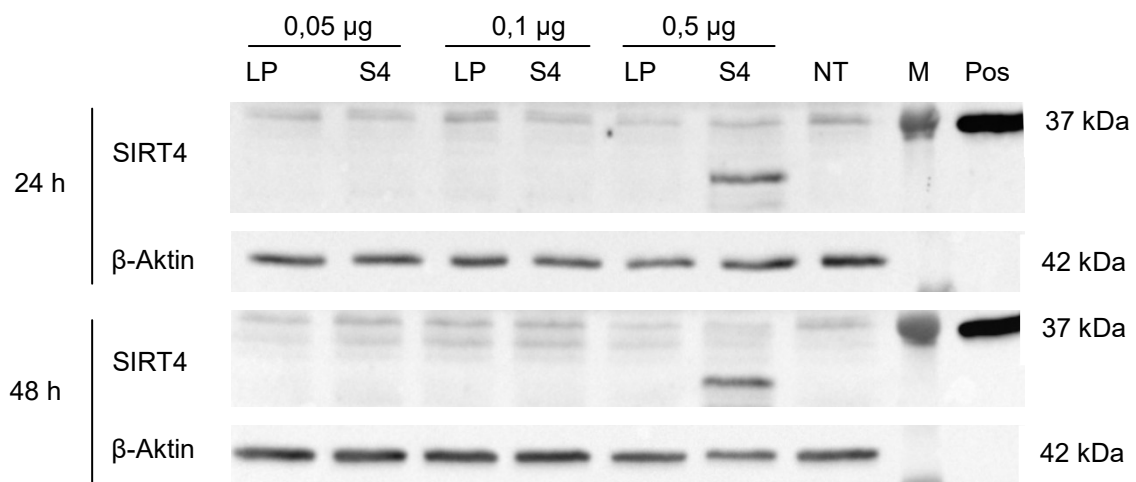
Nach Transfektion mit 0,05 µg pCDNA3.1-/SIRT4 zeigten die Zellen in der qRT-PCR keine SIRT4-Überexpression im Vergleich zu Leerplasmid-transfizierten Zellen. Bei den Zellproben, die mit 0,1 µg Plasmid-DNA transfiziert wurden, betrug der Unterschied zu den Leerplasmid-Kontrollen bereits sieben Zyklen. Die Überexpression bei Zellen, die mit 0,5 µg SIRT4-Plasmid transfiziert wurden, war enorm, die Ct-Werte lagen im Bereich von 11 und 12, bei  $\beta$ -Aktin Ct-Werten von zirka 22.

Wir führten ebenfalls qRT-PCRs mit Proben höherer Plasmid-Dosis durch. Aufgrund der hohen Ct-Werte stießen wir hierbei auf die technischen Grenzen der qRT-PCR, weil die Ct-Werte von  $\beta$ -Aktin und SIRT4 teils um mehr als zehn Zyklen auseinander lagen. Sehr hohe Ct-Werte (unter Ct 10) wurden außerdem vom LC480 nicht mehr erfasst. Es zeigte sich jedoch, dass höhere Plasmid-Mengen (2, 3 und 4 µg) keine wesentlich höhere Überexpression mehr erzielten als Transfektion mit 0,5 µg Plasmid.

#### 4.2.2 Western-Blot - Ergebnisse

Im Anschluss an unsere qRT-PCR-Ergebnisse führten wir Western-Blots durch, um die Überexpression auch auf Proteinebene nachzuweisen. Wir begannen unsere Transfektionen wiederum mit 0,05 µg, 0,1 µg und 0,5 µg Plasmid-DNA und ernteten die transfizierten Zellen nach 24 und 48 Stunden (Abb. 5).

Wir starteten unsere Western-Blots mit einem 10%igen-SDS-PA-Gel. Nachdem im ersten Versuch die SIRT4-Banden nahezu in der Farbfront verliefen, führten wir die nächsten SIRT4-Blots auf 12%igen-Gelen aus, um die Banden möglichst gut aufzutrennen und Informationsverluste zu vermeiden.

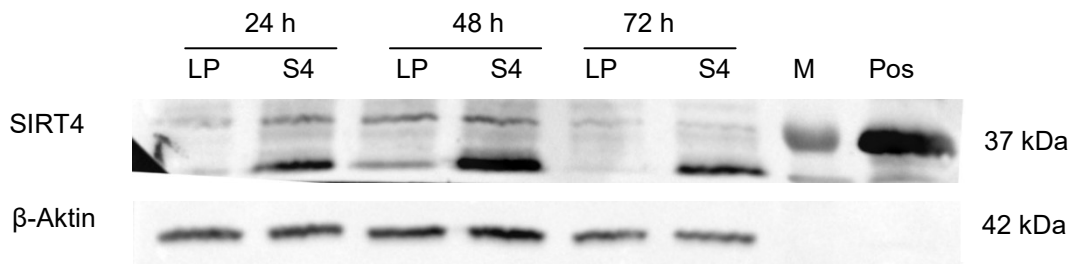


**Abb. 5: Western-Blot-Analyse der Zelllysate von A549/PAR-Zellen, transfiziert mit unterschiedlichen Plasmid-Mengen.** Transfiziert wurde mit 0,05 µg, 0,1 µg und 0,5 µg Plasmid-DNA, die Zellernte erfolgte nach 24 und 48 Stunden. Die Positivkontrolle kommt bei 37 kDa, das SIRT4 aus transfizierten Zellen bei etwas weniger. β-Aktin wurde nach Strippen der Membranen erstellt. Es dient der Qualitätskontrolle, da in allen Zelllysaten gleich viel enthalten sein muss, da es sich ja überall um A549/PAR handelt. Durch die Gleichheit der β-Aktin-Banden ist sichergestellt, dass Unterschiede in den SIRT4-Banden auf unterschiedlich hoher SIRT4-Expression beruhen, und nicht durch das Auftragen ungleicher Mengen an Probenmaterial bedingt sind. LP = Leerplasmid, S4 = SIRT4, NT = Nicht transfiziert, M = Marker, Pos = Positivkontrolle (2 µl lysierte Maus-Niere 1:10).

Aus Abb. 5 wird deutlich, dass 0,05 µg und 0,1 µg pCDNA3.1-/SIRT4 zu wenig sind, um auf Proteinebene eine Überexpression von SIRT4 zu bewirken, obwohl die Überexpression auf mRNA-Ebene nach Transfektion mit 0,1 µg Plasmid-DNA beträchtlich war. Mit 0,5 µg zeigt sich bereits nach 24 Stunden eine deutliche Proteinbande. Obwohl diese nicht auf gleicher Höhe mit der Positivkontrolle erscheint,

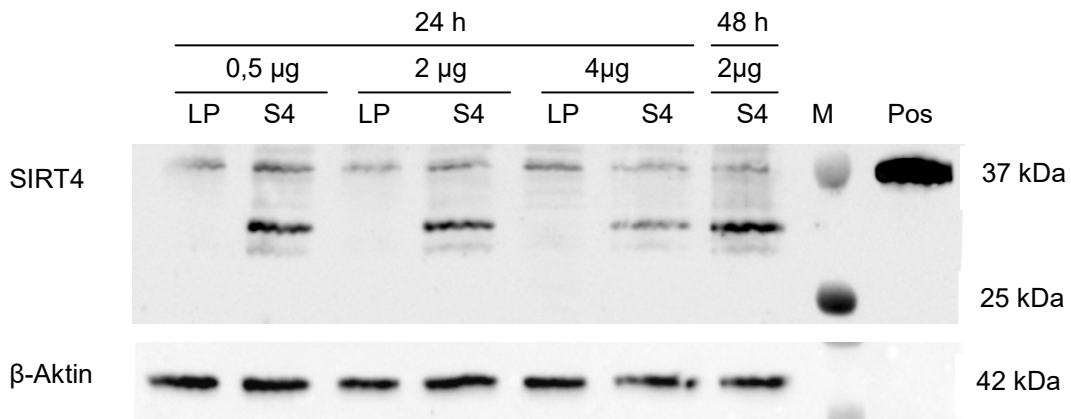
nahmen wir dennoch an, dass es sich hierbei um das SIRT4 unserer Transfektion handelte, was sich in den weiteren Versuchen auch bestätigte.

In weiterer Folge wurde die Plasmid-Menge auf 2 µg erhöht und ein zusätzlicher Erntezeitpunkt nach 72 Stunden hinzugefügt (Abb. 6). Aus Abb. 6 ersieht man, dass die SIRT4-Expression nach 48 Stunden am größten ist und danach wieder abnimmt.



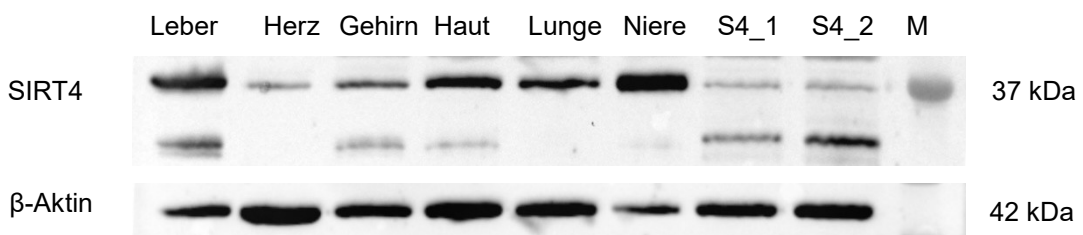
**Abb. 6: Western-Blot-Analyse der Zelllysate transfizierter A549/PAR –Zellen nach unterschiedlichen Erntezeitpunkten.** LP = Leerplasmid, S4 = SIRT4, M = Marker, Pos = Positivkontrolle (2 µl lysierte Maus-Niere 1:10). Die A549/PAR wurden mit 2 µg transfiziert und nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet. β-Aktin wurde nach Strippen der Membranen erstellt. Die Gleichheit der β-Aktin-Banden zeigt, dass die Unterschiede in den SIRT4-Banden auf tatsächlichen Expressionsunterschiede zwischen den A549/PAR-Proben und nicht auf unterschiedlichen Mengen an Probenmaterial beruhen. Die SIRT4-Expression ist demnach nach 48 Stunden am größten.

Um den Proteinsyntheseapparat der Zelle auszureizen, führten wir auch Versuche mit noch höheren Plasmid-Mengen durch (Abb. 7). Nach 24 Stunden sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen 0,5 und 2 µg Plasmid-DNA sichtbar. Vier µg Plasmid-DNA überfordern die Zelle scheinbar und liefern eine geringere SIRT4-Ausbeute.



**Abb. 7: Western-Blot-Analyse der Zelllysate von A549/PAR-Zellen nach Transfektion mit großen Mengen an Plasmid-DNA.** Zusätzlich zur Maus-Niere ist als Positivkontrolle für eine gelungene Transfektion eine bereits als positiv getestete SIRT4-Probe (A549/PAR, transfiziert mit 2 µg Plasmid-DNA, geerntet nach 48 Stunden) aufgetragen. Das SIRT4 aus den transfizierten Zellen erscheint in etwa bei 32 kDa. β-Aktin wurde nach Strippen der Membranen erstellt. Die gleiche Intensität der β-Aktin-Banden in allen Proben zeigt, dass überall gleich viel Probenmaterial aufgetragen wurde, und es sich bei den unterschiedlich intensiven SIRT4-Banden um tatsächliche Expressionsunterschiede handelt. LP = Leerplasmid, S4 = SIRT4, M = Marker, Pos = Positivkontrolle (2 µl lysierte Maus-Niere 1:10).

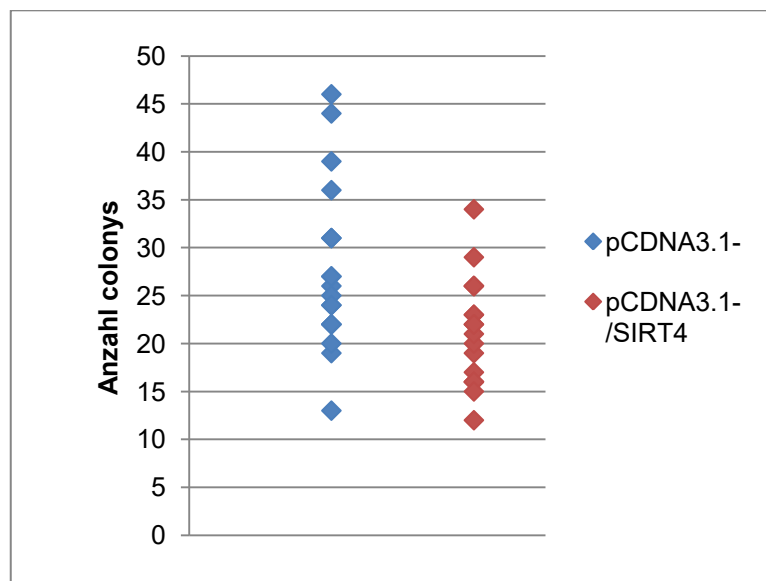
Obwohl sich im Laufe unserer Transfektionsversuche bestätigte, dass jene Bande, die in etwa auf einer Höhe von 32 kDa erscheint, das Produkt der Transfektion ist, verglichen wir in einem weiteren Blot die Größe von SIRT4 aus humanen Lysaten mit ausgewählten transfizierten Proben (Abb. 8). Dem lag der Gedanke zugrunde, dass humanes SIRT4, im Gegensatz zu Maus-SIRT4, das in unseren bisherigen Versuchen als Positivkontrolle diente, auf gleicher Höhe mit dem SIRT4 aus unseren transfizierten Zellen erscheint, was sich allerdings nicht bestätigte.



**Abb. 8: Western-Blot mit Lysaten aus humanen Geweben und SIRT4-transfizierten Proben.** SIRT4 aus humanen Gewebslysaten erscheint bei 37 kDa, SIRT4 aus transfizierten Zellproben zirka bei 32 kDa. Die β-Aktin-Banden wurden nach Strippen der Membranen erstellt und zeigen deutliche Unterschiede, was wahrscheinlich auf den unterschiedlichen β-Aktin-Gehältern der verschiedenen Gewebearten beruht. S4\_1 = A549/PAR, transfiziert mit 0,5 µg pCDNA3.1-/SIRT4 nach 24 h, S4\_2 = A549/PAR, transfiziert mit 2 µg pCDNA3.1-/SIRT4 nach 48 h, M = Marker.

### 4.3 Colony assay

Nachdem wir die optimalen Transfektionsbedingungen herausgefunden hatten, wurde untersucht, ob eine SIRT4-Überexpression die Zellen widerstands- und überlebensfähiger macht. Im Colony assay plattierten wir SIRT4- und mit Leerplasmid transfizierte Zellen (250 Zellen pro Well, 24 Stunden nach Transfektion) aus (Abb. 9). In sechs Versuchen (in Triplikaten) konnten wir keinen wesentlichen Wachstumsunterschied zwischen SIRT4- und Leerplasmid-transfizierten Zellen feststellen. Tendenziell bildeten die Leerplasmid-transfizierten Zellen sogar etwas effizienter Kolonien.



**Abb. 9: Colony assay mit pCDNA3.1- und pCDNA3.1-/SIRT4-transfizierten A549/PAR-Zellen.** Zu sehen sind die Anzahl an Kolonien pro Well. Jeder Punkt repräsentiert ein ausplattiertes Well. Es zeigt sich, dass die Spannweite der Werte relativ groß ist, die Mehrzahl der Werte gruppiert sich bei SIRT4 allerdings zwischen 15 und 25 Kolonien (Median = 21,5), bei pCDNA3.1- (=Leerplasmid) zwischen 18 und 28 Kolonien (Median = 25,5). n = 6, in Triplikaten.

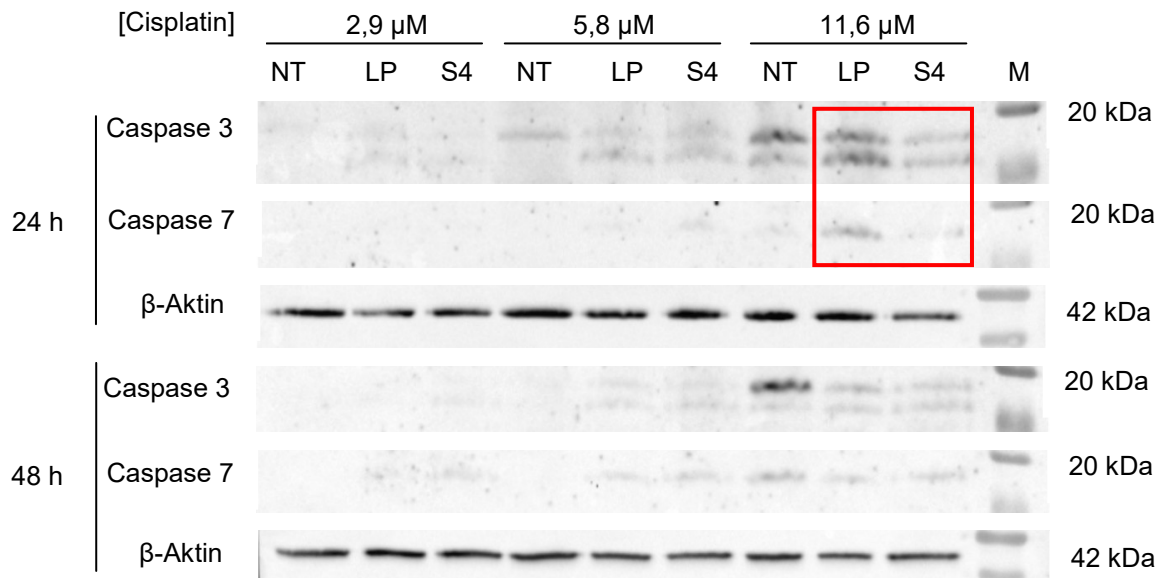
### 4.4 Cisplatin-Versuche

Für die Cisplatin-Versuche transfizierten wir A549/PAR mit 0,5 µg Plasmid-DNA. Die Cisplatin-Behandlung wurde 24 Stunden nach der Transfektion gestartet.

#### 4.4.1 Western-Blot für Caspase 3 und 7

Caspase 3 und 7 sind Proteasen, die bei der Apoptose aktiviert werden und zelleigene Bestandteile abbauen. Durch den Nachweis von aktiver Caspase 3 und 7 kann man das Ausmaß der Apoptose in einer Probe bestimmen.

Die Elektrophorese fand auf einem 15%igem SDS-PA-Gel statt. Leerplasmid-transfizierte Zellen wiesen darin sichtbar mehr Apoptose auf als SIRT4-transfizierte (Abb. 10).



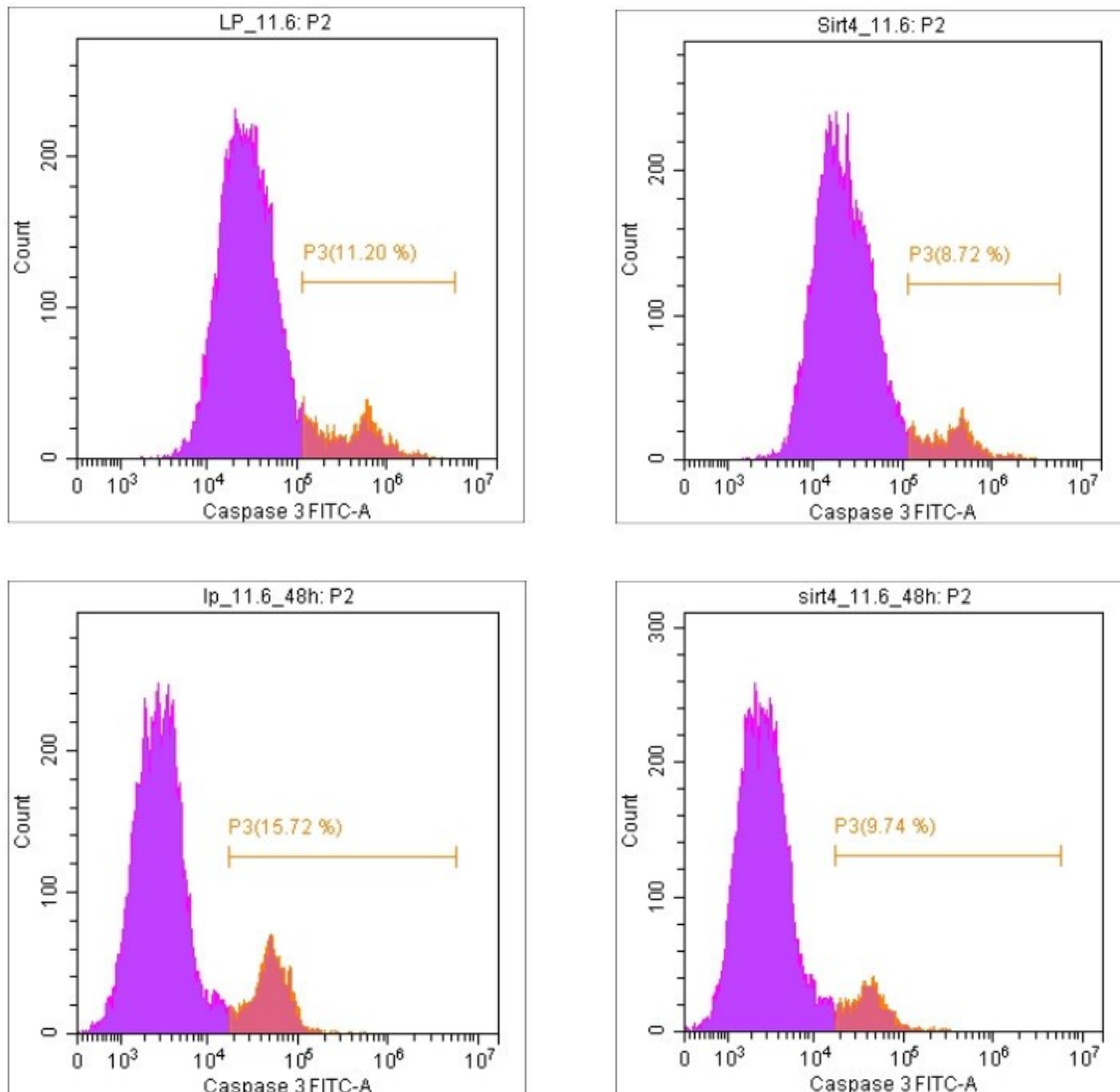
**Abb. 10: Western-Blots für Caspase 3 und 7 nach Cisplatin-Behandlung von transfizierten A549/PAR-Zellen.** Insbesondere die relativ hohe Cisplatin-Dosis (11,6 μM) zeigt einen Anstieg der Apoptose. Die Caspase 3-Banden sind nach 24 Stunden bei SIRT4-transfizierten Zellen weniger intensiv als bei NT und Leerplasmid. Im Caspase 7-Blot weisen LP-Zellen nach 24 Stunden mehr Apoptose auf als SIRT4-Zellen (rotes Rechteck). Nach 48 Stunden zeigen sich weder bei Caspase 3 noch bei Caspase 7 Unterschiede zwischen LP und SIRT4. β-Aktin wurde wiederum nach Strippen der Membranen erstellt und dient der Qualitätskontrolle. NT = Nicht transfiziert, LP = Leerplasmid, S4 = SIRT4, M = Marker.

#### 4.4.2 Durchflusszytometrie (FACS)

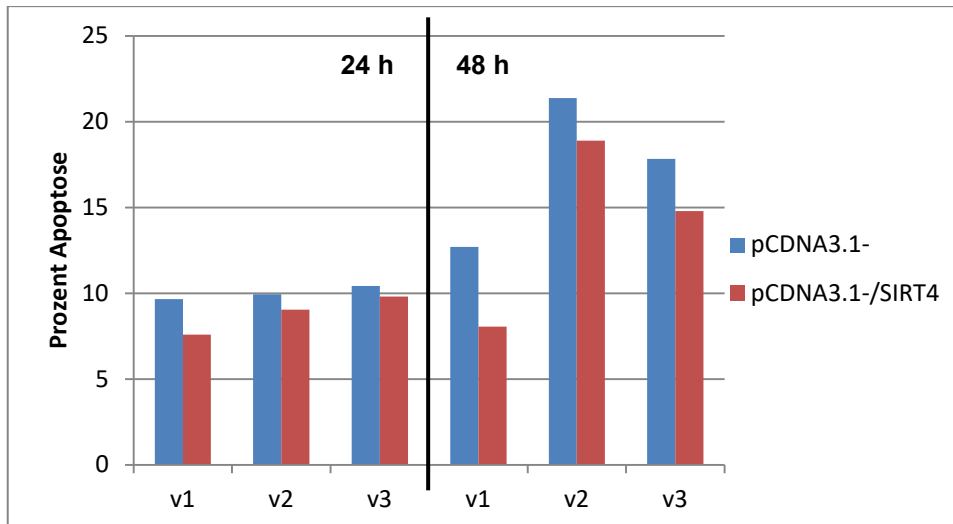
FACS wurde mit Caspase 3 und 7-Markierung durchgeführt. Während bei niedrigen Cisplatin-Konzentrationen (2,9 und 5,8 μM) keine wesentlichen Unterschiede zwischen Leerplasmid und SIRT4 sichtbar wurden, war der Unterschied bei 11,6 μM Cisplatin-Medium deutlich (Abb. 11, 12). SIRT4-transfizierte Zellen vertrugen Cisplatin besser als Leerplasmid-transfizierte. Der Unterschied zeigte sich erst nach 48 Stunden Cisplatin-Behandlung deutlich.

Wir führten ebenfalls eine Nekrose-Messung mittels Propidiumiodid-Markierung durch. Diese zeigte keine Unterschiede zwischen SIRT4- und Leerplasmid-transfizierten Zellen. Den Grund hierfür vermuteten wir darin, dass die DNA-Schäden, die Cisplatin an den Zellen verursacht, erst über einen gewissen Zeit-

raum hinweg und nicht schlagartig zum Zelltod führen. Die Zellen werden also durch Cisplatin-Behandlung (zumindest in unsere Dosierungen) nicht nekrotisch sondern haben genügend Zeit um in die Apoptose zu gehen.



**Abb. 11: FACS-Histogramme von transfizierten A549/PAR nach 24 und 48 Stunden Cisplatin-Behandlung (11,6  $\mu$ M).** Die obere Histogrammreihe zeigt Leerplasmid (LP)- und SIRT4-transfizierte Zellen nach 24 Stunden Cisplatin-Behandlung (11,6  $\mu$ M), die untere Bildreihe nach 48 Stunden. Die rötlich unterlegte Fläche unter der Kurve stellt Caspase 3-markierte Zellen dar. Der Unterschied nach 24 Stunden ist nur gering, nach 48 Stunden zeigen SIRT4-transfizierte Zellen eine deutlich weniger Apoptose als Leerplasmid-transfizierte.



**Abb. 12: FACS-Analyse von transfizierten A549/PAR nach 24 und 48 Stunden Cisplatin-Behandlung (11,6  $\mu$ M).** Dargestellt sind aus drei Versuchsreihen die SIRT4- und Leerplasmid (pCDNA3.1-)-transfizierten-Zellen mit 11,6  $\mu$ M Cisplatin-Medium. Die Quantifizierung der Apoptose erfolgte durch Caspase 3/7-Markierung, wobei nur die aktivierten Formen von Caspase 3 und 7 detektiert werden. Die Unterschiede nach 24 Stunden sind dezent, nach 48 Stunden zeigen SIRT4-Zellen deutlich weniger Apoptose als Leerplasmid-Zellen. v1 = Versuch 1, v2 = Versuch 2, v3 = Versuch 3.

## 5 Diskussion

### 5.1 SIRT4-Überexpression

Wir untersuchen in dieser Arbeit, wie eine artifizielle SIRT4-Überexpression in A549/PAR-Zellen am besten gelingt. Die Methode unserer Wahl hierzu war die Transfektion von Plasmid-DNA mittels jetPRIME -Reagenz.

Mittels qRT-PCR zeigen wir, dass die SIRT4-Überexpression auf mRNA-Ebene 24 Stunden nach Transfektion mit 0,05 µg Plasmid-DNA noch nicht stattgefunden hat. Nach Transfektion mit 0,1 µg SIRT4-Plasmid-DNA beträgt die Überexpression im Vergleich zu den Leerplasmid-Kontrollen bereits zirka sieben Zyklen - in Zahlen ist das eine  $2^7$ -fache, also 128-fache Überexpression. Bei einer weiteren Steigerung der Menge an transfizierter Plasmid-DNA auf 0,5 µg ist die Überexpression bereits so hoch, dass die qRT-PCR an ihre technischen Grenzen stößt. Bei einem  $\beta$ -Aktin-Ct-Wert von etwa 22 erzielten wir SIRT4-Ct-Werte von 10 bis 12, die zugehörigen SIRT4-Ct-Werte der Leerplasmid-Kontrollen lagen bei zirka 30. Numerisch ist das eine mehr als 100.000-fache Überexpression. Würde die Überexpression noch erhöht werden, würden entweder die Ct-Werte der SIRT4-transfizierten Zellen in einen Bereich unter 10 kommen, wo eine valide Messung durch den PCR-Cyler nicht mehr möglich ist, oder die SIRT4-Ct-Werte der Leerplasmid-Kontrollen würden – bedingt durch die hohe Probenverdünnung, die notwendig ist, um die Ct-Werte der SIRT4-transfizierten Zellen in einen messbaren Bereich zu bringen – ins Negative (also hin zu Ct-Werten über 35) verschoben werden.

Darüber hinaus führten wir auch zusätzliche qRT-PCR-Versuche durch, in denen wir die Zellen mit mehr als 0,5 µg Plasmid-DNA, nämlich mit 2, 3 und sogar 4 µg, transfizierten. Wir sahen hierbei folgendes:

- Erstens konnten zahlreiche Proben vom LC480, an dem wir diese qRT-PCRs durchführten, aufgrund zu hoher SIRT4-Expression, also zu niedriger Ct-Werte (<10), nicht gemessen werden.
- Zweitens erzielten jene Zellproben, die mit 2, 3 oder 4 µg Plasmid-DNA transfiziert wurden, vielfach keine wesentlich höhere SIRT4-Expression mehr als Proben, die mit 0,5 µg Plasmid-DNA transfiziert wurden.

Während also die SIRT4-mRNA-Expression nach Transfektion mit 0,1 und 0,5 µg deutlich zunahm (um zirka zehn Zyklen), war der weitere Anstieg nach Transfektio-

on mit 2 µg Plasmid-DNA nur mehr gering und nicht einmal mehr stetig, wiewohl unsere Versuche in diese Richtung zu wenig umfangreich waren, um statistische Signifikanz zu erreichen.

Nach ersten qRT-PCR-Ergebnissen mit Plasmid-Mengen über 0,5 µg beschlossen wir, diese Versuche nicht weiter zu verfolgen, weil

- die technischen Möglichkeiten der qRT-PCR bereits ausgereizt waren.
- der mRNA-Syntheseapparat der Zelle scheinbar bereits nach Transfektion mit 0,5 µg Plasmid-DNA seine Grenzen erreicht hatte.
- sich bereits bei einer 100.000-fachen SIRT4-Überexpression die berechnete Frage stellt, inwiefern solcherart behandelte Zellen noch vergleichbar sind mit tatsächlichen Tumoren in PatientInnen, da eine solch enorme Proteinüberexpressionen in klinischen Tumoren wohl nicht erreicht wird.

Entsprechend unserer qRT-PCR-Ergebnisse führten wir auch Western-Blot-Untersuchungen durch. Interessant waren hier zunächst die Ergebnisse 24 Stunden nach Transfektion mit 0,1 µg Plasmid-DNA. Während die SIRT4-Überexpression in der qRT-PCR unter diesen Bedingungen bereits zirka sieben Zyklen beträgt, also immerhin das 128-fache, ist im Western-Blot noch überhaupt keine Überexpression feststellbar. Dies deutet womöglich darauf hin, dass die Zellen artifiziell exprimiertes SIRT4 auch sehr effektiv wieder abbauen. Erst ab relativ hohen Plasmid- (und somit auch mRNA-) Konzentrationen überwiegt die SIRT4-Synthese den zellulären Abbau und wird auch auf Proteinebene sichtbar – 24 Stunden nach Transfektion mit 0,5 µg Plasmid-DNA war dies bereits der Fall.

Auch die Vermutung aus der qRT-PCR, dass die Transfektion mit höheren Plasmid-Mengen als 0,5 µg keine wesentlich höhere SIRT4-Überexpression mehr bewirkt, konnten wir im Western-Blot bestätigen. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion zeigt sich hierbei im Vergleich zur Transfektion mit 0,5 µg Plasmid-DNA kein wesentlicher Anstieg der SIRT4-Expression mehr. Während die SIRT4-Ausbeute 24 Stunden nach Transfektion mit 2 µg Plasmid-DNA noch sehr gut ist, zeigt sich nach Transfektion mit 4 µg bereits ein deutlicher Abfall. Wir vermuten, dass bei so hohen Plasmid-Konzentrationen bereits toxische Effekte der DNA wirksam werden.

Wir führten auch Zellernten nach verschiedenen Zeitpunkten durch. Es zeigte sich, dass die SIRT4-Expression bereits 24 Stunden nach Transfektion einen Maximal-

wert erreicht. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion ist die SIRT4-Expression ebenfalls noch sehr gut und zeigt im Vergleich zu Zellernten nach 24 Stunden noch keinen Abfall. Zweiundsiebzig Stunden nach Transfektion sinkt die SIRT4-Expression bereits deutlich ab, was vermutlich auch in der abnehmenden Güte des Nährmediums begründet ist.

Ungeklärt bleibt in dieser Arbeit, warum die SIRT4-Bande aus unseren Transfektionen im Western-Blot nicht auf gleicher Höhe mit humanem SIRT4 aus menschlichen Gewebslysaten erscheint. Während SIRT4 aus menschlichen Geweben bei 37 kDa sichtbar wird, zeigen sich die SIRT4-Banden aus unseren transfizierten A549/PAR bei zirka 32 kDa. Maus-SIRT4 erscheint ebenfalls bei 37 kDa, obwohl es um 19 Aminosäuren länger ist als humanes SIRT4. (55) An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die mRNA von genomischem SIRT4 am 5'-Ende länger ist als die SIRT4-mRNA, die von unserem Plasmid abgeschrieben wird, auch wenn es sich hierbei um nichtkodierende mRNA-Abschnitte handelt. Dies bereitete uns insbesondere am Beginn unserer qRT-PCR-Versuche Probleme, da wie die ersten PCRs mit SIRT4-Primern durchführten, die allesamt am 5'-Ende ansetzten und somit nur mRNA aus genomischer SIRT4-DNA, nicht aber von unserem Plasmid, erkannten. Der von uns letztendlich erfolgreich verwendete Primer setzt in der Mitte der mRNA-Sequenz an. Dies könnte bedeuten, dass die SIRT4-Synthese - ausgehend von der SIRT4-DNA bis hin zum fertigen Protein - von unserem Plasmid nicht vollkommen identisch ist mit der Synthese aus dem Genom einer Zelle. Möglicherweise findet bei der SIRT4-Synthese aus dem Genom eine Form von posttranskriptionaler oder -translationaler Modifikation statt, die durch den Verlust von nicht-kodierenden Abschnitten in der mRNA aus unserem Plasmid nicht berücksichtigt wird.

Zusammenfassend haben wir bezüglich der SIRT4-Überexpression in A549/PAR mittels Plasmid-Transfektion gezeigt, dass die maximale Überexpression 24 Stunden nach Transfektion mit 0,5 µg Plasmid-DNA erreicht wird. Sowohl größere Mengen an Plasmid-DNA als auch spätere Zellerntezeitpunkte erhöhten die SIRT4-Ausbeute nicht wesentlich.

## 5.2 Auswirkungen einer SIRT4-Überexpression in A549/PAR auf die Cisplatin-Resistenz

Wir konnten zeigen, dass eine artifizielle SIRT4-Überexpression in A549/PAR-Zellen deren Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin-Behandlung tatsächlich herabsetzt.

Im Western-Blot für Caspase 3 und 7 zeigten A549/PAR, die mit 0,5 µg SIRT4-Plasmid transfiziert wurden, weniger Apoptose als mit Leerplasmid transfizierte Zellen. Noch deutlicher fanden wir diesen Zusammenhang in der Durchflusszytometrie mit Caspase 3 und 7- Markierung. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion zeigten sich hier zwischen SIRT4- und Leerplasmid transfizierten Zellen nur dezente Unterschiede in der Apoptose, nach 48 Stunden vertrugen die SIRT4-transfizierten Zellen Cisplatin deutlich besser als die Leerplasmid-Kontrollen, was sich in einem geringeren Anteil an Zellen mit aktivierter Caspase 3 und 7 äußerte.

Die von uns gefundenen Unterschiede zwischen Leerplasmid- und SIRT4-transfizierten Zellen beziehen sich auf Untersuchungen in Hinblick auf Apoptose. In anderen Versuchen bezüglich der Widerstands- und Überlebensfähigkeit der Zellen konnten wir keine Unterschiede feststellen. FACS mit Propidiumiodid-Markierung, das über eine beschädigte Zellmembran in den Zellkern gelangen und in die DNA interkalieren kann und somit als Nekrose-Markierung dient, zeigte keine Unterschiede zwischen Leerplasmid- und SIRT4-Zellen. Der Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass Cisplatin (zumindest in den von uns gewählten Konzentrationen) die Zellen nicht schlagartig abtötet, sondern über einen Zeitraum von mehreren Stunden die Zelle durch DNA-Doppelstrangbrüche irreversibel schädigt. Die Zelle hat dadurch genügend Zeit in die Apoptose zu gehen – dementsprechend zeigen sich die quantitativen Unterschiede in der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Cisplatin in Unterschieden bezüglich Apoptose und nicht Nekrose.

Neben den Cisplatin-Versuchen führten wir auch noch Colony assays durch, um zu überprüfen, ob SIRT4-Überexpression die Zellen im Allgemeinen überlebensfähiger macht beziehungsweise deren malignes Potenzial erhöht. Dies konnten wir allerdings nicht bestätigen, tendenziell bildeten die Leerplasmid-Zellen sogar mehr Kolonien als die SIRT4-Zellen. Hierbei muss allerdings festgehalten werden, dass die Anzahl unserer Versuche mit Colony assays zu gering, der Unterschied zwischen SIRT4- und Leerplasmid-transfizierten Zellen generell zu klein und die An-

zahl unserer „Ausreißer“ – also der Proben, deren Kolonienzahl weit entfernt vom Mittelwert liegt - zu groß ist, um eine statistisch signifikante Aussage zu treffen. Abgesehen von der mangelnden statistischen Aussagekraft unserer Colony assays erscheint es aber durchaus plausibel, dass Zellen mit SIRT4-Überexpression kein erhöhtes malignes Potenzial aufweisen. Zum einen stellt die SIRT4-Überexpression (die in unseren Versuchen auf mRNA-Ebene 100.000-fach ist) für die Zelle ohnehin einen bedeutenden Energieaufwand dar, was sich durchaus in einer verringerten Fähigkeit zur Kolonienbildung, die für die Zelle ja ebenfalls einen erheblichen Kraftaufwand darstellt, äußern könnte. Zum anderen darf man nicht vergessen, welche Rolle bisherigen Forschungsergebnissen zufolge SIRT4 in der Tumorbilogie spielt. In zahlreichen Studien wurde bereits die Rolle des SIRT4 als Tumorsuppressorgen nachgewiesen (33, 40, 48, 52). Das maligne Potenzial einer Zelle wird durch SIRT4-Überexpression also im Allgemeinen nicht erhöht sondern abgesenkt. Autoren, die SIRT4 als zukünftigen prognostischen Marker für Tumoren sehen, kommen aufgrund Ihrer Untersuchungen an verschiedenen Krebsentitäten zu dem Schluss, dass ein niedriger SIRT4-Gehalt des Tumors prognostisch schlecht ist (41, 49–52), was den Überlegungen dieser Forschungsarbeit ja prinzipiell zuwiderläuft. Die Überlegungen, dass SIRT4-Überexpression Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika resistenter machen kann, wie dies an HepG2- und MEF-Zellen bereits nachgewiesen werden konnte (53) und wie auch wir in unseren Apoptoseuntersuchungen zeigen konnten, beruht auf der Überlegung, dass SIRT4, als regulatorisches Protein im Zellzyklus und über seine Funktion in der DNA-damage-response (DDR), einer Tumorzelle von Nutzen sein kann, nachdem die maligne Entartung bereits stattgefunden hat (24, 25, 54). Diese ambivalente Natur des SIRT4 zeigte sich auch in unseren Versuchen: Eine SIRT4-Überexpression schützt A549/PAR-Zellen offenbar wirklich vor DNA-Schäden durch Cisplatin, es erhöht aber nicht generell deren malignes Potenzial, was aus den Colony assays deutlich wird.

Auch wenn unsere Ergebnisse erkennbar darauf hinweisen, dass eine SIRT4-Überexpression NSCLC-Zellen tatsächlich resistenter gegen Cisplatin macht, muss auf die Limitierungen dieser Arbeit hingewiesen werden. Da es sich hierbei um Grundlagenforschung handelt, ist die direkte Übertragung auf den klinischen Tumor schwierig. Zum einen handelt es sich bei A549/PAR um eigens für Forschungszwecke gezüchtete Tumorzellen, deren Ursprungsgewebe zwar ein nicht-

kleinzelliger Lungenkrebs ist, deren tatsächliche Vergleichbarkeit mit den Tumorzellen, die in einer Patientin oder einem Patienten entstehen, aber nicht genau bekannt ist. Darüber hinaus ist auch nicht genau abschätzbar, wie sehr das Arbeiten in Zellkultur (Trypsinieren, Wegfrieren, Auftauen u.a.) das Genom der Zellen weiter verändert. Nicht zuletzt fanden unsere Versuche in Zellkultur naturgemäß in 6-Well-Platten aus Plastik statt und nicht in der Lunge eines lebenden Menschen. Es sind dies allgemeine Limitierungen der Grundlagenforschung, die nicht nur diese Arbeit, sondern die Grundlagenforschung insgesamt betreffen, hier aber trotzdem erwähnt werden sollen.

Speziell hingewiesen werden muss allerdings auf die von uns verwendeten Cisplatin-Konzentrationen. Die tatsächlichen Serum-Cisplatin-Konzentrationen, die nach halbstündiger Infusion von Cisplatin in therapeutischen Dosen erreicht werden, betragen unmittelbar nach Beenden der Infusion maximal 1700 µg/l, das entspricht einer 5,67 µM Lösung. Bereits eine Stunde nach Beenden der Infusion sinken die Serum-Cisplatin-Werte auf 600 bis 1100 µg/l (2 bis 3,67 µM) ab. Sechs Stunden nach Beenden der Infusion ist Cisplatin aus dem Serum nahezu vollständig eliminiert (56). Unterschiede bezüglich Apoptose konnten wir erst ab einem Cisplatin-Gehalt des Zellmediums von 11,6 µmol/l nachweisen, dieser Wert ist in etwa doppelt so hoch, wie die maximalen Serumwerte von PatientInnen. Darüber hinaus wurde die Konzentration von 11,6 µmol/l über 24 beziehungsweise 48 Stunden nahezu konstant gehalten, während sich in der therapeutischen Verabreichung die Serumwerte nach einer Stunde in etwa halbieren und nach sechs Stunden gegen Null gehen.

Die Aussagekraft dieser Arbeit wird auch durch die relativ kurze Laborzeit von dreieinhalb Monaten limitiert. In dieser Zeit musste das Erlernen der gesamten Labormethodik stattfinden sowie alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche durchgeführt werden, wodurch die Versuchsanzahl sehr beschränkt wurde. Naturgemäß kann diese Arbeit deshalb nur ein Fingerzeig in eine Richtung und keine umfassende Behandlung dieses komplexen Forschungsgegenstandes sein.

Abschließend halten wir fest, dass unsere Ergebnisse darauf hinweisen, dass eine SIRT4-Überexpression NSCLC-Zellen tatsächlich resistenter gegenüber Cisplatin-Behandlung macht. Colony assays zeigen jedoch, dass das maligne Potenzial der Tumorzellen dabei nicht erhöht wird. Der Konnex zum klinisch manifesten Lungenkrebs ist aufgrund der hohen notwendigen Cisplatin-Konzentrationen und dem

für die Tumorzellen letztendlich unphysiologischen Bedingungen in Zellkultur schwierig. Welche Rolle SIRT4 in der klinischen Onkologie spielen kann oder wird, ist im Hinblick auf seine scheinbar protektive Funktion in Tumorzellen einerseits und seine Funktion als Tumorsuppressor andererseits, noch schwer einzuschätzen und wird die Grundlagenforschung wohl noch eine Zeit lang beschäftigen.

## Literaturverzeichnis

1. Statistik Austria. Österreichisches Krebsregister; [Stand 02.10.2015]. Available from:  
URL:[http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/menschen\\_und\\_gesellschaft/gesundheit/krebserkrankungen/index.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/menschen_und_gesellschaft/gesundheit/krebserkrankungen/index.html).
2. Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C, et al., editors. Innere Medizin [E-Book]. 3. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2013. (Duale Reihe).
3. Jiang Y-W, Chen L-A. microRNAs as tumor inhibitors, oncogenes, biomarkers for drug efficacy and outcome predictors in lung cancer (review). *Molecular medicine reports* 2012; 5(4):890–4.
4. Karl Heinz Graefe, Werner Lutz, Heinz Bönisch. Pharmakologie und Toxikologie [E-Book]. 2. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016. (Duale Reihe).
5. Fennell DA, Summers Y, Cadranel J, Benepal T, Christoph DC, Lal R et al. Cisplatin in the modern era: The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Cancer treatment reviews* 2016; 44:42–50.
6. Rosell R, RV, Taron M, Reguart N. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2002; 38(3):217–27.
7. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation research* 2001; 478(1-2):23–43.
8. Cotterman R, Jin VX, Krig SR, Lemen JM, Wey A, Farnham PJ et al. N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor. *Cancer research* 2008; 68(23):9654–62.
9. Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2005; 41(16):2449–61.

10. Chen Y, McGee J, Chen X, Doman TN, Gong X, Zhang Y et al. Identification of druggable cancer driver genes amplified across TCGA datasets. *PloS one* 2014; 9(5):e98293.
11. Leonetti C, Biroccio A, Candiloro A, Citro G, Fornari C, Mottolese M et al. Increase of cisplatin sensitivity by c-myc antisense oligodeoxynucleotides in a human metastatic melanoma inherently resistant to cisplatin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1999; 5(9):2588–95.
12. Hildebrandt MAT, Gu J, Wu X. Pharmacogenomics of platinum-based chemotherapy in NSCLC. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2009; 5(7):745–55.
13. Chang A. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2011; 71(1):3–10.
14. Lu Y, Chen J, Xiao M, Li W, Miller DD. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharmaceutical research* 2012; 29(11):2943–71.
15. Seve P, Reiman T, Dumontet C. The role of betaIII tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2010; 67(2):136–43.
16. Wu X, Xiao H. miRNAs modulate the drug response of tumor cells. *Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences* 2009; 52(9):797–801.
17. Joshi P, Greco TM, Guise AJ, Luo Y, Yu F, Nesvizhskii AI et al. The functional interactome landscape of the human histone deacetylase family. *Molecular systems biology* 2013; 9:672.
18. Gregoret IV, Lee Y-M, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of molecular biology* 2004; 338(1):17–31.
19. Carafa V, Nebbioso A, Altucci L. Sirtuins and disease: the road ahead. *Frontiers in pharmacology* 2012; 3:4.

20. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Molecular biology of the cell* 2005; 16(10):4623–35.
21. Parihar P, Solanki I, Mansuri ML, Parihar MS. Mitochondrial sirtuins: emerging roles in metabolic regulations, energy homeostasis and diseases. *Experimental gerontology* 2015; 61:130–41.
22. Sack MN, Finkel T. Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2012; 4(12).
23. Lohia R, Jain P, Jain M, Burma PK, Shrivastava A, Saran S. Dictyostelium discoideum Sir2D protein, an ortholog of human 1 SIRT1, modulates cell type specific gene expression and is involved in autophagy. *The International journal of developmental biology* 2016.
24. Saunders LR, Verdin E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene* 2007; 26(37):5489–504.
25. Temel M, Koc MN, Ulutas S, Gogebakan B. The expression levels of the sirtuins in patients with BCC. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2016; 37(5):6429–35.
26. Bartosch C, Monteiro-Reis S, Almeida-Rios D, Vieira R, Castro A, Moutinho M et al. Assessing sirtuin expression in endometrial carcinoma and non-neoplastic endometrium. *Oncotarget* 2016; 7(2):1144–54.
27. Pirinen E, Lo Sasso G, Auwerx J. Mitochondrial sirtuins and metabolic homeostasis. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 2012; 26(6):759–70.
28. Huang J-Y, Hirschey MD, Shimazu T, Ho L, Verdin E. Mitochondrial sirtuins. *Biochimica et biophysica acta* 2010; 1804(8):1645–51.
29. Kumar S, Lombard DB. Mitochondrial sirtuins and their relationships with metabolic disease and cancer. *Antioxidants & redox signaling* 2015; 22(12):1060–77.
30. Hirschey MD, Shimazu T, Jing E, Grueter CA, Collins AM, Aouizerat B et al. SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Molecular cell* 2011; 44(2):177–90.

31. Tanno M, Kuno A, Horio Y, Miura T. Emerging beneficial roles of sirtuins in heart failure. *Basic research in cardiology* 2012; 107(4):273.
32. Caton PW, Richardson SJ, Kieswich J, Bugliani M, Holland ML, Marchetti P et al. Sirtuin 3 regulates mouse pancreatic beta cell function and is suppressed in pancreatic islets isolated from human type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2013; 56(5):1068–77.
33. Osborne B, Bentley NL, Montgomery MK, Turner N. The role of mitochondrial sirtuins in health and disease. *Free radical biology & medicine* 2016.
34. Coleman MC, Olivier AK, Jacobus JA, Mapuskar KA, Mao G, Martin SM et al. Superoxide mediates acute liver injury in irradiated mice lacking sirtuin 3. *Antioxidants & redox signaling* 2014; 20(9):1423–35.
35. Jacobus JA, Duda CG, Coleman MC, Martin SM, Mapuskar K, Mao G et al. Low-dose radiation-induced enhancement of thymic lymphomagenesis in Lck-Bax mice is dependent on LET and gender. *Radiation research* 2013; 180(2):156–65.
36. Yu W, Denu RA, Krautkramer KA, Grindle KM, Yang DT, Asimakopoulos F et al. Loss of SIRT3 Provides Growth Advantage for B Cell Malignancies. *The Journal of biological chemistry* 2016; 291(7):3268–79.
37. Quan Y, Wang N, Chen Q, Xu J, Cheng W, Di M et al. SIRT3 inhibits prostate cancer by destabilizing oncoprotein c-MYC through regulation of the PI3K/Akt pathway. *Oncotarget* 2015; 6(28):26494–507.
38. Zhang Y-Y, Zhou L-M. Sirt3 inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through reducing Mdm2-mediated p53 degradation. *Biochemical and biophysical research communications* 2012; 423(1):26–31.
39. Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V et al. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282(46):33583–92.
40. Jeong SM, Xiao C, Finley LW, Lahusen T, Souza AL, Pierce K 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):450–63.

41. Zhang J, Wang G, Mao Q, Li S, Xiong W, Lin Y et al. Glutamate dehydrogenase (GDH) regulates bioenergetics and redox homeostasis in human glioma. *Oncotarget* 2016.
42. Florian Horn. *Biochemie des Menschen*. Stuttgart: Thieme; 2012.
43. Klinke R, editor. *Physiologie*. Stuttgart: Thieme; 2010.
44. Herold G, editor. *Innere Medizin: Herold, Gerd (Verlag)*; 2015.
45. Wang L, Zhou H, Wang Y, Cui G, Di L-J. CtBP maintains cancer cell growth and metabolic homeostasis via regulating SIRT4. *Cell death & disease* 2015; 6:e1620.
46. Kung H-N, Marks JR, Chi J-T. Glutamine synthetase is a genetic determinant of cell type-specific glutamine independence in breast epithelia. *PLoS genetics* 2011; 7(8):e1002229.
47. Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV et al. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer research* 2010; 70(22):8981–7.
48. Csibi A, Fendt S-M, Li C, Poulogiannis G, Choo AY, Chapski DJ et al. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell* 2013; 153(4):840–54.
49. Igci M, Kalender ME, Borazan E, Bozgeyik I, Bayraktar R, Bozgeyik E et al. High-throughput screening of Sirtuin family of genes in breast cancer. *Gene* 2016; 586(1):123–8.
50. Huang G, Cui F, Yu F, Lu H, Zhang M, Tang H et al. Sirtuin-4 (SIRT4) is downregulated and associated with some clinicopathological features in gastric adenocarcinoma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2015; 72:135–9.
51. Miyo M, Yamamoto H, Konno M, Colvin H, Nishida N, Koseki J et al. Tumour-suppressive function of SIRT4 in human colorectal cancer. *British journal of cancer* 2015; 113(3):492–9.

52. Jeong SM, Lee A, Lee J, Haigis MC. SIRT4 protein suppresses tumor formation in genetic models of Myc-induced B cell lymphoma. *The Journal of biological chemistry* 2014; 289(7):4135–44.
53. Jeong SM, Hwang S, Seong RH. SIRT4 regulates cancer cell survival and growth after stress. *Biochemical and biophysical research communications* 2016; 470(2):251–6.
54. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature reviews. Drug discovery* 2013; 12(12):931–47.
55. Pubmed. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).
56. Urien S, Lokiec F. Population pharmacokinetics of total and unbound plasma cisplatin in adult patients. *British journal of clinical pharmacology* 2004; 57(6):756–63.