

Die Rolle des Sirtuins SIRT4 in mitochondrialer Funktion und Qualitätskontrolle, zellulärer Seneszenz und Alterung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alexander Lang

aus Krasnoarmejka

Düsseldorf, November 2017

aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Mohammad Reza Ahmadian

Korreferent: Prof. Dr. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 2018

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	3
2. Abbildungsverzeichnis	4
3. Zusammenfassung	5
4. Summary	7
5. Einleitung	9
5.1. Alterung und Seneszenz	9
5.2. Autophagie ist ein wichtiger Faktor der zellulären Qualitätskontrolle	11
5.3. MikroRNAs als Modulatoren der Genexpression	18
5.4. Funktion der Sirtuine in der zellulären Stressantwort	20
5.5. Zielsetzung	25
6. Manuskripte	38
6.1. MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4	38
6.2. SIRT4 interacts with OPA1 and regulates mitochondrial quality control and mitophagy	78
6.3. Analyse des SIRT4-Proteininteraktoms in mitotischen HEK293-Zellen	107
6.4. Intramitochondriale Prozessierung von SIRT4 am C-Terminus	121
7. Abschlussdiskussion	131
8. Abkürzungsverzeichnis	142
9. Lebenslauf	146
10. Danksagung	148
11. Eidesstattliche Erklärung	150

2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Funktioneller Ablauf der speziellen mitochondrialen Autophagie (Mitophagie).	14
Abb. 2: Mitochondrien-Aggregation in humanen dermalen Fibroblasten vor und nach stressinduzierter Seneszenz.	16
Abb. 3: Regulation des mitochondrialen Netzwerks durch OPA1.	17
Abb. 4: Schematische Struktur der humanen Sirtuin-Familie.	21
Abb. 5: Darstellung des SIRT4-eGFP-Interaktoms mittels einer Silbernitratfärbung.	108
Abb. 6: Übersicht über das SIRT4-Interaktom und dessen mögliche Interaktionen in verschiedenen biologischen Prozessen.	109
Abb. 7: SIRT4 interagiert mit verschiedenen Proteinen, die an der Mitose, ATP-Synthese oder mitochondrialen Qualitätskontrolle beteiligt sind oder diese Prozesse regulieren.	110
Abb. 8: SIRT4-eGFP wird im Mitochondrium am C-Terminus gespalten.	122
Abb. 9: SIRT4-eGFP wird im Mitochondrium C-terminal prozessiert.	123
Abb. 10: Darstellung der vermuteten C-terminalen Schnittstelle von SIRT4 im 3D-Modell.	124
Abb. 11: Zusammenfassende Darstellung einer möglichen Rolle von SIRT4 und dessen Interaktoms in der Alterung.	136

3. Zusammenfassung

Das Sirtuin SIRT4 ist ein metabolischer, NAD⁺-abhängiger Regulator des mitochondrialen Energiemetabolismus, fungiert als Tumorsuppressor und ist involviert in die zelluläre Alterung. Diese Arbeit umfasst die Charakterisierung von SIRT4 als Modulator der Alterung in der mitochondrialen Qualitätskontrolle, der mitochondrialen Dysfunktion sowie der möglichen extramitochondrialen Kontrolle der Mikrotubulifunktion/-dynamik und mitotischen Zellteilung. Die seneszenz- und alterungsabhängige Zunahme der SIRT4-Expression wurde in verschiedenen Alterungsmodellen, im Besonderen in humanen dermalen Fibroblasten und lichtgealterter Haut gezeigt. Hierbei wurde die regulatorische MikroRNA miR-15b identifiziert, die die Expression von SIRT4 auf mRNA- und Proteinebene reguliert. Die Zunahme der SIRT4-Expression durch Inhibition von miR-15b zeigte eine Modulation des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP), aber auch eine Reduktion der mRNA-Mengen nukleär kodierter Proteine, die die mitochondriale Biogenese (TFAM), antioxidative Antwort (NRF1) und Atmungskettenfunktion (Cytochrom C) steuern. Des Weiteren konnte eine erhöhte mitochondriale Aggregation/Fusion, Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials und eine verstärkte Produktion von mitochondrialen *reactive oxygen species* (ROS) in Abhängigkeit der SIRT4-Zunahme gezeigt werden. Die Überexpression von SIRT4-eGFP förderte die Zunahme der langen, aktiven Form der GTPase *Optic Atrophy 1* (L-OPA1), die für die Fusion von Mitochondrien verantwortlich ist. Hierbei wurde eine (direkte oder indirekte) Interaktion von SIRT4-eGFP mit L-OPA1 beobachtet. Die Zunahme von L-OPA1 relativ zu *short* (S)-OPA1 verschob das Gleichgewicht von der mitochondrialen Trennung zur Fusion, so dass ein verstärktes mitochondriales Netzwerk entstand. Ein stabileres Netzwerk reduzierte zugleich die Funktion der Mitophagie, einem Prozess zur Qualitätssicherung der Mitochondrien. Schließlich zeichnete sich die SIRT4-Überexpression durch eine inhibierende Wirkung auf die mitochondriale Atmungskette aus mit einem reduzierten O₂-Verbrauch. Massenspektrometrische Analysen des SIRT4-Interaktoms zeigten, dass SIRT4 mit Proteinen der Atmungskette (Komplex I und Komplex V) interagiert. Eine Interaktion von SIRT4 mit bereits bekannten Bindungspartnern, wie der Glutamatdehydrogenase, validierten diese Analyse. Zudem konnten neue mögliche Funktionen von SIRT4 basierend auf dessen Interaktion mit Regulatoren der Proteinqualität (Chaperonen), der mitochondrialen tRNA-

Beladung/Aminosäureaktivierung (tRNA-Aminoacylierung), der mitochondrialen Organisation (OPA1), aber auch der Mikrotubulifunktion (α/β -Tubulin, γ -Tubulin, GCP2, HDAC6) und Zellzyklusregulation (CDK1) bestätigt bzw. neu gefunden werden.

Schließlich konnten Befunde bzgl. einer neuartigen C-terminalen Prozessierung von mitochondrialem SIRT4 erhoben werden, deren physiologische Bedeutung im Gegensatz zur N-terminalen Prozessierung (mitochondrialer Import) derzeit unklar ist.

Insgesamt kann in dieser Arbeit die Funktion von stressinduziertem SIRT4 als alterungsfördernd beschrieben werden, indem SIRT4 mitochondriale Dysfunktionen (ROS, Senkung des mitochondrialen Membranpotentials, erniedrigte mitochondriale Qualitätskontrolle) bewirkt und möglicherweise auch extramitochondriale Veränderungen (Zellzyklusderegulation, Malmitose) nach sich zieht.

4. Summary

The Sirtuin SIRT4 is a NAD^+ -dependent regulator of cellular energy metabolism in mitochondria. SIRT4 acts as a metabolic tumor suppressor and is associated with cellular senescence and aging. This work focused on the characterization of SIRT4 as a modulator of aging in mitochondrial quality control and mitochondrial dysfunction as well in microtubule function and mitotic cell division, the latter consistent with a potential extra-mitochondrial function of SIRT4. The stress-dependent increase in SIRT4 expression was demonstrated in various aging models, especially in human dermal fibroblasts and photo-aged skin. At the same time, the regulatory microRNA miR-15b was identified as an inhibitor of SIRT4 expression at the mRNA and protein level. The increase in SIRT4 expression by inhibition of miR-15b resulted not only in a modulation of the senescence-associated secretory phenotype (SASP), but caused also a reduction in the mRNA levels of nuclear-encoded mitochondrial regulators involved in mitochondrial biogenesis (TFAM), anti-oxidative response (NRF1), and mitochondrial respiratory chain function (cytochrome C). Furthermore, increased mitochondrial aggregation/fusion, reduction of the mitochondrial membrane potential, and increased production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) were demonstrated as a consequence of SIRT4 increase. Stable overexpression of SIRT4-eGFP at a low level in HEK293 cells promoted stabilization of the long, active form of the GTPase optic atrophy protein 1 (L-OPA1), which is a major regulator of mitochondrial fusion. This stabilization of L-OPA1 could be explained by an (direct or indirect) interaction between SIRT4 and OPA1. The relative increase of L-OPA1 *vs.* the short isoform S-OPA1 shifted the equilibrium from mitochondrial separation to fusion, resulting in an enhanced mitochondrial network. A more stable network also reduced clearance by mitophagy, a constant quality control process for damaged mitochondria. SIRT4 overexpression could also be characterized by an inhibitory effect on the mitochondrial respiratory chain as measured by a reduced O_2 consumption. Mass spectrometric analyses of the SIRT4 interactome indicated that SIRT4 interacts with several proteins of the respiratory chain (complex I and complex V). The interaction with previously known interactors, such as glutamate dehydrogenase, validated this analysis. In addition, novel putative functions of SIRT4 were revealed given that SIRT4 interacted with regulators of protein quality (chaperones), mitochondrial tRNA ligases / amino acid activation (tRNA-

aminoacylation), mitochondrial organization (OPA1), and possibly extra-mitochondrial functions through interaction with mitotic spindle associated proteins (γ -tubulin, α -tubulin, GCP2, HDAC6) and the cell cycle regulator CDK1 (cyclin-dependent kinase 1).

Finally, findings were obtained in favour for a novel C-terminal processing of SIRT4 in mitochondria, of which the physiological significance, in contrast to the N-terminal processing (mitochondrial import), remains to be determined.

Overall, the function of stress-induced SIRT4 can be characterized as aging promoting by causing mitochondrial dysfunction (ROS increase, inhibition of the mitochondrial membrane potential, altered mitochondrial quality control and mitophagy) and also potentially leading to extra-mitochondrial changes in proliferation (cell cycle deregulation, malmitosis).

5. Einleitung

5.1. Alterung und Seneszenz

Die Alterung ist gegenwärtig eines der aktivsten Forschungsgebiete, und es wird immer deutlicher, dass das Verständnis der zellulären Signalwege des Alterns für die Vorbeugung und Therapie altersbedingter Krankheiten wie z.B. Osteoporose, Gicht oder auch Demenz unverzichtbar ist. Eine einfache Definition von Alterung ist der Verlust von Stabilität und Erneuerungsfähigkeit von Geweben. Gealterte Zellen bezeichnet man als seneszent. Merkmale seneszenter Zellen sind unter anderem eine verringerte Proliferationsfähigkeit, eine veränderte Interaktion mit der direkten Umgebung durch Modulation sekretierter Proteine, sowie eine Abnahme der Proteinqualität. Eine aktuelle Studie im Mausmodell zeigt, dass die Depletion seneszenter Zellen im gealterten Organismus die gesunde Lebenszeit deutlich verlängern kann [2].

Alterung beinhaltet in der Gesamtheit verschiedene charakteristische Phänotypen. Die umfassendste Einteilung dieser Phänotypen basiert auf neun biologisch messbaren und beschreibbaren Kennzeichen (*hallmarks*) [3]:

1. Reduktion der Stammzell-Erneuerung
2. Zelluläre Seneszenz
3. Genomische Instabilität
4. Abnahme der Telomerlänge
5. Epigenetische Veränderungen, wie Histonmodifikationen, DNA-Methylierung und daraus resultierende transkriptionelle Veränderungen
6. Reduktion der Proteinqualität durch ineffizienten proteasomalen Abbau
7. Deregulation der Antwort auf Signalstoffe und Hormone, insbesondere Insulin
8. Mitochondriale Dysfunktion
9. Veränderte intrazelluläre Signaltransduktion.

Ein weiteres wichtiges Kennzeichen ist die Interaktion seneszenten Zellen mit der zellulären Umgebung. Einer der messbaren Faktoren hierbei ist der SASP (Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp), der sich durch die veränderte Sekretion von Proteinen wie Proteasen, Zytokinen und löslichen Rezeptoren auszeichnet und dadurch eine modulierende parakrine und endokrine Wirkung auf die Umgebung zeigt. Durch seneszente Zellen wird die Homöostase der Gewebe dementsprechend stark verändert [4–6].

Die Charakterisierung der verschiedenen Kennzeichen der Alterung zeigt, dass diese oft miteinander wechselwirken und zusammenhängend betrachtet werden müssen. Zum einen gibt es Beobachtungen, die darauf hindeuten, dass die fehlende Aktivität des Telomerase-Proteins *telomerase reverse transcriptase* (TERT) zuerst die mitochondriale Dysfunktion auslöst, und erst darauffolgend Effekte wie DNA-Schäden und Induktion von Alterungsphänotypen auftreten [7]. Als weiteres Beispiel induziert der Zellzyklusregulator p21 durch seine Wirkung als Inhibitor der *cyclin-dependent-kinase 2* (CDK2) zelluläre Seneszenz. Parallel dazu nimmt die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) in Mitochondrien stark zu. Die erhöhte ROS-Produktion führt unter anderem zur akkumulativen Schädigung des Genoms und fördert so eine stärkere Seneszenz der Zelle [8]. Eine Reduktion der Mitochondrienmasse reduziert die Ausprägung der Seneszenz und könnte so die Alterung verzögern [9]. Doch neben der Mitochondrienmasse ist auch die Stabilität des mitochondrialen Genoms von entscheidender Bedeutung. Die fehlende Qualitätssicherung des mitochondrialen Genoms führt zu einer stärkeren Akkumulation von seneszenten Zellen *in vivo* und *in vitro* [10]. Es wäre daher eine plausible Annahme, dass die Modulation eines Kennzeichens der Alterung auf weitere Kennzeichen wirkt und so die Vitalität des gesamten Organismus positiv oder negativ verstärkt werden kann. Dabei spielen Mechanismen der Qualitätskontrolle in der Zelle eine besondere Rolle. Diese sollten daher vertieft untersucht werden, um die Mechanismen der Alterung verstehen zu können.

5.2. Autophagie ist ein wichtiger Faktor der zellulären Qualitätskontrolle

Die Autophagie ist ein zellulärer Prozess, der die Funktionalität und Qualität von langlebigen Proteinen und Organellen sicherstellt. Mittels Autophagie, also „Selbstverdauung“ (von lateinisch: *auto*- selbst und griechisch: *phagein*- verdauen), werden defekte Organellen, Proteine und andere Zellbestandteile abgebaut und die Bausteine wiederverwertet. Dieser in der Evolution hoch konservierte Prozess wurde bereits im Jahr 1967 erstmalig beschrieben [11]. In den folgenden Jahren wurde die Autophagie sowohl in der Hefe als auch in mehrzelligen Organismen detailliert erforscht. Heute wird die Autophagie in drei Arten unterteilt: Makroautophagie (oft nur als Autophagie betitelt), Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie [12, 13]. Die grundlegenden Funktionen sind bei allen drei Arten der Autophagie sehr ähnlich: Es gibt stets erste initiiierende Schritte, die in einer spezifischen Abfolge zur Formation eines Doppelmembranvesikels führen, welches sich um die zu degradierende „Fracht“ bildet. Dieses Vesikel wird als Autophagosom bezeichnet. Eine Schlüsselrolle bei der Bildung des Autophagosoms nehmen die Autophagie-verwandten Gene (*autophagy-related genes*, *ATGs*) ein, die zum einem die Initiation der Bildung des Autophagosoms hervorrufen (ATG13, ATG1, ATG14L) und zum anderen die Reifung und Beladung einer Autophagophore (ATG8 [LC3], ATG12) ermöglichen. Anschließend fusioniert dieses Autophagosom mit einem Lysosom zu einem Autolysosom, was zum Abbau des Inhalts führt (Abb. 1). Dieser Prozess wird im Allgemeinen als zelluläres Recycling verstanden [14]. Während die Makroautophagie ganze Organellen und größere Proteine degradiert, können kleine Moleküle direkt mithilfe der Mikroautophagie durch Membraneinstülpungen segregiert und verdaut werden. Auch kann hierbei der Abbau ohne den Transport in einem Phagosom stattfinden. Hierzu können Chaperone falsch gefaltene Proteine anhand einer spezifischen Aminosäuresequenz erkennen, binden und so direkt zum Lysosom transportieren [15, 16].

Durch die Autophagie können mehrere Kennzeichen der Alterung, wie die Reduktion der Proteinqualität oder die mitochondriale Dysfunktion, reduziert werden, da sowohl geschädigte Proteine als auch größere Organellen wie Mitochondrien selektiv abgebaut werden können [17].

Daher ist es nicht überraschend, dass eine Reduktion der Autophagie in seneszenten/gealterten Zellen und Organismen zu beobachten ist [18–21].

5.2.1. Mitochondrien als Ziel der selektiven Autophagie (Mitophagie)

Mitochondrien sind semiautonome Organellen der eukaryotischen Zelle und sind laut der Endosymbionten-Theorie durch evolutionären Druck aus prokaryotischen Einzellern durch Aufnahme in andere Einzeller und stabile Koexistenz entstanden [22]. Mit der stabilen Vermehrung und Erhaltung durch den Wirt ist die Funktion der Mitochondrien von diesem stark abhängig. Heute besitzen diese nur 37 eigene Gene. Von diesen kodieren 13 für Proteine, die vor allem Bestandteile der Atmungskette sind. Die übrigen 24 Gene kodieren für tRNAs und rRNAs. Diese Reduktion des mitochondrialen Genoms wird durch die Kodierung der übrigen mitochondrialen Proteine im nukleären Genom des Wirts ermöglicht [23]. Dabei ist der Transport der mitochondrialen Proteine durch Signalpeptide an den Proteinen selbst und gezielte Transporter in den beiden Membranen der Mitochondrien und der mitochondrialen Matrix stark reguliert [24, 25].

Eine der Hauptfunktionen der Mitochondrien ist die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) mithilfe der Atmungskette. Hierbei wird die Energiegewinnung aus den Produkten des Zitratzyklus (NADH/H^+ , FADH_2) genutzt, um einen Protonengradienten im Intermembranraum der Mitochondrien aufzubauen. Der Rückfluss der Protonen durch den Komplex V der Atmungskette treibt die Synthese von ATP an. Gleichzeitig ist der Protonengradient ein wichtiger Faktor zur Qualitätsmessung des Mitochondriums. Ein Verlust dieses Gradienten führt zur Depolarisation des Mitochondriums und ist in der Lage, eine Signalkaskade auszulösen, die den Abbau des Mitochondriums fördert [26]. Relevant für die Alterung ist die Produktion von ROS, die vor allem durch die Aktivität der Komplexe I und III entstehen und die mit der Zeit zu einer Ansammlung von Schäden in der Zelle, aber auch in der mitochondrialen DNA, führen können [27]. Es ist also wichtig, diese alterungsrelevanten Mechanismen, mit denen die Zelle diese Zweischneidigkeit der Atmungskette und deren Folgen reguliert, zu untersuchen [27, 28].

Mitochondriale Dysfunktion ist ein essentieller Teil der Alterung. Dies eröffnet die Frage, wie ein Organell kontrolliert werden kann, welches durch eine seiner Hauptfunktionen, die Energiegewinnung in der Atmungskette, sehr viele Schäden und schädliche Metabolite, wie ROS, erzeugt [20]. Ein System zur Qualitätssicherung der Mitochondrien ist die Mitophagie, eine spezifische und selektive Form der Autophagie. Dieser Prozess wurde bereits 2001 vorausgesagt [29] und 2005 erstmalig als Mitophagie beschrieben [30]. Derzeit sind zwei Signalwege bekannt, welche die spezifische Mitophagie regulieren.

5.2.2. Mitophagie-induzierende Signalwege

Der erste gut verstandene Signalweg der Mitophagie ist der PINK/Parkin-Signalweg, welcher durch mitochondriale Depolarisation aktiviert wird [26]. Im stressfreien Zustand eines Mitochondriums wird die Serin-/Threonin-Kinase PINK1 nach der Translation in das Mitochondrium transportiert und dort durch Enzyme, wie PARL, gespalten und inaktiviert [31]. Die Spaltprodukte werden wieder ins Zytoplasma hinaus transportiert und vermutlich durch das 26S-Proteasom degradiert [32, 33]. Wird ein Mitochondrium geschädigt und der Protonengradient dereguliert, so kann der PINK1-Transport in das Mitochondrium nicht aufrechterhalten werden, und PINK1 wird somit nicht inaktiviert. Dies führt zur Autophosphorylierung, Dimerisierung und Lokalisierung von PINK1 an der äußeren Membran dieses Mitochondriums [34, 35]. Diese Selbstaktivierung führt zu einer Interaktion mit der E3-Ubiquitin-Ligase Parkin. PINK1 kann Parkin phosphorylieren und somit aktivieren, so dass mehrere mitochondriale Proteine durch Parkin ubiquitiniert werden [36, 37]. Es folgt die Segregation des einzelnen defekten Mitochondriums aus dem mitochondrialen Netzwerk und daraufhin die Interaktion mit Proteinen, welche die Ubiquitinierung erkennen und die Aufnahme des Mitochondriums in ein Autophagosom fördern [36]. Mittels Mitophagie wird das geschädigte Mitochondrium im Autolysosom letztlich abgebaut [38].

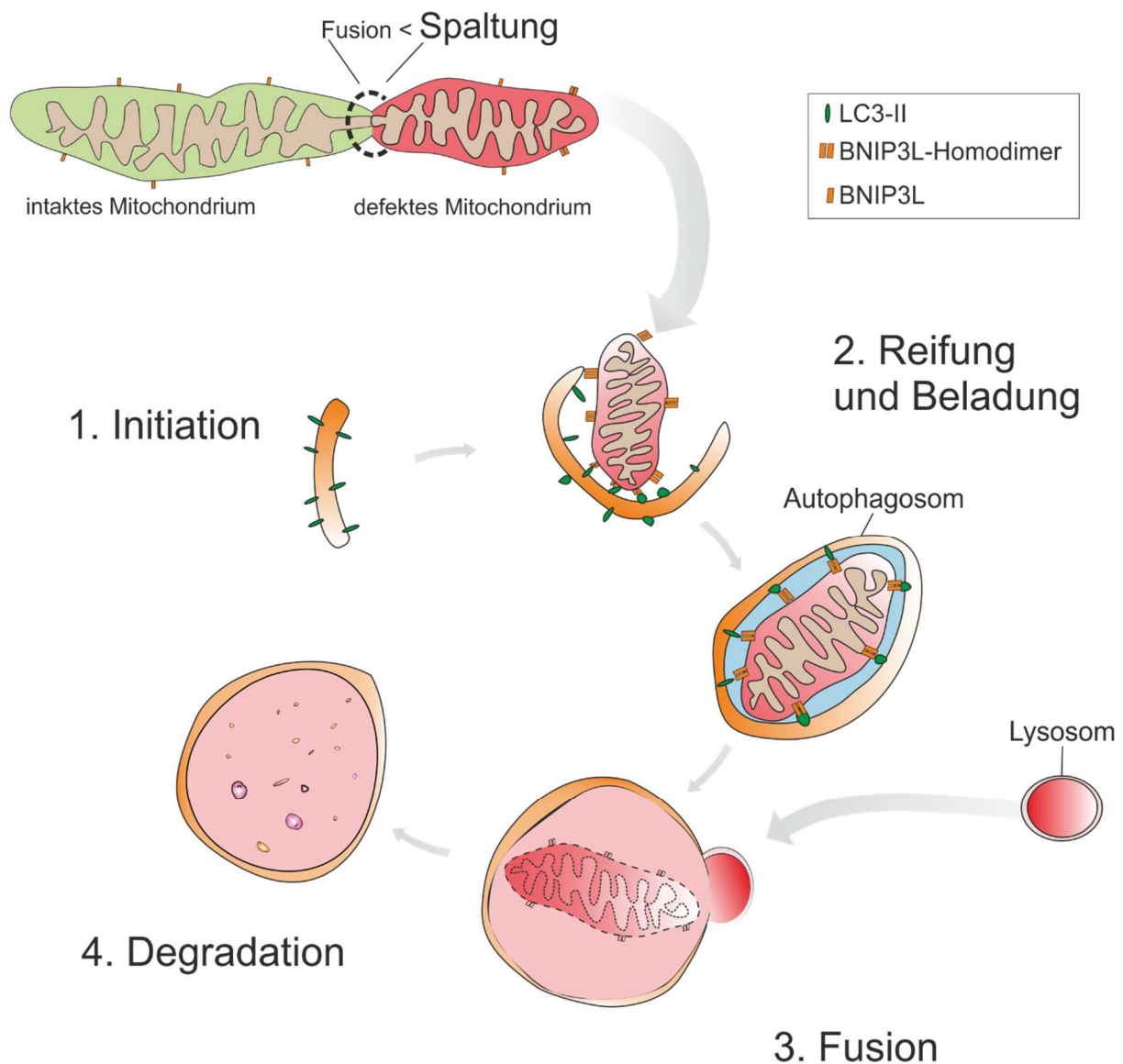


Abb. 1: Funktioneller Ablauf der speziellen mitochondrialen Autophagie (Mitophagie).

Die Zahl beschädigter Mitochondrien kann durch Abtrennung dieser aus dem mitochondrialen Netzwerk reduziert werden. Abgetrennte Mitochondrien werden durch die Mitophagie recycelt und als Aminosäuren, Nukleotide und Lipide ins System zurückgeführt. Der Ablauf der Autophagie kann dabei in verschiedene Phasen unterteilt werden. Zuerst bildet sich die Phagophore, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht, die aus verschiedenen Komponenten, wie dem lipidierten Protein LC3-II, geformt wird. Die Interaktion zwischen den Proteinen in der Phagophore und den Proteinen und Organellen, die abgebaut werden sollen, ist notwendig, um das Ummanteln dieser im Autophagosom zu ermöglichen. Oft interagieren die Proteine mit ihrer LIR-Domäne (hier BNIP3L) mit dem lipidierten LC3-II, welches in der Phagophore verankert ist. Dieser Schritt wird als Reifung der Phagophore bezeichnet. Im nächsten Schritt fusioniert das Autophagosom mit einem Lysosom und bildet somit ein Autolysosom. Darauf folgt die Degradation des Inhalts. Modifiziert nach Choi *et al.*, 2013 [1].

Der zweite Signalweg der Mitophagie wird als Rezeptor-vermittelte Mitophagie beschrieben. Bei dieser gibt es mehrere Proteine, welche selektiv defekte Mitochondrien für die Mitophagie

markieren, mit Autophagosomen interagieren und so die Einkapselung fördern [39]. Die Proteine *Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3* (BNIP3), *BNIP3-like* (BNIP3L) und *FUN14 domain-containing 1* (FUDNC1) sind die drei am besten untersuchten Regulatoren dieser Art der Mitophagie. Sie werden an der äußeren mitochondrialen Matrix exprimiert. Eine Gemeinsamkeit dieser Proteine ist die *LC3-interacting region* (LIR)-Domäne, welche für die selektive Beladung von Mitochondrien in die Autophagosomen verantwortlich ist. Unter Stresseinwirkung werden diese Rezeptoren modifiziert und aktiviert. Ein Beispiel hierfür stellt die Erythropoese dar, in deren Verlauf Erythrozyten ohne Mitochondrien entstehen. Hierbei ist BNIP3L von entscheidender Bedeutung: Wenn ein Mitochondrium entsorgt werden soll, wird BNIP3L aktiviert und homodimerisiert (Abb. 1). Dadurch kann die LIR-Domäne effektiver LC3 binden. Da dieses Protein direkt an dem Aufbau und der Stabilität, aber auch der selektiven Beladung des Autophagosoms beteiligt ist, kann das Mitochondrium umschlossen und wenig später abgebaut werden [40].

5.2.3. Mitochondrien in der Alterung

Mitochondriale Qualitätskontrolle in Form von gezielter Autophagie ist ein essentieller Faktor, um negative Effekte auf die Zelle durch geschädigte oder deregulierte Mitochondrien zu begrenzen [41–43]. Dementsprechend ist die Autophagie in der Seneszenz und Alterung reduziert [19, 44, 45]. Dies führt dazu, dass die Qualität der Mitochondrien in der Summe sinkt. Beispiele hierfür sind die reduzierte Aktivität der Atmungskette und die zunehmende Aggregation des mitochondrialen Netzwerks in der Haut von gealterten Menschen [46] (Abb. 2).

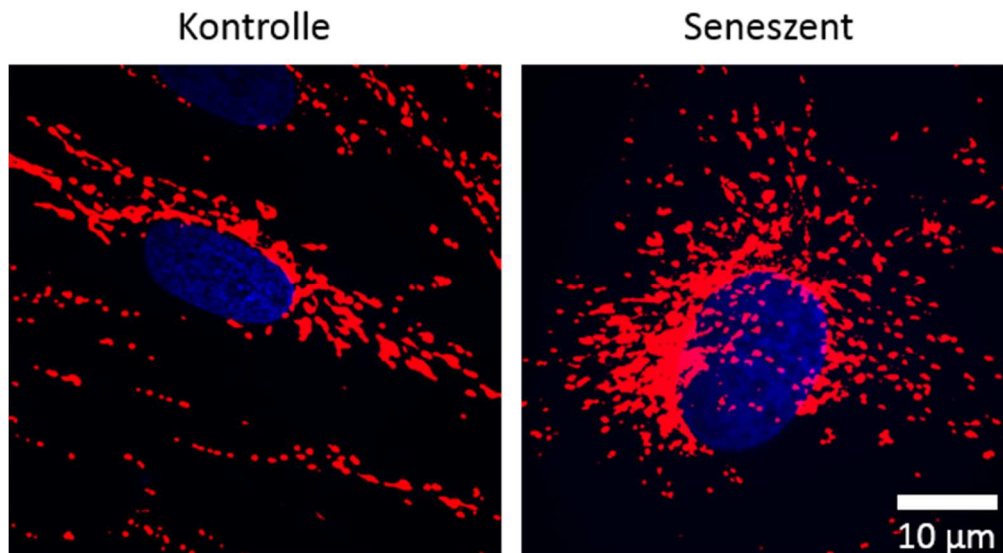


Abb. 2: Mitochondrien-Aggregation in humanen dermalen Fibroblasten vor und nach stressinduzierter Seneszenz.

Die mitochondriale Netzwerkstruktur in humanen dermalen Fibroblasten ist nach Induktion der Seneszenz stark aggregiert. Gezeigt sind Zellen vor und nach Induktion der Seneszenz mittels ionisierender Gammastrahlung (γ IR; 20 Gy). Nach vier Tagen wurden die Zellen fixiert und die Mitochondrien wurden mittels immunzytochemischer Färbung mit dem Antikörper MTC02 (Abcam, ab3298) in einer konfokal-mikroskopischen Aufnahme detektiert. Mithilfe des Programms ImageJ wurde ein binäres Bild generiert, um die Unterschiede zwischen den mitochondrialen Netzwerken hervorzuheben. Mitochondrien sind rot und Zellkerne blau [Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)] dargestellt.

Mitophagie wird vor allem durch die Dynamik des mitochondrialen Netzwerks reguliert: Segregierte Mitochondrien können effizienter durch die Mitophagie abgebaut werden als Mitochondrien in einem dichten Netzwerk [28]. Dafür ist es notwendig, dass geschädigte Mitochondrien nicht nur markiert, sondern auch vom mitochondrialen Netzwerk getrennt werden [47]. Das Gleichgewicht zwischen mitochondrialer Fusion und Spaltung wird vor allem durch die Aktivität einiger weniger Enzyme bestimmt, die zur Familie der monomeren Guanosintriphosphatasen (GTPasen) gehören [48]. Zur Abspaltung einzelner Mitochondrien wird das zytoplasmatische Protein *dynamin-1-like protein* (DRP1) benötigt. Für die Fusion der äußeren mitochondrialen Matrix sind die membrangebundenen Proteine Mitofusin 1 (MFN1) und Mitofusin 2 (MFN2) verantwortlich. Für die Fusion der inneren mitochondrialen Membran ist das in der inneren Membran befindliche Protein *optic atrophy protein 1* (OPA1) entscheidend. Die Regulation der Spaltungs- und Fusionsprozesse mündet in einem Tauziehen um ein Gleichgewicht, dass das mitochondriale Netzwerk moduliert.

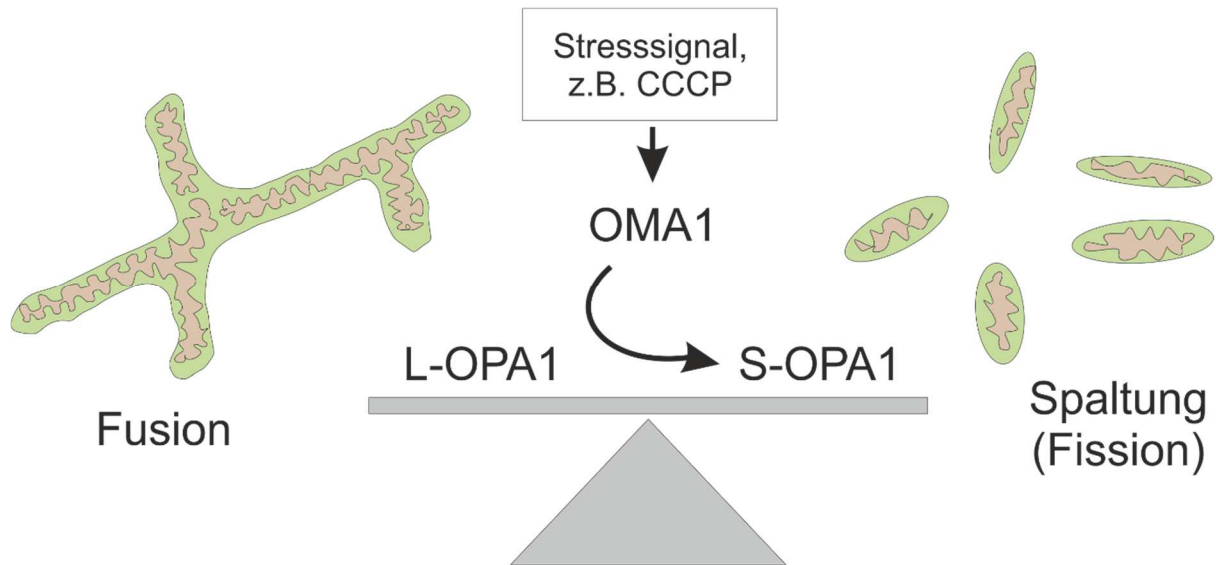


Abb. 3: Regulation des mitochondrialen Netzwerks durch OPA1.

Die Vernetzung des mitochondrialen Netzwerks wird unter anderem durch die Expression von mitochondrialen OPA1 reguliert. Die lange Form L-OPA1 fördert die Fusion der mitochondrialen inneren Membran und ermöglicht die Vernetzung von Mitochondrien. Wird die lange Form durch die Metalloprotease OMA1 geschnitten, so entsteht die kurze Form S-OPA1, welche die Fusion nicht reguliert. Durch das dynamische Verschieben des Gleichgewichts zugunsten einer der beiden OPA1-Formen kann das mitochondriale Netzwerk oder die mitochondriale Spaltung gestärkt werden. Modifiziert nach Wai und Langer 2016 [50].

Dabei kann eine leichte Verschiebung des Gleichgewichts drastische Effekte auslösen [49]. Die Regulation des Fusionsproteins OPA1 ist mit der Abspaltung seines Membranankers bildlich erklärbar: Das Protein ist in seiner vollen Länge aktiv, an der inneren Membran verankert und fördert so die Fusion der Mitochondrien. Wirken jedoch Stressoren auf das Mitochondrium, wie beispielsweise der Verlust des Membranpotentials, so wird die Metalloendopeptidase OMA1 aktiviert. Diese kann OPA1 an einer spezifischen Schnittstelle spalten und so von der inneren Membran trennen (Abb. 3). Es gibt somit zwei Formen des Proteins OPA1: Die aktive lange Form L-OPA1 und die inaktive kurze Form S-OPA1 [50, 51]. Die Stabilisierung des L-OPA1-Proteins an der inneren Membran führt zu einer starken Aggregation von Mitochondrien [52]. Nach Inhibition von OMA1 fusionieren die Mitochondrien verstärkt und bilden große, sehr stabile Netzwerke. Interessant ist hierbei, dass die Mitophagie in diesem System deutlich abnimmt [53]. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Regulation der mitochondrialen Morphologie einen wichtigen Bestandteil der Qualitätskontrolle darstellt.

5.3. MikroRNAs als Modulatoren der Genexpression

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Expression eines Gens zu regulieren. Die wichtigste ist die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder Repressorkomplexen an die jeweilige Promotorregion und somit die Regulation der Transkription. Die vollendete Transkription und das darauffolgende Spleißen führen zur reifen *messenger RNA* (mRNA), welche mithilfe der Ribosomen in Proteine translatiert wird. In den letzten Jahrzehnten wurde eine weitere Möglichkeit, die RNA-Interferenz, erforscht. Diese ermöglicht der Zelle posttranskriptionell die Proteinexpression zu regulieren und situationsabhängig schnell zu modulieren. Das System beruht auf endogenen mikroRNAs (miRNA). Die miRNAs sind eine große Familie nicht-kodierender RNAs mit einer Länge von 20-22 Nukleotiden, von denen zurzeit angenommen wird, dass sie die Expression von bis zu 50% der Proteine in Säugern modulieren können [54]. Die miRNAs binden in den meisten Fällen an das 3'-Ende der untranslatierten Region (UTR) und in seltenen Fällen an das 5'-Ende der UTR der mRNA, wodurch die effektive Translation inhibiert oder der Abbau der gesamten mRNA induziert wird [55].

Die miRNAs werden, ähnlich wie Proteine, durch Gene im Genom codiert [56]. Nach der Transkription der miRNA entsteht die pri-miRNA. Diese wird durch spezifische Proteine, wie *Ribonuclease 3* (DROSHA) und *Microprocessor complex subunit DGCR8* (DGCR8) durch Spaltung in eine dreidimensionale Struktur in Form einer Haarnadel umgewandelt. Diese miRNA-Form wird pre-miRNA genannt. Darauf folgt der Export der pre-miRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma durch Exportin-5/Ran-GTP. Im Zytoplasma wird diese durch die Enzyme Dicer und TRBP in die inaktive miRNA-Form umgewandelt, welche eine Duplex-Struktur besitzt. Die Aktivität einer RNA-spaltenden Helikase ermöglicht eine weitere Spaltung der miRNA, welche zu einer Aktivierung der miRNA führt. Mit Hilfe des *RNA induced silencing complex* (RISC) kann die miRNA an die mRNA der Zielgene anlagern und die Translation inhibieren. Die Übereinstimmung der Bindesequenz ist entscheidend dafür, ob nur die Translation inhibiert wird oder die gesamte mRNA abgebaut wird. Die meisten miRNAs können die Expression auch ohne eine 100%ige Sequenzkomplementarität effizient regulieren [57–63].

5.3.1. Die Rolle der miRNAs in Seneszenz und Alterung

MikroRNAs spielen in vielen Signalwegen der Zelle eine wichtige Rolle und sind hierbei an der Regulation von Alterung und Seneszenz maßgeblich beteiligt. Einige miRNAs können Seneszenz inhibieren oder verzögern. Die inhibitorische Wirkung von miRNAs auf die Expression der Zellzyklusregulatoren, wie beispielsweise p21 [64–66], p16 [67] oder p53 [68] zeigt deutlich, dass miRNAs Seneszenz effektiv verhindern können. Andererseits können miRNAs zelluläre Seneszenz auch induzieren. Hierbei wird die Translation von Proteinen inhibiert, welche die Proliferation und Stabilität des Genoms fördern. Ein Beispiel ist die miR-34a-vermittelte Reduktion der Expression von TERT, welches für die Telomer-Erhaltung zuständig ist [69]. Einige miRNAs sind auch an der Modulation der Lebenserwartung beteiligt: miR-14 in *Drosophila melanogaster* beispielsweise ist entscheidend für Seneszenzinduktion. Eine Mutation dieser miRNA reduziert die Alterung und verlängert die Lebenszeit der Fliege signifikant [70]. Ein Zusammenhang zwischen Mitochondrienfunktionalität und Alterung konnte ebenfalls in miRNA-Studien gefunden werden. In der Leber von Mäusen verschiedenen Alters wurde hierbei deutlich, dass die Expression der meisten miRNAs im Alter zunimmt. Dabei wurden z.B. verschieden Zielproteine herunterreguliert, die im Besonderen die mitochondrialen Funktionen erhalten sollen. Unter anderem war die Expression verschiedener Glutathion S-Transferasen (Gstz1, Gstm1, Gstt1) reduziert und somit eine mögliche Verbindung zu zunehmenden ROS-Mengen in geschädigten Mitochondrien beschrieben [71].

5.3.2. Rolle von miR-15b in der Alterung

Die MikroRNA miR-15b besitzt sowohl proliferative als auch antiproliferative Wirkungen, letztere über eine negative Regulation der Zellzyklusprogression. Eine hohe Expression von miR-15b beim Leberkarzinom korreliert mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit [72]. Ebenfalls erhöht sich die Metastasierungs- und Migrationsfähigkeit mit zunehmender miR-15b-Expression [73]. Auch in Lymphomen wird diese miRNA als transformierend und proliferativ beschrieben [74]. Im Gegensatz zu diesen Befunden reduziert die Überexpression von miR-15b in HepG2-Zellen die Proliferationsrate der Zellen und reguliert das Onkogen *B-cell leukemia/lymphoma 2* (BCL2) auf mRNA-Niveau herunter [75]. In Osteoblasten reduzierte

die Zunahme von miR-15b ebenfalls einen Anstieg der Proliferation [76]. Auch konnte die Überexpression von miR-15b in embryonalen Rattenzellen eine Reduktion der Proliferation durch Inhibition der ERK1-Expression auslösen [77]. Eine direktere negative Wirkung von miR-15b auf die Proliferation konnte durch die Inhibition der Translation des Proteins Cyclin D1 gezeigt werden [78, 79]. Die Expression der miR-15b ist in seneszenten humanen Hautfibroblasten stark reduziert [80] und im gleichen Zusammenhang wird dessen Target *mitogen-activated protein kinase kinase 4* (MKK4) hochreguliert [81]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere Funktion von miR-15b als Inhibitor der Expression des metabolischen Tumorsuppressors SIRT4 in der zellulären Seneszenz identifiziert [82]. Die Inhibition von miR-15b führte hierbei durch Herunterregulation von SIRT4 zu einer veränderten mitochondrialen Morphologie und verringerten mitochondrialen Funktion.

5.4. Funktion der Sirtuine in der zellulären Stressantwort

In Säugern werden sieben Sirtuine exprimiert, die eine starke Homologie zum einzigen Sirtuin der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), Sir2p, besitzen [83]. Sir2p fungiert unter Kalorienrestriktion als Histon-Deacetylase und verlängert dadurch die Lebensspanne der Hefezelle [84]. Die sieben Säuger-Sirtuine sind primär beschrieben als NAD⁺-abhängige Deacetylasen. Dennoch besitzen die meisten Isoformen auch verschiedene andere enzymatische Aktivitäten [85] (Abb. 4). Sirtuine sind aufgrund ihrer NAD⁺-Abhängigkeit wichtige Signalkomponenten, die wesentlich zur Reaktion der Zelle auf Stress und Energiedefizite beitragen [86]. Sie sind an verschiedenen intrazellulären Signalwegen und Prozessen der Zelle beteiligt und können unter anderem auch in Säugern die Lebensspanne regulieren [87].

5.4.1. Humane Sirtuine

Es werden primär nukleäre (SIRT1, SIRT6 und SIRT7), zytoplasmatische (SIRT2) und mitochondriale (SIRT3, SIRT4 und SIRT5) Sirtuine unterschieden [83]. Neben dem konservierten NAD⁺-bindenden Bereich besitzen humane Sirtuine unterschiedliche N- und C-

Termini, die wahrscheinlich für die subzelluläre Lokalisation und Substratspezifität verantwortlich sind [86]. Werden die N-Termini deletiert, so können mitochondriale Sirtuine nicht in Mitochondrien transportiert werden (Abb. 4). Im Falle von SIRT4 befindet sich das mitochondriale Translokationssignal (MTS) innerhalb der ersten 28 Aminosäuren (AS) [88]. Der stark homologe Bereich in der Mitte des Proteins konzentriert sich um ein hochkonserviertes Histidin. Dieses fungiert als Protonenakzeptor und ist für die enzymatische Aktivität unabdingbar [88].

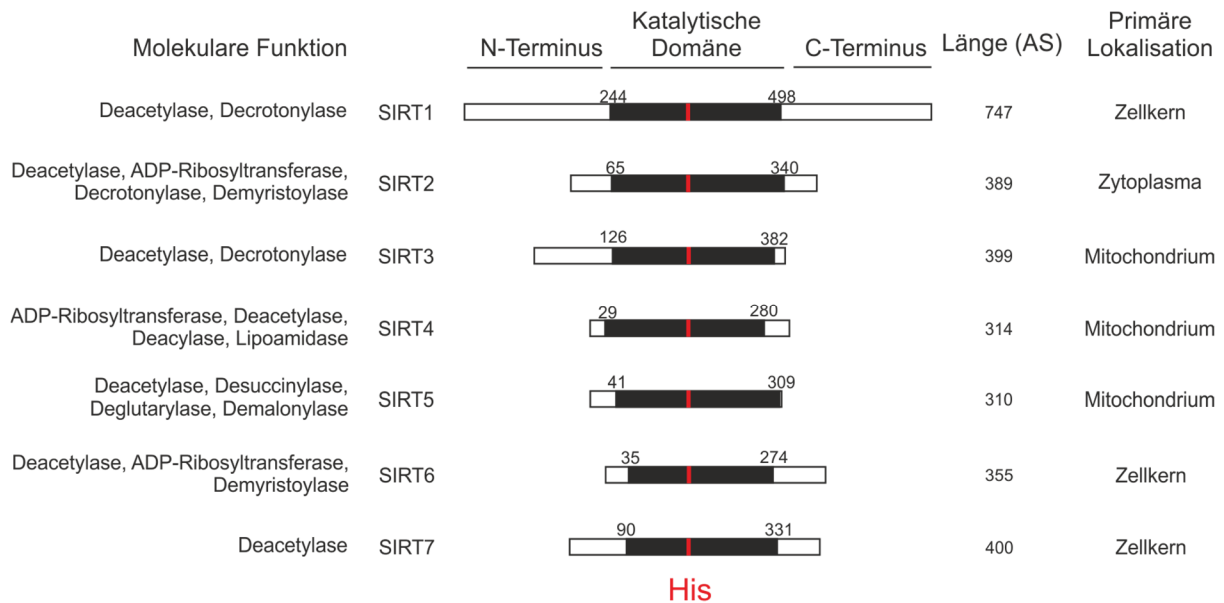


Abb. 4: Schematische Struktur der humanen Sirtuin-Familie.

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

Nukleäre Sirtuine interagieren am häufigsten mit expressionsmodulierenden Proteinen. Oft sind die Interaktoren Histone, die deacetyliert werden, wodurch die Expression spezifischer Gene reguliert wird. Das zytoplasmatische SIRT2 hat ein sehr breites Spektrum an Interaktoren und enzymatischen Aktivitäten. Mitochondriale Sirtuine sind Regulatoren von metabolischen Enzymkaskaden. Sie können Signalwege direkt modulieren und so, wie im Fall der Inaktivierung der Glutamatdehydrogenase (GDH) oder Pyruvatdehydrogenase (PDH), den Citratzyklus und die Energiegewinnung im Mitochondrium regulieren [89].

5.4.2. Nukleäre und zytoplasmatische Sirtuine

Eines der am besten untersuchten Sirtuine ist das nukleäre SIRT1. Es besitzt die höchste Homologie zum Sir2p der Hefe. SIRT1 inhibiert Apoptose [90], die Glukoneogenese [91] und die glukoseabhängige Insulinsekretion [92]. Eine weitere wichtige Eigenschaft von SIRT1 ist die Funktion in der DNA-Reparatur, wobei SIRT1 mithilfe der enzymatischen Deacetylaseaktivität die Reparatur von Doppelstrangbrüchen fördert [93, 94].

Das zytoplasmatische SIRT2 inhibiert die transkriptionelle Aktivität von *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) und hat so eine positive Wirkung auf die Lipidsynthese [95]. Es modifiziert aber auch zum großen Teil Proteine, welche die Energiehomöostase regulieren, wie das *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α) [96, 97]. Durch Deacetylierung kann es die Glukokinase regulieren [98]. Zudem hat SIRT2 eine Funktion in der Genomstabilität, indem es als Deacetylase von Cdk9 den Mitose-Arrest auflöst und die Mitose fortschreiten lässt [99]. Auch kann eine Inhibition der SIRT2 Deacetylaseaktivität die Stabilität von Mikrotubuli beeinflussen und so starken zellulären Stress auslösen [100].

Das nukleäre SIRT6 modifiziert Histon H3 durch Deacetylierung und moduliert dadurch unter anderem die Genexpression von HIF1 α . Daraus folgt eine erhöhte Glukoseaufnahme in SIRT6-defizienten Mäusen. Diese entwickeln sich zwar normal, doch sterben sie deutlich früher an einer Hypoglykämie und eignen sich somit auch als metabolisches Alterungsmodell [101]. Durch den Verlust von SIRT6 entsteht darüber hinaus eine hohe genomische Instabilität [102, 103].

Auch SIRT7 interagiert mit Histonen. Durch Deacetylierung von Histon H3 ermöglicht es eine effizientere DNA-Rekrutierung von 53BP1, einem wichtigen Regulator der DNA-Reparatur, und kann so die Reparatur von DNA-Schäden verstärken [104]. In der Summe ist zu beobachten, dass diese Enzyme die Genomstabilität und die metabolische Homöostase der Zelle auf verschiedenste Weise regulieren können und zudem in die Regulation der Alterung wesentlich involviert sind.

5.4.3. Die mitochondrialen Sirtuine SIRT3, SIRT4 und SIRT5

Mitochondriale Sirtuine sind besonders wichtig für die Substratmetabolisierung und Energiestatusregulation der Zelle. Hierbei besitzen SIRT3 und SIRT4 oft antagonistische Funktionen [105]. Dies betrifft z.B. die anaplerotischen Reaktionen des Zitratzyklus. Während SIRT3 die GDH, eines der zentralsten Proteine im mitochondrialen Stoffwechsel, welches L-Glutamat zu α -Ketoglutarat umwandelt, aktiviert [106], kann SIRT4 GDH inaktivieren [88]. Eine ähnliche Funktion haben SIRT3 und SIRT4 in der Regulation der Pyruvatdehydrogenase (PDH): SIRT3 deacetyliert die PDH-Untereinheit E1 α und aktiviert die Produktion von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) [107]. SIRT4 kann dagegen den Liponamid-Rest an der PDH-Untereinheit E2 (DLAT) hydrolysieren und so die PDH-Aktivität inhibieren [108]. Im Falle des Diabetes Typ 2 ist die SIRT3-Proteinmenge in Pankreasinseln reduziert [109] und eine entsprechende Überexpression kann wieder zu einer verstärkten Insulinsekretion führen [110]. Wohingegen die SIRT4-Inaktivierung zu einer erhöhten Insulinsekretion führen kann [111]. Des Weiteren reduziert SIRT3 die Bildung von ROS durch Deacetylierung und Aktivierung der antioxidativen Funktion der *superoxide dismutase 2* (SOD2) [112, 113] und anderer Komponenten der mitochondrialen Atmungskette [89, 114]. Im Gegensatz zu SIRT3 fördert die Überexpression von SIRT4 eine Zunahme der ROS-Produktion in Mitochondrien und reduziert deren Qualität, wie in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden konnte [82]. Es ist erwähnenswert, dass SIRT3 die wichtigste Deacetylase im Mitochondrium ist, und dass ein Knockout des *Sirt3*-Gens zu einer starken Zunahme von acetylierten, mitochondrial lokalisierten Proteinen führt [115].

SIRT5 wurde als Deacetylase, Demalonylase, Deglutarylase und Desuccinylase beschrieben [85, 116–118]. SIRT5 wird, wie auch SIRT3, durch die Aktivität von PGC-1 α transkriptionell reguliert und bei Energiemangel nimmt dessen Expression zu [119–121]. Durch die Regulation von SIRT3 und SIRT5 kann PGC-1 α so den Harnstoffzyklus in der Leber hochregulieren. SIRT5 deacetyliert und aktiviert hierbei die *carbamoyl phosphate synthetase 1* (CPS1), die im Harnstoff-Zyklus als Initiator agiert [122]. Ebenfalls kann SIRT5 *superoxide dismutase 1* (SOD1) binden und den Succinyl-Rest abbauen. Diese Modifizierung erhöht die SOD1-Aktivität, die die ROS-Produktion in der Zelle reduziert [123]. Zusammengefasst scheint, SIRT5, wie SIRT3, die Produktion von ROS zu inhibieren.

Verglichen mit den zahlreich beschriebenen Substraten von SIRT3 als Deacetylase sind von SIRT4 bisher nur wenige Interaktoren bekannt. SIRT4 ist zusammen mit GDH als Substrat eine ADP-Ribosyltransferase [88], während es mit dem PDH-Komplex eine Lipoamidase-Aktivität aufweist [108]. Ein weiteres Substrat von SIRT4 stellt die Malonyl-CoA-Decarboxylase (MCD) im Lipidstoffwechsel dar, welche durch SIRT4 deacetyliert wird, wodurch weniger Acetyl-CoA aus Malonyl-CoA generiert wird [124, 125]. Schließlich kann SIRT4 auch als Lysin-Deacylase agieren und so posttranslationale Modifikationen an Proteinen wie z.B. *methylcrotonyl-CoA carboxylase A* (MCCA) reduzieren. Somit agiert SIRT4 in diesem Fall als Regulator des Leucin-Metabolismus [126].

5.4.4. Hinweise auf eine Rolle von SIRT4 in der zellulären Seneszenz und mitochondrialen Qualitätskontrolle

Neben der regulatorischen Rolle im mitochondrialen Metabolismus scheint SIRT4 auch in der Alterung eine Funktion einzunehmen. Einer der deutlichsten Hinweise darauf ist die Regulation der SIRT4-Expression durch die Lysin-spezifische Histon-Demethylase 1A (LSD1). Wird die Expression von SIRT4 in Trophoblasten-Stammzellen über LSD1-Hemmung hochreguliert, so werden diese Zellen seneszent und verlieren die Stammzeleigenschaften [127]. Diese Beobachtung lässt sich sehr gut auf zwei der „*hallmarks*“ der Alterung anwenden: Seneszenz und Stammzellverlust (Lopez-Otin *et al.* 2013). Die negative Regulation der Insulinsekretion durch SIRT4 in Mäusen [111] korreliert mit einem weiteren Seneszenzmarker, der Deregulation der Antwort auf Signalstoffe, insbesondere im Insulin-Signalweg.

Wird die Expression von SIRT4 in verschiedenen Tumorarten verglichen mit gesundem Gewebe betrachtet, so deutet die Reduktion der SIRT4-Menge in transformierten Zelltypen darauf hin, dass es als Tumorsuppressor fungiert [88, 111]. Beim Brust- und Oesophaguskrebs korreliert die Reduktion der SIRT4-Expression mit einer niedrigen Überlebenswahrscheinlichkeit [128, 129]. Auch der Knockout des *Sirt4*-Gens äußert sich in der spontanen Bildung von Lungentumoren [130]. Entsprechend diesen Befunden fördert die Überexpression von SIRT4 im Darmkrebs, in dem die SIRT4-Menge signifikant reduziert ist, eine Reduktion der Proliferation, inhibiert

den Glutaminmetabolismus und erhöht in therapeutischer Kombination mit Glykolyse-Inhibitoren die Zelltodrate [131].

Des Weiteren scheint SIRT4 einen Einfluss auf Form und Qualität der Mitochondrien zu haben [132]. Durch Hochregulation von SIRT4 werden die Mitochondrien stärker fusioniert und das Netzwerk statischer. Eine mögliche Funktion könnte durch eine SIRT4 abhängige Inhibierung der Drp1-Rekrutierung an der mitochondrialen Membran sein. Dies führt zu einer Reduktion der mitochondrialen Trennung und einem stabileren und statischeren mitochondrialen Netzwerk. Zudem wirkt die Expression von SIRT4 negativ auf die mitochondriale Atmung [133, 134]. Allerdings ist bisher unklar, ob die Reduktion der mitochondrialen Atmung durch SIRT4 eine Folge der Veränderung der mitochondrialen Fusion bzw. Trennung und somit der Inhibition der Mitophagie ist, oder ob sie durch direkte Interaktion zwischen SIRT4 und der Atmungskette und somit Inhibition dieser entsteht. Die Regulation der Atmungskette durch SIRT4 könnte durch dessen Interaktion mit Komponenten der ATP-Synthase erklärt werden. Diese Interaktion wurde bereits in massenspektrometrischen Studien beobachtet [89]. Die Reduktion der Mitochondrienqualität und Funktion ist ein weiteres Kennzeichen der Alterung wobei SIRT4 die Mitochondrienqualität negativ reguliert und somit möglicherweise die Seneszenz und Alterung fördert. Diese putative Rolle von SIRT4 in der Alterung korreliert dabei mit dessen Funktion als metabolischer Tumorsuppressor.

5.5. Zielsetzung

Verschiedene Literaturbefunde ließen auf einen Zusammenhang zwischen der stressassoziierten Hochregulation des mitochondrialen Sirtuins und metabolischen Tumorsuppressors SIRT4 und dessen Funktion als möglicher Modulator der mitochondrialen Struktur und Funktion rückschließen. Es konnte gezeigt werden, dass SIRT4 durch extrinsische Noxen, wie z.B. UV-Strahlung, induziert wird und anti-proliferativ wirkt, während die Expression von SIRT4 in Tumorzellen oft runterreguliert ist. Die stressassoziierte Regulation der SIRT4-Expression sowie die zelluläre und mitochondriale (evtl. auch extramitochondriale) Rolle von SIRT4 in der zellulären Seneszenz und Alterung waren zu Beginn dieser Arbeit unklar. Daher sollten in diesem Zusammenhang insbesondere die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Wie wird die Expression von SIRT4 in seneszenten Zellen reguliert und welche Auswirkungen ergeben sich hierbei insbesondere auf das SASP?
2. Welche Auswirkung hat eine erhöhte, stressinduzierte Expression von SIRT4 auf die mitochondriale Funktion und Qualitätskontrolle, und welche molekularen Mechanismen sind hierbei involviert?
3. Hat SIRT4 neben seiner mitochondrialen Rolle möglicherweise auch eine extra-mitochondriale Funktion? Dieser Punkt sollte mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse des zellulären SIRT4-Interaktoms geklärt werden.
4. Schließlich sollte eine neuartige C-terminale Prozessierung von SIRT4 in Mitochondrien auf molekularer Ebene weitergehend charakterisiert werden.

Die Bearbeitung dieser Punkte sollte zu einem besseren Verständnis der zellulären Funktion des Tumorsuppressors SIRT4 in der stressinduzierten Seneszenz und zellulären Alterung beitragen.

Literaturverzeichnis

1. Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 2013;368:651–62. doi:10.1056/NEJMr1205406.
2. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature.* 2016;530:184–9. doi:10.1038/nature16932.
3. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153:1194–217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039.
4. Coppe J-P, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6:2853–68. doi:10.1371/journal.pbio.0060301.
5. He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell.* 2017;169:1000–11. doi:10.1016/j.cell.2017.05.015.

6. Byun H-O, Lee Y-K, Kim J-M, Yoon G. From cell senescence to age-related diseases: Differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. *BMB Rep.* 2015;48:549–58.
7. Spilsbury A, Miwa S, Attems J, Saretzki G. The role of telomerase protein TERT in Alzheimer's disease and in tau-related pathology in vitro. *J Neurosci.* 2015;35:1659–74. doi:10.1523/JNEUROSCI.2925-14.2015.
8. Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol.* 2010;6:347. doi:10.1038/msb.2010.5.
9. Correia-Melo C, Marques FDM, Anderson R, Hewitt G, Hewitt R, Cole J, et al. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J.* 2016;35:724–42. doi:10.15252/embj.201592862.
10. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab.* 2016;23:303–14. doi:10.1016/j.cmet.2015.11.011.
11. Deter RL. INFLUENCE OF GLUCAGON, AN INDUCER OF CELLULAR AUTOPHAGY, ON SOME PHYSICAL PROPERTIES OF RAT LIVER LYSOSOMES. *The Journal of Cell Biology.* 1967;33:437–49. doi:10.1083/jcb.33.2.437.
12. Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ. Autophagy: Principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792:3–13. doi:10.1016/j.bbadis.2008.10.016.
13. Noda T. Regulation of Autophagy through TORC1 and mTORC1. *Biomolecules* 2017. doi:10.3390/biom7030052.
14. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.* 2010;20:748–62. doi:10.1038/cr.2010.82.
15. Chiang HL, Dice JF. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J Biol Chem.* 1988;263:6797–805.
16. Fernández-Fernández MR, Gragera M, Ochoa-Ibarrola L, Quintana-Gallardo L, Valpuesta JM. Hsp70: A master regulator in protein degradation. *FEBS Lett* 2017. doi:10.1002/1873-3468.12751.
17. Komatsu M, Ichimura Y. Selective autophagy regulates various cellular functions. *Genes Cells.* 2010;15:923–33. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01433.x.
18. Zhou J, Chong SY, Lim A, Singh BK, Sinha RA, Salmon AB, Yen PM. Changes in macroautophagy, chaperone-mediated autophagy, and mitochondrial metabolism in murine skeletal and cardiac muscle during aging. *Aging (Albany NY).* 2017;9:583–99. doi:10.18632/aging.101181.

19. Kalfalah F, Janke L, Schiavi A, Tigges J, Ix A, Ventura N, et al. Crosstalk of clock gene expression and autophagy in aging. *Aging (Albany NY)*. 2016;8:1876–95. doi:10.18632/aging.101018.
20. Lopez-Lluch G, Santos-Ocana C, Sanchez-Alcazar JA, Fernandez-Ayala DJM, Asencio-Salcedo C, Rodriguez-Aguilera JC, Navas P. Mitochondrial responsibility in ageing process: Innocent, suspect or guilty. *Biogerontology*. 2015;16:599–620. doi:10.1007/s10522-015-9585-9.
21. Diot A, Morten K, Poulton J. Mitophagy plays a central role in mitochondrial ageing. *Mamm Genome*. 2016;27:381–95. doi:10.1007/s00335-016-9651-x.
22. Martin WF, Tielens AGM, Mentel M, Garg SG, Gould SB. The Physiology of Phagocytosis in the Context of Mitochondrial Origin. *Microbiol Mol Biol Rev* 2017. doi:10.1128/MMBR.00008-17.
23. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong S-E, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*. 2008;134:112–23. doi:10.1016/j.cell.2008.06.016.
24. Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:751–80. doi:10.1146/annurev.biochem.76.071905.090048.
25. Dudek J, Rehling P, van der Laan M. Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833:274–85. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.028.
26. Wang Y, Nartiss Y, Steipe B, McQuibban GA, Kim PK. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy*. 2012;8:1462–76. doi:10.4161/auto.21211.
27. Payne BAI, Chinnery PF. Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1847:1347–53. doi:10.1016/j.bbabbio.2015.05.022.
28. Weber TA, Reichert AS. Impaired quality control of mitochondria: Aging from a new perspective. *Exp Gerontol*. 2010;45:503–11. doi:10.1016/j.exger.2010.03.018.
29. Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J*. 2001;15:2286–7. doi:10.1096/fj.01-0206fje.
30. Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res*. 2005;8:3–5. doi:10.1089/rej.2005.8.3.
31. Yamano K, Youle RJ. PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy*. 2013;9:1758–69. doi:10.4161/auto.24633.

32. Lazarou M, Jin SM, Kane LA, Youle RJ. Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell*. 2012;22:320–33. doi:10.1016/j.devcel.2011.12.014.
33. Anand R, Langer T, Baker MJ. Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833:195–204. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.025.
34. Okatsu K, Uno M, Koyano F, Go E, Kimura M, Oka T, et al. A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *J Biol Chem*. 2013;288:36372–84. doi:10.1074/jbc.M113.509653.
35. Okatsu K, Kimura M, Oka T, Tanaka K, Matsuda N. Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. *J Cell Sci*. 2015;128:964–78. doi:10.1242/jcs.161000.
36. Matsuda N. Phospho-ubiquitin: Upending the PINK-Parkin-ubiquitin cascade. *J Biochem*. 2016;159:379–85. doi:10.1093/jb/mvv125.
37. Martinez A, Lectez B, Ramirez J, Popp O, Sutherland JD, Urbé S, et al. Quantitative proteomic analysis of Parkin substrates in *Drosophila* neurons. *Mol Neurodegener*. 2017;12:29. doi:10.1186/s13024-017-0170-3.
38. Palikaras K, Daskalaki I, Markaki M, Tavernarakis N. Mitophagy and age-related pathologies: Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover. *Pharmacol Ther* 2017. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.04.005.
39. Wei H, Liu L, Chen Q. Selective removal of mitochondria via mitophagy: Distinct pathways for different mitochondrial stresses. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853:2784–90. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.03.013.
40. Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, Schumacher A, Prchal JT, Chen M, Wang J. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature*. 2008;454:232–5. doi:10.1038/nature07006.
41. Fivenson EM, Lautrup S, Sun N, Scheibye-Knudsen M, Stevnsner T, Nilsen H, et al. Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Neurochem Int* 2017. doi:10.1016/j.neuint.2017.02.007.
42. Dengjel J, Abeliovich H. Roles of mitophagy in cellular physiology and development. *Cell Tissue Res*. 2017;367:95–109. doi:10.1007/s00441-016-2472-0.
43. Gaziev AI, Abdullaev S, Podlutsky A. Mitochondrial function and mitochondrial DNA maintenance with advancing age. *Biogerontology*. 2014;15:417–38. doi:10.1007/s10522-014-9515-2.
44. Marzetti E, Lorenzi M, Landi F, Picca A, Rosa F, Tanganelli F, et al. Altered mitochondrial quality control signaling in muscle of old gastric cancer patients with cachexia. *Exp Gerontol*. 2017;87:92–9. doi:10.1016/j.exger.2016.10.003.

45. Bunkar N, Bhargava A, Khare NK, Mishra PK. Mitochondrial anomalies: Driver to age associated degenerative human ailments. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016;21:769–93.
46. Sgarbi G, Matarrese P, Pinti M, Lanzarini C, Ascione B, Gibellini L, et al. Mitochondria hyperfusion and elevated autophagic activity are key mechanisms for cellular bioenergetic preservation in centenarians. *Aging (Albany NY)*. 2014;6:296–310. doi:10.18632/aging.100654.
47. Twig G, Shirihai OS. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14:1939–51. doi:10.1089/ars.2010.3779.
48. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:872–84. doi:10.1038/nrm3013.
49. Chiong M, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Mondaca-Ruff D, Morales PE, García-Miguel M, Mellado R. Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Front Cell Dev Biol*. 2014;2:72. doi:10.3389/fcell.2014.00072.
50. Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27:105–17. doi:10.1016/j.tem.2015.12.001.
51. Del Dotto V, Mishra P, Vidoni S, Fogazza M, Maresca A, Caporali L, et al. OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions. *Cell Rep*. 2017;19:2557–71. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.073.
52. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012;337:1062–5. doi:10.1126/science.1219855.
53. MacVicar TDB, Lane JD. Impaired OMA1-dependent cleavage of OPA1 and reduced DRP1 fission activity combine to prevent mitophagy in cells that are dependent on oxidative phosphorylation. *J Cell Sci*. 2014;127:2313–25. doi:10.1242/jcs.144337.
54. Maffioletti E, Tardito D, Gennarelli M, Bocchio-Chiavetto L. Micro spies from the brain to the periphery: New clues from studies on microRNAs in neuropsychiatric disorders. *Front. Cell. Neurosci*. 2014;8:317. doi:10.3389/fncel.2014.00075.
55. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med*. 2009;60:167–79. doi:10.1146/annurev.med.59.053006.104707.
56. Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Wood WH3, De S, Ejiogu N, Zhang Y, et al. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging (Albany NY)*. 2013;5:725–40. doi:10.18632/aging.100603.
57. Wienholds E, Plasterk RHA. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*. 2005;579:5911–22. doi:10.1016/j.febslet.2005.07.070.
58. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DIK, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function.

- Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005;102:16961–6. doi:10.1073/pnas.0506482102.
59. Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell*. 2007;26:611–23. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.001.
 60. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005;436:740–4. doi:10.1038/nature03868.
 61. Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*. 2002;297:2053–6. doi:10.1126/science.1076311.
 62. Faraonio R, Salerno P, Passaro F, Sedia C, Iaccio A, Bellelli R, et al. A set of miRNAs participates in the cellular senescence program in human diploid fibroblasts. *Cell Death Differ*. 2012;19:713–21. doi:10.1038/cdd.2011.143.
 63. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404:293–6. doi:10.1038/35005107.
 64. Sohn D, Peters D, Piekorz RP, Budach W, Jänicke RU. miR-30e controls DNA damage-induced stress responses by modulating expression of the CDK inhibitor p21WAF1/CIP1 and caspase-3. *Oncotarget*. 2016;7:15915–29. doi:10.18632/oncotarget.7432.
 65. Borgdorff V, Lleonart ME, Bishop CL, Fessart D, Bergin AH, Overhoff MG, Beach DH. Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). *Oncogene*. 2010;29:2262–71. doi:10.1038/onc.2009.497.
 66. Gomez-Cabello D, Adrados I, Gamarra D, Kobayashi H, Takatsu Y, Takatsu K, et al. DGCR8-mediated disruption of miRNA biogenesis induces cellular senescence in primary fibroblasts. *Aging Cell*. 2013;12:923–31. doi:10.1111/acer.12117.
 67. Overhoff MG, Garbe JC, Koh J, Stampfer MR, Beach DH, Bishop CL. Cellular senescence mediated by p16INK4A-coupled miRNA pathways. *Nucleic Acids Research*. 2014;42:1606–18. doi:10.1093/nar/gkt1096.
 68. Ugalde AP, Ramsay AJ, La Rosa J de, Varela I, Marino G, Cadinanos J, et al. Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *EMBO J*. 2011;30:2219–32. doi:10.1038/emboj.2011.124.
 69. Xu X, Chen W, Miao R, Zhou Y, Wang Z, Zhang L, et al. miR-34a induces cellular senescence via modulation of telomerase activity in human hepatocellular carcinoma by targeting FoxM1/c-Myc pathway. *Oncotarget*. 2015;6:3988–4004. doi:10.18632/oncotarget.2905.

70. Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The Drosophila MicroRNA Mir-14 Suppresses Cell Death and Is Required for Normal Fat Metabolism. *Current Biology*. 2003;13:790–5. doi:10.1016/S0960-9822(03)00250-1.
71. Maes OC, An J, Sarojini H, Wang E. Murine microRNAs implicated in liver functions and aging process. *Mech Ageing Dev*. 2008;129:534–41. doi:10.1016/j.mad.2008.05.004.
72. Ji W-B, Liu X, Luo Y, Zhang W-Z. High expression of miR-15b predicts poor prognosis for hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Oncol Rep*. 2016;36:1901–8. doi:10.3892/or.2016.4982.
73. Li J, Chen Y, Guo X, Zhou L, Jia Z, Tang Y, et al. Inhibition of miR-15b decreases cell migration and metastasis in colorectal cancer. *Tumour Biol*. 2016;37:8765–73. doi:10.1007/s13277-015-4396-9.
74. Arakawa F, Kimura Y, Yoshida N, Miyoshi H, Doi A, Yasuda K, et al. Identification of miR-15b as a transformation-related factor in mantle cell lymphoma. *Int J Oncol*. 2016;48:485–92. doi:10.3892/ijo.2015.3295.
75. Zhang Y, Huang F, Wang J, Peng L, Luo H. MiR-15b mediates liver cancer cells proliferation through targeting BCL-2. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:15677–83.
76. Vimalraj S, Selvamurugan N. Regulation of proliferation and apoptosis in human osteoblastic cells by microRNA-15b. *Int J Biol Macromol*. 2015;79:490–7. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.05.017.
77. Luo H, Li Y, Liu B, Yang Y, Xu Z-QD. MicroRNA-15b-5p targets ERK1 to regulate proliferation and apoptosis in rat PC12 cells. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:1023–9. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.140.
78. Sun G, Shi L, Yan S, Wan Z, Jiang N, Fu L, et al. MiR-15b targets cyclin D1 to regulate proliferation and apoptosis in glioma cells. *Biomed Res Int*. 2014;2014:687826. doi:10.1155/2014/687826.
79. Lovat F, Fassan M, Gasparini P, Rizzotto L, Cascione L, Pizzi M, et al. miR-15b/16-2 deletion promotes B-cell malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112:11636–41. doi:10.1073/pnas.1514954112.
80. Holly AC, Grellscheid S, van de Walle P, Dolan D, Pilling LC, Daniels DJ, et al. Comparison of senescence-associated miRNAs in primary skin and lung fibroblasts. *Biogerontology*. 2015;16:423–34. doi:10.1007/s10522-015-9560-5.
81. Marasa BS, Srikantan S, Masuda K, Abdelmohsen K, Kuwano Y, Yang X, et al. Increased MKK4 abundance with replicative senescence is linked to the joint reduction of multiple microRNAs. *Sci Signal*. 2009;2:ra69. doi:10.1126/scisignal.2000442.
82. Lang A, Grether-Beck S, Singh M, Kuck F, Jakob S, Kefalas A, et al. MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4. *Aging (Albany NY)*. 2016;8:484–505. doi:10.18632/aging.100905.

83. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:253–95. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250.
84. Jiang JC, Wawryn J, Shantha Kumara HMC, Jazwinski SM. Distinct roles of processes modulated by histone deacetylases Rpd3p, Hda1p, and Sir2p in life extension by caloric restriction in yeast. *Exp Gerontol.* 2002;37:1023–30.
85. Osborne B, Bentley NL, Montgomery MK, Turner N. The role of mitochondrial sirtuins in health and disease. *Free Radic Biol Med.* 2016;100:164–74. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.197.
86. Poljsak B, Milisav I. NAD⁺ as the Link Between Oxidative Stress, Inflammation, Caloric Restriction, Exercise, DNA Repair, Longevity, and Health Span. *Rejuvenation Res* 2016. doi:10.1089/rej.2015.1767.
87. Verdin E. The many faces of sirtuins: Coupling of NAD metabolism, sirtuins and lifespan. *Nat Med.* 2014;20:25–7. doi:10.1038/nm.3447.
88. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell.* 2006;126:941–54. doi:10.1016/j.cell.2006.06.057.
89. Yang W, Nagasawa K, Munch C, Xu Y, Satterstrom K, Jeong S, et al. Mitochondrial Sirtuin Network Reveals Dynamic SIRT3-Dependent Deacetylation in Response to Membrane Depolarization. *Cell.* 2016;167:985-1000.e21. doi:10.1016/j.cell.2016.10.016.
90. Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2008;105:13421–6. doi:10.1073/pnas.0801613105.
91. Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S, et al. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature.* 2008;456:269–73. doi:10.1038/nature07349.
92. Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, et al. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol.* 2006;4:e31. doi:10.1371/journal.pbio.0040031.
93. Dobbin MM, Madabhushi R, Pan L, Chen Y, Kim D, Gao J, et al. SIRT1 collaborates with ATM and HDAC1 to maintain genomic stability in neurons. *Nat Neurosci.* 2013;16:1008–15. doi:10.1038/nn.3460.
94. Lin Y-H, Yuan J, Pei H, Liu T, Ann DK, Lou Z. KAP1 Deacetylation by SIRT1 Promotes Non-Homologous End-Joining Repair. *PLoS One.* 2015;10:e0123935. doi:10.1371/journal.pone.0123935.
95. Wang F, Tong Q. SIRT2 suppresses adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with PPARgamma. *Mol Biol Cell.* 2009;20:801–8. doi:10.1091/mbc.E08-06-0647.

96. Krishnan J, Danzer C, Simka T, Ukropec J, Walter KM, Kumpf S, et al. Dietary obesity-associated Hif1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system. *Genes Dev.* 2012;26:259–70. doi:10.1101/gad.180406.111.
97. Buler M, Andersson U, Hakkola J. Who watches the watchmen? Regulation of the expression and activity of sirtuins. *FASEB J.* 2016;30:3942–60. doi:10.1096/fj.201600410RR.
98. Park J-M, Kim T-H, Jo S-H, Kim M-Y, Ahn Y-H. Acetylation of glucokinase regulatory protein decreases glucose metabolism by suppressing glucokinase activity. *Sci Rep.* 2015;5:17395. doi:10.1038/srep17395.
99. Zhang H, Park S-H, Pantazides BG, Karpiuk O, Warren MD, Hardy CW, et al. SIRT2 directs the replication stress response through CDK9 deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013;110:13546–51. doi:10.1073/pnas.1301463110.
100. Patel VP, Chu CT. Decreased SIRT2 activity leads to altered microtubule dynamics in oxidatively-stressed neuronal cells: Implications for Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2014;257:170–81. doi:10.1016/j.expneurol.2014.04.024.
101. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, et al. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1 α . *Cell.* 2010;140:280–93. doi:10.1016/j.cell.2009.12.041.
102. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 2006;124:315–29. doi:10.1016/j.cell.2005.11.044.
103. Lombard DB. Sirtuins at the breaking point: SIRT6 in DNA repair. *Aging (Albany NY).* 2009;1:12–6. doi:10.18632/aging.100014.
104. Vazquez BN, Thackray JK, Simonet NG, Kane-Goldsmith N, Martinez-Redondo P, Nguyen T, et al. SIRT7 promotes genome integrity and modulates non-homologous end joining DNA repair. *EMBO J.* 2016;35:1488–503. doi:10.15252/emboj.201593499.
105. Tang X, Chen X-F, Chen H-Z, Liu D-P. Mitochondrial Sirtuins in cardiometabolic diseases. *Clin Sci.* 2017;131:2063–78. doi:10.1042/CS20160685.
106. Schlicker C, Gertz M, Papatheodorou P, Kachholz B, Becker CFW, Steegborn C. Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol.* 2008;382:790–801. doi:10.1016/j.jmb.2008.07.048.
107. Ozden O, Park S-H, Wagner BA, Yong Song H, Zhu Y, Vassilopoulos A, et al. SIRT3 deacetylates and increases pyruvate dehydrogenase activity in cancer cells. *Free Radic Biol Med.* 2014;76:163–72. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.001.

108. Mathias RA, Greco TM, Oberstein A, Budayeva HG, Chakrabarti R, Rowland EA, et al. Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell*. 2014;159:1615–25. doi:10.1016/j.cell.2014.11.046.
109. 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;56:1068–77. doi:10.1007/s00125-013-2851-y.
110. Zhang H-H, Ma X-J, Wu L-N, Zhao Y-Y, Zhang P-Y, Zhang Y-H, et al. Sirtuin-3 (SIRT3) protects pancreatic beta-cells from endoplasmic reticulum (ER) stress-induced apoptosis and dysfunction. *Mol Cell Biochem*. 2016;420:95–106. doi:10.1007/s11010-016-2771-5.
111. Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, et al. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*. 2007;282:33583–92. doi:10.1074/jbc.M705488200.
112. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab*. 2010;12:662–7. doi:10.1016/j.cmet.2010.11.015.
113. Zhang L, Chen C-L, Kang PT, Jin Z, Chen Y-R. Differential protein acetylation assists import of excess SOD2 into mitochondria and mediates SOD2 aggregation associated with cardiac hypertrophy in the murine SOD2-tg heart. *Free Radic Biol Med*. 2017;108:595–609. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.022.
114. Bell EL, Guarente L. The SirT3 divining rod points to oxidative stress. *Mol Cell*. 2011;42:561–8. doi:10.1016/j.molcel.2011.05.008.
115. Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep*. 2010;11:45–51. doi:10.1038/embor.2009.256.
116. Peng C, Lu Z, Xie Z, Cheng Z, Chen Y, Tan M, et al. The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10:M111.012658. doi:10.1074/mcp.M111.012658.
117. Tan M, Peng C, Anderson KA, Chhoy P, Xie Z, Dai L, et al. Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell Metab*. 2014;19:605–17. doi:10.1016/j.cmet.2014.03.014.
118. Du J, Zhou Y, Su X, Yu JJ, Khan S, Jiang H, et al. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*. 2011;334:806–9. doi:10.1126/science.1207861.
119. Li L, Zhang P, Bao Z, Wang T, Liu S, Huang F. PGC-1 α Promotes Ureagenesis in Mouse Periportal Hepatocytes through SIRT3 and SIRT5 in Response to Glucagon. *Sci Rep*. 2016;6:24156. doi:10.1038/srep24156.

120. Buler M, Aatsinki S-M, Izzi V, Uusimaa J, Hakkola J. SIRT5 is under the control of PGC-1 α and AMPK and is involved in regulation of mitochondrial energy metabolism. *FASEB J.* 2014;28:3225–37. doi:10.1096/fj.13-245241.
121. Ding Y, Yang H, Wang Y, Chen J, Ji Z, Sun H. Sirtuin 3 is required for osteogenic differentiation through maintenance of PGC-1 α -SOD2-mediated regulation of mitochondrial function. *Int J Biol Sci.* 2017;13:254–64. doi:10.7150/ijbs.17053.
122. Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell.* 2009;137:560–70. doi:10.1016/j.cell.2009.02.026.
123. Lin Z-F, Xu H-B, Wang J-Y, Lin Q, Ruan Z, Liu F-B, et al. SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441:191–5. doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.033.
124. Laurent G, German NJ, Saha AK, Boer VCJ de, Davies M, Koves TR, et al. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol Cell.* 2013;50:686–98. doi:10.1016/j.molcel.2013.05.012.
125. Mathias RA, Greco TM, Cristea IM. Identification of Sirtuin4 (SIRT4) Protein Interactions: Uncovering Candidate Acyl-Modified Mitochondrial Substrates and Enzymatic Regulators. *Methods Mol Biol.* 2016;1436:213–39. doi:10.1007/978-1-4939-3667-0_15.
126. Anderson KA, Huynh FK, Fisher-Wellman K, Stuart JD, Peterson BS, Douros JD, et al. SIRT4 Is a Lysine Deacylase that Controls Leucine Metabolism and Insulin Secretion. *Cell Metab.* 2017;25:838-855.e15. doi:10.1016/j.cmet.2017.03.003.
127. Castex J, Willmann D, Kanouni T, Arrigoni L, Li Y, Friedrich M, et al. Inactivation of Lsd1 triggers senescence in trophoblast stem cells by induction of Sirt4. *Cell Death Dis.* 2017;8:e2631. doi:10.1038/cddis.2017.48.
128. Shi Q, Liu T, Zhang X, Geng J, He X, Nu M, Pang D. Decreased sirtuin 4 expression is associated with poor prognosis in patients with invasive breast cancer. *Oncol Lett.* 2016;12:2606–12. doi:10.3892/ol.2016.5021.
129. Nakahara Y, Yamasaki M, Sawada G, Miyazaki Y, Makino T, Takahashi T, et al. Downregulation of SIRT4 Expression Is Associated with Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology.* 2016;90:347–55. doi:10.1159/000445323.
130. Jeong SM, Xiao C, Finley LWS, 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;23:450–63. doi:10.1016/j.ccr.2013.02.024.

131. Huang G, Cheng J, Yu F, Liu X, Yuan C, Liu C, et al. Clinical and therapeutic significance of sirtuin-4 expression in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2016;35:2801–10. doi:10.3892/or.2016.4685.
132. Fu L, Dong Q, He J, Wang X, Xing J, Wang E, et al. SIRT4 inhibits malignancy progression of NSCLCs, through mitochondrial dynamics mediated by the ERK-Drp1 pathway. *Oncogene* 2016. doi:10.1038/onc.2016.425.
133. Ho L, Titus AS, Banerjee KK, George S, Lin W, Deota S, et al. SIRT4 regulates ATP homeostasis and mediates a retrograde signaling via AMPK. *Aging (Albany NY).* 2013;5:835–49. doi:10.18632/aging.100616.
134. Moura MB de, Uppala R, Zhang Y, van Houten B, Goetzman ES. Overexpression of mitochondrial sirtuins alters glycolysis and mitochondrial function in HEK293 cells. *PLoS One.* 2014;9:e106028. doi:10.1371/journal.pone.0106028.

6. Manuskripte

6.1. MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4

Lang A*, Grether-Beck S*, Singh M*, Kuck F, Jakob S, Kefalas A, Altinoluk-Hambüchen S, Graffmann N, Schneider M, Lindecke A, Brenden H, Felsner I, Ezzahoini H, Marini A, Weinhold S, Vierkotter A, Tigges J, Schmidt S, Stühler K, Köhrer K, Uhrberg M, Haendeler J, Krutmann* J and Piekorz RP*; *Aging (Albany NY)*. 2016; 8:484-505. <https://doi.org/10.18632/aging.100905>. (*shared first/last authorships).

6.1.1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der regulatorischen Funktion der MikroRNA-15b (miR-15b) auf die seneszenzassoziierte Expression des mitochondrialen Sirtuins SIRT4 und einer möglichen Funktion dieses Proteins in der Alterung erarbeitet. Hierzu wurde die Korrelation zwischen der Abnahme der Expression von miR-15b und der Zunahme von SIRT4 in verschiedenen zellulären Seneszenzmodellen sowie *in vivo* in humaner photogealterter Haut charakterisiert. Im weiteren Verlauf wurde die aktive und entsprechend inverse Regulation der SIRT4-Expression durch die Transfektion von miR-15b-Inhibitoren oder miR-15b-Mimetika auf mRNA- und Proteinniveau nachgewiesen. In diesem Modell der miR-15b-vermittelten, moderaten Hochregulation der SIRT4-Menge wurde beobachtet, dass die Zunahme von SIRT4 eine regulatorische Wirkung auf den seneszenzassoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP), auf die Expression nukleär-kodierter, mitochondrialer Gene und auf spezifische mitochondriale Funktionen und die mitochondriale Morphologie besitzt. Mithilfe der qPCR-Methode wurde die nach SIRT4-Hochregulation erniedrigte der Expression mitochondrialer Gene untersucht, welche die Integrität und Funktion der Mitochondrien stabilisieren. Dabei handelte es sich um

Cytochrom c (CytC), eine wichtige Komponente der Atmungskette, sowie um den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (TFAM) und den *nuclear respiratory factor 1* (NRF1), welche wesentlich die mitochondriale Genexpression und antioxidative Antwort steuern. Ebenfalls konnte eine Reduktion der Expression von SASP-Faktoren beobachtet werden. Hierzu wurde die Sekretion des Chemokins *Interleukin-8* (IL-8), der Interleukine IL-6, IL-1 α , IL-1 β , des Interferons IFN γ sowie des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) untersucht. Diese Komponenten des SASP stehen im Zusammenhang mit Seneszenz als Modulatoren der zellulären Umgebung. Durch diese wird *in vivo* unter anderem die Aktivität der Immunantwort, Migration von verschiedenen Zellen in das Gewebe und die Regulation der Versorgung mit Nährstoffen durch das Blutsystem moduliert. Neben der regulierenden Wirkung auf das SASP konnte eine Reduktion des Membranpotentials der Mitochondrien nach Hochregulation der SIRT4-Expression beobachtet werden. Parallel dazu nahm die mitochondriale ROS-Menge zu und die Morphologie der Mitochondrien veränderte sich. Diese nahmen hierbei mehr Fläche ein und wurden im Durchmesser breiter. Somit konnten in dieser Publikation ein Effekt von miR-15b auf die Modulation der Seneszenz durch Inhibition von SIRT4 analysiert und Effekte auf die mitochondriale Qualität in den Fokus gesetzt werden.

Der Autor der vorliegenden Dissertation erarbeitete ca. 50% der Daten dieser Publikation. Dazu zählen die Etablierung der Modulation der SIRT4-Expression durch Transfektion von miR-15b-Inhibitoren und der Cotransfektion mit SIRT4-siRNAs in humane dermale Fibroblasten. Ebenfalls wurde die Quantifizierung der SIRT4-Protein-Menge mithilfe der ELISA-Methode und der Konfokalmikroskopie etabliert und optimiert. Neben der Auswertung der Modulation des SASP mithilfe der qPCR wurden die Mitochondrienqualität, mitochondriale ROS-Produktion und mitochondriale Morphologie untersucht und ausgewertet.

MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4

Alexander Lang^{1,5*}, Susanne Grether-Beck^{2*}, Madhurendra Singh^{1*}, Fabian Kuck¹, Sascha Jakob², Andreas Kefalas¹, Simone Altinoluk-Hambüchen¹, Nina Graffmann³, Maren Schneider², Antje Lindecke⁴, Heidi Brenden², Ingo Felsner², Hakima Ezzahoui¹, Alessandra Marini², Sandra Weinhold³, Andrea Vierkötter², Julia Tigges², Stephan Schmidt¹, Kai Stühler⁵, Karl Köhrer⁴, Markus Uhrberg³, Judith Haendeler², Jean Krutmann^{2,6#}, and Roland P. Piekorz^{1#}

¹Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany

²IUF – Leibniz Research Institute for Environmental Medicine, Düsseldorf, Germany

³Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ), Düsseldorf, Germany

⁴Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum (BMFZ), Düsseldorf, Germany

⁵Molecular Proteomics Laboratory, BMFZ, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany

⁶University of Düsseldorf, Medical Faculty, Düsseldorf, Germany

*Shared first authorship

#Shared last authorship

Key words: MicroRNA-15b/miR-15b, nuclear encoded mitochondrial genes, photoaging, reactive oxygen species/ROS, senescence, senescence associated secretory phenotype/SASP, SIRT4/Sirtuin 4, skin

Abbreviations: CytC, cytochrom C; γ IR, gamma-irradiation; GDH, glutamate dehydrogenase; miRNA, microRNA; mitoQ, 10-(6'-ubiquinonyl) decyltriphenylphosphonium bromide; MMP1, matrix metalloproteinase-1; MTCO2, mitochondrially encoded cytochrome C oxidase II; mtSIRT, mitochondrially localized sirtuin; NRF1, nuclear respiratory factor 1; PDH, pyruvate dehydrogenase; qRT-PCR, quantitative real-time PCR; ROS, reactive oxygen species; SASP, senescence associated secretory phenotype; SIPS, stress-induced, premature senescence; SIRT, sirtuin; TACC3, Transforming Acidic Coiled Coil 3; TFAM, transcription factor A, mitochondrial; UTR, untranslated region; UV, ultraviolet; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Received: 08/05/15; **Accepted:** 01/30/16; **Published:** 02/26/16

Correspondence to: Roland P. Piekorz, PhD; **E-mail:** Roland.Piekorz@uni-duesseldorf.de

Copyright: Lang et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Abstract: Mammalian sirtuins are involved in the control of metabolism and life-span regulation. Here, we link the mitochondrial sirtuin SIRT4 with cellular senescence, skin aging, and mitochondrial dysfunction. SIRT4 expression significantly increased in human dermal fibroblasts undergoing replicative or stress-induced senescence triggered by UVB or gamma-irradiation. *In-vivo*, SIRT4 mRNA levels were upregulated in photoaged vs. non-photoaged human skin. Interestingly, in all models of cellular senescence and in photoaged skin, upregulation of SIRT4 expression was associated with decreased levels of miR-15b. The latter was causally linked to increased SIRT4 expression because miR-15b targets a functional binding site in the *SIRT4* gene and transfection of oligonucleotides mimicking miR-15b function prevented SIRT4 upregulation in senescent cells. Importantly, increased SIRT4 negatively impacted on mitochondrial functions and contributed to the development of a senescent phenotype. Accordingly, we observed that inhibition of miR-15b, in a SIRT4-dependent manner, increased generation of mitochondrial reactive oxygen species, decreased mitochondrial membrane potential, and modulated mRNA levels of nuclear encoded mitochondrial genes and components of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). Thus, miR-15b is a negative regulator of stress-induced SIRT4 expression thereby counteracting senescence associated mitochondrial dysfunction and regulating the SASP and possibly organ aging, such as photoaging of human skin.

INTRODUCTION

Extrinsic skin aging (*i.e.*, photoaging) is primarily driven by solar ultraviolet (UV) radiation as a major environmental noxae [1]. The exact mechanisms, by which UV radiation lead to skin aging, is an area of active investigation. Interestingly, it has been shown that in addition to UV radiation-induced stress responses in the epidermal compartment, which *e.g.* may elicit the production and release of soluble factors like proteolytic enzymes, damage to dermal fibroblasts contributes to photoaging as well [2]. Accordingly, mitochondrial dysfunction in dermal fibroblasts associated with increased production of reactive oxygen species ("defective powerhouse model") has been proposed as a major driving force in extrinsic aging of human skin (reviewed in [3]). This concept is supported by the observation of Koziel et al. that in skin fibroblasts from aged donors the mitochondrial membrane potential is significantly decreased, whereas levels of reactive oxygen species (ROS) are increased [4], a major hallmark of fibroblast aging [5].

In general, these findings are in line with the idea that DNA damage triggered by UV radiation or other extrinsic factors, including oxidative stress or cytotoxic drugs, causes cellular aging referred to as stress-induced premature senescence (SIPS) [6]. This phenotype is typically associated with and dependent on mitochondrial dysfunction [7-11]. In addition, human cells display an intrinsic type of senescence (replicative senescence) which is based on the progressive erosion of telomeres. Senescent cells are characterized by several features which distinguish them from quiescent cells reversibly arrested in the G₁ phase of the cell cycle [6, 12]. In particular, upon senescence, cells undergo morphological changes such as flattening and increased granularity, formation of senescence associated heterochromatic foci (SAHF) linked to the repression of proliferative genes and hence DNA synthesis, and increased senescence associated β -galactosidase (SA- β gal) expression based on an expansion of the lysosomal compartment [13, 14]. A particular characteristic of senescent cells is their ability to produce and secrete various autocrine- or paracrine-acting factors, including cytokines, growth factors, proteases, and soluble receptors, giving rise to the so-called senescence-associated secretory phenotype (SASP) [14-18]. We recently demonstrated that premature senescence can also be induced as a consequence of mitotic spindle stress elicited by cellular depletion of the centrosomal protein TACC3, a major regulator of mitotic spindle dynamics [19-21]. In this model system, centrosomal and spindle dysfunction were found to modulate post-mitotic senescence

through a p53-p21^{WAF} dependent pathway [22].

In the present study we investigated the causes for mitochondrial dysfunction in cellular senescence in general [10] and fibroblast senescence and photoaging of human skin in particular [3, 4] by focusing on sirtuins. Mammalian sirtuins comprise a conserved protein family of seven members of NAD⁺-dependent deacetylases or, in the case of SIRT4, ADP-ribosyltransferases [23, 24], which are all expressed in human skin [25]. The prototype sirtuin, SIRT1, plays diverse and senescence/aging-associated roles in metabolism and stress biology. Downregulation or inhibition of SIRT1 is associated with metabolic dysregulation and antagonization of anti-aging effects linked to calorie restriction, impaired DNA repair, and apoptosis in the context of cellular stress responses [26-28]. Moreover, SIRT1 contributes to telomere maintenance [29] and is downregulated during cellular senescence [30]. In contrast to all other sirtuins that localize in the cytosol or nucleus, SIRT3, SIRT4, and SIRT5 are exclusively found in the mitochondrion, an organelle linking energy metabolism/metabolic homeostasis and aging [31-34]. Important metabolic enzymes, like glutamate dehydrogenase (GDH) and pyruvate dehydrogenase (PDH) in the case of SIRT4, have been identified as specific substrates of mitochondrial SIRT proteins (mtSIRTs) [23, 35-37], but the regulation and putative roles of mtSIRTs, in particular SIRT4, in intrinsically and extrinsically induced cellular senescence and tissue aging are currently poorly understood.

RESULTS AND DISCUSSION

SIRT4 is upregulated in various models of cellular senescence

In the present study, we addressed a possible role of mtSIRTs in aging by analyzing their expression during cellular senescence and tissue aging. Initially, we observed that SIRT4 mRNA levels were upregulated at later passages during replicative senescence of human foreskin fibroblasts, comparable to the parallel increase in expression of the p53-induced cell cycle inhibitor and senescence effector p21^{WAF} (Fig. 1A). The increase in SIRT4 mRNA levels was not specific to replicative senescence, as SIRT4 transcripts were found at elevated levels in primary human dermal fibroblasts, in which senescence was induced extrinsically by repetitive exposure to low, sublethal doses of ultraviolet radiation (UV) B radiation [38, 39] (Fig. 1B).

To test whether senescence-associated SIRT4 upregulation was cell-type specific, we next employed

additional cellular models of premature senescence. We combined this analysis with gene array-based expression screens, which included all SIRT isoforms (suppl. Fig. 1), followed up by reassessment of the expression of mtSIRTs using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) (Fig. 2). Interestingly, among the seven sirtuin family members, and in particular among the mtSIRTs SIRT3, SIRT4, and SIRT5, only SIRT4 was consistently and significantly upregulated in epithelial breast adenocarcinoma MCF7 cells undergoing stress-induced senescence. This result was observed regardless of whether senescence was triggered by mitotic spindle stress through depletion of the centrosomal protein TACC3 [22] or by treatment with gamma-irradiation (γ IR) [40] (suppl. Fig. 1 and Fig. 2A,B). Additionally, we also subjected primary human dermal fibroblasts to γ IR to trigger stress-induced senescence [41]. As

indicated in Fig. 3 and suppl. Fig. 2 (as well as in Fig. 6A at the transcript level), γ IR resulted in an increased protein levels of SIRT4, which colocalized with the mitochondrial marker MTCO2 (mitochondrially encoded cytochrome C oxidase II) as observed by confocal laser scanning microscopy. The relative fluorescence intensity of cellular SIRT4 signals (as normalized to MTCO2 signals) was significantly higher in γ -irradiated cells as compared to sham treated controls (Fig. 3C). ELISA-based quantification of total cell lysates revealed SIRT4 protein levels which were increased by approximately 20% in irradiated vs. non-irradiated cells (Fig. 3D). These findings show that cellular senescence, either of replicative or stress-induced nature, is accompanied in a cell type-independent manner by an increased SIRT4 expression in mitochondria.

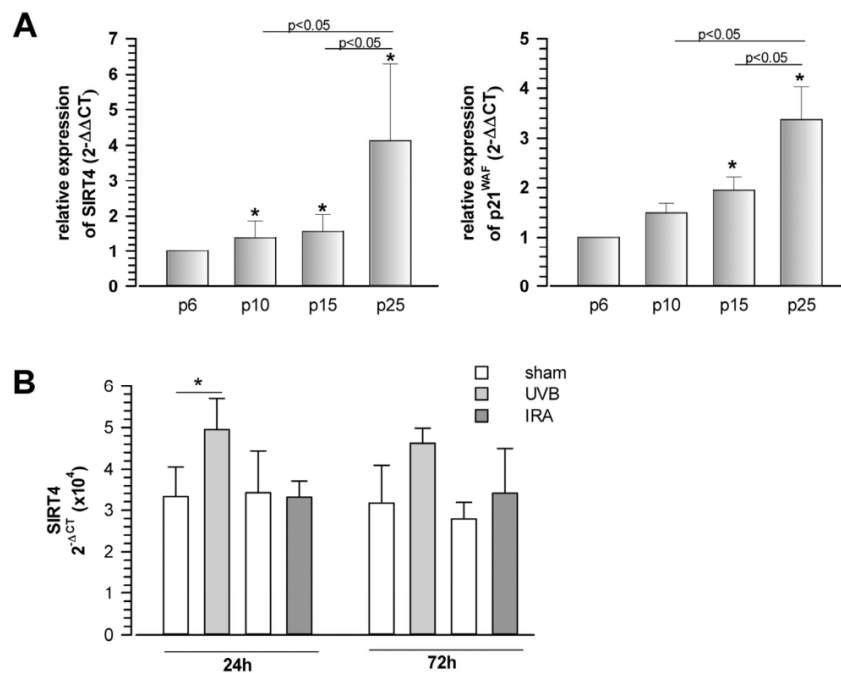


Figure 1. Increased expression of the mitochondrial sirtuin SIRT4 in human fibroblasts undergoing replicative or UVB-induced senescence. (A) Concomitant upregulation of SIRT4 and p21^{WAF1} expression during replicative senescence. Human foreskin fibroblast lines (from n=4 donors; mean $\pm$ s.d.) were analysed at increasing passage numbers for SIRT4 and p21^{WAF1} mRNA levels by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR; suppl. Material & Methods). To evaluate statistical significance, ANOVA (on ranks for SIRT4) SNK were performed (*p<0.05). (B) Primary human dermal fibroblasts (n=4 donors; mean $\pm$ s.d.) were subjected to repetitive ultraviolet irradiation (100 J/m² UVB per day) or infrared irradiation (360 J/m² UVB per day) for a total of five days. Cells were harvested 24 and 72 h following the last irradiation and SIRT4 mRNA levels were determined by qRT-PCR. To evaluate statistical significance ANOVA on ranks (SNK) were performed (*p<0.05).

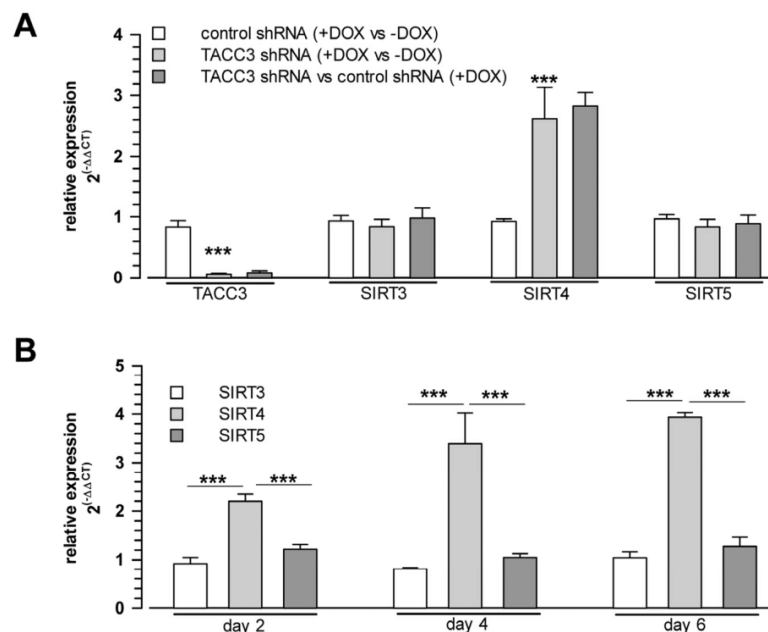


Figure 2. Selective upregulation of SIRT4 expression among the mitochondrial SIRT isoforms in cellular models of stress-induced premature senescence. (A) Increased SIRT4 mRNA levels in MCF7 cells driven into premature senescence through shRNA-mediated depletion of the centrosomal protein TACC3 [22] (analysis on day 4 upon doxycycline treatment which induces control or TACC3 shRNA expression; mean $\pm$ s.d. from three independent experiments). (B) Upregulation of SIRT4 mRNA levels in MCF7 cells 2, 4 and 6 days following γ -irradiation (single dose of 20 Gy; mean $\pm$ s.d. from three independent experiments). mRNA levels were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction. To evaluate statistical significance, ANOVA SNK were performed (** $p < 0.001$).

Downregulation of miR-15b is inversely associated with increased SIRT4 expression in cellular senescence

Currently, little is known about the regulation of SIRT4 expression. A major feature of senescent cells is altered gene expression that leads to growth arrest, apoptosis resistance, and induction of the SASP [8, 42], which is controlled by the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway [43]. Surprisingly, although mTORC1 activity is thought to promote cellular senescence and accelerated aging [44], SIRT4 expression is transcriptionally repressed by mTORC1 [45]. Given our contrary findings of a senescence-associated upregulation of SIRT4 (Fig. 1-3 and 6A), we hypothesized that small non-coding silencing RNAs (miRNAs) would function as inhibitors of SIRT4 expression. In accordance with this hypothesis, a role of miRNAs has been proposed in various senescence and aging model systems [46-51]. MicroRNAs represent

potent regulators of gene expression networks by either degrading or translationally repressing one or more target mRNAs. This process enables cells to coordinate and fine-tune a variety of cellular processes or to modulate antagonistic phenotypes like malignant proliferation vs. senescence/cellular aging. As an example, increased vs. decreased levels of cell cycle regulating miRNAs from the miR-17-92 cluster are associated with malignant proliferation or oncogene-induced senescence, respectively [50, 52].

In order to assess the potential role of miRNAs in senescence-associated SIRT4 upregulation, we next performed a global, microarray-based comparison of corresponding miRNA- and mRNA expression profiles (both linked in suppl. Table 2) followed by relative miRNA quantification using qRT-PCR in our model systems. Our miRNA findings are based on an initial screen performed in MCF7 cells undergoing premature senescence upon TACC3 depletion (suppl. Table 1). We

identified and verified a differential expression of various miRNAs, including members of the miR-17-92 and miR-106a-363 clusters, which became down-regulated upon cellular senescence (suppl. Table 1 and suppl. Fig. 3), consistent with the work of Hackl et al. [48]. Upregulated senescence-associated miRNAs included miR-146, which is linked to dampening of the SASP [46], and miR-125b, which is

involved in the regulation of keratinocyte proliferation and differentiation [53]. In contrast, miR-22, a miRNA upregulated in human senescent fibroblasts targeting SIRT1 expression [54], was not identified as differentially expressed upon TACC3 depletion (suppl. Table 1), a finding consistent with insignificantly changed SIRT1 mRNA levels (suppl. Fig. 1).

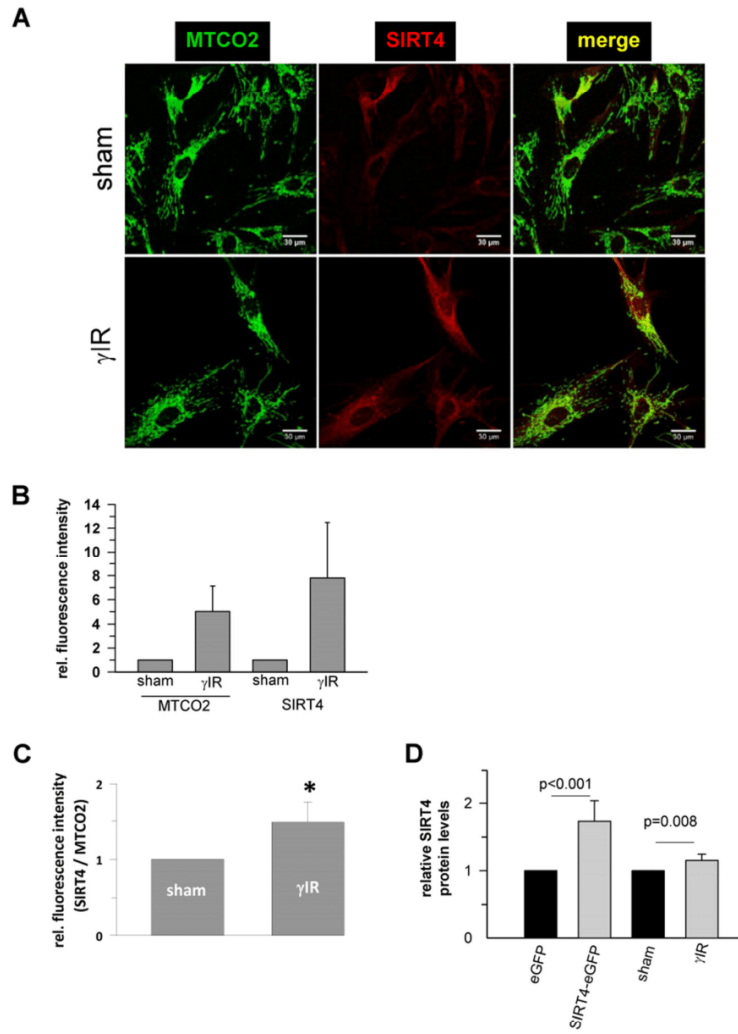


Figure 3. Confocal microscopy based analysis of the expression and colocalization of SIRT4 with the mitochondrial marker MTCO2 (mitochondrially encoded cytochrome C oxidase II) in γ -irradiated human dermal fibroblasts. (A) Subcellular visualization of MTCO2 (green) and SIRT4 (red) in γ -irradiated (20 Gy) fibroblasts as compared to control (sham treated) cells. **(B)** Relative quantification of total MTCO2 and SIRT4 signal intensities in γ -irradiated cells as compared to control (sham treated) cells using the ImageJ software. **(C)** Total SIRT4 signal intensities were normalized to MTCO2 signals in γ -irradiated cells as compared to control (sham treated) cells. Mean $\pm$ s.d. from four independent experiments. Thirty to fifty cells were analysed per experiment and condition. To evaluate statistical significance, Mann-Whitney rank sum test was performed (* $p<0.05$). **(D)** ELISA-based quantification of relative SIRT4 protein levels (suppl. Material & Methods) in γ -irradiated fibroblasts as compared to sham treated cells. As comparison, relative SIRT4 levels were determined in HEK293 cells stably expressing SIRT4-eGFP vs. eGFP expressing control cells. To evaluate statistical significance, Mann-Whitney rank sum test was performed (n=5 independent experiments, mean $\pm$ s.d).

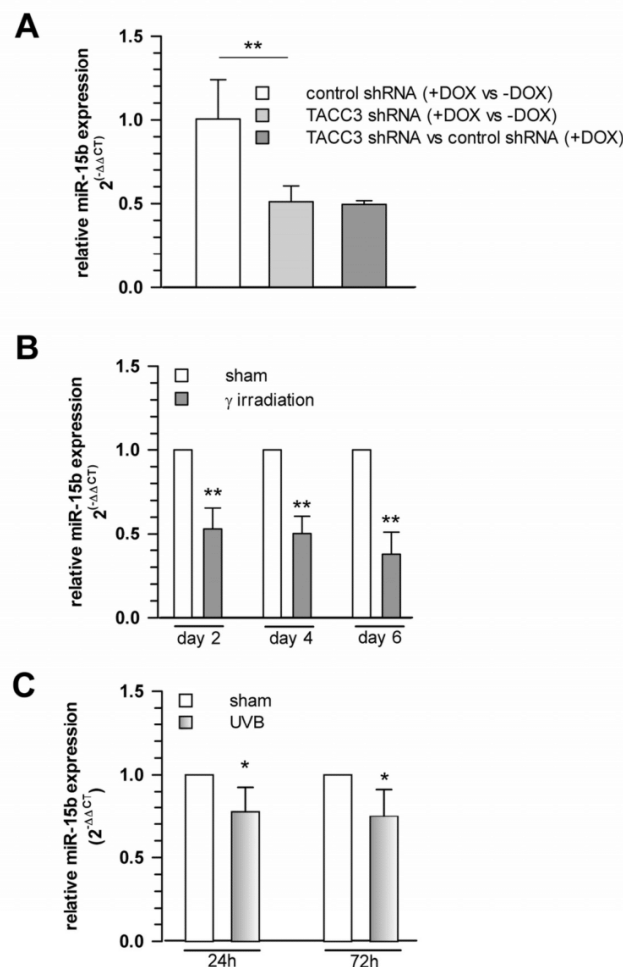


Figure 4. Cellular levels of miR-15b are decreased concomitant with upregulated SIRT4 gene expression in various aging models. (A) Decreased miR-15b mRNA levels in MCF7 cells following induction of senescence through TACC3 depletion (analysis on day 4 of doxycycline-induced TACC3 shRNA expression; mean $\pm$ s.d. from three independent experiments). To evaluate statistical significance, ANOVA SNK were performed (** $p < 0.01$). (B) Analysis of miR-15b levels in MCF7 cells following ionizing radiation (application of 20 Gy at day 0; mean $\pm$ s.d. from three independent experiments). (C) Primary human dermal fibroblasts ($n = 4$ donors) were subjected to ultraviolet irradiation (100 J/m² UVB per day) for a total of five days. Cells were harvested 24 and 72 h following the last irradiation and miR-15b levels were determined by qRT-PCR (mean $\pm$ s.d.). To evaluate statistical significance in (b) and (c), t-tests ($n = 3$; ** $p < 0.01$) and Mann-Whitney rank sum tests ($n = 4$; * $p < 0.05$) were performed, respectively.

Interestingly, among the miRNAs analysed, we observed a robust and significant downregulation of miR-15b in TACC3 depleted or γ -irradiated senescent MCF7 cells (Fig. 4A,B), concomitant with a parallel upregulation of SIRT4 expression (Fig. 2), which represents a *bona fide* candidate target of miR-15b (suppl. Table 2 and suppl. Fig. 4). Similarly, and again in accordance with the SIRT4 expression status (Fig. 1B), miR-15b levels were also decreased in UV-

irradiated or gamma-irradiated senescent primary human dermal fibroblasts (Fig. 4C and 6B). Lastly, consistent with our findings, up to fourfold decreased miR-15b levels were observed in various models of organismal aging as well as replicative cellular senescence [48, 49, 55, 56], the latter being in accordance with an increased SIRT4 expression in human fibroblasts undergoing replicative senescence (Fig. 1A).

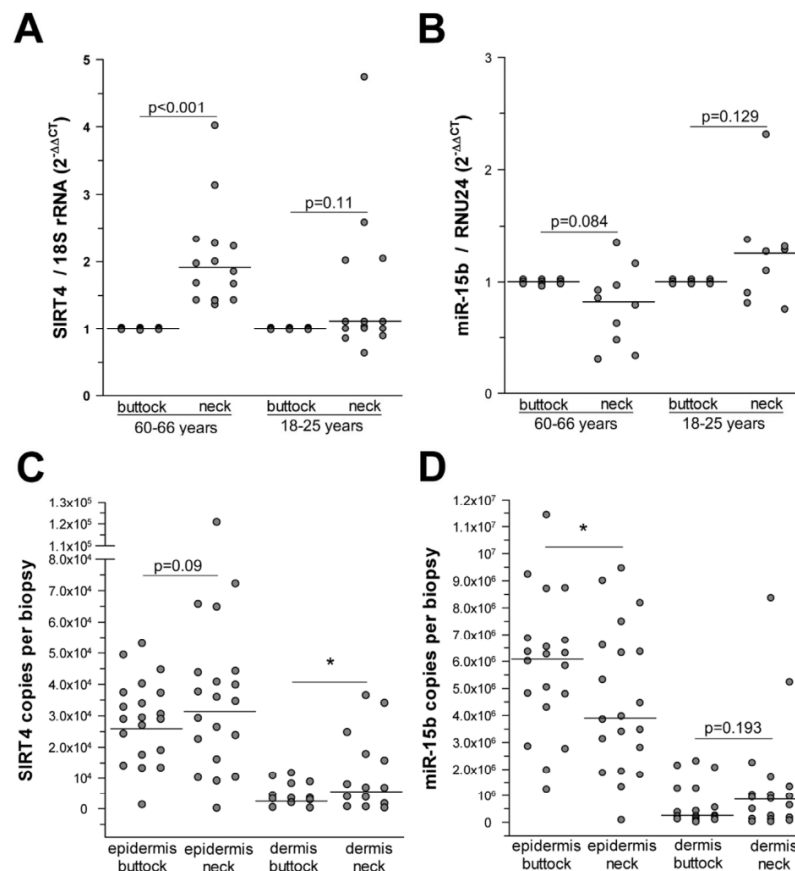


Figure 5. Increased SIRT4 expression is inversely associated with decreased miR-15b levels in human photoaged skin. (A) SIRT4 expression analysis in human skin samples obtained from neck vs. buttock skin of the same individuals (age ranges: 18-25 years and 60-66 years; n=15-16 per group). (B) miR-15b expression analysis in human skin samples obtained from neck vs. buttock skin of the same individuals (age ranges: 18-25 years and 60-66 years; n=9-10 per group). (C, D) Determination of SIRT4 mRNA (c) and miR-15b (d) copy numbers in the epidermal (SIRT4: n=20; miR-15b: n=20) and dermal (SIRT4: n=12-14; miR-15b: n=17-19) compartments isolated from human photoaged skin (neck vs. buttock) of the same individuals (age range: 60-66 years). Median $\pm$ SEM; *p<0.05. To evaluate statistical significance, Wilcoxon signed rank tests were employed.

Inverse expression of miR-15b and SIRT4 *in-vivo* in photoaged human skin

After establishing an inverse correlation between miR-15b and SIRT4 expression in various *in vitro* models of cellular senescence, we next asked whether an analogous scenario exists in organ aging. To answer this question we focused on photoaged human skin, in which the aging process is driven by UV radiation exposure (*i.e.*, photoaging) through mechanisms involving mitochondrial dysfunction [3], and which can be easily distinguished from intrinsically (chronologi-

cal) aged skin by means of the SCINEXATM score [57] (suppl. Fig. 5 & suppl. Material and Methods). Interestingly, a highly significant increase of SIRT4 transcripts was detected in human skin biopsies obtained from photoaged skin (fold increase: 1.91 ± 1.23 ; median $\pm$ SEM, p<0.001; n=16) compared with non-photoaged skin of the same individuals aged 60-66 years or to skin of young individuals (n=15; age range 18-25 years) (Fig. 5A). In a similar trend, the same biopsies showed a decreased expression of miR-15b in photoaged skin samples of the older individuals (0.82 ± 0.11 ; median $\pm$ SEM) as compared with their

intrinsically aged skin counterparts (Fig. 5B). This difference was significant when SIRT4 and miR-15b copy numbers were measured in a skin compartment specific manner. In these experiments, skin biopsies from twenty individuals (age range: 60-66 years) were subjected to dispase II treatment to enzymatically separate the epidermal and dermal compartments followed by a quantitative determination of the copy numbers of SIRT4 and miR-15b using internal standards (see Material & Methods). We found that SIRT4 levels were significantly increased in the dermis of photoaged human skin as compared with non-photoaged skin ($6.75 \times 10^3 \pm 3.31 \times 10^3$ vs. $3.37 \times 10^3 \pm 1.14 \times 10^3$; median $\pm$ SEM; * $p < 0.05$) (Fig. 5C). In addition, there was a trend towards higher SIRT4 copy numbers in photoaged skin, if epidermal compartments were compared with each other. Analysis of miR-15b expression revealed that it was highest in the epidermis as compared with the dermis, thus confirming a pre-

vious report [58]. Importantly, comparison of photoaged vs. non-photoaged skin revealed the following pattern: In the photoaged epidermis significantly less miR-15b copy numbers were detected as compared with non-photoaged epidermis ($3.91 \times 10^6 \pm 0.60 \times 10^6$ vs. $6.13 \times 10^6 \pm 0.57 \times 10^6$; median $\pm$ SEM; * $p < 0.05$), and for the two dermal compartments a trend towards decreased copy numbers in photoaged skin was evident (Fig. 5D). Based on these results we conclude that miR-15b downregulation in the epidermis may contribute to aging-associated SIRT4 expression. Given the high levels of miR-15b in the epidermis (Fig. 5D) [58], it is tempting to speculate that the epidermis and dermis communicate with each other *via* intercellular transport of miRNAs. Such cell-cell communication could be mediated by keratinocyte microvesicles (containing besides proteins and nucleic acids also miRNAs), which have been recently shown to affect gene and protein expression in fibroblasts [59].

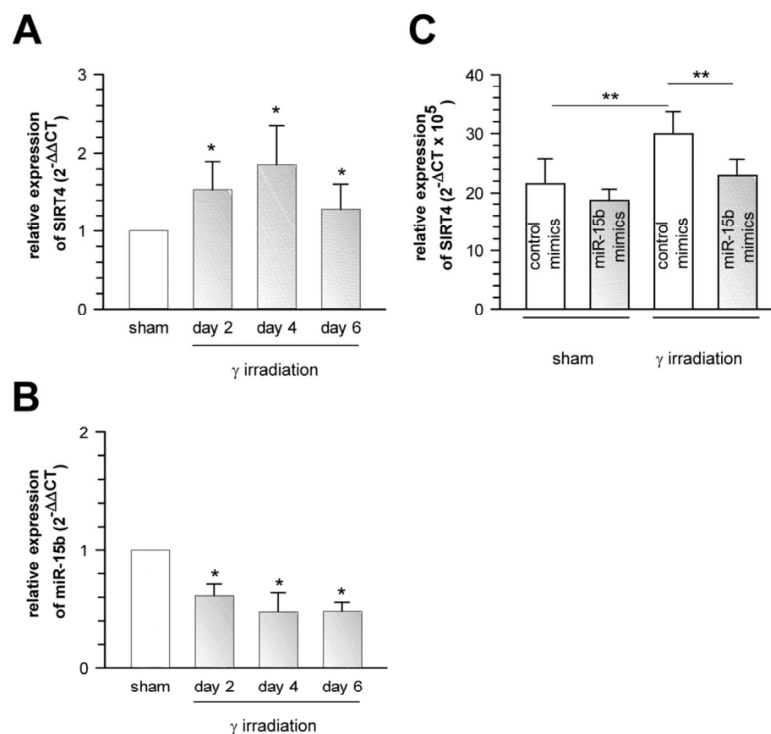


Figure 6. Suppression of senescence-associated SIRT4 upregulation in γ -irradiated primary human dermal fibroblasts by oligonucleotides mimicking the function of endogenous miR-15b. Concomitant upregulation of SIRT4 expression (A) and downregulation of miR-15b levels (B) in human dermal fibroblasts two, four, and six days upon γ -irradiation (single dose of 20 Gy; $n=6$, mean $\pm$ s.d.). To evaluate statistical significance, ANOVA on ranks were performed (* $p < 0.05$). (C) Extrinsically applied miR-15b mimics inhibit the senescence-associated upregulation of SIRT4 mRNA levels in human dermal fibroblasts upon γ -irradiation (single dose of 20 Gy) as compared to irradiated cells transfected with control mimics ($n=5$ independent experiments, mean $\pm$ s.d.). To evaluate statistical significance, ANOVA SNK were performed (** $p < 0.01$).

Alternatively, photoaging-associated SIRT4 increase in the dermis may occur independently from miR-15b expression, possibly associated with downregulation of other miR-15/16 family members as observed in gamma-irradiated human dermal fibroblasts (suppl. Fig. 6). Nevertheless, in all *in vitro* models studied an inverse correlation between SIRT4 and miR-15b was observed to occur during cellular senescence and, irrespective of the precise link between SIRT4 and miR-15b (cell autonomous or paracrine regulation), also in photoaging of human skin and thus in organ aging. Of note, Dong et al. observed inverse alterations of transcript levels of mtSIRTs, i.e. SIRT4 (increased) vs. SIRT3 (decreased) in normal human epidermal keratinocytes upon UVB exposure [60]. In addition, expression of SIRT3 (besides that of SIRT1 and SIRT7) seems to be decreased in photoaged/UV-irradiated skin as compared to non-irradiated control samples [61, 62].

MicroRNA-15a is also stress responsive and downregulated upon γ -irradiation in primary human dermal fibroblasts

miR-15b was the only regulated and senescence-linked miRNA in our miRNA screen (suppl. Table 1) with a uniquely conserved binding site within the 3'-untranslated region (UTR) of the *SIRT4* gene in vertebrates (suppl. Fig. 4). However, it should be noted that this binding site can also be targeted by additional miRNAs (miR-15a/16/195/424/497; suppl. Fig. 4) which recognize the same seed sequence [63]. In addition to miR-15b human dermal fibroblasts also express miR-15a and miR-16-1 at high and comparable copy numbers, whereas the expression levels of miR-16-2, miR-195, and miR-497 were clearly lower (suppl. Fig. 6). In this regard, miR-195 levels are elevated rather than downregulated upon replicative senescence [64]. Interestingly, besides miR-15b, miR-15a (but not miR-16-1) was also stress-responsive and significantly downregulated upon γ IR treatment (suppl. Fig. 6). Thus, SIRT4 expression may be repressed by both miR-15b and miR-15a during cellular senescence and aging, probably in a cell-type and senescence stimulus dependent manner.

Members of the miR-15/16 group are genomically embedded in two host genes, SMC4 (structural maintenance of chromosomes 4) and pseudogene DLEU2 (deleted in leukemia 2). To gain insight into the regulation of miR-15/16 family members during photoaging, we determined the transcript levels of SMC4 and DLEU2, which can be assumed to be coexpressed with miR-15b/16-2 and miR-15a/16-1, respectively [63]. However, as depicted in suppl. Fig. 7, and in contrast to decreased miR-15b levels (Fig.

5B,D), the expression of both SMC4 and DLEU2 was increased in photoaged skin (n=13; age range 60-66 years) as compared to non-photoaged skin of the same individuals. Thus, the expression of miR-15/16 family members is not co-regulated with their host genes during aging. Of note, these microRNAs are subject to global cell stress and p53 regulation [63], and increased miR-15b expression was shown to correlate with tumor cell proliferation and apoptosis [65]. In this regard, miR-15 and miR-16 are direct transcriptional targets of E2F1 and become induced during mitogenic signaling to prevent replicative stress [66, 67]. Expression of E2F1 is downregulated during cellular senescence [68], and a 3.5- to 5.1-fold downregulation of E2F1 transcripts was observed by microarray analysis in spindle stress-induced and γ IR-triggered senescence, respectively (data not shown). Concomitantly, E2F1 protein levels were strongly decreased (suppl. Fig. 8). It is thus tempting to speculate that E2F1 is a major regulator of the miR-15/16 – SIRT4 axis during cellular senescence, with decreased E2F1 causing reduced miR-15/16 levels resulting in increased SIRT4 expression. Interestingly, miR-17-92 represents another major miRNA cluster that is consistently downregulated in senescence and human aging [48] (suppl. Fig. 3). Given that E2F1 induces expression of miR-17-92 [69], it might be that downregulation of the miR-17-92 cluster, similar to miR-15/16, is based on decreased E2F1 levels as well.

MicroRNA-15b directly inhibits stress-induced expression of SIRT4

To assess if miR-15b directly regulates SIRT4 mRNA levels, we exogenously applied oligonucleotides mimicking endogenous miR-15b function (miR-15b “mimics”) to the MCF7 model of spindle stress-triggered senescence as well as to gamma-irradiated senescent human dermal fibroblasts. In these experiments, miR-15b mimics dampened basal SIRT4 mRNA levels and inhibited senescence-associated upregulation of SIRT4 transcripts (suppl. Fig. 9A and Fig. 6C). Moreover, by employing luciferase assays we show that the 3'UTR of human SIRT4 is a direct target of miR-15b, as miR-15b mimics significantly inhibited the relative luciferase activity of a transfected SIRT4 – 3'-UTR construct, but not, when the SIRT4 – 3'-UTR was mutated within the seed sequence for miR-15b (suppl. Fig. 9B). These results show that miR-15b mimics are *per se* sufficient to directly target SIRT4 expression. However, we cannot exclude the possibility that additional miRNAs, like miR-15a, which underlie stress regulation (suppl. Fig. 6) and potentially recognize the 3'-UTR of the *SIRT4* gene, are also of functional relevance for the regulation of SIRT4 expression.

Inhibition of miR-15b promotes mitochondrial ROS generation and reduces mitochondrial membrane potential in a SIRT4-dependent manner

Recent studies showed that miR-15b can act as a negative modulator of cellular ATP levels and mitochondrial function by targeting ADP-ribosylation factor-like 2 (Arl2) [70]. SIRT4 and Arl2 are not the only miRNA targets transcriptionally regulated during cellular senescence and implicated in the regulation of mitochondrial energy metabolism. Using the aging mouse brain model, Li et al. observed an upregulation of a panel of miRNAs predicted to target key genes involved in oxidative phosphorylation, including the mitochondrial complex IV and F0F1 ATPase [71]. Given

these findings we next assessed the role of the miR-15b – SIRT4 axis in mitochondrial function of primary human dermal fibroblasts. Transfection of fibroblasts with miR-15b inhibitors, which caused a significant upregulation of SIRT4 at the transcript (Fig. 7A), protein (Fig. 7B) and protein/mitochondrial localization level (Fig. 7C-E), resulted in a concomitant increase in mitochondrial ROS levels and a decrease of the mitochondrial membrane potential (Fig. 8A, B). Importantly, co-transfection of miR-15b inhibitors with siRNA duplexes against SIRT4 (Fig. 8A, B) or co-treatment with the mitochondria-specific antioxidant mitoQ [72] (in the case of mtROS levels; Fig. 8C) prevented these changes, indicating that miR-15b negatively impacts on mitochondrial function in a SIRT4-dependent manner.

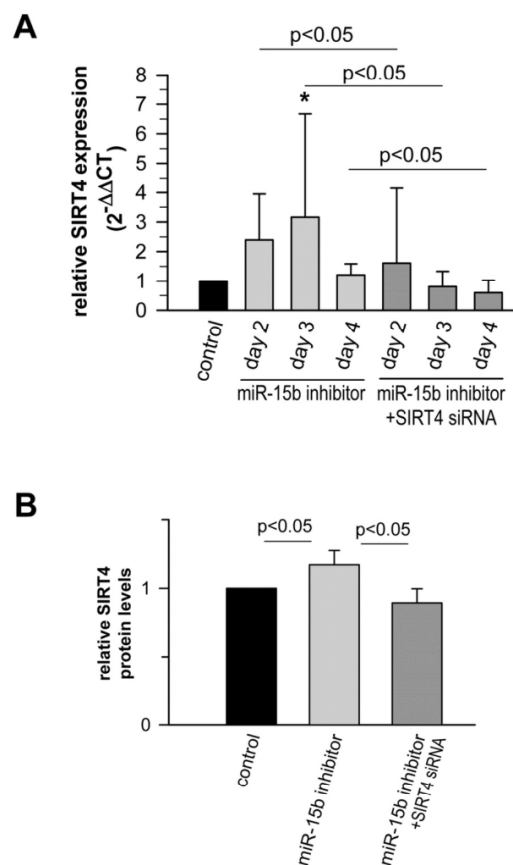


Figure 7. Analysis of the expression of SIRT4 and its colocalization with the mitochondrial marker MTCO2 in human dermal fibroblasts upon transfection of miR-15b inhibitors. (A) Modulation of SIRT4 expression *via* transfection of miR-15b inhibitors in the absence or presence of siRNA duplexes against SIRT4 (mean $\pm$ s.d. from nine to twelve experiments). (B) ELISA-based quantification of relative SIRT4 protein levels (suppl. Material & Methods) in fibroblasts transfected with miR-15b inhibitors in the absence or presence of siRNA duplexes against SIRT4 (mean $\pm$ s.d. from four experiments). To evaluate statistical significance, ANOVA SNK was performed.

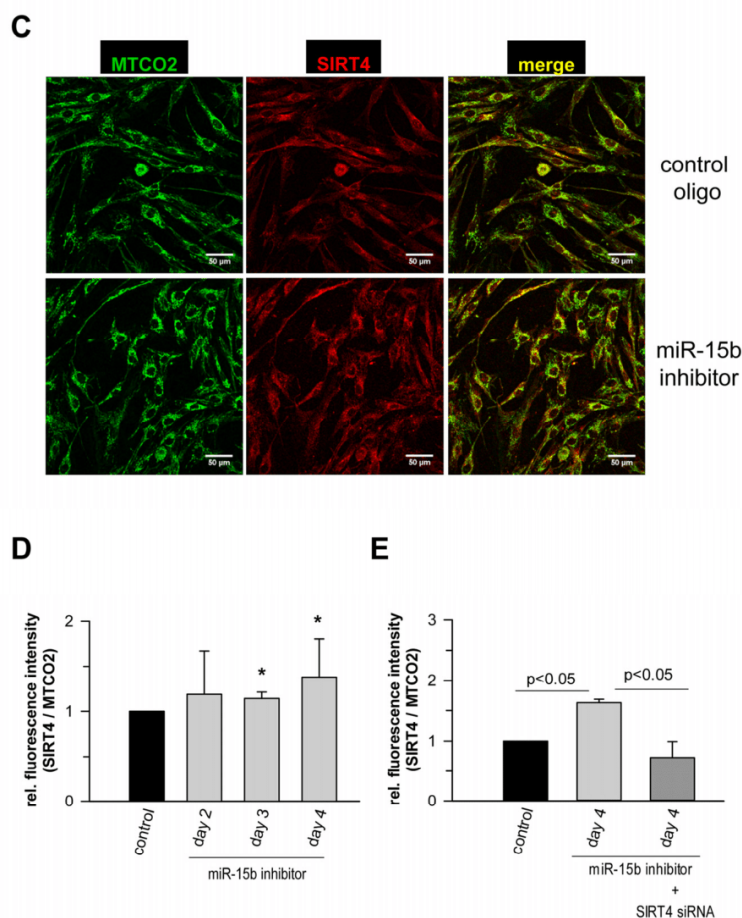


Figure 7. Analysis of the expression of SIRT4 and its colocalization with the mitochondrial marker MTCO2 in human dermal fibroblasts upon transfection of miR-15b inhibitors. (C) Confocal microscopy-based visualization of the mitochondrial marker MTCO2 (green) and SIRT4 (red) in miR-15b inhibitor-transfected fibroblasts as compared to control cells. Total SIRT4 signal intensities were normalized to MTCO2 in miR-15b inhibitor-transfected cells in the absence (D) or presence (E) of siRNA duplexes against SIRT4 using ImageJ software. Mean $\pm$ s.d. from four (D) and three (E) independent experiments. Thirty to fifty cells were analysed per experiment and condition. To evaluate statistical significance, ANOVA on ranks Dunn's tests were performed (* $p < 0.05$).

At a molecular level, SIRT4 may modulate mitochondrial oxidative capacity and function *via* ADP-ribosylation and subsequent inhibition of its target glutamate dehydrogenase (GDH), thereby linking amino acid metabolism with oxidative phosphorylation [35]. A direct involvement of SIRT4 in ROS generation is likely given the finding that the SIRT4-GDH axis modulates mitochondrial permeability *via* the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) [73], which directly influences the mitochondrial membrane potential [74]. However, GDH activity was not altered

in fibroblasts upon transfection with miR-15b inhibitors (suppl. Fig. 10). Alternatively, the miR-15b – SIRT4 axis might affect ROS generation and mitochondrial dysfunction (Fig. 8) *via* another metabolic gate keeper, the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex, because SIRT4 was recently found to inhibit PDH *via* a lipoamidase activity [37]. This assumption is consistent with the observation that defects in the PDH complex are associated with increased ROS (superoxide) accumulation and age-related disorders [75]. Indeed, preliminary data indicate that inhibition of miR-15b

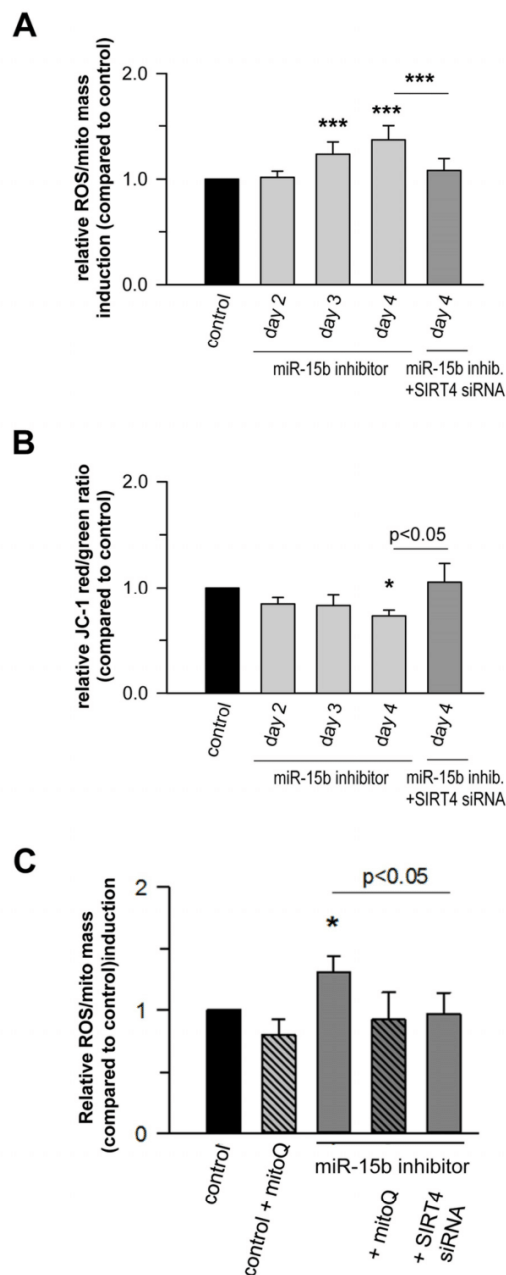


Figure 8. Mir-15b regulates mitochondrial ROS generation and the mitochondrial membrane potential in a SIRT4-dependent manner in primary human dermal fibroblasts. Mitochondrial ROS levels (A) and the mitochondrial membrane potential (B) were determined by staining with cell-permeable dyes and flow cytometric analysis as described in Materials & Methods and by Kalfalah *et al.* [102]. Shown are mean $\pm$ s.d. values from four to six experiments. (C) Mitochondrial ROS levels were determined in the presence of the mitochondria-specific antioxidant mitoQ [72]. Cells were analyzed four days following transfection of miR-15b inhibitors in the absence or presence of siRNA duplexes against SIRT4. Depicted are mean $\pm$ s.d. values from four to six experiments. To evaluate statistical significance, ANOVA on ranks Dunn's tests were performed (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

impedes PDH activity in human dermal fibroblasts in a SIRT4-dependent manner (Lang *et al.*, unpublished). Given that ROS affects mitochondrial fragmentation [76, 77] we next addressed the impact of the miR-15b – SIRT4 axis on mitochondrial morphology. Employing confocal imaging (SIRT4/MTCO2) and ImageJ-based quantification, the fold changes in mitochondrial morphology-related parameters (%area, perimeter, circularity, and solidity) were analysed in dermal fibroblasts four days after one-time transfection with miR-15b inhibitors +/- siRNA duplexes against SIRT4. Interestingly, as indicated in Figure 9, inhibition of miR-15b led to increases in average mitochondrial area (in relation to the average cellular size), perimeter, and circularity which were ameliorated when SIRT4 was depleted. However, we did not observe significant changes in mitochondrial solidity, indicating that the mitochondrial dynamics in terms of connectivity and fragmentation was greatly unchanged. The latter could be supported by preliminary experiments using Mitotracker stainings (data not shown).

Collectively, this study and other studies indicate that SIRT3 and SIRT5 promote mitochondrial energy production, whereas SIRT4 has the opposite effect [34, 73, 78, 79]. SIRT3 and SIRT5 may thus antagonize metabolic abnormalities occurring in cellular senescence and organismal aging, whereas SIRT4 has opposite effects. Mechanistically, SIRT3 deacetylates and thereby activates mitochondrial HMG-CoA synthetase 2 required for ketone body production [80] and functions as a metabolic tumor suppressor [81]. Moreover, SIRT3 deficiency causes a severe dysregulation of mitochondrial protein acetylation which then contributes to the development of the metabolic syndrome [82]. SIRT3 and its mitochondrial acetyl-proteome may therefore be considered as an important network in metabolic homeostasis [83]. SIRT5 has been described to positively regulate the urea cycle [84] and to control glycolysis *via* lysine malonylation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [85]. In contrast, SIRT4, which is induced by DNA damaging agents and exhibits tumor-suppressive activity [86, 87], negatively impacts on gene expression and various metabolic processes in mitochondria. In addition to GDH and PDH, SIRT4 also targets malonyl CoA decarboxylase and thereby regu-

lates lipid homeostasis at the protein [36] and transcript level [79]. Accordingly, knock down of SIRT4 *in vivo* leads to an improved fatty acid oxidation and mitochondrial function [88].

The miR-15b - SIRT4 axis may regulate expression of nuclear encoded mitochondrial genes

It has been reported that overexpression of SIRT4 elicits an AMPK-dependent “retrograde” signaling response

from mitochondria to the nucleus thereby inhibiting expression of nuclear encoded key genes involved in mitochondrial biogenesis [79]. We therefore tested the impact of the miR-15b – SIRT4 axis on the expression of cytochrome C (CytC), a major component of the respiratory chain, as well as TFAM (TFAM, transcription factor A, mitochondrial) and NRF1 (NRF1, nuclear respiratory factor 1), which are both critically involved in mitochondrial gene expression [89, 90] and the antioxidant response [91]. Primary

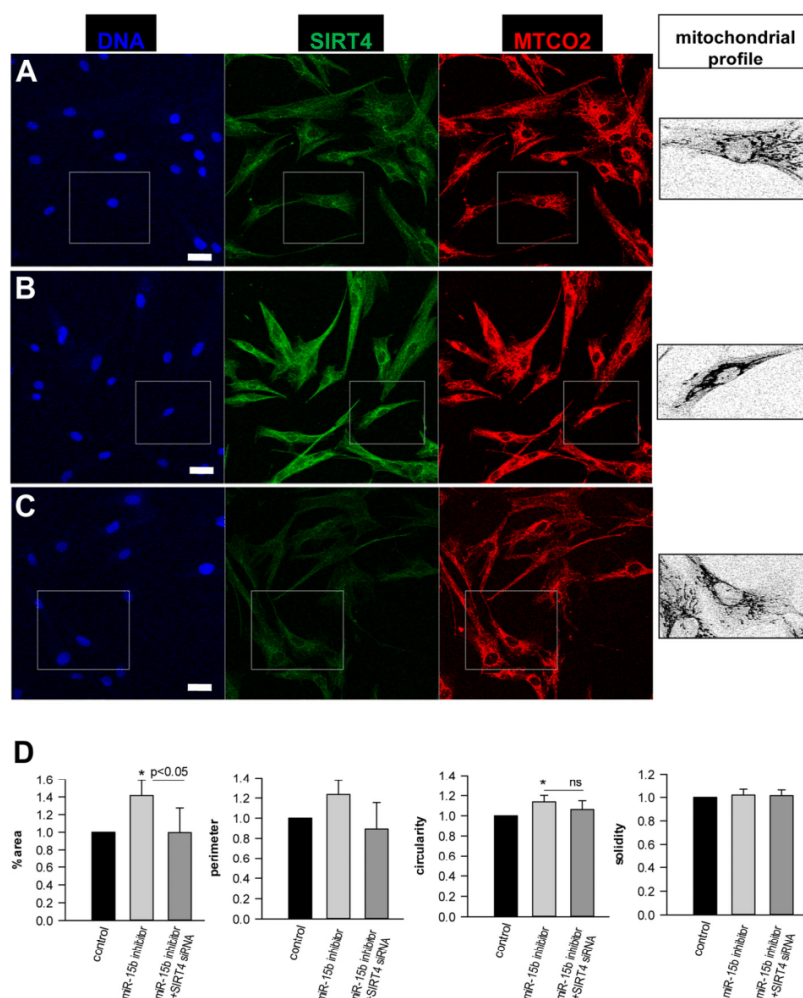


Figure 9. Analysis of the effect of the miR-15b – SIRT4 axis on mitochondrial morphology and fragmentation. Human dermal fibroblasts were transfected with control oligos (A) or miR-15b inhibitor oligos in the absence (B) or (C) presence of siRNA duplexes against SIRT4. Four days later, cells were stained with SIRT4 and MTCO2 specific antibodies. Confocal laser scanning microscopy and an ImageJ macro were employed to analyse fold changes in mitochondrial morphology-related parameters, including %area (total mitochondrial area/total cell area), mitochondrial perimeter, circularity, and solidity. Approximately two hundred cells were analysed per experimental condition. To evaluate statistical significance, ANOVA SNK were performed (*p<0.05). Bar: 20 μ m.

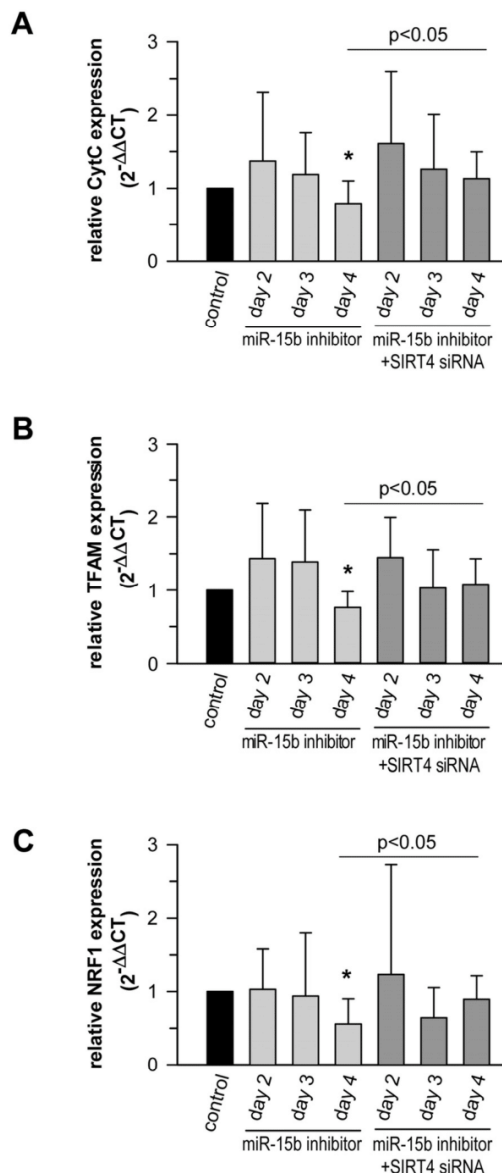


Figure 10. The miR-15b - SIRT4 axis regulates the expression of nuclear encoded mitochondrial genes. Inhibitors against miR-15b were transfected in primary human dermal fibroblasts in the absence or presence of siRNA duplexes against SIRT4. Transcript levels of CytC (A), TFAM (B), and NRF1 (C) were determined by qRT-PCR. Shown are mean $\pm$ s.d. values from nine to thirteen experiments. To evaluate statistical significance, ANOVA on ranks Dunn's tests were performed (* $p < 0.05$).

human dermal fibroblasts transfected with miR-15b inhibitors displayed a significant SIRT4 increase as early as three days after transfection (Fig. 7). Interestingly, under these conditions transcript levels of CytC, TFAM, and NRF1 were significantly reduced by approximately 21 to 44% by day 4 (Fig. 10A-C). The decrease in transcript levels could be prevented when miR-15b inhibitors were co-transfected with siRNA duplexes against SIRT4 showing that it is SIRT4 dependent (Fig. 10A-C). Thus, consistent with the findings of Ho et al. [79], increased SIRT4 expression may antagonize the expression of important nuclear encoded mitochondrial proteins. These results further support the concept of a causal relationship between the miR-15b - SIRT4 axis and ROS generation / mitochondrial dysfunction.

Inhibition of miR-15b impacts on the expression of components of the SASP in a SIRT4-dependent and -independent manner

Senescent cells produce and secrete various autocrine- or paracrine-acting factors, including pro-inflammatory (e.g. IL-6) and pro-migratory (e.g. IL-8) cytokines, growth factors (e.g. VEGF), and proteases like matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), collectively known as the SASP [14, 15, 17, 92-94]. MicroRNAs play an important role in SASP regulation and e.g. prevent an overproduction of inflammatory cytokines and therefore persistent inflammatory responses [17]. This is e.g. illustrated by the senescence associated up-regulation of miR-146b (suppl. Table 1) which serves to tune down the expression of Interleukin-6 (IL-6) and Interleukin-8 (IL-8) *via* downregulating IRAK1 expression and thus NF κ B activity [46]. We therefore tested whether the miR-15b - SIRT4 axis is of functional relevance for the expression of well-known components of the SASP in primary human dermal fibroblasts. Interestingly, miR-15b inhibitors displayed a biphasic impact on the expression of VEGF and the cytokines analysed. We observed an increased expression at day 2 upon transfection of miR-15b inhibitors followed by a clear decrease of transcript levels (31-80%) at day 3 (IFN γ) and day 4 (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, and VEGF) (Fig. 11A-F). The latter decrease was SIRT4 dependent as the expression of all factors was ameliorated when miR-15b inhibitors were co-transfected with siRNA duplexes against SIRT4 (Fig. 11A-F). Of note, the initial rise in cytokine transcript levels upon miR-15b inhibition could be potentially due to increased IRAK2-NF κ B signaling, given that IRAK2 represents a predicted target gene of miR-15b [95] (A. Lang and R. Piekorz, unpublished). Taken together, miR-15b may regulate the SASP, which is typically NF κ B driven [96], at two levels, negatively *via* IRAK2, comparable with

miR146-induced dampening of IL-6 and IL-8 expression *via* IRAK1 targeting [46], and positively *via* SIRT4 downregulation.

The expression of MMP-1, a SASP component that is typically upregulated in photoaged human skin *in vivo* [3], was also increased up to 3.2-fold in fibroblasts upon

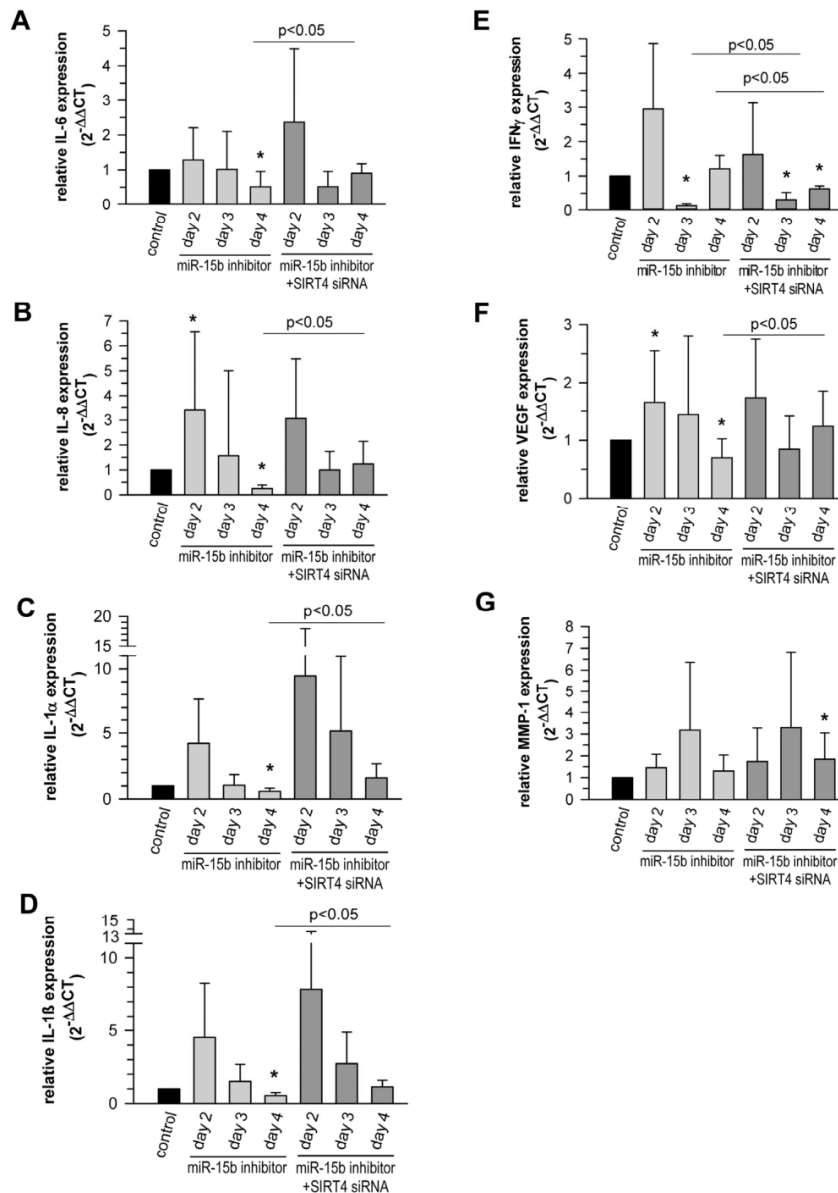


Figure 11. The miR-15b - SIRT4 axis regulates the expression of components of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). Inhibitors against miR-15b were transfected in primary human dermal fibroblasts in the absence or presence of siRNA duplexes against SIRT4. Transcript levels of Interleukin-6 (IL-6) (A), Interleukin-8 (IL-8) (B), Interleukin-1α (IL1α) (C), Interleukin-1β (IL1β) (D), Interferon γ (IFNγ) (E), vascular endothelial growth factor (VEGF) (F), and matrix metalloproteinase-1 (MMP1) (G) were analysed by qRT-PCR. Shown are mean ± s.d. values from nine to thirteen experiments (except C, D, and E, where 5-6 independent experiments were performed). To evaluate statistical significance, ANOVA on ranks Dunn's tests were performed (*p<0.05).

transfection of miR-15b inhibitors (Fig. 11G). However, this effect was SIRT4-independent, since co-transfection of miR-15b inhibitors and SIRT4-specific siRNA duplexes failed to alter the expression kinetics of MMP-1. This observation is of particular interest, because increased MMP-1 expression in photoaged skin is believed to cause profound degradation of collagen fibers and the subsequent development of coarse wrinkles, i.e. a clinical hallmark of photoaged skin [1, 2]. Given our observation that decreased miR-15b levels are also present in photoaged human skin *in vivo*, we thus propose a model for skin aging in which reduced miR-15b disturbs mitochondrial function and contributes to the development of a SASP including an increased production of MMP-1. Further studies employing conditional mouse models deficient in SIRT4 expression and/or function in the skin are necessary to test this hypothesis and to define more closely SIRT4-dependent and -independent pathways downstream of miR-15b.

Taken together, this work identifies miR-15b as a novel regulator of stress induced increase of SIRT4 expression and thereby links the miR-15b – SIRT4 axis to senescence associated mitochondrial (dys)function/redox homeostasis and SASP regulation.

MATERIAL AND METHODS

Ionizing γ -irradiation (γ IR) of primary human dermal fibroblasts. Primary human dermal fibroblasts isolated from the foreskin of two different donors (F623 and F357) were cultured on 10 cm plates as described below. Cells were trypsinized and exposed to γ IR (20 Gy) using a Gammacell 1000 Elite irradiator (Nordion International, Inc., Fleurus, Belgium). After irradiation, cells were plated at a density of $3.6 \times 10^3/\text{cm}^2$ and $1.8 \times 10^3/\text{cm}^2$ (controls, day 2 and days 4 and 6, respectively) and $7.3 \times 10^3/\text{cm}^2$ (20 Gy) and harvested for mRNA analysis on days 2, 4, and 6 after treatment.

RNA extraction from cultured cells and cells subjected to UV or ionizing γ -irradiation and concomitant quantitative real-time PCR analysis (mRNA and miRNA). Cell lysates were homogenized using Qiashredder spin columns (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA without small RNAs (> 200 bp) was extracted using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the standard manufacturers protocol. Total RNA containing small RNAs was isolated using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the supplementary protocol “Purification of total RNA containing miRNA from animal cells using the RNeasy Plus Mini Kit”. Nucleic acid concentrations were measured at 260 nm by

spectrophotometry using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Extracted RNA samples were stored at -80°C .

For relative quantification of mRNAs, total RNA was reverse transcribed to cDNA using the ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer’s instructions. In brief, up to 1 μg RNA was reverse transcribed to cDNA in a final volume of 20 μl using Oligo (dT)₁₅ primers (0.5 $\mu\text{g}/\text{reaction}$) and 3.75 mM MgCl_2 . Each quantitative real-time PCR reaction mixture (20 μl) contained 1 μl of RT product (cDNA transcribed from 50 ng of total RNA), 10 μl of TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) and 1 μl of the appropriate TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) containing primers and probe for the mRNA of interest. The mixture was initially incubated at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 60 s. PCR reactions were carried out on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) in triplicate. Samples were normalized relative to human large ribosomal protein (RPLPO) which served as endogenous control. mRNA levels were compared as $2^{-\Delta\text{Ct}}$ values or relative gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [97].

For relative quantification of miRNAs, total RNA was reverse transcribed using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) according to the manufacturer’s protocol. 10 ng of total RNA in a total volume of 15 μl were transcribed to cDNA using specific primers for each respective miRNA. The reverse transcription (RT) reaction was performed by sequential incubation at 16 $^\circ\text{C}$ for 30 min, 42 $^\circ\text{C}$ for 30 min, and 85 $^\circ\text{C}$ for 5 min. Each quantitative real-time PCR reaction mixture (20 μl) contained 1.33 μl of RT product, 10 μl of TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) and 1 μl of the appropriate TaqMan® MicroRNA Assay (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) containing primers and probe for the miRNA of interest. TaqMan® MicroRNA assays were used as follows. The mixture was initially incubated at 95 $^\circ\text{C}$ for 10 min, followed by 40 cycles of 95 $^\circ\text{C}$ for 15 s and 60 $^\circ\text{C}$ for 60 s. PCR reactions were carried out on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) in triplicate. Samples were normalized relative to human small nucleolar RNA RNU38b or RNU24, which served as endogenous control. mRNA levels were compared as $2^{-\Delta\text{Ct}}$ values or relative gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [97].

TaqMan probes used were: SIRT4: Part No.: 4331182, assay-ID: Hs00202033_m1*; RPLPO: Part No.: 4331182, assay-ID: Hs99999902_m1*; hsa-mir-15b: Part No.: 4427975, assay-ID: 000390; RNU38B (for analysis of cultured cells): Part No.: 4427975, assay-ID: 001004; RNU24 (for analysis of total skin samples): Part No.: 4427975, assay-ID: 001001. Results are given as means $\pm$ s.d. P-values below 0.05 were considered significant.

Analysis of gene expression of components of the SASP and nuclear encoded mitochondrial genes in primary human dermal fibroblasts. qRT-PCR analysis of matrix metalloproteinase-1 (MMP1) was performed essentially as described above by the TaqMan assay (part No.: 4331182, assay-ID: Hs00899658_m1*). Expression of further components of the SASP (IL-6, IL-8, vascular endothelial growth factor [VEGF], IL-1 α , IL-1 β , and IFN γ) as well as nuclear encoded mitochondrial genes (cytC, cytochrome C, TFAM, transcription factor A-mitochondrial; NRF1, nuclear respiratory factor 1) [79] was performed using the Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). PCR primer used were: IL-6 (P05231, 5'-AAAGAGGCACTGGCAGAAAA-3' and 5'-CAGGGGTGGTTATTGCATCT-3'); IL-8 (P10145, 5'-TTTCCACCCCAAATTTATCA-3' and 5'-AACCTACAACAGACCCACA-3'); VEGF (P15692, 5'-GGATTGCGCATTTTATTTTCTTG-3' and 5'-GTATGTATGTGGGTGGGTGTGTCT-3'); TFAM (Q00059, 5'-CTTATAGGGCGGAGTGCGCAG-3' and 5'-GCTGAACGAGGTCTTTTGGT-3'); NRF1 (Q16656, 5'-CACAGAAAAGGTGCTCAAAGGA-3' and 5'-TTTGGGTCACTCCGTGTTC-3'); CytC (P08574, 5'-GAGATGTTTCATGCGGCCAG-3' and 5'-ACGTAGTCCTCACCACCAT-3'); IL1 α (P01583, 5'-TCAGCAAAGAAGTCAAGATGGC-3' and 5'-CCTTCCCGTTGGTTGCTACT-3'); IL1 β (P01584, 5'-CTTCGAGGCACAAGGCACAA-3' and 5'-CTGGAAGGAGCACTTCATCTGT-3'); and IFN γ (P01579, 5'-AGCTCTGCATCGTTTTGGGT-3' and 5'-TTCTGTCACTCTCCTCTTTCCA-3'). Samples were normalized relative to 18S rRNA (X03205) which served as endogenous control (primer used: 5'-GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG-3' and 5'-CATTCTTGCAAATGCTTTTCG-3').

Analysis of SIRT4 expression in human skin samples. Approval had been obtained from the Ethics Committee of the Heinrich-Heine-University. The study has been conducted according to the ethical rules stated in the Declaration of Helsinki Principles and the ICH GCP guideline was observed insofar as applicable. Healthy human volunteers (n=51) from two age groups (young 18-25 years, and old 60-66 years) were enrolled after

written informed consent. All individuals were non-smokers and had no history of any severe skin disease, especially no photosensitivity disorders. Skin types ranged from Fitzpatrick type I to IV. In each volunteer, one 4 mm punch biopsy was taken from neck (i.e. a skin side chronically exposed to UV radiation) and from buttock skin (i.e. a skin side chronically protected from UV radiation), as previously described [98]. Total RNA from human biopsies was isolated as described [99]. Alternatively, skin tissue was disrupted and homogenized in 600 μ l RLT+ buffer (+ 1% β -mercaptoethanol) for 60-90 seconds using an Ultra-Turrax.

Primer for SIRT4 [35] were derived from the sequence NM_012240.2 (5'-GCACACTGGGCTTTGAGC-3' and 5'-CACAATCCAAGCACAGGA-3'). Samples were normalized relative to 18S rRNA (X03205) which served as endogenous control (primer used: 5'-GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG-3' and 5'-CATTCTTGCAAATGCTTTTCG-3'). For comparison of relative expression in real time PCR of unexposed and exposed skin the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used [100]. Alternatively, analysis of SIRT4 mRNA levels in human skin samples was also performed essentially as described above for the analysis of cultured cells.

Quantification of copy numbers of mir15b and SIRT4 in the epidermis and dermis of human skin. Enzymatic separation of epidermis and dermis: 4-mm skin biopsies were enzymatically separated by incubation with 0.6 mg/ml dispase II (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) in PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺ (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany) for 18 h at 4°C. The epidermal and dermal tissue was homogenized in RLT buffer (Qiagen, Hilden; Germany) using a Mixer Mill (Retsch, Haan, Germany) three times with 26 Hz for 3 min. The lysate was further homogenized using a Qiashredder (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA containing small RNAs was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the supplementary protocol "Purification of total RNA containing miRNA from animal cells using the RNeasy Plus Mini Kit". Additionally, buffer RW1 was replaced by buffer RWT. The RNA concentration was determined by spectrophotometric absorbance at 260 nm.

Real-time quantitative RT-PCR analysis: For quantification of miR-15b diluted RNA was reversely transcribed using universal cDNA synthesis kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark). qRT-PCR was performed in quadruplet by using LNA[™] PCR primer sets (hsa-miR-15b product no 204243), and SYBR[®] Green PCR kit (both Exiqon, Vedbaek, Denmark). cDNA synthesis

started with 20 ng RNA in 20 µl qRT-PCR was performed in 15 µl volumes in a Biorad CFX384 real time PCR detection system using the following settings: 95°C, 10 min; 40 amplification cycle at 95°C (10 s) and 60°C (1 min), 1.6°C/s ramp-rate. For quantification of SIRT4, 50 ng RNA was employed for cDNA-synthesis with M-MLV (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). For real time PCR of SIRT4 a TaqMan assay (FAM, # 4331182, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) with the following settings was used: 95°C, 10 min; 40 amplification cycles at 95°C (15 s) and 60°C (1 min).

To avoid different expression of housekeeping genes in the two skin compartments, copy numbers were measured as described [101] using a standard DNA fragment which has been purified with a NucleoSpin® (Macherey & Nagel, Düren, Germany). After spectrophotometrical quantification of the fragment the concentration in copy number/biopsy was calculated using the molecular weight of the standard DNA.

Inhibition of basal and senescence-associated SIRT4 expression in MCF7 cells and primary human dermal fibroblasts by transfection of miR-15b specific “mimics”. Six nmoles of control miRNA mimics or oligonucleotides mimicking endogenous miR-15b function (“miR-15b mimics”; Qiagen, Hilden) were transfected into MCF7 cells seeded on 6-well plates using the HiPerFect transfection reagent (Qiagen) essentially as described by the provider. Immediately thereafter premature senescence by cellular TACC3 depletion was triggered by the addition of doxycycline [22]. SIRT4 mRNA levels were determined four days later by qRT-PCR as described above.

In the case of primary human dermal fibroblasts, cells were transfected with 50 nmoles of control mimics or miR-15b mimics using the DharmaFect transfection reagent essentially as described by the manufacturer (ThermoScientific). Cells were trypsinized twenty four hours after transfection, exposed to γIR (20 Gy) as described above, and thereafter re-seeded on 6-well plates at densities of $7.3 \times 10^3/\text{cm}^2$ (controls) and $10.5 \times 10^3/\text{cm}^2$ (γIR). SIRT4 mRNA levels were determined twenty four hours later by quantitative RT-PCR as described above.

Immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy. Human dermal fibroblasts were subjected to γ-irradiation as described above and seeded in 6-well plates on coverslips. Alternatively, cells were transfected with miR-15b inhibitors in the absence or presence of siRNA duplexes against SIRT4 as described below. Cells were fixed four days later in 4%

paraformaldehyde for 20 min and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 20 min followed by a blocking step with 4% BSA/0.05% saponin for 30 min at room temperature. Subsequently, cells were costained with primary antibodies against the mitochondrial marker MTCO2 (abcam, ab3298; 1:500), SIRT4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-135053; 1:200), and α-Tubulin (Acris antibodies, SM568P, 1:500) overnight at 4°C. Secondary antibodies (Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 543-conjugated goat anti-rabbit IgG, and Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-rat IgG) were from Life Technologies and used at a dilution of 1:500 for 1 hr at room temperature. Analyses were performed with a LSM510-Meta confocal microscope (Zeiss) equipped with 40/1.3 or 63/1.4 immersion objectives and excitation wavelengths of 488 nm, 543 nm, and 633 nm. Cells were examined and pictures were taken at the Z-stack level (0.5 µm) and when indicated further analysed using the ImageJ software v1.49k as described in the suppl. Materials & Methods part.

Transfection of miR-15b “inhibitors” and siRNA duplexes to modulate SIRT4 expression. Primary human dermal fibroblasts were transfected in six-well plates (2×10^5 cells/well) with 6.5 nmoles of miR-15b “inhibitor” oligos (Qiagen, MIN0004586) or control oligos (Qiagen, 1022076) in the presence or absence of 10 nmoles of 27-mcr siRNA duplexes against human SIRT4 (Origene, SR308254) using the DharmaFect transfection reagent essentially as described above. Cells were analysed two, three, and four days after transfection. Transfection efficiency was controlled by employing the siGLO Red transfection indicator (GE Healthcare, D-001630-02-05).

Measurement of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential. Cells were costained with 100 nM MitoTrackerGreen® (Cell Signaling Technology, #9074) and 5 µM MitoSoxRed™ mitochondrial superoxide indicator (Life Technologies, M36008) to determine mitochondrial ROS levels. JC-1 (2 µM; Life Technologies, T3168) was employed to determine the mitochondrial membrane potential. Protocols were followed and flow cytometric measurements performed on a FACSCalibur™ (BD) essentially as described [102]. MitoQ [10-(6'-ubiquinonyl) decyltriphenylphosphonium bromide] [72] (kindly provided by Dr. Mike Murphy, Cambridge) was used as a mitochondria-specific antioxidant thereby treating fibroblasts with a concentration of 100 nM for three days.

Analysis of mitochondrial morphology and fragmentation. Human dermal fibroblasts were

transfected with miR-15b inhibitors in the presence or absence of siRNA duplexes against SIRT4 as described above. Four days later, cells were fixed and stained with SIRT4 and MTCO2 specific antibodies. The mitochondrial network was analysed as described [103] employing an ImageJ Mito-Morphology macro (http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:morphology:mitochondrial_morphology_macro_plugin:start) [104] to evaluate microscopic pictures taken by confocal laser scanning microscopy. Cellular morphology/size was defined by parallel α -Tubulin staining.

Statistical analysis. *In-vitro* data are typically presented as mean $\pm$ SD, *in-vivo* data as vertical point plot with median indicated as horizontal line. When comparing two groups, paired, unpaired t-test, or the non-parametric Wilcoxon signed rank or Mann-Whitney rank sum tests were employed. Multiple comparisons were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) (or on ranks) followed by SNK.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Reza Ahmadian, Jürgen Scheller, Peter Schroeder, Olga Modlich, Inês Ferreira, and members of the Institute of Biochemistry and Molecular Biology II for input, support and critical comments. We thank Christoph Peter and Katharina Schmitz for providing the siGLO Red transfection indicator, Mike Murphy (Cambridge) and Marc Majora for kindly sharing *mitoQ*, and Thomas Haarmann-Stemmann for advice on the luciferase measurements.

Funding

Collaborative Research Center SFB 728 (TP A5, B4 and C1 to R.P.P. and J.K., respectively) and KR871/5-1 (to J.K.) funded by the DFG; GerontoSys (to J.K.) funded by the BMBF; Strategischer Forschungsfond (SFF) of the Heinrich-Heine-University (to R.P.P.); Chinese Academy of Sciences (PIFI-CAS) to J.K.; and the research commission of the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University (to R.P.P., M.U., and S.W.).

Conflict of interest statement

The authors state no conflict of interest.

REFERENCES

1. Krutmann J and Gilchrist BA. Photoaging of skin. In: Skin Aging (Gilchrist BA, Krutmann J). (New York: Springer), 2006; 33-44.
2. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S and Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med*. 1997; 337:1419-1428.

3. Krutmann J and Schroeder P. Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective powerhouse model. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2009; 14:44-49.
4. Koziel R, Greussing R, Maier AB, Declercq L and Jansen-Durr P. Functional interplay between mitochondrial and proteasome activity in skin aging. *J Invest Dermatol*. 2011; 131:594-603.
5. Tigges J, Krutmann J, Fritsche E, Haendeler J, Schaal H, Fischer JW, Kalfalah F, Reinke H, Reifemberger G, Stuhler K, Ventura N, Gundermann S, Boukamp P, et al. The hallmarks of fibroblast ageing. *Mech Ageing Dev*. 2014; 138:26-44.
6. Campisi J and d'Adda di Fagnana F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8:729-740.
7. Ben-Porath I and Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37:961-976.
8. Collado M and Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:472-476.
9. Moiseeva O, Bourdeau V, Roux A, Deschenes-Simard X and Ferbeyre G. Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol*. 2009; 29:4495-4507.
10. Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, Miwa S, Olijslagers S, Hallinan J, Wipat A, Saretzki G, Rudolph KL, Kirkwood TB, et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol*. 2010; 6:347.
11. Passos JF and Zglinicki TV. Mitochondrial dysfunction and cell senescence - skin deep into mammalian aging. *Aging (Albany NY)*. 2012; 4:74-75.
12. Chuaire-Noack L. The dual role of senescence in tumorigenesis. *Int J Morphol*. 2010; 28:37-50.
13. Hildebrand DG, Lehle S, Borst A, Haferkamp S, Essmann F and Schulze-Osthoff K. α -Fucosidase as a novel convenient biomarker for cellular senescence. *Cell Cycle*. 2013; 12:1922-1927.
14. Singh M and Piekorz RP. Senescence-associated lysosomal α -L-fucosidase (SA- α -Fuc): A sensitive and more robust biomarker for cellular senescence beyond SA- β -Gal. *Cell Cycle*. 2013; 12:1996.
15. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013; 75:685-705.
16. Demaria M, Desprez PY, Campisi J and Velarde MC. Cell autonomous and non-autonomous effects of senescent cells in the skin. *J Invest Dermatol*. 2015; doi: 10.1038/jid.2015.108.
17. Rodier F and Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011; 192:547-556.
18. Waldera-Lupa DM, Kalfalah F, Safferling K, Boukamp P, Poschmann G, Volpi E, Gotz-Rosch C, Bernerd F, Haag L, Huebenthal U, Fritsche E, Boege F, Grabe N, et al. Characterization of skin aging associated secreted proteins (SAASP) produced by dermal fibroblasts isolated from intrinsically aged human skin. *J Invest Dermatol*. 2015; doi: 10.1038/jid.2015.120.
19. Schmidt S, Essmann F, Cirstea IC, Kuck F, Thakur HC, Singh M, Kletke A, Janicke RU, Wiek C, Hanenberg H, Ahmadian MR, Schulze-Osthoff K, Nurnberg B, et al. The centrosome and mitotic spindle apparatus in cancer and senescence. *Cell Cycle*. 2010; 9:4469-4473.
20. Thakur HC, Singh M, Nagel-Steger L, Kremer J, Prumbaum D, Fansa EK, Ezzahoini H, Nouri K, Gremer L, Abts A, Schmitt L,

- Raunser S, Ahmadian MR, et al. The centrosomal adaptor TACC3 and the microtubule polymerase chTOG interact via defined C-terminal subdomains in an Aurora-A kinase-independent manner. *J Biol Chem*. 2014; 289:74-88.
21. Thakur HC, Singh M, Nagel-Steger L, Prumbaum D, Kalawy Fansa E, Gremer L, Ezzahoini H, Abts A, Schmitt L, Raunser S, Ahmadian MR and Piekorz RP. Role of centrosomal adaptor proteins of the TACC family in the regulation of microtubule dynamics during mitotic cell division. *Biol Chem*. 2013; 394:1411-1423.
22. Schmidt S, Schneider L, Essmann F, Cirstea IC, Kuck F, Kletke A, Jänicke RU, Wiek C, Hanenberg H, Ahmadian MR, Schulze-Osthoff K, Nurnberg B and Piekorz RP. The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program. *Oncogene*. 2010; 29:6184-6192.
23. Haigis MC and Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*. 2010; 5:253-295.
24. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC and Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell*. 2005; 16:4623-4635.
25. Benavente CA, Schnell SA and Jacobson EL. Effects of niacin restriction on sirtuin and PARP responses to photodamage in human skin. *PLoS One*. 2012; 7:e42276.
26. Chang HC and Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2014; 25:138-145.
27. Donmez G and Guarente L. Aging and disease: connections to sirtuins. *Aging Cell*. 2010; 9:285-290.
28. Guarente L. Sirtuins in aging and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007; 72:483-488.
29. Palacios JA, Herranz D, De Bonis ML, Velasco S, Serrano M and Blasco MA. SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination *J Cell Biol*. 2010; 191:1299-1313.
30. Sasaki T, Maier B, Bartke A and Scramble H. Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal. *Aging Cell*. 2006; 5:413-422.
31. German NJ and Haigis MC. Sirtuins and the Metabolic Hurdles in Cancer. *Curr Biol*. 2015; 25:R569-583.
32. Li X and Kazgan N. Mammalian sirtuins and energy metabolism. *Int J Biol Sci*. 2011; 7:575-587.
33. Pirinen E, Lo Sasso G and Auwerx J. Mitochondrial sirtuins and metabolic homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012; 26:759-770.
34. Verdin E, Hirschey MD, Finley LW and Haigis MC. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends Biochem Sci*. 2010; 35:669-675.
35. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindrich R, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*. 2006; 126:941-954.
36. Laurent G, German NJ, Saha AK, de Boer VC, Davies M, Koves TR, Dephore N, Fischer F, Boanca G, Vaitheesvaran B, Lovitch SB, Sharpe AH, Kurland IJ, et al. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol Cell*. 2013; 50:686-698.
37. Mathias RA, Greco TM, Oberstein A, Budayeva HG, Chakrabarti R, Rowland EA, Kang Y, Shenk T and Cristea IM. Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell*. 2014; 159:1615-1625.
38. Chainiaux F, Magalhaes JP, Eliaers F, Remacle J and Toussaint O. UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34:1331-1339.
39. Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F, Ninane N, Carrard G, Friguet B, de Longueville F, Boffe S, Remacle J and Toussaint O. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci*. 2005; 118:743-758.
40. Essmann F, Engels IH, Totzke G, Schulze-Osthoff K and Janicke RU. Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Res*. 2004; 64:7065-7072.
41. Blumstein A, Kumar N, Leger K, Traenkle J, Oostrum J, Rehauer H, Baudis M and Hottiger MO. PKC signaling prevents irradiation-induced apoptosis of primary human fibroblasts. *Cell Death Dis*. 2013; 4:e498.
42. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A and Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010; 5:99-118.
43. Garbers C, Kuck F, Aparicio-Siegmund S, Konzak K, Kessenbrock M, Sommerfeld A, Haussinger D, Lang PA, Brenner D, Mak TW, Rose-John S, Essmann F, Schulze-Osthoff K, et al. Cellular senescence or EGFR signaling induces Interleukin 6 (IL-6) receptor expression controlled by mammalian target of rapamycin (mTOR). *Cell Cycle*. 2013; 12:3421-3432.
44. Dulic V. Senescence regulation by mTOR. *Methods Mol Biol*. 2013; 965:15-35.
45. Csibi A, Fendt SM, Li C, Poulgiannis G, Choo AY, Chapski DJ, Jeong SM, Dempsey JM, Parkhitko A, Morrison T, Henske EP, Haigis MC, Cantley LC, et al. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell*. 2013; 153:840-854.
46. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Orjalo AV, Rodier F, Lithgow GJ and Campisi J. MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-1. *Aging (Albany NY)*. 2009; 1:402-411.
47. Greussing R, Hackl M, Charoentong P, Pauck A, Monteforte R, Cavinato M, Hofer E, Scheideler M, Neuhaus M, Micutkova L, Mueck C, Trajanoski Z, Grillari J, et al. Identification of microRNA-mRNA functional interactions in UVB-induced senescence of human diploid fibroblasts. *BMC Genomics*. 2013; 14:224.
48. Hackl M, Brunner S, Fortschegger K, Schreiner C, Micutkova L, Muck C, Laschober GT, Lepperdinger G, Sampson N, Berger P, Herndler-Brandstetter D, Wieser M, Kuhnel H, et al. miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging. *Aging Cell*. 2010; 9:291-296.
49. Holly AC, Grellscheid S, van de Walle P, Dolan D, Pilling LC, Daniels DJ, von Zglinicki T, Ferrucci L, Melzer D and Harries LW. Comparison of senescence-associated miRNAs in primary skin and lung fibroblasts. *Biogerontology*. 2015; DOI 10.1007/s10522-015-9560-5.
50. Hong L, Lai M, Chen M, Xie C, Liao R, Kang YJ, Xiao C, Hu WY, Han J and Sun P. The miR-17-92 Cluster of microRNAs Confers Tumorigenicity by Inhibiting Oncogene-Induced Senescence. *Cancer Res*. 2010; 70:8547-8557.

51. Lafferty-Whyte K, Cairney CJ, Jamieson NB, Oien KA and Keith WN. Pathway analysis of senescence-associated miRNA targets reveals common processes to different senescence induction mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792:341-352.
52. Grillari J, Hackl M and Grillari-Voglauer R. miR-17-92 cluster: ups and downs in cancer and aging. *Biogerontology*. 2010; 11:501-506.
53. Xu N, Brodin P, Wei T, Meisgen F, Eidsmo L, Nagy N, Kemeny L, Stahle M, Sonkoly E and Pivarcsi A. MiR-125b, a microRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. *J Invest Dermatol*. 2011; 131:1521-1529.
54. Xu D, Takeshita F, Hino Y, Fukunaga S, Kudo Y, Tamaki A, Matsunaga J, Takahashi RU, Takata T, Shimamoto A, Ochiya T and Tahara H. miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011; 193:409-424.
55. Faraonio R, Salerno P, Passaro F, Sedia C, Iaccio A, Bellelli R, Nappi TC, Comegna M, Romano S, Salvatore G, Santoro M and Cimino F. A set of miRNAs participates in the cellular senescence program in human diploid fibroblasts. *Cell Death Differ*. 2012; 19:713-721.
56. Marasa BS, Srikantan S, Masuda K, Abdelmohsen K, Kuwano Y, Yang X, Martindale JL, Rinker-Schaeffer CW and Gorospe M. Increased MKK4 abundance with replicative senescence is linked to the joint reduction of multiple microRNAs. *Sci Signal*. 2009; 2:ra69.
57. Vierkotter A, Ranft U, Kramer U, Sugiri D, Reimann V and Krutmann J. The SCINEXA: a novel, validated score to simultaneously assess and differentiate between intrinsic and extrinsic skin ageing. *J Dermatol Sci*. 2009; 53:207-211.
58. Ning MS and Andl T. Control by a hair's breadth: the role of microRNAs in the skin. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70:1149-1169.
59. Huang P, Bi J, Owen GR, Chen W, Rokka A, Koivisto L, Heino J, Hakkinen L and Larjava H. Keratinocyte Microvesicles Regulate the Expression of Multiple Genes in Dermal Fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2015; doi: 10.1038/jid.2015.320.
60. Dong K, Pelle E, Yarosh DB and Pernodet N. Sirtuin 4 identification in normal human epidermal keratinocytes and its relation to sirtuin 3 and energy metabolism under normal conditions and UVB-induced stress. *Exp Dermatol*. 2012; 21:231-233.
61. Lasserre C, D'Arcangelis A, Mildner M, Bhatt P and Tschachler E. The effect of ultraviolet irradiation on sirtuin expression in human skin. *J Invest Dermatol* 2007; 127:S57. doi:10.1038/sj.jid.5701090.
62. Serravallo M, Jagdeo J, Glick SA, Siegel DM and Brody NI. Sirtuins in dermatology: applications for future research and therapeutics. *Arch Dermatol Res*. 2013; 305:269-282.
63. Finnerty JR, Wang WX, Hebert SS, Wilfred BR, Mao G and Nelson PT. The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases. *J Mol Biol*. 2010; 402:491-509.
64. Maes OC, Sarojini H and Wang E. Stepwise up-regulation of microRNA expression levels from replicating to reversible and irreversible growth arrest states in WI-38 human fibroblasts. *J Cell Physiol*. 2009; 221:109-119.
65. Satzger I, Mattern A, Kuettler U, Weinspach D, Voelker B, Kapp A and Gutzmer R. MicroRNA-15b represents an independent prognostic parameter and is correlated with tumor cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma. *Int J Cancer*. 2010; 126:2553-2562.
66. Bueno MJ, Gomez de Cedron M, Laresgoiti U, Fernandez-Piqueras J, Zubiaga AM and Malumbres M. Multiple E2F-induced microRNAs prevent replicative stress in response to mitogenic signaling. *Mol Cell Biol*. 2010; 30:2983-2995.
67. Ofir M, Hacohen D and Ginsberg D. miR-15 and miR-16 are direct transcriptional targets of E2F1 that limit E2F-induced proliferation by targeting Cyclin E. *Mol Cancer Res*. 2011; 9:440-447.
68. Chen T, Xue L, Niu J, Ma L, Li N, Cao X, Li Q, Wang M, Zhao W, Li G, Wang J and Tong T. The retinoblastoma protein selectively represses E2F1 targets via a TAAC DNA element during cellular senescence. *J Biol Chem*. 2012; 287:37540-37551.
69. He S, Yang S, Deng G, Liu M, Zhu H, Zhang W, Yan S, Quan L, Bai J and Xu N. Aurora kinase A induces miR-17-92 cluster through regulation of E2F1 transcription factor. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67:2069-2076.
70. Nishi H, Ono K, Iwanaga Y, Horie T, Nagao K, Takemura G, Kinoshita M, Kuwabara Y, Mori RT, Hasegawa K, Kita T and Kimura T. MicroRNA-15b modulates cellular ATP levels and degenerates mitochondria via Arl2 in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2010; 285:4920-4930.
71. Li N, Bates DJ, An J, Terry DA and Wang E. Up-regulation of key microRNAs, and inverse down-regulation of their predicted oxidative phosphorylation target genes, during aging in mouse brain. *Neurobiol Aging*. 2009; 32:944-955.
72. Saretzki G, Murphy MP and von Zglinicki T. MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress. *Aging Cell*. 2003; 2:141-143.
73. Verma M, Shulga N and Pastorino JG. Sirtuin-4 modulates sensitivity to induction of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1827:38-49.
74. Zorov DB, Juhaszova M and Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014; 94:909-950.
75. Stacpoole PW. The pyruvate dehydrogenase complex as a therapeutic target for age-related diseases. *Aging Cell*. 2012; 11:371-377.
76. Fan X, Hussien R and Brooks GA. H2O2-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49:1646-1654.
77. Willems PH, Rossignol R, Dieteren CE, Murphy MP and Koopman WJ. Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Cell Metab*. 2015; 22:207-218.
78. de Moura MB, Uppala R, Zhang Y, Van Houten B and Goetzman ES. Overexpression of mitochondrial sirtuins alters glycolysis and mitochondrial function in HEK293 cells. *PLoS One*. 2014; 9:e106028.
79. Ho L, Titus AS, Banerjee KK, George S, Lin W, Deota S, Saha AK, Nakamura K, Gut P, Verdin E and Kolthur-Seetharam U. SIRT4 regulates ATP homeostasis and mediates a retrograde signaling via AMPK. *Aging (Albany NY)*. 2013; 5:1-15.
80. Shimazu T, Hirschey MD, Hua L, Dittenhafer-Reed KE, Schwer B, Lombard DB, Li Y, Bunkenborg J, Alt FW, Denu JM, Jacobson MP and Verdin E. SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell Metab*. 2010; 12:654-661.
81. Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, van der Meer R, Nguyen P, Savage J, Owens KM, Vassilopoulos A, Ozden O, Park SH, et al. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for

maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell*. 2010; 17:41-52.

82. Hirschey MD, Shimazu T, Jing E, Grueter CA, Collins AM, Aouizerat B, Stancakova A, Goetzman E, Lam MM, Schwer B, Stevens RD, Muehlbauer MJ, Kakar S, et al. SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Mol Cell*. 2011; 44:177-190.

83. Dittenhafer-Reed KE, Richards AL, Fan J, Smallegan MJ, Fotuhi Siahipirani A, Kemmerer ZA, Prolla TA, Roy S, Coon JJ and Denu JM. SIRT3 mediates multi-tissue coupling for metabolic fuel switching. *Cell Metab*. 2015; 21:637-646.

84. Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC and Guarente L. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell*. 2009; 137:560-570.

85. Nishida Y, Rardin MJ, Carrico C, He W, Sahu AK, Gut P, Najjar R, Fitch M, Hellerstein M, Gibson BW and Verdin E. SIRT5 Regulates both Cytosolic and Mitochondrial Protein Malonylation with Glycolysis as a Major Target. *Mol Cell*. 2015; 59:321-332.

86. Jeong SM, Lee A, Lee J and Haigis MC. SIRT4 protein suppresses tumor formation in genetic models of Myc-induced B cell lymphoma. *J Biol Chem*. 2014; 289:4135-4144.

87. Jeong SM, Xiao C, Finley LW, Lahusen T, Souza AL, Pierce K, Li YH, Wang X, Laurent G, German NJ, Xu X, Li C, Wang RH, et al. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. *Cancer Cell*. 2013; 23:450-463.

88. Nasrin N, Wu X, Fortier E, Feng Y, Bare OC, Chen S, Ren X, Wu Z, Streeper RS and Bordone L. SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells. *J Biol Chem*. 2010; 285:31995-32002.

89. Campbell CT, Kolesar JE and Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1819:921-929.

90. Hock MB and Kralli A. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol*. 2009; 71:177-203.

91. Biswas M and Chan JY. Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 244:16-20.

92. Cahu J. SASP: roadblock for tissue re-organization. *Aging (Albany NY)*. 2013; 5:641-642.

93. Coleman PR, Chang G, Hutas G, Grimshaw M, Vadas MA and Gamble JR. Age-associated stresses induce an anti-inflammatory senescent phenotype in endothelial cells. *Aging (Albany NY)*. 2013; 5:913-924.

94. Waldera-Lupa DM, Kalfalah F, Safferling K, Boukamp P, Poschmann G, Volpi E, Gotz-Rosch C, Bernerd F, Haag L, Huebenthal U, Fritsche E, Boege F, Grabe N, et al. Characterization of Skin aging Associated Secreted Proteins (SAASP) Produced by Dermal Fibroblasts Isolated from Intrinsically Aged Human Skin. *J Invest Dermatol*. 2015; 135:1954-1968.

95. Zhong G, Cheng X, Long H, He L, Qi W, Xiang T, Zhao Z and Zhu B. Dynamically expressed microRNA-15b modulates the activities of CD8⁺ T lymphocytes in mice with Lewis lung carcinoma. *J Transl Med*. 2013; 11:71.

96. Freund A, Patil CK and Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J*. 2011; 30:1536-1548.

97. Schmittgen TD and Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008; 3:1101-1108.

98. Berneburg M, Gattermann N, Stege H, Grewe M, Vogelsang K, Ruzicka T and Krutmann J. Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. *Photochem Photobiol*. 1997; 66:271-275.

99. Grether-Beck S, Muhlberg K, Brenden H, Felsner I, Brynjolfsdottir A, Einarsson S and Krutmann J. Bioactive molecules from the Blue Lagoon: in vitro and in vivo assessment of silica mud and microalgae extracts for their effects on skin barrier function and prevention of skin ageing. *Exp Dermatol*. 2008; 17:771-779.

100. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25:402-408.

101. Grether-Beck S, Felsner I, Brenden H, Kohne Z, Majora M, Marini A, Jaenicke T, Rodriguez-Martin M, Trullas C, Hupe M, Elias PM and Krutmann J. Urea uptake enhances barrier function and antimicrobial defense in humans by regulating epidermal gene expression. *J Invest Dermatol*. 2012; 132:1561-1572.

102. Kalfalah F, Sobek S, Bornholz B, Gotz-Rosch C, Tigges J, Fritsche E, Krutmann J, Kohrer K, Deenen R, Ohse S, Boerries M, Busch H and Boege F. Inadequate mito-biogenesis in primary dermal fibroblasts from old humans is associated with impairment of PGC1A-independent stimulation. *Exp Gerontol*. 2014; 56:59-68.

103. Barbato DL, Tatulli G, Aquilano K and Ciriolo MR. Mitochondrial Hormesis links nutrient restriction to improved metabolism in fat cell. *Aging (Albany NY)*. 2015; 7:869-881.

104. Dagda RK, Cherra SJ, 3rd, Kulich SM, Tandon A, Park D and Chu CT. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J Biol Chem*. 2009; 284:13843-13855.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Cellular TACC3 depletion in MCF7 cells. The centrosomal protein TACC3 was depleted essentially as described [1-3]. Cells were plated at a density of $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ (control shRNA) and $6.7 \times 10^3/\text{cm}^2$ (TACC3 shRNA). Expression of control or TACC3 shRNA was induced by adding doxycycline (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to the culture medium for 4 days.

Ionizing γ -irradiation (γIR) of MCF7 cells. Trypsinized cells were exposed to γIR (20 Gy) using a Gammacell 1000 Elite irradiator (Nordion International, Inc., Fleurus, Belgium). After irradiation, MCF7 cells were plated at a density of $6.7 \times 10^3/\text{cm}^2$, $3.3 \times 10^3/\text{cm}^2$, $0.8 \times 10^3/\text{cm}^2$ (control), and $8.3 \times 10^3/\text{cm}^2$ (20 Gy) and harvested for analysis on days 2, 4 and 6 after treatment.

Repetitive UV treatment of primary human skin fibroblasts. Human dermal fibroblasts were isolated from the foreskin of four different donors (age: 1 to 3 years). Approval had been obtained from the Ethics Committee of the Heinrich-Heine-University. The study has been conducted according to the ethical rules stated in the Declaration of Helsinki Principles and the ICH GCP guideline was followed as applicable. Cells were cultivated in Eagle's minimum essential medium with Earle's salts (MEM, PAA Laboratories, Pasching, Austria) and supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 1% antibiotics/antimycotics (penicillin, streptomycin, amphotericin B), and 1% glutamine (Invitrogen) and then cultivated on 100 mm plastic culture dishes (Greiner, Solingen, Germany) at 37°C in humidified air with 5% CO_2 . Cells were used between passages five and ten and grown to confluency before treatment. Twenty four hours before UV irradiation media were changed to serum-free MEM.

Cells were exposed once daily to a single dose of $100 \text{ mW}/\text{m}^2$ ultraviolet radiation from TL20W/12RS SLV (Phillips, Hamburg, Germany) fluorescent bulbs, which primarily emit in the range of 290-315 nm (= UVB) for a period of five days. For irradiation, medium was replaced by phosphate-buffered saline (37°C , Invitrogen). Control cells (sham treated) were held on room temperature under similar conditions, but without irradiation. Following the last treatment, cells were cultivated for 24 and 72 hours with serum-free MEM medium at 37°C .

Quantification of copy numbers of miR-15/16 family members in primary human dermal fibroblasts exposed to γIR . Isolation of miRNAs from control and γIR -treated (20 Gy) fibroblasts and real-time quantitative

RT-PCR analysis was performed essentially as described in the Material and Methods section of the manuscript. PCR primer sets miRCURY LNATM Universal RT were obtained from Exiqon (Vedbaek, Denmark) and used were: hsa-miR-15b, product no. 204243; miR-15a, product no. 204066; miR-16-1, product no. 205902; miR-16-2 product no. 204309; miR-195, product no. 204128; miR-497, product no. 204354.

Quantification of SIRT4 protein levels by ELISA. Cells were lysed in buffer containing 1% Nonidet P-40, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 2 mM EDTA and protein concentrations were measured using the Bio-Rad protein assay kit. Ninety-six well plates (M9410, Sigma) were coated overnight at 4°C with 20 μg protein lysate in 100 μl coating buffer (0.03 M Na_2CO_3 , 0.07 M NaHCO_3 , pH 9.6). Plates were washed with PBS-T (0.05% Tween) and blocked with 1% BSA for 2 h at room temperature followed by successive incubation steps with a primary antibody against SIRT4 (H-300, Santa Cruz; overnight at 4°C) diluted in blocking solution (1:200) and secondary antibodies (#7074, Cell Signaling; 1:1000; 2 h at room temperature). Signal development was started by the addition of 100 μl BM Blue POD Substrate (11442066001, Roche), stopped by adding 100 μl H_2SO_4 (1.8 M), and analyzed at 450 nm using an Infinite 200 PRO NanoQuant Microplate Reader (Tecan).

Calculation of the SCINEXATM Score. Calculation of the SCINEXATM Score was performed as described previously [4] except for the following adaptations: In this study the different skin parameters were scored from 0 to 5, not 0 to 3. Regarding extrinsic skin aging the following parameters were not included: Yellowness and dryness of the skin, pseudo scars, permanent erythema as well as the pathological skin conditions (carcinomas, melanoma, actinic pre-cancerosis) as these were exclusion criteria of the study. Instead, we included sunburn and lentigines solaris at two different body sites and evaluated coarse wrinkles at six different locations. Regarding intrinsic skin aging we evaluated lax skin appearance at two different body sites instead of judging the overall appearance of the skin. In addition coarse wrinkles formation was evaluated at six different locations while reduced fat tissue was not included as a scoring parameter. The overall number of parameters remained the same as in the original publication.

Analysis of SMC4 and DLEU2 expression in human skin samples. Expression levels of SMC4 and DLEU2 were determined by real-time quantitative RT-PCR

analysis as described in the Material and Methods section of the manuscript. PCR primer for SMC4 and DLEU2 were derived from the sequences: NM_05496.3 (SMC4: 5'-TCG AAG CCA TGG AAT TGA CTT-3' and 5'-TGT TCA GTC TGG-CCT TTT GGT-3') and NM_002612.1 (DLEU2: 5'-AGC ACA GTG GAA CTA GAT CCT AGT ACA G-3' and 5'-GTT-TGG AGA TCA GTA GAA GGA AAT TTC-3').

Microarray analysis (mRNA and miRNA). Microarray analyses were done using the "Quick Amp Labeling Kit, one color" (Agilent Technologies Cat.-No 5190-0442) and the RNA Spike In Kit, one color (Agilent Technologies Cat.-No 5188-5282) following the manufacturer's protocol. We used 500 ng of total RNA as starting material for cDNA synthesis. The cDNA synthesis and *in vitro* transcription (IVT) were performed according the manufacturer's instructions. The quantity and labeling efficiency of the labeled cRNA were measured photometrical (NanoDrop ND-1000, Fisher Scientific). For gene expression analysis the labeled cRNA was hybridized onto "Whole Human Genome 4x44K Microarrays" (Agilent Technologies, Cat.-No G4112F) for 17 hours at 65°C and 10 rpm in the hybridization oven (Agilent Technologies). For miRNA expression analysis the "Human miRNA Microarray (V2)" (Cat.-No G4471A-019118; Agilent Technologies) was employed. Washing of the arrays were performed according to the manufacturer's recommendation. The Cy3 fluorescence intensities were detected by scanning the arrays using the Agilent DNA microarray scanner (G2505B). The resulting image files were analyzed with Feature extraction software. Raw data files were processed and analysed using the GeneSpring Software Version 11 (Agilent Technologies) and were deposited at GEO (Gene Expression Omnibus) (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE45729).

SIRT4 - 3'-UTR luciferase bindings assays employing miR-15b specific "mimics." HeLa cells were grown on 6-well plates and seeded at 1.2×10^5 cells per well 24 h before transfection using the lipofectamine 2000 transfection reagent (Life Technologies). Cells were co-transfected with firefly luciferase reporter plasmids (4 µg; pMirTarget, Origene; SC202362; harboring the SIRT4 - 3'-UTR with a wild-type miR-15b seed sequence [5'-TGCTGCTA-3'] or a mutated miR-15b seed sequence [5'-TGCGACTA-3']) and the pRL-SV40 renilla luciferase vector (0.3 µg; Promega) together with 50 nmoles of oligonucleotides mimicking endogenous miR-15b function ("miR-15b mimics"; Qiagen) or

control miRNA mimics. Cells were harvested 36 h after transfection and luciferase activity was determined using the Dual Luciferase® assay system (Promega) and a MicrolumetPlus Luminometer LB96V (EG&G Berthold). Depicted are normalized luciferase activities (ratio of firefly/renilla luciferase signal intensities).

Enzymatic glutamate dehydrogenase (GDH) activity assay. GDH activity was determined colorimetrically employing an assay kit (Sigma-Aldrich, MAK099) essentially as described by the manufacturer. Cells were lysed in GDH assay buffer and protein concentration of the lysates was measured using the protein assay kit II (Bio-Rad, #500-0002). Enzymatic activities were determined from 25 µg of lysate by calculating the rates of enzymatic activity from the slope of the linear part of the reaction curve.

Immunoblot analysis. Total cell lysates were prepared in lysis buffer containing 1% Nonidet P-40, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 2 mM EDTA. Protein samples were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond C, GE Healthcare, Freiburg, Germany). Blots were probed with an E2F1-specific antibody (#3742; Cell Signaling). Following incubation with the secondary antibody signals were visualized using a LI-COR imaging system. GAPDH levels (antibody from Abcam, Cambridge) served as loading control.

Image analysis of confocal microscopic pictures. Stacked confocal images were analyzed using the ImageJ software v1.49k (Z project average, using the α -Tubulin signal to create a region of interest; filter: median, radius: 4; background subtracted, rolling=200; threshold: huang white; particles analyzed from the size of 500 px to infinity, edges were excluded) by employing the following macro command:

```
original = getTitle();
# run Z Project "Median" with all ten pictures
run("Z Project...");
run("Split Channels");
# select the alpha-Tubulin-channel
selectWindow("C4-AVG_" + original);
run("Median...", "radius=4");
run("Subtract Background...", "rolling=200");
run("Auto Threshold", "method=Huang white");
run("Watershed")
run("Analyze Particles...", "size=500-Infinity exclude add");
selectWindow("C2-AVG_" + original);
roiManager("Measure");
close();
selectWindow("C3-AVG_" + original);
roiManager("Measure");
```

```
close();
selectWindow("C4-AVG_" + original);
close();
```

SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES

Please browse Full text version of this manuscript to see Supplementary Figures, Tables and Datasets.

Supplementary Figures 1-10 and legends are listed below.

Suppl. Figure 1. Microarray based expression analysis of SIRT isoforms in MCF7 cells at day 4 of doxycycline-induced TACC3 shRNA expression (A) or four days upon γ -irradiation (γ IR) using 20 Gy as single dose (B). For SIRT3 and SIRT5, three oligos each were detected on the original arrays with rather inconsistent expression changes. Only SIRT4 mRNA levels were significantly and consistently upregulated both in TACC3-depleted and γ -irradiated cells. Mean $\pm$ s.d. from four replicates of TACC3-depleted or γ -irradiated cells vs. controls. To evaluate statistical significance, Student's t-tests were performed (* p <0.05).

Suppl. Figure 2. Imaging-based analysis of the expression and colocalization of SIRT4 with the mitochondrial marker MTCO2 in γ -irradiated human dermal fibroblasts. Confocal sections (0.5 μ m) depicting MTCO2 (green) – SIRT4 (red) and their colocalization (yellow to orange) are shown for control (sham treated) and γ -irradiated fibroblasts.

Suppl. Figure 3. qPCR-based quantification of selected and senescence-associated miRNAs in MCF7 cells at day 4 of doxycycline-induced TACC3 shRNA expression. (A) members of the miR-17-92 and miR-106a-363 clusters are downregulated upon TACC3 depletion. (B) qPCR-based expression analysis of miRNAs which were differentially expressed upon TACC3 depletion (suppl. Table 1). Means $\pm$ s.d. from three independent experiments analysing TACC3-depleted cells vs. controls are depicted. To evaluate statistical significances, Student's t-tests were performed (* p <0.05; ** p <0.01).

Suppl. Figure 4. Prediction of miRNA binding sites using the TargetScan software. (A) Overview of candidate miRNAs binding to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the *SIRT4* gene in vertebrates. The putative binding site for miR-15/16/195/424/497 (all miRNAs display the same seed region of 8 bp) is highly conserved among vertebrates (Hsa, *Homo sapiens*). Among these miRNAs, only miR-15b was

downregulated in TACC3-depleted MCF7 cells undergoing premature senescence (suppl. Table 1). (B) Comparison between conserved and poorly conserved miRNA sites in the human *SIRT4* gene. Algorithms used by TargetScan (www.targetscan.org) have been described elsewhere [5-7].

Suppl. Figure 5. Differentiation between extrinsic (UV radiation) and intrinsic (chronological) skin aging through determination of the SCINEXATM score. Human skin samples obtained from neck vs. buttock skin of the same individuals (age ranges: 18-25 years and 60-66 years; median $\pm$ SEM) were assessed for multiple parameters as previously described [4] in order to distinguish between extrinsic (score >2) and intrinsic (score <2) skin aging. To evaluate statistical significance, Wilcoxon signed rank tests were performed (** p <0.001).

Suppl. Figure 6. Quantitative analysis of members of the miR-15/16 family in primary human dermal fibroblasts. Determination of copy numbers of the indicated miRNAs of the miR-15/16 family in fibroblasts four days (A) and six days (B) after γ IR (20 Gy) as compared to control (sham treated) cells. Means $\pm$ s.d. from six independent experiments are depicted. To evaluate statistical significance for each miRNA, ANOVA (or on ranks) SNK was performed. For clarity, results are depicted for each day separately and sorted by copy number ranking (* p <0.05).

Suppl. Figure 7. Increased expression of SMC4 and DLEU2 in human photoaged skin. Analysis of SMC4 and DLEU2 expression by real-time quantitative RT-PCR in human skin samples obtained from neck vs. buttock skin of the same individuals [age ranges: 18-25 years (A) and 60-66 years (B); n=13-14 per group; median $\pm$ SEM]. To evaluate statistical significance, Wilcoxon signed rank tests were performed (** p <0.001).

Suppl. Figure 8. The protein levels of E2F1, a putative regulator of the miR-15/16 – SIRT4 axis, decrease during stress induced senescence. E2F1 protein levels were analysed in MCF7 cells at day 6 upon doxycycline-induced TACC3 shRNA expression (A) or γ -irradiation (γ IR) using 20 Gy as single dose (B).

Suppl. Figure 9. Suppression of senescence-associated SIRT4 upregulation in MCF7 cells by oligonucleotides mimicking the function of endogenous miR-15b. (A) Extrinsically applied miR-15b mimics inhibit basal SIRT4 mRNA levels and prevent their upregulation in MCF7 cells driven into premature senescence through TACC3 depletion (n=3

independent experiments, mean $\pm$ s.d.). To evaluate statistical significance, ANOVA on ranks SNK were performed (* $p < 0.05$). **(B)** The 3'-UTR of the human SIRT4 mRNA is a direct target of miR-15b. HeLa cells were co-transfected with firefly luciferase reporter plasmids harbouring the SIRT4 - 3'-UTR or a mutated SIRT4 - 3'-UTR (mut.) and the pRL-SV40 renilla luciferase vector together with oligonucleotides mimicking endogenous miR-15b function ("miR-15b mimics") or control oligonucleotides. Results are given as means $\pm$ s.d (n=4 independent experiments with all transfections performed in triplicate). To evaluate statistical significance, ANOVA on Ranks SNK was performed (* $p < 0.05$).

Suppl. Figure 10. Transfection of MicroRNA-15b inhibitors does not result in an inhibition of glutamate dehydrogenase (GDH) activity in human dermal fibroblasts. Fibroblasts were transfected with miR-15b inhibitors or control oligonucleotides and GDH activity was determined at the indicated days following. N=5-6, mean $\pm$ s.d.; to evaluate statistical significances, Mann-Whitney rank sum test were performed.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Schmidt S, Schneider L, Essmann F, Cirstea IC, Kuck F, Kletke A, Jänicke RU, Wiek C, Hanenberg H, Ahmadian MR, Schulze-Osthoff K, Nürnberg B and Piekorz RP. The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program. *Oncogene*. 2010; 29:6184-6192.
2. Schneider L, Essmann F, Kletke A, Rio P, Hanenberg H, Schulze-Osthoff K, Nürnberg B and Piekorz RP. TACC3 depletion sensitizes to paclitaxel-induced cell death and overrides p21WAF-mediated cell cycle arrest. *Oncogene*. 2008; 27:116-125.
3. Schneider L, Essmann F, Kletke A, Rio P, Hanenberg H, Wetzel W, Schulze-Osthoff K, Nürnberg B and Piekorz RP. The transforming acidic coiled coil 3 protein is essential for spindle-dependent chromosome alignment and mitotic survival. *J Biol Chem*. 2007; 282:29273-29283.
4. Vierkötter A, Ranft U, Kramer U, Sugiri D, Reimann V and Krutmann J. The SCINEXA: a novel, validated score to simultaneously assess and differentiate between intrinsic and extrinsic skin ageing. *J Dermatol Sci*. 2009; 53:207-211.
5. Friedman RC, Farh KK, Burge CB and Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009; 19:92-105.
6. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP and Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. 2007; 27:91-105.
7. Lewis BP, Burge CB and Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120:15-20.

Suppl. Table 1: miRNAs differentially regulated upon TACC3 depletion in MCF7 cells thereby undergoing premature senescence.

miRNA	Regulation	Fold increase / decrease	P value
hsa-miR-146b-5p	up	3,82	0,0094
hsa-miR-1977	up	2,34	0,0345
hsa-miR-181a*	up	2,20	0,0174
hsa-miR-193b*	up	2,14	0,0243
hsa-miR-141	up	1,98	0,0046
hsa-miR-1973	up	1,92	0,0229
hsa-miR-29b-1*	up	1,77	0,0033
hsa-miR-125b	up	1,72	0,0322
hsa-miR-21*	up	1,71	0,0213
hsa-miR-491-3p	up	1,69	0,0001
hsa-miR-30c	up	1,68	0,0203
hsa-miR-200a*	up	1,64	0,0189
hsa-miR-30e	up	1,54	0,0450
hsa-miR-200c*	up	1,53	0,0424
hsa-miR-1275	up	1,53	0,0002
hsa-miR-183*	down	3,34	0,0037
hsa-miR-501-3p	down	2,65	0,0046
hsa-miR-345	down	2,63	0,0140
hsa-miR-18a	down	2,27	0,0071
hsa-miR-194	down	2,07	0,0429
hsa-miR-33a	down	2,06	0,0005
hsa-miR-218	down	1,99	0,0341
hsa-miR-32	down	1,94	0,0046
hsa-miR-17	down	1,93	0,0205
hsa-miR-18b	down	1,84	0,0169
hsa-miR-19a	down	1,83	0,0115
hsa-miR-19b	down	1,83	0,0109
hsa-miR-7	down	1,82	0,0388
hsa-miR-192	down	1,77	0,0072
hsa-miR-19b-1*	down	1,75	0,0011
hsa-miR-101	down	1,70	0,0301
hsa-miR-362-3p	down	1,70	0,0051
hsa-miR-769-5p	down	1,64	0,0164
hsa-miR-20a	down	1,62	0,0339
hsa-miR-15b	down	1,61	0,0207
hsa-miR-590-5p	down	1,57	0,0243
hsa-miR-503	down	1,54	0,0283
hsa-miR-219-5p	down	1,52	0,0284

Analysis of differentially expressed miRNAs using the Genespring software (ver11) (expression changes ≥ 1.5 -fold were determined four days after DOX-induced TACC3 shRNA expression that triggers premature senescence; $p \leq 0.05$; student's t-test).

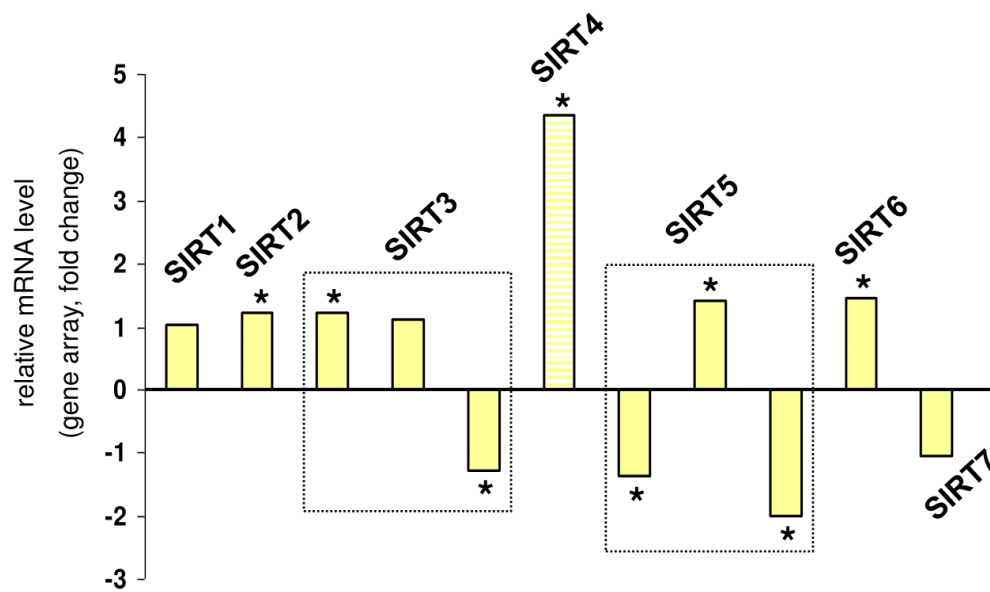
Suppl. Table 2: Overview of the number of differentially regulated, putative miRNA target genes vs. the total number of candidate miRNA target genes.

	miRNA	Differentially regulated putative target genes	Candidate target genes (total)	P value
1	hsa-miR-17	138	1601	0,000011
2	hsa-miR-20a	138	1594	0,000008
3	hsa-miR-30e	129	1445	0,000004
4	hsa-miR-30c	124	1440	0,000031
5	hsa-miR-19a	124	1385	0,000004
6	hsa-miR-19b	124	1383	0,000004
7	hsa-miR-15b	108	1359	0,001533
8	hsa-miR-21*	99	1345	0,021258
9	hsa-miR-32	96	992	0,000002
10	hsa-miR-218	75	928	0,005707
11	hsa-miR-101	65	855	0,032452
12	hsa-miR-125b	61	845	0,088203
13	hsa-miR-7	63	473	0,000007
14	hsa-miR-503	35	355	0,002857
15	hsa-miR-18a	32	320	0,003698
16	hsa-miR-18b	32	320	0,003698
17	hsa-miR-590-5p	30	307	0,006633
18	hsa-miR-219-5p	29	417	0,342896
19	hsa-miR-491-3p	25	278	0,028984
20	hsa-miR-194	23	363	0,651865
21	hsa-miR-382-3p	21	327	0,634298
22	hsa-miR-146b-5p	20	168	0,002443
23	hsa-miR-33a	15	376	0,148934
24	hsa-miR-192	13	125	0,051686
25	hsa-miR-345	11	140	0,277760
26	hsa-miR-501-3p	9	241	0,211704
27	hsa-miR-769-5p	7	126	1,000000
28	hsa-miR-1275	3	90	0,493812

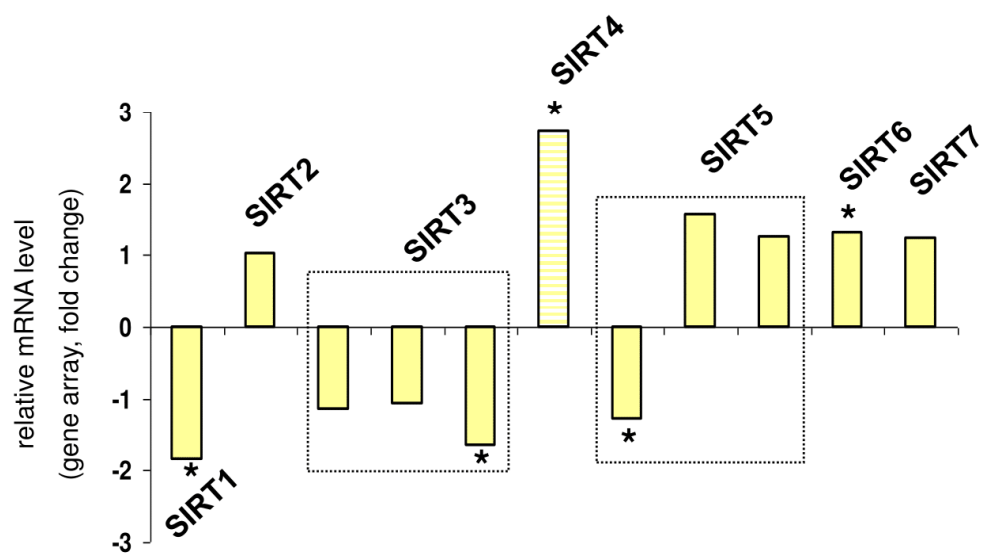
Analysis of putative target mRNAs differentially regulated by miRNAs was performed using the Genespring software (ver11). Expression changes ≥ 1.75 were determined four days after DOX-induced TACC3 shRNA expression and senescence induction ($p \leq 0.05$; student's t-test). As indicated in the last column, significant correlations between the total number of putative target mRNAs vs. the number of differentially expressed candidate target mRNAs were determined using Fisher's exact test ($p \leq 0.05$) and a Bonferroni correction (highly significant miRNA-mRNA correlations with $p \leq 0.0018$ are indicated in bold).

A

TACC3 depletion
(TACC3 shRNA vs. control shRNA, day 4 of DOX treatment)

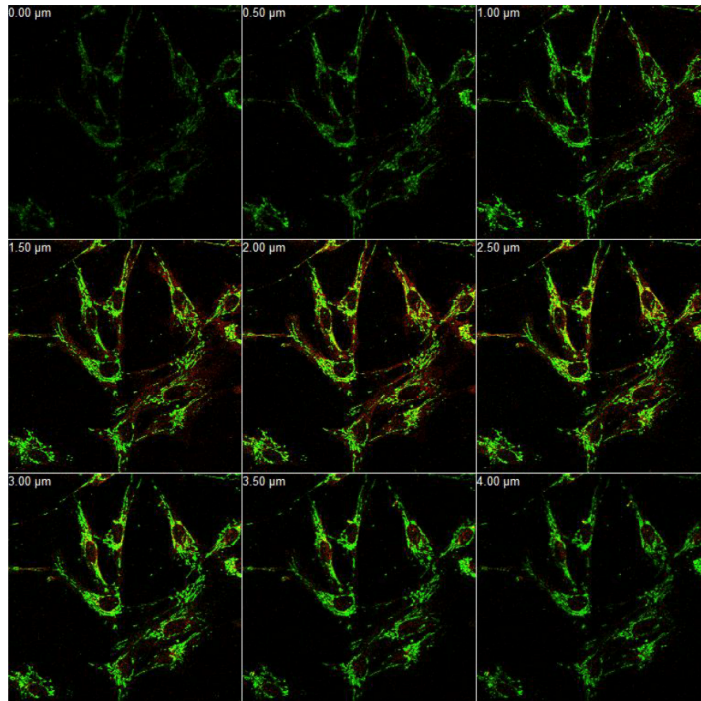
**B**

γ IR (20 Gy) vs. control (day 4)

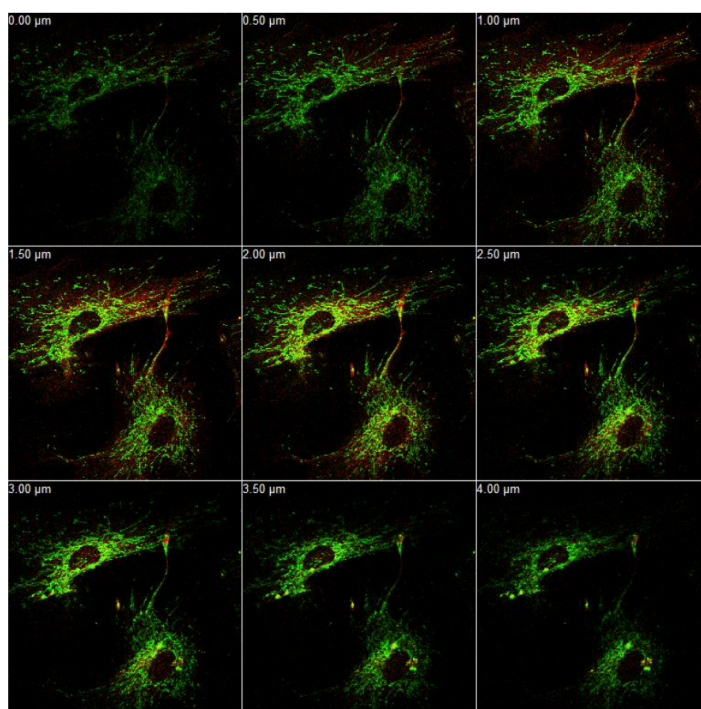


suppl. Figure 1

Merge (MTCO2 / SIRT4)

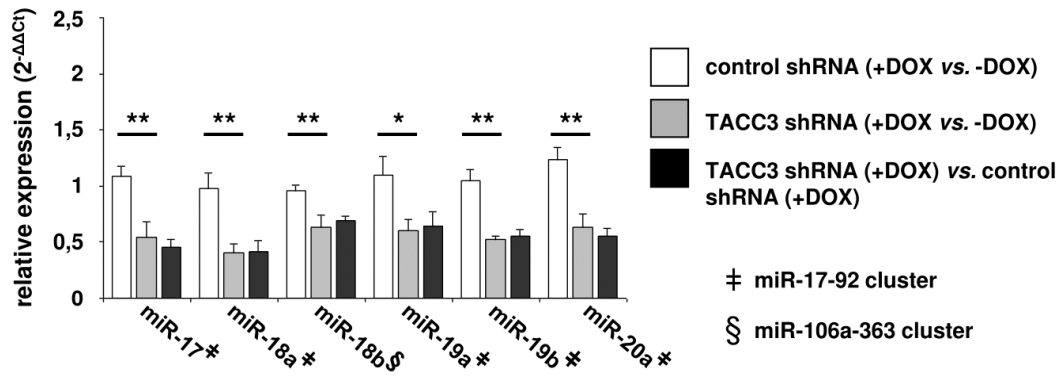
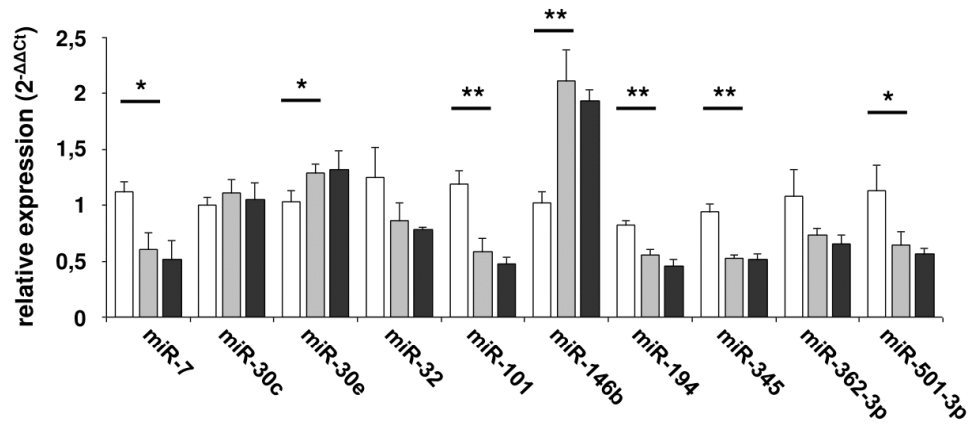


sham



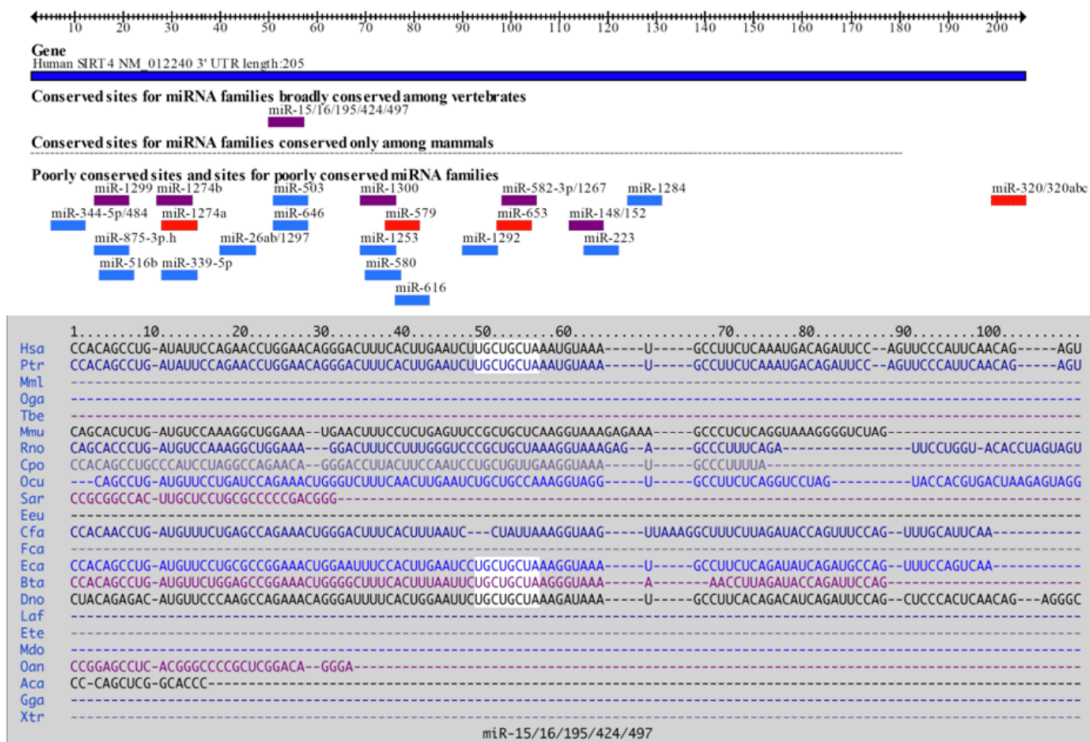
γ IR

suppl. Figure 2

A**B**

suppl. Figure 3

A



http://www.targetscan.org/cgi-bin/vert_50/view_gene.cgi?gs=SIRT4&taxid=9606&members=&showcnc=1&shownc=1

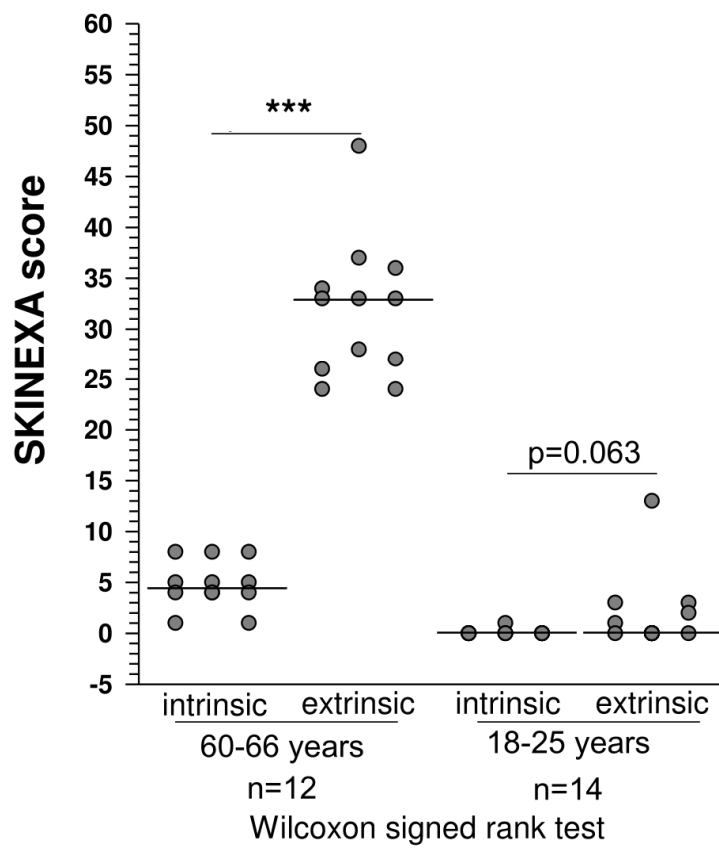
B

Human SIRT4 3' UTR miRNA Table
Table sorted by total context score [Sort table by aggregate P_{CT}]
miRNA families broadly conserved among vertebrates

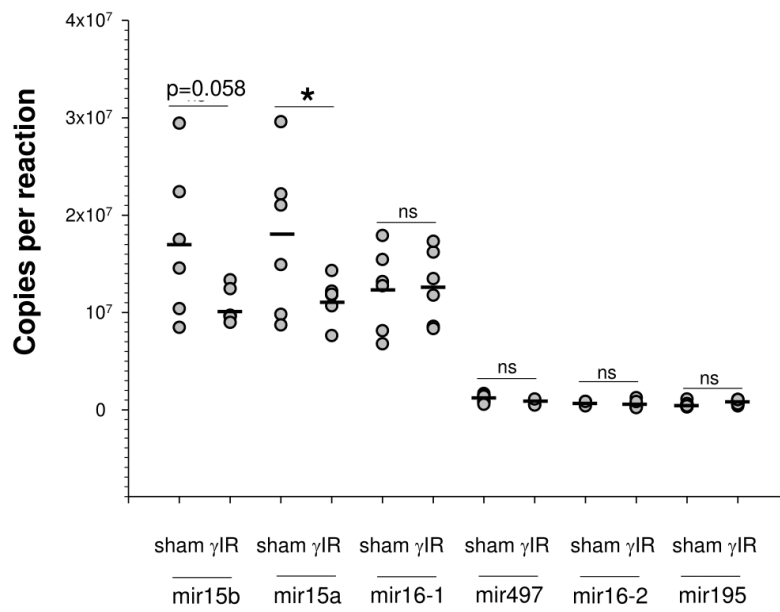
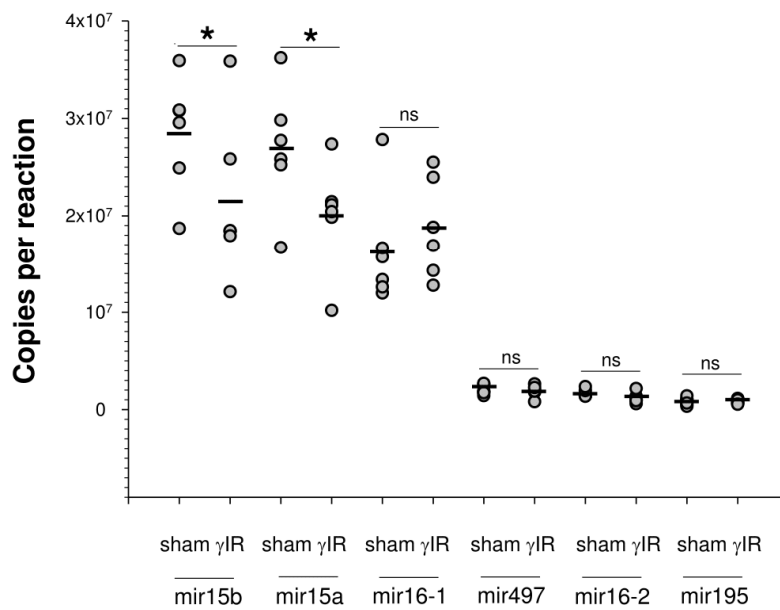
miRNA	conserved sites				poorly conserved sites				Total Context score	Aggregate P_{CT}
	Total	8mer	7mer-m8	7mer-1A	Total	8mer	7mer-m8	7mer-1A		
miR-15/16/195/424/497	1	1	0	0	0	0	0	0	-0.47	< 0.1
miR-148/152	0	0	0	0	1	1	0	0	-0.32	0.22
miR-503	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.20	< 0.1
miR-26ab/1297	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.16	< 0.1
miR-223	0	0	0	0	1	0	0	1	-0.13	0.20

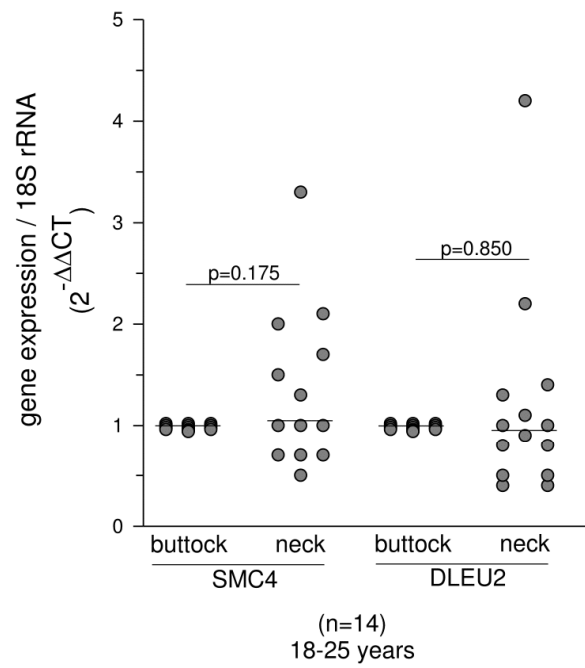
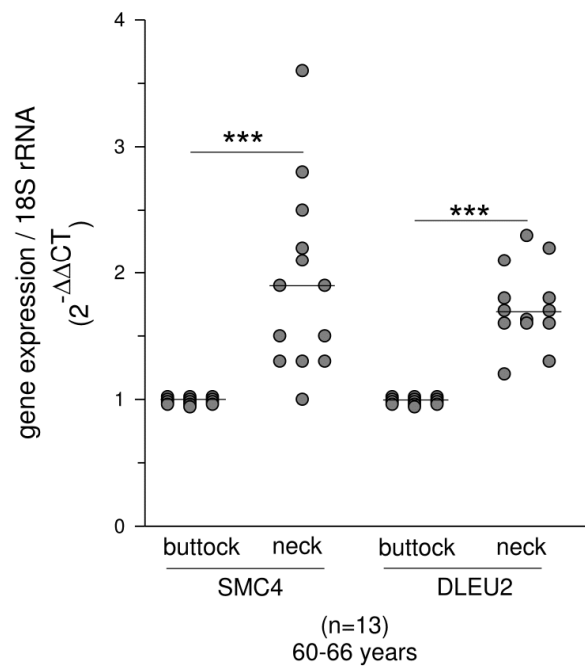
http://www.targetscan.org/cgi-bin/vert_50/view_genetable.cgi?gs=SIRT4&taxid=9606&members=&showcnc=1&shownc=1&sortText=cs

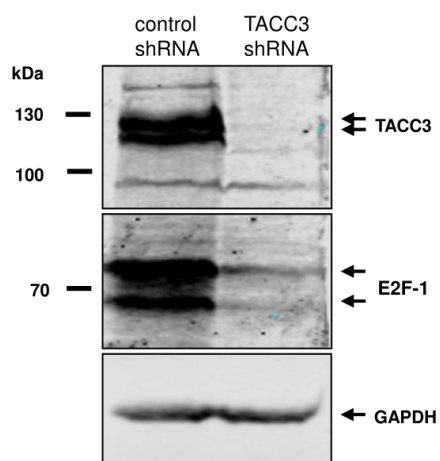
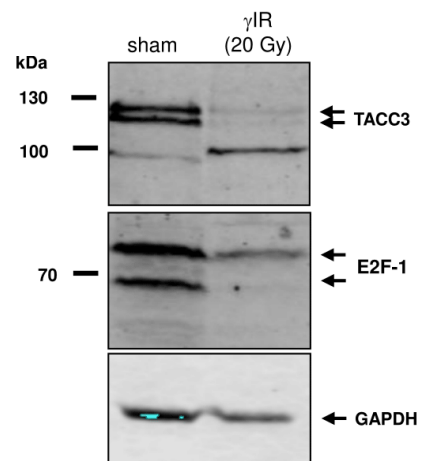
suppl. Figure 4



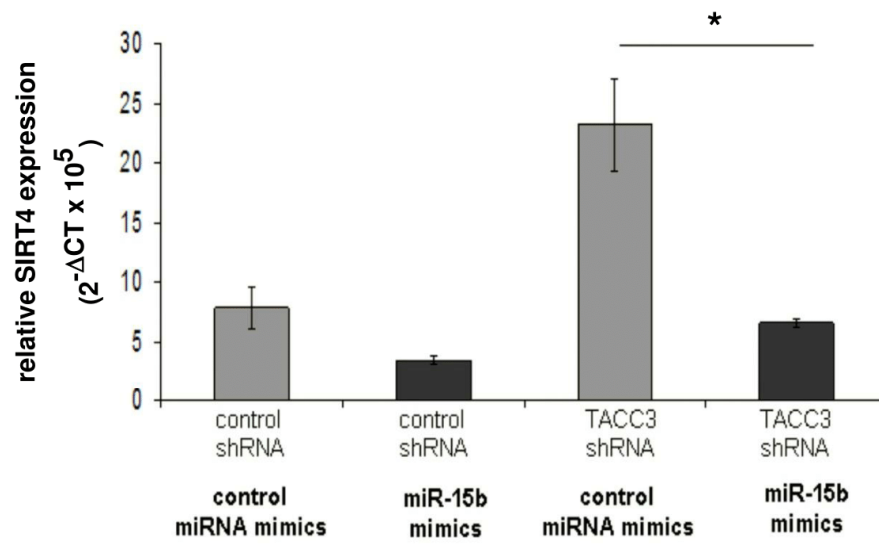
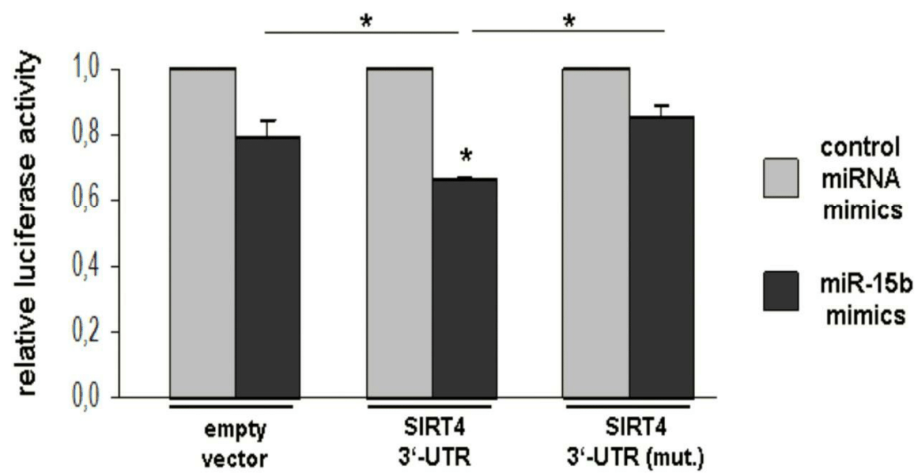
suppl. Figure 5

A**B****suppl. Figure 6**

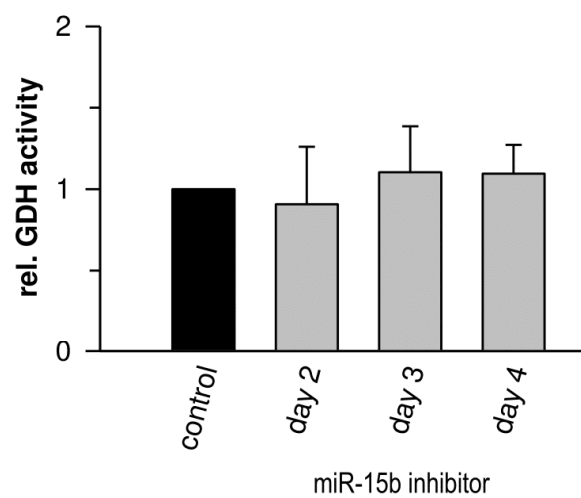
A**B****suppl. Figure 7**

A**B**

suppl. Figure 8

A**B**

suppl. Figure 9



suppl. Figure 10

6.2. SIRT4 interacts with OPA1 and regulates mitochondrial quality control and mitophagy

Lang A, Anand R, Altinoluk-Hambüchen S, Ezzahoini H, Stefanski A, Iram A, Bergmann L, Urbach J, Böhler P, Hänsel J, Franke M, Stühler K, Krutmann J, Scheller J, Stork B, Reichert AS and Piekorz RP. *Aging (Albany NY)*. 2017; 9:2160-2186. DOI: 10.18632/aging.101307

6.2.1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung des stressresponsiven mitochondrialen Sirtuins SIRT4 auf die mitochondriale Qualitätskontrolle weiterführend charakterisiert. Wie bereits in Kapitel 6.1 beschrieben, konnten in Zusammenhang mit der Hochregulation der SIRT4-Expression durch miR-15b-Inhibition in humanen dermalen Fibroblasten negative Effekte auf die Morphologie und Qualität der Mitochondrien beobachtet werden. Dabei nahm unter anderem das Membranpotential ab und die Produktion von mitochondrialem ROS zu.

In dieser Arbeit zeigte die moderate Überexpression von wildtypischem SIRT4, jedoch nicht der enzymatisch inaktiven H161Y-Mutante oder der zytoplasmatischen Form $\Delta 28N$, eine deutliche Sensitivierung von Mitochondrien gegenüber mitochondrialem Stress. Die Behandlung der Zellen mit Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon (CCCP) erhöhte die mitochondriale ROS-Zunahme besonders stark in SIRT4-überexprimierenden Zellen. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass diese Zellen mehr Autophagosomen bilden und dass somit der Autophagiefluss hochreguliert wird. Die genaue Betrachtung der mitochondrien-spezifischen Autophagie (Mitophagie), deren Ziel es ist, gesondert defekte Mitochondrien effizient abzubauen, wurde mittels der konfokalen Laserscanmikroskopie ausgewertet und erfolgte durch die Analyse der mitochondrialen Rekrutierung von Parkin (Parkin-Punktformationen an Mitochondrien). Obwohl die absolute Anzahl der Parkin-Punkte pro Zelle in SIRT4-überexprimierenden Zellen zunahm, wurde durch den Bezug auf die jeweilige Mitochondrienmasse ersichtlich, dass die Parkin-Rekrutierung pro Mitochondrium abnahm und dass SIRT4 somit die Mitophagie dementsprechend reduziert. In mikroskopischen Aufnahmen, aber auch in der Durchflusszytometrie, konnte eine Zunahme der Mitochondrienmasse in Abhängigkeit von

wildtypischen SIRT4 beobachtet werden. Ebenfalls zeigte die Überexpression von SIRT4 eine Reduktion des Sauerstoffverbrauchs in den Zellen. Dies ließ ebenfalls auf eine reduzierte mitochondriale Qualität schließen. Mithilfe von massenspektrometrischen Interaktionsanalysen konnte *Optic atrophy protein 1* (OPA1) als Interaktionspartner von SIRT4 identifiziert werden, der für die Fusion von Mitochondrien wesentlich ist. Die SIRT4-OPA1-Interaktion wurde in Co-Immunpräzipitationsexperimenten validiert und hierbei eine Abhängigkeit der Interaktion von der katalytischen Aktivität von SIRT4 beobachtet. Morphologische Untersuchungen mithilfe der hochauflösenden *spinning disk*-Mikroskopie zeigten, dass die Überexpression von SIRT4 die Mitochondrienmasse in den Zellen deutlich ansteigen lässt und hierbei stärker verzweigte mitochondriale Netzwerke fördert. Unter basalen Bedingungen konnte in den Zellen eine größere Menge der aktiven, die Fusion von Mitochondrien fördernden L-OPA1-Form im Vergleich zur „inaktiven“ S-OPA1-Form nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wurde in primären humanen Hautfibroblasten als Seneszenzmodell validiert, in welchem SIRT4 nach miR-15b-Inhibition oder ionisierender Bestrahlung (γ IR) hochreguliert wurde. Hierbei nahm die L-OPA1-Form ebenfalls zu. Dieser Effekt konnte durch Transfektion mit SIRT4-siRNAs inhibiert werden. Auch die mitochondriale Morphologie zeigte in den Fibroblasten-Seneszenzmodellen ähnliche Veränderungen wie im SIRT4-Überexpressionsmodell in HEK293-Zellen. Zusammengefasst beschreibt diese Publikation eine mögliche Reduktion der mitochondrialen Qualitätskontrolle durch die SIRT4-vermittelte Stabilisierung der aktiven L-OPA1-Form, wodurch ein stabileres und fixierteres mitochondriales Netzwerk entsteht und so die Mitophagie reduziert. Diese SIRT4-abhängige Inhibition der mitochondrialen Qualitätskontrolle könnte einen Effekt auf die zelluläre Seneszenz und Alterung haben.

Der Autor der vorliegenden Dissertation erarbeitete ca. 90% der Befunde dieser Publikation. Alle Experimente wurden vom Autor durchgeführt und ausgewertet. Die Koautoren halfen bei der Durchführung komplexer Methoden wie der Massenspektrometrie und Respirometrie und unterstützten durch konstruktive Diskussion das Voranschreiten der Arbeit sowie die Zusammenstellung der Publikation.

SIRT4 interacts with OPA1 and regulates mitochondrial quality control and mitophagy

Alexander Lang¹, Ruchika Anand², Simone Altinluk-Hambüchen¹, Hakima Ezzahoini¹, Anja Stefanski³, Afshin Iram¹, Laura Bergmann¹, Jennifer Urbach², Philip Böhler⁴, Jan Hänsel¹, Manuel Franke¹, Kai Stühler³, Jean Krutmann⁵, Jürgen Scheller¹, Björn Stork⁴, Andreas S. Reichert², and Roland P. Piekorz¹

¹Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany

²Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany

³Molecular Proteomics Laboratory (BMFZ), Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany

⁴Institut für Molekulare Medizin I, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany

⁵IUF - Leibniz Institut für umweltmedizinische Forschung, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany

Correspondence to: Roland P. Piekorz; **email:** Roland.Piekorz@hhu.de

Keywords: Sirtuin-4/SIRT4, mitochondrial quality control, mitochondrial fusion/fission, mitophagy, OPA1, reactive oxygen species/ROS, senescence, fibroblast, aging

Received: July 16, 2017

Accepted: October 15, 2017

Published: October 29, 2017

Copyright: Lang et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The stress-responsive mitochondrial sirtuin SIRT4 controls cellular energy metabolism in a NAD⁺-dependent manner and is implicated in cellular senescence and aging. Here we reveal a novel function of SIRT4 in mitochondrial morphology/quality control and regulation of mitophagy. We report that moderate overexpression of SIRT4, but not its enzymatically inactive mutant H161Y, sensitized cells to mitochondrial stress. CCCP-triggered dissipation of the mitochondrial membrane potential resulted in increased mitochondrial ROS levels and autophagic flux, but surprisingly led to increased mitochondrial mass and decreased Parkin-regulated mitophagy. The anti-respiratory effect of elevated SIRT4 was accompanied by increased levels of the inner-membrane bound long form of the GTPase OPA1 (L-OPA1) that promotes mitochondrial fusion and thereby counteracts fission and mitophagy. Consistent with this, upregulation of endogenous SIRT4 expression in fibroblast models of senescence either by transfection with miR-15b inhibitors or by ionizing radiation increased L-OPA1 levels and mitochondrial fusion in a SIRT4-dependent manner. We further demonstrate that SIRT4 interacts physically with OPA1 in co-immunoprecipitation experiments. Overall, we propose that the SIRT4-OPA1 axis is causally linked to mitochondrial dysfunction and altered mitochondrial dynamics that translates into aging-associated decreased mitophagy based on an unbalanced mitochondrial fusion/fission cycle.

INTRODUCTION

Aging is defined as a time-dependent loss of physiological integrity and organ function and is characterized by key hallmarks, among them genomic instability, stem cell exhaustion, mitochondrial dysfunction, and cellular senescence [1]. Senescence is either elicited endogenously, e.g. *via* telomere shortening in the case of replicative senescence [2-4], or triggered by extrinsic noxae such as UV radiation (stress-induced senescence) that is responsible for photo-aging of the skin [5-7]. Senescent cells occur and accumulate *in-vivo*, and clearance of senescent cells ameliorates aging-associated pathologies thereby extending healthy lifespan [8, 9]. The hallmarks of aging are functionally interconnected. For instance, upregulation of the cyclin-dependent kinase (CDK) and cell cycle inhibitor p21^{WAF}, a p53 target gene and key effector of stress-induced cellular senescence [10, 11], leads to a reduced capacity of stem cell dependent tissue regeneration [12]. Moreover, p21^{WAF} maintains a vicious circle in γ -irradiated fibroblasts by re-enforcing senescence signaling *via* the generation of more mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) and thus more ROS induced DNA damage [13]. Overall, the pro-aging effects of senescence and the SASP (senescence associated secretory phenotype) seem to be at least in part dependent on the presence of mitochondria [14, 15].

The morphology and dynamics of mitochondria underlie a stringent quality control *via* fusion-fission cycles which are primarily mediated by the key large GTPases OPA1 (optic atrophy 1), mitofusins (MFN1 and 2), and DRP1 (dynamitin-related protein 1). Aging-associated changes in the expression levels of fusion proteins (OPA1, MFN1/2) or reduction of the fission factors DRP1 and FIS1 (a recruitment factor for DRP1 in the mitochondrial outer membrane) have been observed in senescent endothelial or mesenchymal stem cells, both resulting in increased mitochondrial elongation and fusion [16, 17]. As part of mitochondrial quality control, dysfunctional/depolarized, fragmented mitochondria are continuously eliminated by mitophagy, a form of selective autophagy [18-20]. However, there is accumulating evidence for a decline of autophagy and mitophagy during aging [18, 21-27] thereby impairing mitochondrial quality and function. For instance, mitophagy was greatly reduced in aged muscle stem cells (satellite cells) resulting in accumulation of dysfunctional mitochondria, increased ROS generation, and a senescent phenotype [28, 29].

Mitochondrial sirtuins (mtSIRT) comprise three members, SIRT3, SIRT4, and SIRT5 which are all involved in regulating energy metabolism and metabolic

homeostasis [30-33] and whose expression is regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms, including miRNAs [34, 35]. Among the mtSIRTs, SIRT4 expression is upregulated during senescence triggered by different stimuli as well as *in-vivo* in photo-aged human skin [35]. Upregulation of SIRT4 expression can *per se* induce senescence as shown in trophoblast stem cells [36]. Only limited information exists about the role of mtSIRTs in the regulation of mitochondrial morphology/dynamics and quality control mechanisms. SIRT3, the major deacetylase of metabolic targets in mitochondria, promotes mitochondrial networking and function by activating the fusion factor OPA1 [37]. In the case of SIRT5, an enzyme with demalonylase, deglutarylase, and desuccinylase activities [38, 39] that regulates ammonia detoxification, mitochondrial size was increased and mitophagy decreased upon SIRT5 overexpression [40]. Lastly, overexpression of SIRT4 was linked to the regulation of mitochondrial dynamics *via* inhibition of ERK-mediated phosphorylation of the pro-fission factor DRP1, therefore inhibiting its activity and hence mitochondrial fission [41]. Similar to SIRT5, several enzymatic activities have been described for SIRT4, including ADP-ribosylation of glutamate dehydrogenase (GDH) [42], lipoamidase mediated targeting of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex [43], and lysine deacetylation in the control of leucine metabolism [44].

We demonstrated recently that up-regulation of endogenous SIRT4 expression inhibits the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), increases mtROS level, and alters mitochondrial morphology towards aggregation [35]. Here, we further addressed the molecular basis for this phenotype in cells stably expressing wild-type and mutant forms of SIRT4 at low levels and characterized the role of SIRT4 in mitochondrial morphology/quality control and mitophagy under basal and mitochondrial stress conditions.

RESULTS

SIRT4 promotes stress induced mitochondrial ROS production

In the present study, we addressed the role of SIRT4, a miR-15b repressed and stress-inducible senescence-associated mitochondrial sirtuin [35, 45], in the regulation of mitochondrial dynamics and quality control. We generated HEK293 cell lines stably expressing C-terminal eGFP fusion proteins of SIRT4, including its catalytically inactive version (H161Y) or SIRT4(Δ 28N) lacking the N-terminal mitochondrial targeting signal [46]. Expression and subcellular

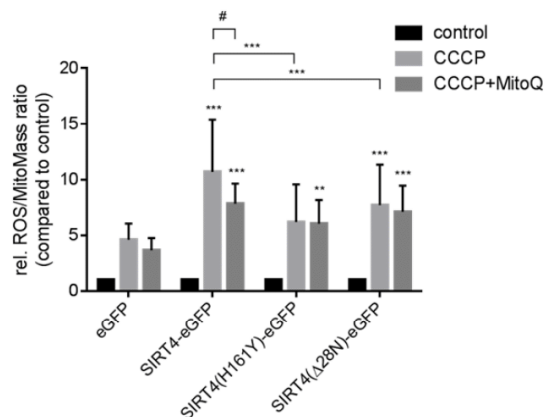


Figure 1. Catalytically active SIRT4-eGFP increases mitochondrial ROS production after CCCP-induced mitochondrial uncoupling. HEK293 cell lines stably expressing eGFP, SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ28N)-eGFP were treated with CCCP (10 nM) for two hours either with or without pretreatment with MitoQ (100 nM; 16 hours). Thereafter cells were stained with the cell-permeant dyes MitoTracker® Deep Red and MitoSOX™ Red followed by flow cytometric analysis. Shown are mean ± s.d. values from nine experiments. To evaluate statistical significance (comparison of eGFP vs. wild-type or mutant SIRT4 or comparisons indicated by brackets) two-way ANOVA followed-up by Tukey's test were performed (**p<0.01; ***p<0.001). The effect of MitoQ treatment was evaluated using a paired t-test (#p<0.05).

localization of SIRT4-eGFP and its mutants were confirmed by confocal microscopy, immunoblotting, and flow cytometry analysis (Suppl. Fig. 1). We next subjected these cell lines to CCCP (Carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone) treatment and hence to dissipation of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). As depicted in Fig. 1, cells expressing SIRT4-eGFP displayed a significant increase in stress-induced mitochondrial ROS (mtROS) levels which were two-times higher as compared to eGFP-expressing control cells and which could be significantly inhibited by co-treatment with the mitochondria-specific anti-oxidant mitoQ [47, 48]. In contrast, mtROS response was significantly weaker in cells expressing SIRT4(H161Y)-eGFP or SIRT4(Δ28N)-eGFP (Fig. 1). Here, co-treatment with mitoQ did not show an effect. Thus, consistent with the mtROS inducing and Ψ_m -decreasing role of SIRT4 in primary human dermal fibroblasts [35], SIRT4 expression promotes stress-induced mtROS production also in HEK293 cells *via* its enzymatic activity.

SIRT4 expression promotes stress triggered autophagic flux, but decreases Parkin associated mitophagy considering the increased mitochondrial content

Mitochondria with sustained depolarization are removed by mitophagy, a selective degradation mechanism for damaged mitochondria, ensuring mitochondrial quality control [22, 49]. To assess the role of SIRT4 in this process we determined the autophagic flux in HEK293 cell lines stably expressing SIRT4-eGFP or its mutants by analyzing the levels of the autophagy marker LC3B-II after treatment with rapamycin (mTORC1 inhibitor and general autophagy inducer) or CCCP (a mitochondrial uncoupler and selective mitophagy inducer). As depicted in Fig. 2, LC3B-II levels were approximately two-fold-increased in CCCP-treated HEK293 SIRT4-eGFP cells, but did not change significantly in cells expressing SIRT4(H161Y)-eGFP or SIRT4(Δ28N)-eGFP. We did not detect significant changes in the autophagic flux of any of these cell lines following rapamycin treatment. Consistent with the immunoblot analysis in Fig. 2, the number of LC3B dots per cell was also approximately two-fold higher in CCCP treated SIRT4-eGFP cells vs. eGFP controls as determined by confocal imaging analysis (data not shown). Given this potentially specific effect of SIRT4 on mitophagy, we next analyzed the translocation of the E3 ligase Parkin to damaged mitochondria, a process that promotes selective recruitment of mitochondria to the autophagic machinery [18]. HEK293 cells expressing SIRT4-eGFP (or its mutants) were transfected with a cDNA coding for mCherry-Parkin, subjected to treatment with CCCP and Bafilomycin A1 (BafA1), and analyzed by confocal microscopic imaging (Fig. 3A). Translocation of mCherry-Parkin to mitochondria was observed in all instances as expected after dissipation of the membrane potential. Yet, only for SIRT4-eGFP expressing cells the mitochondrial mass was increased when compared to the eGFP control (Fig. 3B). Taking this into account, we observed that HEK293 cells expressing SIRT4-eGFP, but not the catalytically inactive SIRT4(H161Y)-eGFP or the extra-mitochondrially localized SIRT4(Δ28N)-eGFP mutants, displayed a relative decrease in mCherry-Parkin/MTC02 double-positive dots by approximately 40% when standardized against the mitochondrial content (*i.e.*, total MTC02 signal) (Fig. 3C). Taken together, these data indicate that under mitochondrial stress conditions SIRT4 despite promoting mtROS production leads to a net decrease in mitophagy and therefore subsequent decreased removal of dysfunctional mitochondria.

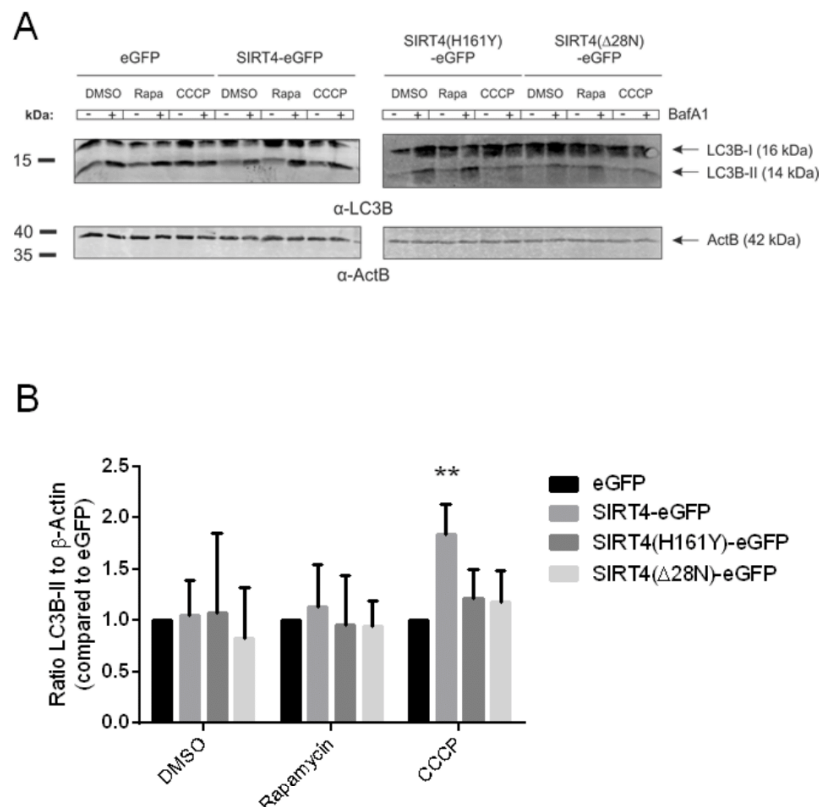


Figure 2. SIRT4-eGFP expression leads to an increased autophagic flux upon CCCP-induced mitochondrial uncoupling. (A) HEK293 cell lines stably expressing eGFP, SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ28N)-eGFP were treated with DMSO (control), rapamycin (100 nM), or CCCP (10 μM) for two hours. In addition, during the second hour cells were either untreated (-) or co-treated (+) with BafA1 (Bafilomycin A; 100 nM) that stalls autophagic flux *via* inhibition of the fusion between lysosomes and autophagosomes. A representative experiment is depicted in which LC3B-I and LC3B-II levels were analyzed by immunoblotting. (B) LC3B-II signals (co-treatment with BafA1) were compared to the protein levels of β-Actin/ACTB as loading control using ImageJ based quantification. Data shown are mean ± s.d. values from four to seven experiments. To evaluate statistical significance (treatment vs. DMSO) two-way ANOVA followed by Tukey's test was performed (**p<0.01).

SIRT4 expression inhibits mitochondrial respiration already under basal conditions

The findings above raised the question whether ectopic SIRT4 expression predisposes cells to mitochondrial stress by impacting already on basal mitochondrial functions such as oxidative phosphorylation. Conflicting results have been described regarding the impact of increased SIRT4 levels on mitochondrial oxygen consumption [50, 51]. We therefore measured the oxygen flow in HEK293 cells expressing SIRT4-eGFP (or its mutants) under basal conditions and upon inhibition of specific respiratory complexes of the electron transport chain (ETC) [52]. As depicted in Fig.

4A and B, HEK293 SIRT4-eGFP cells displayed a significantly reduced oxygen flow both under basal conditions and at maximum respiration, the latter mirroring a reduced electron transport system capacity (ETS) upon complete mitochondrial uncoupling of the electron transport system using CCCP. Surprisingly, cells expressing SIRT4(Δ28N)-eGFP, which cannot localize to mitochondria, showed a significantly increased O₂ flow both at basal and maximum respiration (Fig. 4C). This finding suggests a dominant-negative function of SIRT4(Δ28N) that could be caused by inhibition and/or trapping of endogenous SIRT4 in the cytosol. This interpretation is consistent with an increased oxygen flux and improved mitochondrial function upon SIRT4 depletion [51].

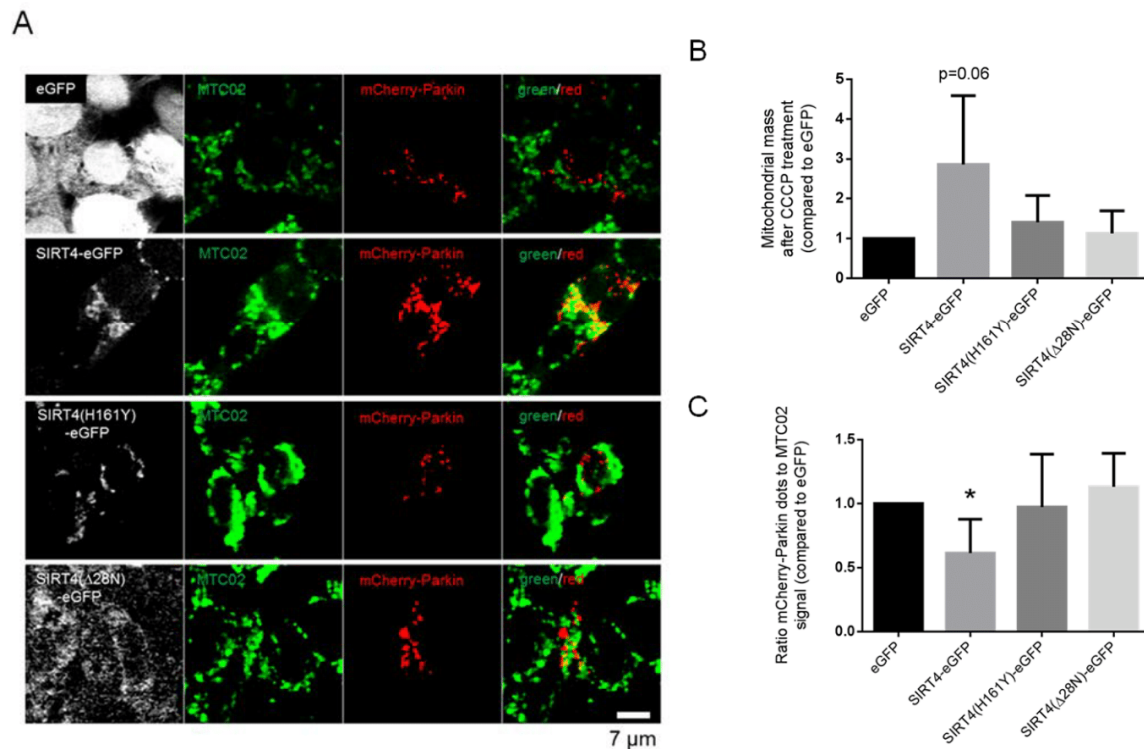


Figure 3. SIRT4-eGFP expression results in overall decreased mitochondrial recruitment of mCherry-Parkin upon CCCP-induced mitochondrial uncoupling. (A) HEK293 cell lines stably expressing eGFP, SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ28N)-eGFP (GFP signal in white) were transfected with an expression construct for mCherry-Parkin (red). After one day, cells were treated with CCCP (10 μM) for two hours followed by co-treatment with BafA1 (100 nM) during the second hour. Cells were fixed and subjected to confocal microscopic analysis. Mitochondria were detected using the marker MTC02 (green). (B) Quantification of the mitochondrial content via MTC02 staining analysis using ImageJ software (Material & Methods and suppl. Material & Methods). (C) Quantification of mCherry-Parkin/MTC02 double-positive dots was performed based on the mitochondrial content as determined in (B) using ImageJ software (Material & Methods and suppl. Material & Methods). Numbers of cells analyzed in (B) and (C) from four experiments: eGFP, 57; SIRT4-eGFP, 55; SIRT4(H161Y)-eGFP, 43; SIRT4(Δ28N)-eGFP, 48. To evaluate statistical significance two-way ANOVA followed by Tukey's test was performed (* $p < 0.05$).

SIRT4 expression leads to a higher degree of elongated/fused mitochondria associated with higher levels of the mitochondrial fusion regulator L-OPA1

Mitochondria, dependent on their (dys)functional status/depolarization, undergo either increased mitochondrial fusion or fission, the latter of which leads to mitophagic clearance upon excessive damage [20, 27]. To further analyze the impact of SIRT4 on mitochondrial quality control we analyzed the mitochondrial network, i.e. mass and structure, in HEK293 cells expressing SIRT4-eGFP (or its mutants). We employed confocal microscopy using staining with the anti-mitochondria antibody MTC02 and subsequent ImageJ based analysis. As depicted in Fig. 5A, cells expressing SIRT4-eGFP underwent an increased

mitochondrial aggregation already under basal (untreated) conditions. This aggregation was clearly less pronounced in GFP control cells or cells expressing the SIRT4 mutants. These findings were corroborated by flow cytometry where HEK293 SIRT4-eGFP cells, but not cells expressing SIRT4(H161Y)-eGFP or SIRT4(Δ28N)-eGFP, depicted significantly increased MitoTracker® staining intensity and hence an increased mitochondrial mass (Suppl. Fig. 2A and 2B). Further quantitative analysis revealed that the mean length of fused mitochondrial tubes was significantly increased only in SIRT4-eGFP expressing cells (Fig. 5B and Suppl. Fig. 3; Suppl. Movies 1 to 4). To corroborate this finding at the molecular level we analyzed the proteolytic processing of the large GTPase and key mitochondrial fusion/fission regulator OPA1 [53, 54].

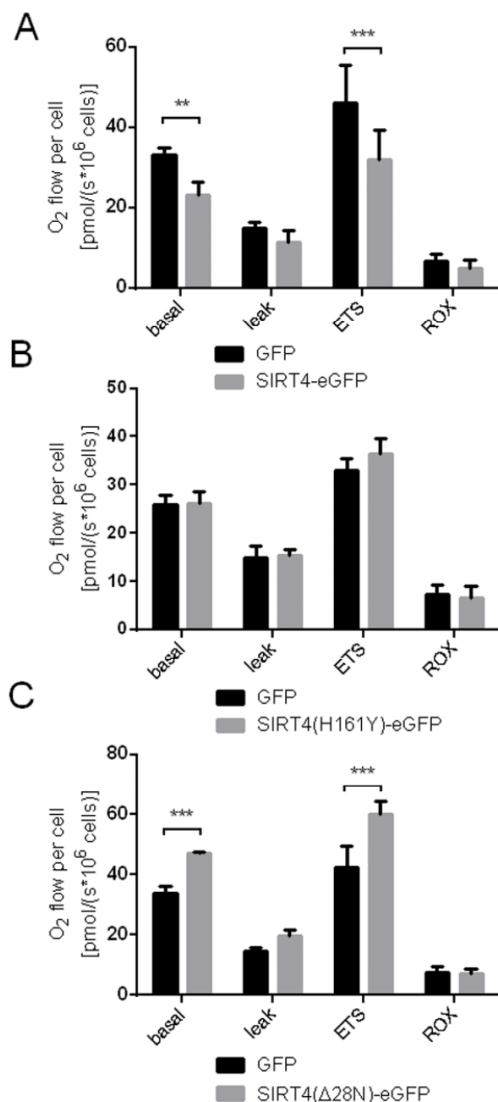


Figure 4. Oxygen consumption is reduced in HEK293 cells expressing SIRT4-eGFP. Respirometric measurements of oxygen consumption were performed in HEK293 cell lines stably expressing SIRT4-eGFP (A), SIRT4(H161Y)-eGFP (B), or SIRT4(Δ28N)-eGFP (C) as previously described [52, 64]. Oxygen consumption was measured under basal and stressed conditions (leak: treatment with oligomycin A, 2 μg/ml; ETS: mitochondrial uncoupling of the electron transport system using CCCP, 400-500 nM; residual oxygen consumption, ROX: treatment with 500 nM rotenone and 2.5 μM antimycin A) as compared to control cells expressing eGFP. To evaluate statistical significance two-way ANOVA followed by Tukey's test was performed [$**p<0.01$, $***p<0.001$; SIRT4-eGFP: $n=5$; SIRT4(H161Y)-eGFP, $n=4$; SIRT4(Δ28N)-eGFP: $n=4$].

Indeed, in HEK293 SIRT4-eGFP cells, the ratio of the proteolytically processed forms of OPA1 was significantly shifted from S-OPA1 (associated with mitochondrial fission and mitophagy) towards L-OPA1 (associated with mitochondrial fusion) (Fig. 6A and 6B). Taken together, these data suggest that SIRT4-eGFP expression inhibits mitochondrial respiration that in terms of mitochondrial quality control translates into increased mitochondrial fusion, the latter possibly resulting in reduced basal mitophagy.

SIRT4 interacts with the mitochondrial fusion regulator L-OPA1

To get further insight into the molecular mechanism of how SIRT4 regulates basal mitochondrial quality control we performed co-immunoprecipitation and mass spectrometry to identify interaction partners of SIRT4 in HEK293 cells. The mitochondrial fusion regulator OPA1 was identified to interact specifically with SIRT4-eGFP. Next, we verified this interaction by Western blot analysis after co-immunoprecipitation both in untreated and in CCCP-stressed cells using single-domain-anti-GFP antibodies (Fig. 7A). Here, both forms of OPA1, L-OPA1 and S-OPA1, co-immunoprecipitated with SIRT4-eGFP as well as with its mutants. However, we observed that the amount of L-OPA1 co-immunoprecipitating with SIRT4(H161Y)-eGFP was significantly lower as compared to wild-type SIRT4-eGFP when standardized to the total protein input (Fig. 7B). The (direct or indirect) interaction between SIRT4-eGFP and OPA1 could be confirmed *via* reverse co-immunoprecipitation using a rabbit anti-OPA1 antibody [55] (Suppl. Fig. 4). Taken together, SIRT4 may interact in an enzyme activity-dependent manner with L-OPA1 *via* a currently unknown mechanism and thereby regulate mitochondrial fusion.

Upregulation of endogenous SIRT4 expression in fibroblast models of cellular senescence increases L-OPA1 levels and mitochondrial fusion in a SIRT4-dependent manner

Altered mitochondrial dynamics with decreased autophagy or mitophagy are hallmarks to cellular aging [22-24, 27, 56]. We therefore expanded our analyses to primary human dermal fibroblasts to confirm the role of the SIRT4 – L-OPA1 axis in mitochondrial morphology and dynamics in a cellular model more relevant to aging. To upregulate the expression of SIRT4 fibroblasts were either transfected with miR-15b inhibitors or subjected to γ-irradiation (γIR; single dose of 20 Gy) [35]. Under both conditions fibroblasts showed an anti-proliferative response [13, 35], as *e.g.* measured by decreased BrdU incorporation (Suppl. Fig. 5). Thereafter, L-OPA1 vs. S-OPA1 levels and the

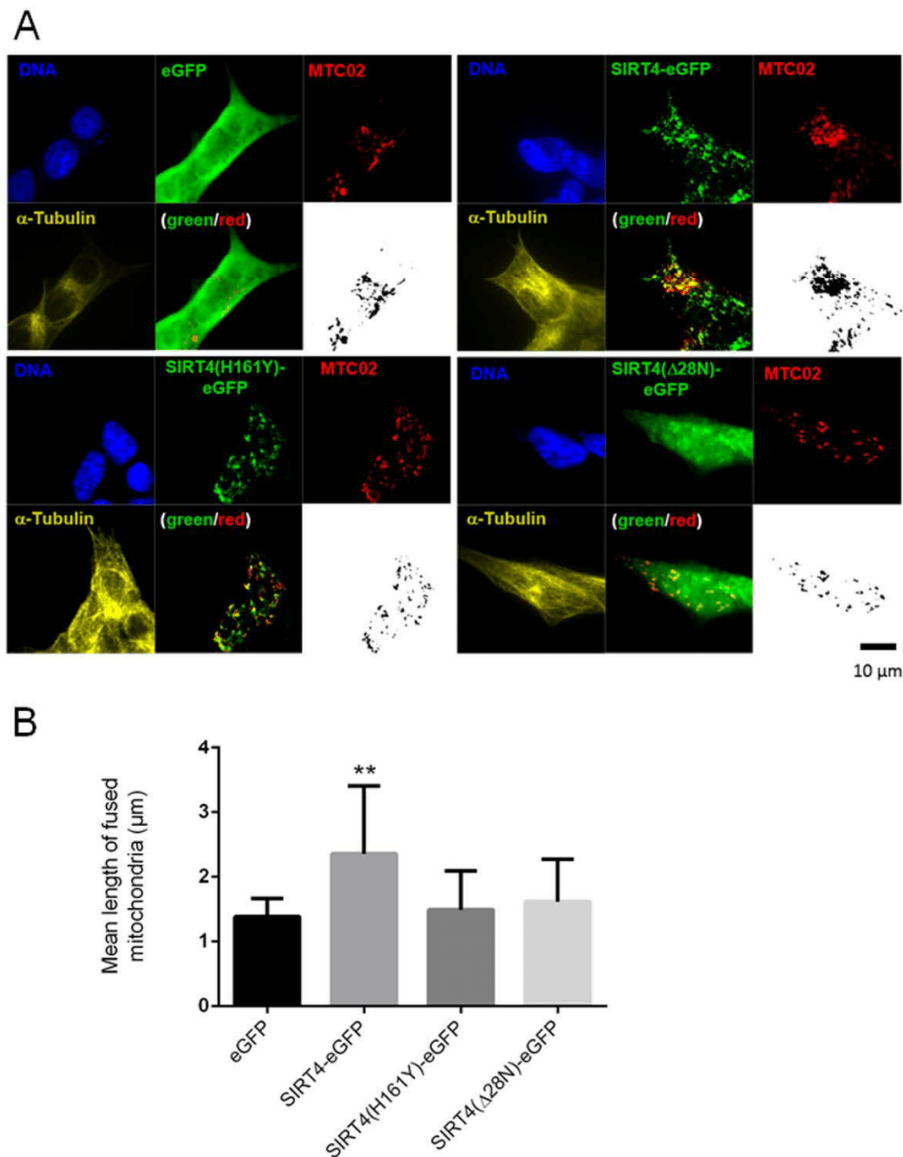


Figure 5. SIRT4-eGFP expression leads to increased mitochondrial aggregation/fusion. (A) Subcellular visualization of the mitochondrial marker MTC02 and α -Tubulin was performed by confocal microscopy in HEK293 cells stably expressing eGFP, SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ 28N)-eGFP. Mitochondrial profiles (MTC02; black/white pictures) were visualized using ImageJ software (Material & Methods and suppl. Material & Methods) to integrate microscopic confocal pictures. Cellular morphology/size was defined by α -Tubulin staining. Representative images are depicted. (B) Quantification of the mean length of fused mitochondria in cells expressing SIRT4-eGFP or its mutants. Numbers of cells analyzed from four experiments: eGFP, 136; SIRT4-eGFP, 75; SIRT4(H161Y)-eGFP, 104; SIRT4(Δ 28N)-eGFP, 107. To evaluate statistical significance (compared to eGFP), two-way ANOVA followed-up by Tukey's test was performed (** $p < 0.01$)

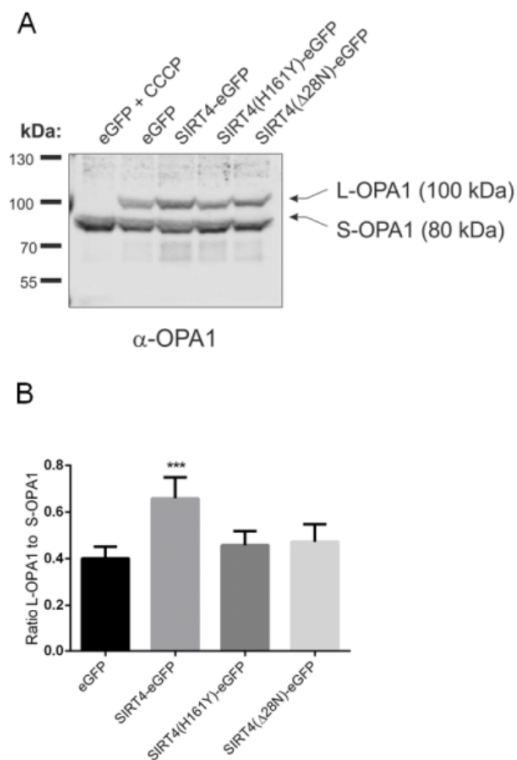


Figure 6. SIRT4-eGFP expression stabilizes the mitochondrial fusion regulator L-OPA1. (A) The expression of L-OPA1 vs. S-OPA1 was analyzed by immunoblotting in HEK293 cells stably expressing eGFP, SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ28N)-eGFP. As a control for complete proteolytic processing of L-OPA1 to S-OPA1 eGFP-expressing control cells were treated with CCCP (10 μM) for two hours. (B) The ratio between the expression levels of L-OPA1 and S-OPA1 was determined by ImageJ-based densitometric analysis. To evaluate statistical significance (compared to eGFP), two-way ANOVA followed by Tukey's tests was performed (**p<0.01; n=6).

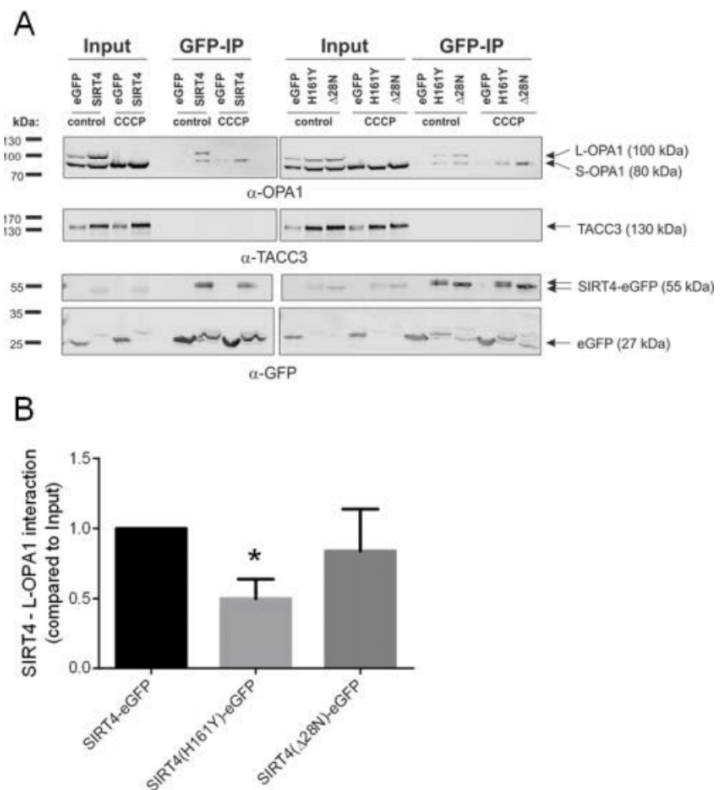


Figure 7. SIRT4-eGFP interacts with OPA1. (A) HEK293 cells stably expressing SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ28N)-eGFP were either untreated or treated with CCCP (10 μM, 2h) and thereafter subjected to OPA1 co-immunoprecipitation (IP) analysis using sepharose beads coupled anti-GFP single-domain-antibodies (nanobodies). Total cell lysates were loaded as input control (5%). CCCP treatment caused a complete proteolytic processing of L-OPA1 to S-OPA1. TACC3 was detected using specific antibodies and served as a representative negative co-immunoprecipitation control. (B) SIRT4 enzymatic activity is required for efficient interaction of SIRT4 with L-OPA1. The amount of L-OPA1 co-immunoprecipitated with SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ28N)-eGFP was determined in relation to the protein input and subjected to ImageJ-based densitometric analysis. To evaluate statistical significance, two-way ANOVA followed by Tukey's tests was performed (*p<0.05; n=4).

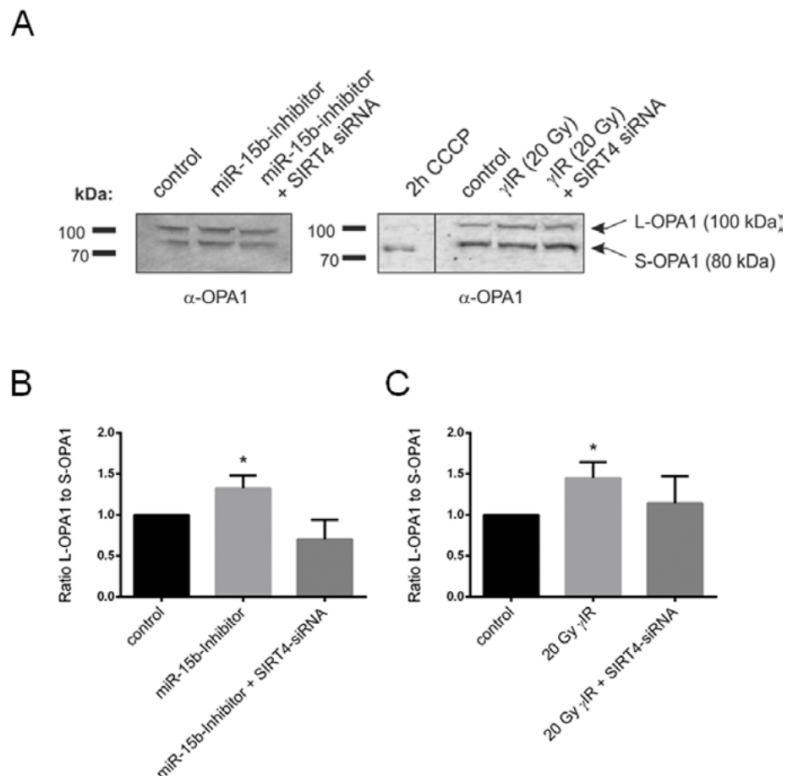


Figure 8. Aging-associated SIRT4 upregulation leads to a shifted L-OPA1 to S-OPA1 ratio in two different fibroblast senescence models. Primary human dermal fibroblasts were either transfected with miR-15b inhibitors (or control oligonucleotides) or subjected to γ -irradiation (γ IR; 20 Gy) (both in the presence or absence of siRNA duplexes against SIRT4) [35] followed by analysis of OPA1-L and OPA1-S expression by immunoblotting after four days (A) As a control for complete proteolytic processing of L-OPA1 to S-OPA1, fibroblasts were treated with CCCP (10 μ M) for two hours. The ratio between the expression levels of L-OPA1 and S-OPA1 was determined by ImageJ-based densitometric analysis in miR-15b inhibitor transfected fibroblasts (B) and cells subjected to γ IR (C). To evaluate statistical significance (compared to control), two-way ANOVA followed by Tukey's test was performed (* $p < 0.05$; $n = 4$).

mitochondrial profile/morphology were analyzed in the presence or absence of siRNA duplexes against SIRT4. Consistent with the findings in SIRT4-eGFP expressing HEK293 cells, in both fibroblast senescence models the ratio of L-OPA1 to S-OPA1 was significantly up-regulated, both in a SIRT4-dependent manner (Fig. 8A and 8B) and consistent with corresponding changes in the mitochondrial profiles as visualized by confocal microscopy and quantitative ImageJ based analysis. Increased mitochondrial mass and significantly elevated mitochondrial fusion (indicated by an increased mean length of fused mitochondrial tubes) were observed upon SIRT4 upregulation through miR-15b inhibition (Fig. 9, Suppl. Fig. 6, Suppl. Movies 5 to 7) or γ -irradiation (Fig. 10, Suppl. Fig. 7, Suppl. Movies 8 to 10).

DISCUSSION

This study provides novel insight into the role of the mitochondrially localized and aging associated sirtuin SIRT4 in basal and stress-induced regulation of mitochondrial morphology and turnover mechanisms. Our data show that SIRT4 promotes mtROS generation triggered by dissipation of the membrane potential across the inner membrane. Although this led to an increase in autophagic flux, overall Parkin-linked mitophagy was apparently decreased due to an increased mitochondrial content. Mechanistically, we propose that SIRT4 functions *via* interacting with L-OPA1 representing a novel regulatory axis in mitochondrial quality control, *i.e.* promotion of

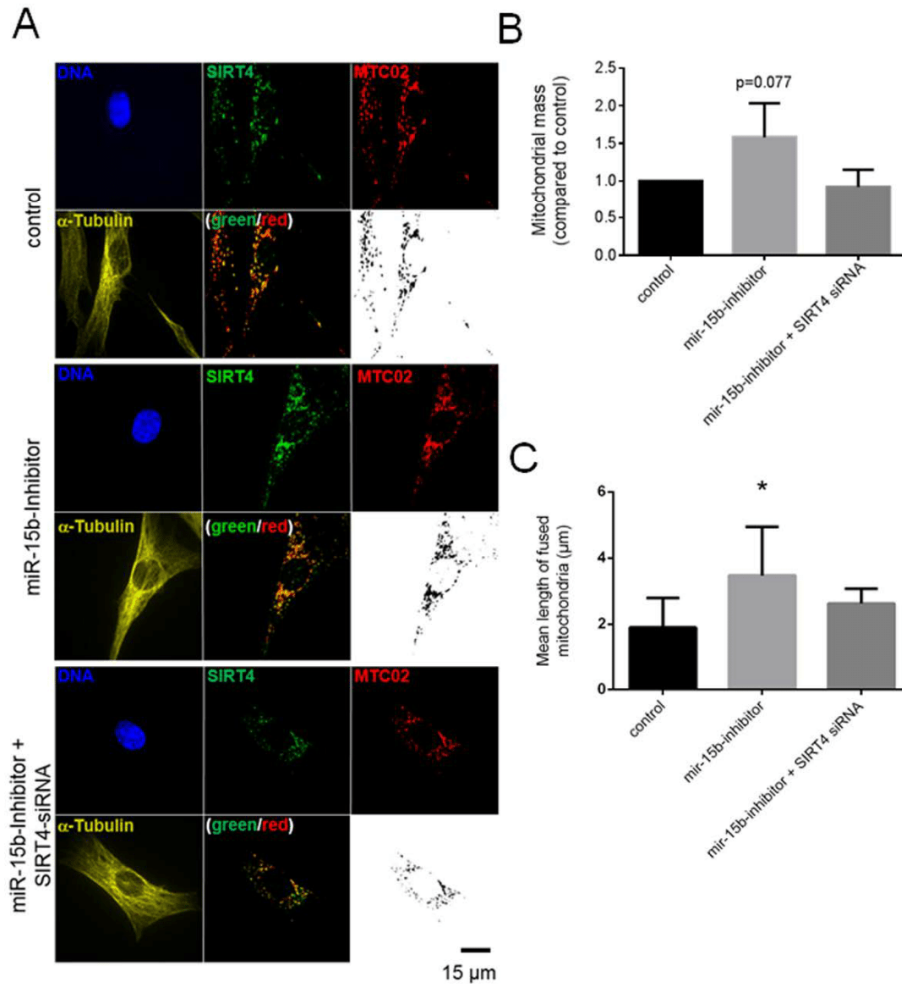


Figure 9. SIRT4 upregulation through miR-15b inhibition increases L-OPA1 levels and promotes mitochondrial fusion in fibroblasts. (A) Primary human dermal fibroblasts were transfected with miR-15b inhibitors (or control oligonucleotides) in the presence or absence of siRNA duplexes against SIRT4 [35] followed by subcellular visualization of SIRT4 (green), MTC02 (red), and α -Tubulin (yellow) after four days. The mitochondrial profiles (MTC02; black/white) were further visualized as binary confocal pictures. Cellular morphology/size was defined by α -Tubulin staining. Representative images are depicted. (B) Quantification of the mitochondrial mass via MTC02 staining analysis using ImageJ software (Material & Methods and suppl. Material & Methods). (C) Quantitative analysis of mitochondrial fusion/length of mitochondrial tubes (as exemplified in suppl. Fig. 6) using ImageJ software (Material & Methods and suppl. Material & Methods). To evaluate statistical significance, two-way ANOVA followed by Tukey's test was performed (* $p < 0.05$; $n = 12-14$ cells analysed by spinning disk confocal microscopy in three experiments).

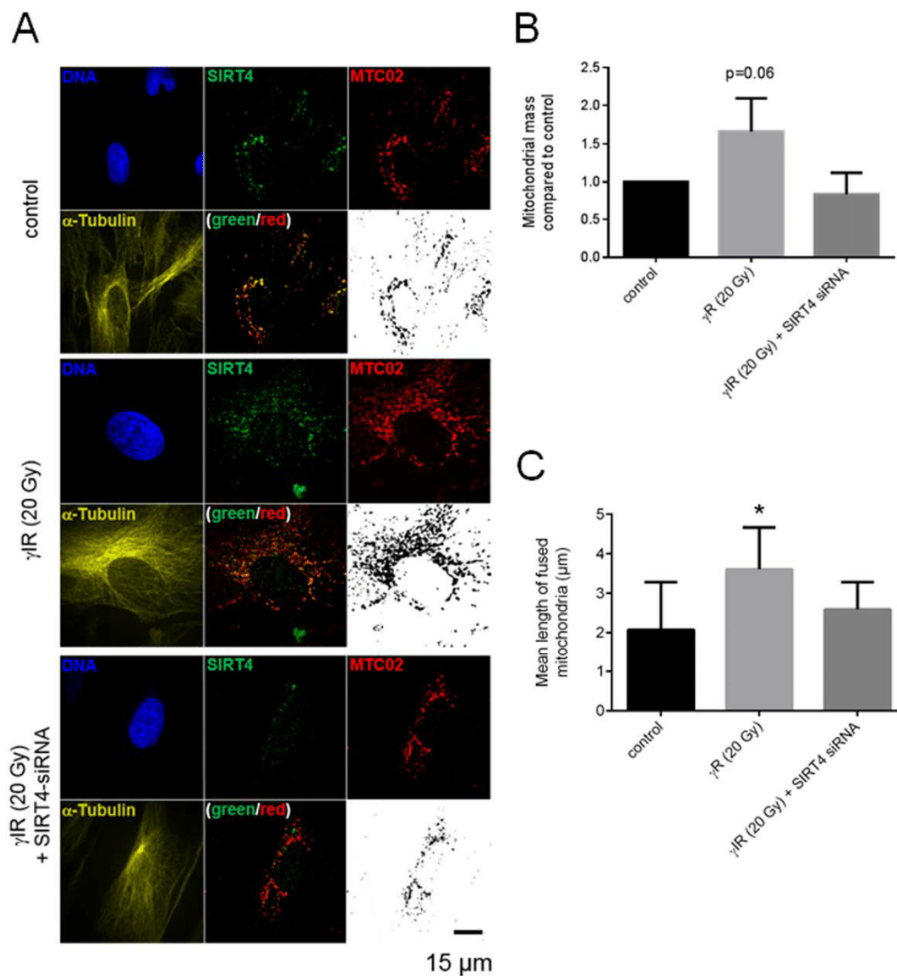


Figure 10. SIRT4 upregulation upon ionizing radiation stress increases L-OPA1 levels and promotes mitochondrial fusion in fibroblasts. (A) Primary human dermal fibroblasts were subjected to γ IR (20 Gy) both in either the presence or absence of siRNA duplexes against SIRT4 [35] followed by subcellular visualization of SIRT4 (green), MTC02 (red), and α -Tubulin (yellow) after four days. The mitochondrial profiles (MTC02; black/white) were further visualized as binary confocal pictures. Cellular morphology/size was defined by α -Tubulin staining. Representative images are depicted. (B) Quantification of the mitochondrial mass *via* MTC02 staining analysis using ImageJ software (Material & Methods and suppl. Material & Methods). (C) Quantitative analysis of mitochondrial fusion/length of mitochondrial tubes (as exemplified in suppl. Fig. 7) using ImageJ software (Material & Methods and suppl. Material & Methods). To evaluate statistical significance, two-way ANOVA followed by Tukey's test was performed (* $p < 0.05$; $n = 13$ -19 cells analysed by spinning disk confocal microscopy in three experiments).

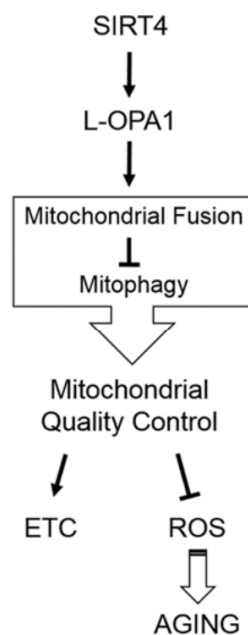


Figure 11. Model summarizing the regulatory role of the SIRT4-OPA1 axis in mitochondrial quality control. OPA1, optic atrophy gene 1; ETC, electron transport chain; ROS, reactive oxygen species.

mitochondrial fusion and therefore likely reduction of mitophagy (summarized in Fig. 11).

Mitochondria represent a major source of ROS [57] that dependent on its concentration negatively impacts on mitochondrial function eventually resulting in autophagic clearance of damaged mitochondria. MtROS are typically increased in cells overexpressing enzymatically active SIRT4 [35] (Fig. 1) together with a reduced oxygen consumption under basal and mitochondrial stress conditions (Fig. 4) [51]. In contrast, depletion of SIRT4 in HEK293 cells results in increased oxygen flux and improved mitochondrial function [51]. Consistent with this, we observed an increased O_2 flow in HEK293 SIRT4(Δ 28N)-eGFP cells both at basal and maximum respiration (Fig. 4), possibly reflecting a dominant-negative function of SIRT4(Δ 28N). The latter may bind to wild-type SIRT4 and prevent it from mitochondrial translocation (that is dependent on the first 28 a.a.), given that recombinant SIRT4 as well as SIRT4 expressed in HEK293 cells forms homo-oligomeric to multimeric complexes in gel filtration analysis (own unpublished results). The molecular basis for the inhibitory and promoting effects of SIRT4 on mitochondrial respiration and mtROS

generation, respectively, is likely connected to the functional inhibition of one or more SIRT4 targets in the inner mitochondrial membrane and matrix. For instance, SIRT4 negatively regulates key steps in anaplerosis of the citric acid cycle *via* different NAD^+ -dependent enzymatic reactions, *i.e.* ADP-ribosylation and inhibition of glutamate dehydrogenase (GDH) [42] or lipoamidase-mediated targeting and inhibition of the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex [43]. Moreover, mass spectrometric characterization of the protein interaction network of SIRT4 identified components of mitochondrial complexes involved in oxidative phosphorylation, namely complex I, IV, and V [58], with complex I representing a major source of mtROS [59].

Besides their functions in energy metabolism and mitochondrial respiratory chain complexes [58], all three mtSIRTs participate in the regulation of mitochondrial morphology/dynamics and hence mitochondrial quality control through interaction with key fusion/fission regulators. SIRT3 promotes mitochondrial networking and functions by deacetylation and therefore activation of the fusion factor OPA1 thereby increasing its GTPase activity [37]. In the case of SIRT4, we now observed increased mitochondrial fusion (Fig. 5, 9, and 10) concomitant with an elevated mitochondrial content in cells overexpressing wild-type SIRT4, but not the catalytically inactive mutant H161Y. These findings were further corroborated by the novel physical link between SIRT4 and OPA1 that was evident in mass spectrometry analysis of SIRT4-eGFP binding partners (Lang et al., manuscript in preparation) and GFP-single-domain antibody (Fig. 7) as well as anti-OPA1 antibody (Suppl. Fig. 4) based co-immunoprecipitation experiments. The molecular mechanism leading to SIRT4 triggered increase in the L-OPA1/S-OPA1 ratio as well the interaction of SIRT4 with L-OPA1 (Fig. 7A and Suppl. Fig. 4) were dependent on the enzymatic activity of SIRT4 (Fig. 7B), and could involve the stabilization of L-OPA1 *via* (in)direct protein-protein interaction or protection from stress-induced and OMA1 mediated processing [60]. The elevated L-OPA1 levels in all cell models analyzed were associated with an increased mitochondrial fusion (Fig. 5, 9, and 10). Moreover, in line with our findings, a recent report linked SIRT4 to the regulation of mitochondrial dynamics *via* inhibition of ERK-mediated phosphorylation of the pro-fission factor DRP1, therefore inhibiting its activity and hence mitochondrial fission [41]. However, similar to the SIRT4-OPA1 interaction, the molecular mechanism by which SIRT4 impacts on the ERK-DRP1 axis is currently unclear and may require one or more of the known enzymatic activities of SIRT4 (ADP-ribosyltransferase,

lipoamidase, or lysine deacylase; [42-44]). Lastly, in the case of SIRT5, mitochondrial size was increased and mitophagy decreased upon SIRT5 overexpression, whereas the opposite effect was observed in SIRT5 silenced cells or upon treatment with the SIRT5 inhibitor MC3482 [40]. SIRT5 overexpression led to increased levels of the fusion factors OPA1 and MFN2, whereas at the same time the positive mitophagy regulators PINK2 and PARK1 were downregulated [40]. Consistent with this, SIRT5 has a protective role by preventing mitochondrial fragmentation during starvation, given that SIRT5 deficiency increases mitochondrial DRP1 levels and mitophagy [61]. Taken together, all three mtSIRTs seem to promote mitochondrial fusion and/or inhibit fission, and thus might attenuate mitophagic clearance of dysfunctional mitochondria. Of note, Ho et al. observed that higher SIRT4 levels trigger increased retrograde AMPK/PGC1 α signaling from mitochondria to the nucleus [51]. However, this mechanism may rather mediate an increase in mitochondrial biogenesis to compensate for the accumulation of dysfunctional mitochondria which eventually did not undergo proper mitophagic clearance.

In summary, our findings are consistent with an inverse correlation between increased levels of the metabolic tumor suppressor SIRT4 in cellular senescence and aging [35, 45] and cumulative evidence for declining autophagy with advanced age [18, 22, 24-27, 56]. An increased content of mitochondria, which accumulate in a dysfunctional status, is characteristic for senescent cells [1, 13]. Thus, we propose that stress/senescence induced SIRT4 functions *via* L-OPA1 as a novel determinant in the down-regulation of mitophagy during aging by shifting the mitochondrial fusion/fission cycle towards fusion.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

HEK293 cells and primary human dermal fibroblasts isolated from foreskin [35] were cultured at 37°C and 5% CO₂ in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) containing high glucose (4.5 g/L; 11965092, Thermo Fisher Scientific) with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin (100 units/mL)/streptomycin (100 µg/mL).

Cloning of SIRT4-eGFP expression constructs and generation of stable HEK293 lines

Full-length human SIRT4 (from pCMV6-SIRT4-Myc, Origene) and its mutants (H161Y, catalytically inactive; Δ 28N, lacking the N-terminal mitochondrial

translocation sequence) were cloned as C-terminal eGFP fusion proteins into pcDNA3.1. HEK293 cells were transfected using TurboFect (Thermo Fisher Scientific) and subjected to G418 (400 µg/ml) selection to generate stable cell lines. Expression of SIRT4-eGFP fusion constructs was validated by confocal microscopy, immunoblotting, and flow cytometry (Suppl. Fig. 1).

Measurement of mitochondrial reactive oxygen species (mtROS)

Cells were stained with cell-permeable dyes MitoTracker® Deep Red FM (100 µM; M22426) and MitoSOX™ Red (5 µM; M36008), both obtained from Thermo Fisher Scientific. The mitochondria-specific antioxidant MitoQ (10-(6'-ubiquinonyl) decyl triphenylphosphonium bromide) [47], kindly provided by Dr. Mike Murphy (Cambridge), was used to treat cells at a concentration of 100 nM for two days. Treatment of cells with the mitochondrial uncoupler CCCP (Carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone; 10 µM) occurred for two hours followed by harvesting and staining living cells in 1x PBS for 20 min. Analyses were performed with a BD FACSCanto™ II system (BD Biosciences) employing Flowing Software 2.5.1 (University of Turku, Finland).

Preparation of total cell lysates for immunoblot analysis

Cleared cell lysates were generated using lysis buffer containing 0.3% CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM Na₄O₇P₂, 1 µM DTT, 1x cOmplete™ protease inhibitor cocktail (CO-RO, Sigma-Aldrich). Lysates were cleared by centrifugation (11,000 x g at 4°C for 20 min). Protein concentration of the supernatants was determined using the Bradford assay (K015.1, Roth).

Immunoprecipitation of eGFP fusion proteins

The single-domain-anti-GFP antibody ("nanobody") method [62, 63] was employed to immunoprecipitate SIRT4-eGFP fusion proteins. Total cell lysates from HEK293 cells stably expressing eGFP, SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ 28N)-eGFP were prepared as described above. Two mg protein was diluted together with 10 µl single-domain-anti-GFP antibody beads in a final volume of 400 µl lysis buffer [0.3% CHAPS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM Na₄O₇P₂, 1 µM DTT, 1x cOmplete™ protease inhibitor cocktail]. This mixture

was incubated overnight at 4°C under rotation. On the next day, the beads were washed four-times with 1 ml washing buffer (lysis buffer without cOmplete™ protease inhibitor cocktail) followed by incubation in Laemmli loading buffer at 95°C for 5 min. Samples and total cell lysates (5% of input) were subjected to SDS-PAGE (10% gels) and proteins were transferred on nitrocellulose membranes (Hybond C, GE Healthcare). Membranes were incubated overnight at 4°C with antibodies against OPA1 [55], TACC3 (sc-22773, Santa Cruz Biotechnology), or GFP (11814460001, Roche Molecular Systems) which were diluted 1:1000 in TBS containing 0.05% Tween 20.

Measurement of autophagic flux by LC3B-II immunoblot analysis

HEK293 cells were seeded on six-well-plates and cultured for two days at 37°C and 5% CO₂. To induce autophagy or selective autophagy of mitochondria (mitophagy) cells were treated with 100 nM Rapamycin or 10 μM CCCP (Carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone; 857815, Sigma-Aldrich), respectively, for two hours. During the second hour cells were co-treated with (Bafilomycin A; 100 nM; Invivogen) to stall autophagic flux *via* inhibition of the fusion between lysosomes and autophagosomes. Total cell lysates (50 μg) were analyzed on 13.5% SDS-PAGE gels. Antibodies detecting both LC3B-I/ LC3B-II (#2775, Cell Signaling Technology) and β-actin/ACTB (MAB1501, Millipore) were diluted 1:1000 in TBS-Tween (0.05%) and incubated on immunoblot membranes overnight at 4°C. Primary antibodies were detected by IRDye® 680RD goat anti-mouse IgG (P/N 925-68070, LI-COR) and IRDye® 800CW goat anti-rabbit IgG (P/N 925-32211, LI-COR) secondary antibodies using the Odyssey® Imaging System (LI-COR Biosciences).

Immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy to analyze mitophagy

HEK293 cells stably expressing eGFP, SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ28N)-eGFP were transfected with pCMV6-mCherry-Parkin (PARK2) and treated with 10 μM CCCP together with 100 nM Bafilomycin A1 for two hours on the next day, as described above. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 20 min followed by a blocking step with 4% BSA/0.05% saponin for 30 min at room temperature. Cells were co-stained with primary antibodies against the mitochondrial marker MTC02 (abcam, ab3298; 1:500), and α-Tubulin/TUBA1B (Acris antibodies, SM568P; 1:500) overnight at 4°C. Secondary antibodies (Alexa Fluor 546-conjugated goat

anti-mouse IgG and Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-rat IgG) were from Life Technologies and used at a dilution of 1:500 for one hour at room temperature. Analyzes were performed with a LSM510-Meta confocal microscope (Zeiss) equipped with 40/1.3 immersion objectives and emission wavelengths of 468 nm, 488 nm, 543 nm, and 633 nm. Quantification of mCherry-Parkin dots was performed based on the mitochondrial content (MTC02 signal) using ImageJ software v1.49k and a specific macro (Suppl. Material & Methods).

Immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy to analyze mitochondrial morphology and mitochondrial fusion/tube formation

To obtain high resolution pictures for analysis of mitochondrial morphology HEK293 cells and primary human dermal fibroblasts were co-stained with antibodies against MTC02 (Abcam, ab3298; 1:500) and α-Tubulin (Abcam, ab52866, 1:500) overnight at 4°C. To increase detection of SIRT4-eGFP fusion proteins (in the case of stably transfected HEK293 cells) primary antibodies against GFP (Nacalai Tesque, Inc., GF090R, 1:1000) were employed. Secondary antibodies were Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rat, Alexa Fluor 546-conjugated goat anti-mouse IgG, and Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-rabbit IgG. Acquisitions were performed with the UltraVIEW spinning disk confocal microscope (Perkin Elmer) with emission wavelengths of 468 nm, 488 nm, 543 nm, and 633 nm and the Volocity 6.3 software (Perkin Elmer). Pictures were further analyzed using ImageJ software v1.49k employing specific macros for the analysis of mitochondrial mass and mitochondrial tube formation/length analysis (Suppl. Material & Methods).

Respirometric measurements

Oxygen consumption was determined in HEK293 cells (10⁶/ml media) stably expressing eGFP, SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ28N)-eGFP under basal and stress conditions as compared to control cells expressing eGFP. Measurement were performed essentially as described [52, 64] (leak: treatment with oligomycin A, 2 μg/ml; ETS: mitochondrial uncoupling of the electron transport system using CCCP, 400-500 nM; residual oxygen consumption, ROX: treatment with 500 nM rotenone and 2.5 μM antimycin A).

Transfection of oligonucleotides

Primary human dermal fibroblasts were transfected with miR-15b inhibitors (or control oligonucleotides) with or without SIRT4 siRNA duplexes to modulate SIRT4 expression essentially as described [35]. Transfection

efficiency was controlled by co-transfection of siGLO Red transfection indicators (GE Dharmacon).

Ionizing γ -irradiation (γ IR)

Primary human dermal fibroblasts were transfected with siRNA duplexes against SIRT4 essentially as described [35]. Following 24h, cells were exposed to γ IR (one dose of 20 Gy; 175 kV and 15 mA) using a Gulmay RS225 X-ray system from X-Strahl (Camberley, UK) and were cultured for another three days before analysis.

Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ s.d. Multiple comparisons were analyzed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) employing the GraphPad Prism software.

ABBREVIATIONS

BafA1: Bafilomycin A1; CCCP: Carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone; γ IR: gamma-irradiation; ETC: electron transport chain; GDH: glutamate dehydrogenase; miRNA: microRNA; mitoQ: 10-(6'-ubiquinonyl) decyltriphenylphosphoniumbromide; mtSIRT: mitochondrially localized sirtuin; OPA1: optic atrophy gene 1; $\Delta\Psi_m$: mitochondrial membrane potential; mtROS: mitochondrial reactive oxygen species; ROX: residual oxygen consumption; SASP: senescence associated secretory phenotype.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Katharina Schmitz, Chris Wichmann, Reza Ahmadian, and members of the institute for discussions and comments on the manuscript, Jan Borchert for help with ImageJ software, Axel Gödecke for use of the LI-COR imaging system, and Mike Murphy (Cambridge) and Marc Majora for sharing MitoQ.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

FUNDING

Strategischer Forschungsfond (grant 701.301.987) of the Heinrich-Heine-University (to R.P.P.), the research commission (grant 9772643) of the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University (to R.P.P.), and Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB728 project A05 (to R.P.P). Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB594 project B09 (to A.S.R) and research commission grant

2/2015 by the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf (to R.A. and A.S.R.).

REFERENCES

1. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153:1194–217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
2. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8:729–40. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
3. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961; 25:585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
4. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011; 192:547–56. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
5. Cavinato M, Jansen-Dürr P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Exp Gerontol*. 2017; 94:78–82. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.01.009>
6. Krutmann J, Gilchrist BA. (2006). Photoaging of skin. In: *Skin Aging* (Gilchrist BA, Krutmann J). (New York: Springer), pp. 33-44.
7. Tigges J, Krutmann J, Fritsche E, Haendeler J, Schaal H, Fischer JW, Kalfalah F, Reinke H, Reifemberger G, Stühler K, Ventura N, Gundermann S, Boukamp P, Boege F. The hallmarks of fibroblast ageing. *Mech Ageing Dev*. 2014; 138:26–44. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2014.03.004>
8. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, Saltness RA, Jeganathan KB, Verzosa GC, Pezeshki A, Khazaie K, Miller JD, van Deursen JM. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. 2016; 530:184–89. <https://doi.org/10.1038/nature16932>
9. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011; 479:232–36. <https://doi.org/10.1038/nature10600>
10. Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM. p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med*. 2017; 23:310–19. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.001>

11. Singh M, Piekorz RP. Senescence-associated lysosomal α -L-fucosidase (SA- α -Fuc): a sensitive and more robust biomarker for cellular senescence beyond SA- β -Gal. *Cell Cycle*. 2013; 12:1996. <https://doi.org/10.4161/cc.25318>
12. Ju Z, Choudhury AR, Rudolph KL. A dual role of p21 in stem cell aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1100:333–44. <https://doi.org/10.1196/annals.1395.036>
13. Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, Miwa S, Olijslagers S, Hallinan J, Wipat A, Saretzki G, Rudolph KL, Kirkwood TB, von Zglinicki T. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol*. 2010; 6:347. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.5>
14. Correia-Melo C, Marques FD, Anderson R, Hewitt G, Hewitt R, Cole J, Carroll BM, Miwa S, Birch J, Merz A, Rushton MD, Charles M, Jurk D, et al. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J*. 2016; 35:724–42. <https://doi.org/10.15252/embj.201592862>
15. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, Shirakawa K, Lim HW, Davis SS, Ramanathan A, Gerencser AA, Verdin E, Campisi J. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metab*. 2016; 23:303–14. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>
16. Mai S, Klinkenberg M, Auburger G, Bereiter-Hahn J, Jendrach M. Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *J Cell Sci*. 2010; 123:917–26. <https://doi.org/10.1242/jcs.059246>
17. Stab BR 2nd, Martinez L, Grismaldo A, Lerma A, Gutiérrez ML, Barrera LA, Sutachan JJ, Albarracín SL. Mitochondrial functional changes characterization in young and senescent human adipose derived MSCs. *Front Aging Neurosci*. 2016; 8:299. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00299>
18. Hamacher-Brady A, Brady NR. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73:775–95. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2087-8>
19. Komatsu M, Ichimura Y. Selective autophagy regulates various cellular functions. *Genes Cells*. 2010; 15:923–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01433.x>
20. Twig G, Shirihai OS. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14:1939–51. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3779>
21. Diot A, Morten K, Poulton J. Mitophagy plays a central role in mitochondrial ageing. *Mamm Genome*. 2016; 27:381–95. <https://doi.org/10.1007/s00335-016-9651-x>
22. Gaziev AI, Abdullaev S, Podlitsky A. Mitochondrial function and mitochondrial DNA maintenance with advancing age. *Biogerontology*. 2014; 15:417–38. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9515-2>
23. Kalfalah F, Janke L, Schiavi A, Tigges J, Ix A, Ventura N, Boege F, Reinke H. Crosstalk of clock gene expression and autophagy in aging. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8:1876–95. <https://doi.org/10.18632/aging.101018>
24. Korolchuk VI, Miwa S, Carroll B, von Zglinicki T. Mitochondria in cell senescence: is mitophagy the weak link? *EBioMedicine*. 2017; 21:7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.020>
25. López-Lluch G, Santos-Ocaña C, Sánchez-Alcázar JA, Fernández-Ayala DJ, Asencio-Salcedo C, Rodríguez-Aguilera JC, Navas P. Mitochondrial responsibility in ageing process: innocent, suspect or guilty. *Biogerontology*. 2015; 16:599–620. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9585-9>
26. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell*. 2011; 146:682–95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.030>
27. Weber TA, Reichert AS. Impaired quality control of mitochondria: aging from a new perspective. *Exp Gerontol*. 2010; 45:503–11. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.018>
28. García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, Ortet L, Rodríguez-Ubreva J, Rebollo E, Ruiz-Bonilla V, Gutarra S, Ballestar E, Serrano AL, Sandri M, Muñoz-Cánoves P. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*. 2016; 529:37–42. <https://doi.org/10.1038/nature16187>
29. García-Prat L, Muñoz-Cánoves P, Martínez-Vicente M. Dysfunctional autophagy is a driver of muscle stem cell functional decline with aging. *Autophagy*. 2016; 12:612–13. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1143211>
30. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*. 2010; 5:253–95. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250>

31. Li X, Kazgan N. Mammalian sirtuins and energy metabolism. *Int J Biol Sci.* 2011; 7:575–87. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.575>
32. Pirinen E, Lo Sasso G, Auwerx J. Mitochondrial sirtuins and metabolic homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012; 26:759–70. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.001>
33. van de Ven RA, Santos D, Haigis MC. Mitochondrial sirtuins and molecular mechanisms of aging. *Trends Mol Med.* 2017; 23:320–31. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.005>
34. Buler M, Andersson U, Hakkola J. Who watches the watchmen? Regulation of the expression and activity of sirtuins. *FASEB J.* 2016; 30:3942–60. <https://doi.org/10.1096/fj.201600410RR>
35. Lang A, Grether-Beck S, Singh M, Kuck F, Jakob S, Kefalas A, Altinolu-Hambüchen S, Graffmann N, Schneider M, Lindecke A, Brenden H, Felsner I, Ezzahoini H, et al. MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4. *Aging (Albany NY).* 2016; 8:484–505. <https://doi.org/10.18632/aging.100905>
36. Castex J, Willmann D, Kanouni T, Arrigoni L, Li Y, Friedrich M, Schleicher M, Wöhrle S, Pearson M, Kraut N, Méret M, Manke T, Metzger E, et al. Inactivation of Lsd1 triggers senescence in trophoblast stem cells by induction of Sirt4. *Cell Death Dis.* 2017; 8:e2631. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.48>
37. Samant SA, Zhang HJ, Hong Z, Pillai VB, Sundaresan NR, Wolfgeher D, Archer SL, Chan DC, Gupta MP. SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress. *Mol Cell Biol.* 2014; 34:807–19. <https://doi.org/10.1128/MCB.01483-13>
38. Osborne B, Bentley NL, Montgomery MK, Turner N. The role of mitochondrial sirtuins in health and disease. *Free Radic Biol Med.* 2016; 100:164–74. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.197>
39. Yang L, Ma X, He Y, Yuan C, Chen Q, Li G, Chen X. Sirtuin 5: a review of structure, known inhibitors and clues for developing new inhibitors. *Sci China Life Sci.* 2017; 60:249–56. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0060-7>
40. Polletta L, Vernucci E, Carnevale I, Arcangeli T, Rotili D, Palmerio S, Steegborn C, Nowak T, Schutkowski M, Pellegrini L, Sansone L, Villanova L, Runci A, et al. SIRT5 regulation of ammonia-induced autophagy and mitophagy. *Autophagy.* 2015; 11:253–70. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1009778>
41. Fu L, Dong Q, He J, Wang X, Xing J, Wang E, Qiu X, Li Q. SIRT4 inhibits malignancy progression of NSCLCs, through mitochondrial dynamics mediated by the ERK-Drp1 pathway. *Oncogene.* 2017; 36:2724–36. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.425>
42. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell.* 2006; 126:941–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.057>
43. Mathias RA, Greco TM, Oberstein A, Budayeva HG, Chakrabarti R, Rowland EA, Kang Y, Shenk T, Cristea IM. Sirtuin 4 is a lipamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell.* 2014; 159:1615–25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.046>
44. Anderson KA, Huynh FK, Fisher-Wellman K, Stuart JD, Peterson BS, Douros JD, Wagner GR, Thompson JW, Madsen AS, Green MF, Sivley RM, Ilkayeva OR, Stevens RD, et al. SIRT4 is a lysine deacylase that controls leucine metabolism and insulin secretion. *Cell Metab.* 2017; 25:838–855.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.003>
45. Jeong SM, Xiao C, Finley LW, Lahusen T, Souza AL, Pierce K, Li YH, Wang X, Laurent G, German NJ, Xu X, Li C, Wang RH, et al. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. *Cancer Cell.* 2013; 23:450–63. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.024>
46. Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P, Verdin E. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem.* 2007; 282:33583–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705488200>
47. Murphy MP. Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage. *Biochem Soc Trans.* 2016; 44:1219–26. <https://doi.org/10.1042/BST20160108>
48. Saretzki G, Murphy MP, von Zglinicki T. MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress. *Aging Cell.* 2003; 2:141–43. <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2003.00040.x>

49. Held NM, Houtkooper RH. Mitochondrial quality control pathways as determinants of metabolic health. *BioEssays*. 2015; 37:867–76. <https://doi.org/10.1002/bies.201500013>
50. de Moura MB, Uppala R, Zhang Y, Van Houten B, Goetzman ES. Overexpression of mitochondrial sirtuins alters glycolysis and mitochondrial function in HEK293 cells. *PLoS One*. 2014; 9:e106028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106028>
51. Ho L, Titus AS, Banerjee KK, George S, Lin W, Deota S, Saha AK, Nakamura K, Gut P, Verdin E, Kolthur-Seetharam U. SIRT4 regulates ATP homeostasis and mediates a retrograde signaling via AMPK. *Aging (Albany NY)*. 2013; 5:835–49. <https://doi.org/10.18632/aging.100616>
52. Anand R, Strecker V, Urbach J, Wittig I, Reichert AS. Mic13 is essential for formation of crista junctions in mammalian cells. *PLoS One*. 2016; 11:e0160258. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160258>
53. MacVicar T, Langer T. OPA1 processing in cell death and disease - the long and short of it. *J Cell Sci*. 2016; 129:2297–306. <https://doi.org/10.1242/jcs.159186>
54. MacVicar TD, Lane JD. Impaired OMA1-dependent cleavage of OPA1 and reduced DRP1 fission activity combine to prevent mitophagy in cells that are dependent on oxidative phosphorylation. *J Cell Sci*. 2014; 127:2313–25. <https://doi.org/10.1242/jcs.144337>
55. Barrera M, Koob S, Dikov D, Vogel F, Reichert AS. OPA1 functionally interacts with MIC60 but is dispensable for crista junction formation. *FEBS Lett*. 2016; 590:3309–22. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12384>
56. Biala AK, Dhingra R, Kirshenbaum LA. Mitochondrial dynamics: orchestrating the journey to advanced age. *J Mol Cell Cardiol*. 2015; 83:37–43. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.04.015>
57. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*. 2017; 86:715–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
58. Yang W, Nagasawa K, Münch C, Xu Y, Satterstrom K, Jeong S, Hayes SD, Jedrychowski MP, Vyas FS, Zaganjor E, Guarani V, Ringel AE, Gygi SP, et al. Mitochondrial Sirtuin network reveals dynamic SIRT3-dependent deacetylation in response to membrane depolarization. *Cell*. 2016; 167:985–1000.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.016>
59. Dröse S, Brandt U, Wittig I. Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1844:1344–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.02.006>
60. Korwitz A, Merkwirth C, Richter-Dennerlein R, Tröder SE, Sprenger HG, Quirós PM, López-Otín C, Rugarli EI, Langer T. Loss of OMA1 delays neurodegeneration by preventing stress-induced OPA1 processing in mitochondria. *J Cell Biol*. 2016; 212:157–66. <https://doi.org/10.1083/jcb.201507022>
61. Guedouari H, Daigle T, Scorrano L, Hebert-Chatelain E. Sirtuin 5 protects mitochondria from fragmentation and degradation during starvation. *Biochim Biophys Acta*. 2017; 1864:169–76. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.015>
62. Franke M, Schröder J, Monhasery N, Ackfeld T, Hummel TM, Rabe B, Garbers C, Becker-Pauly C, Floss DM, Scheller J. Human and murine interleukin 23 receptors are novel substrates for a disintegrin and metalloproteases ADAM10 and ADAM17. *J Biol Chem*. 2016; 291:10551–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.710541>
63. Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC, Leonhardt H. A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2008; 7:282–89. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700342-MCP200>
64. Pesta G, Gnaiger E. (2012). High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle. In: Palmeira C and Moreno AJ, eds. *Methods in Molecular Biology*: Springer Science+Business Media, pp. 25-58.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

ImageJ based analysis of confocal microscopic pictures

The following macros were used to quantify mCherry-Parkin dots (A), mitochondrial mass (B), and the length of mitochondrial tubes (C):

(A) Confocal pictures were recorded in ten Z-stacks and analyzed with z-project [run("Z Project...", "projection=[Average Intensity]"); run("Split Channels");]. The MTC02 and mCherry-Parkin channels were made binary [selectWindow("Parkin.lsm"); run("Subtract Background...", "rolling=300 stack"); run("Auto Threshold", "method=MaxEntropy white"); selectWindow("MTC02.lsm"); run("Auto Threshold", "method=RenyiEntropy white");]. The number of mCherry-Parkin dots localized in the regions with MTC02 signals were analyzed with the plugin "Speckle Inspector" [2] [run("Speckle Inspector", "big=MTC02.tif small=Parkin.tif min_object=3 min_object_circularity=0.3 min_speckle_size=3 max_speckle_size=50 exclude roi speckle");].

(B) Confocal pictures were recorded in ten and more Z-stacks and analyzed with z-project [run("Z Project...", "projection=[Average Intensity]"); run("Split Channels");]. Further on α -Tubulin signal was reduced to a binary picture [run("Median...", "radius=4"); run("Subtract Background...", "rolling=200"); run("Auto Threshold", "method=Li dark");]. MTC02 signal was detected in regions of interest of the α -Tubulin signal [run("Analyze Particles...", "size=50-Infinity add"); selectWindow(MTC02); roiManager("Measure");].

(C) Confocal pictures were recorded in ten and more Z-stacks and analyzed with z-project [run("Z Project...", "projection=[Average Intensity]"); run("Split Channels");]. The MTC02 channel was made binary [run("Subtract Background...", "rolling=300 stack"); run("Auto Threshold", "method=Default dark");]. The mitochondrial length was measured by "Particle Length (via Skeleton)" [2] [run("Analyze Particles...", "size=0,3-Infinity show=Outlines display");].

Measurement of BrdU incorporation

Primary human dermal fibroblasts were transfected with miR-15b-inhibitors with co-transfection of siRNA duplexes against SIRT4 or control siRNA duplexes.

Following two days, cells were incubated for another two days in culture media containing 10 μ M BrdU. Staining of fixed cells and further FACS analysis were performed as described in the BrdU staining kit (556029, BD Biosciences). DNA was stained for 10 min with 7-AAD (10 μ l/10⁶ cells; 00-6993-50, eBioscience™).

Quantification of mitochondrial mass by MitoTracker® FACS

HEK293 cells were stained with the cell-permeable dye MitoTracker® Deep Red FM (100 μ M; Thermo Fisher Scientific) for 20 min followed by flow cytometry using a BD FACSCanto™ II system (BD Biosciences) and Flowing Software 2.5.1 (University of Turku, Finland) or FlowJo V10 (FlowJo, LLC).

Immunoprecipitation of OPA1 from stably transfected HEK293 cells

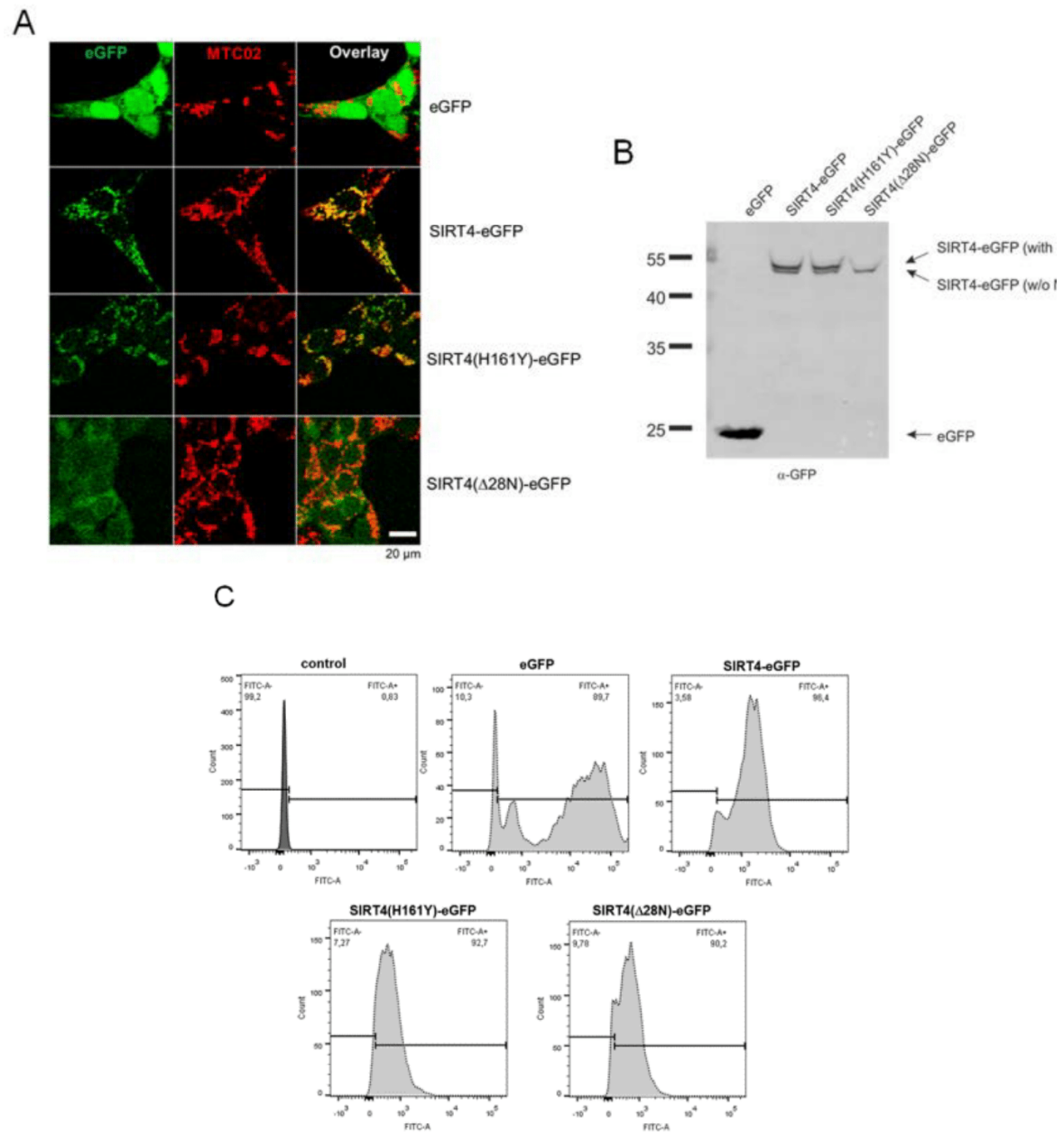
Total cell lysates from HEK293 cells stably expressing eGFP, SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ 28N)-eGFP were prepared as described above. Two mg protein was incubated with 0.5 μ l rabbit anti-OPA1 antibody [3] in a total volume of 300 μ l lysis buffer [0.3% CHAPS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM Na₄O₇P₂, 1 μ M DTT, 1x cOmplete™ protease inhibitor cocktail (Roche)] overnight at 4°C. Protein A/G sepharose beads (Santa Cruz Biotechnology 10 μ l beads in 100 μ l lysis buffer) were added and followed by incubation for two hours at 4°C under rotation. The beads were washed four-times with 1 ml washing buffer (lysis buffer without cOmplete™ protease inhibitor cocktail) followed by incubation in Laemmli loading buffer at 95°C for 5 min. Samples and total cell lysates (5% of input) were subjected to SDS-PAGE (10% gels) and proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Hybond C, GE Healthcare). Membranes were incubated overnight at 4°C with antibodies against GFP (11814460001, Roche Molecular Systems) and OPA1 (612607, BD Biosciences) diluted 1:1000 in TBS containing 0.05% Tween 20.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

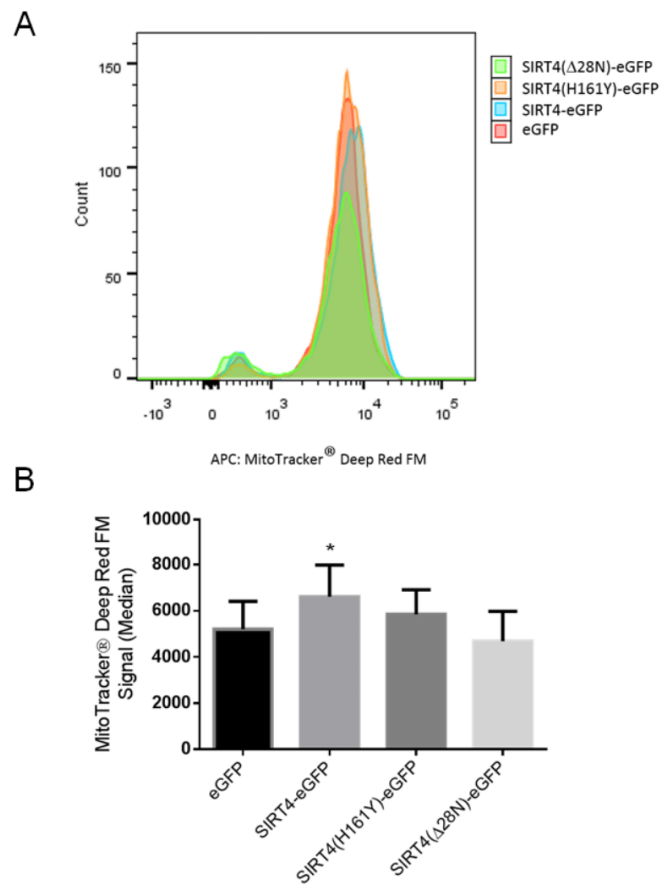
1. Lang A, Grether-Beck S, Singh M, Kuck F, Jakob S, Kefalas A, Altinluk-Hambuchen S, Graffmann N, Schneider M, Lindecke A, Brenden H, Felsner I, Ezzahoini H, et al. MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4. *Aging* (Albany NY). 2016; 8:534-559. <https://doi.org/10.18632/aging.100905>

2. Brocher J. The BioVoxel Image Processing and Analysis Toolbox. EuBIAS-Conference. 2015, Jan 5.
3. Barrera M, Koob S, Dikov D, Vogel F and Reichert AS. OPA1 functionally interacts with MIC60 but is dispensable for crista junction formation. FEBS Lett. 2016; 590(19):3309-3322.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468>

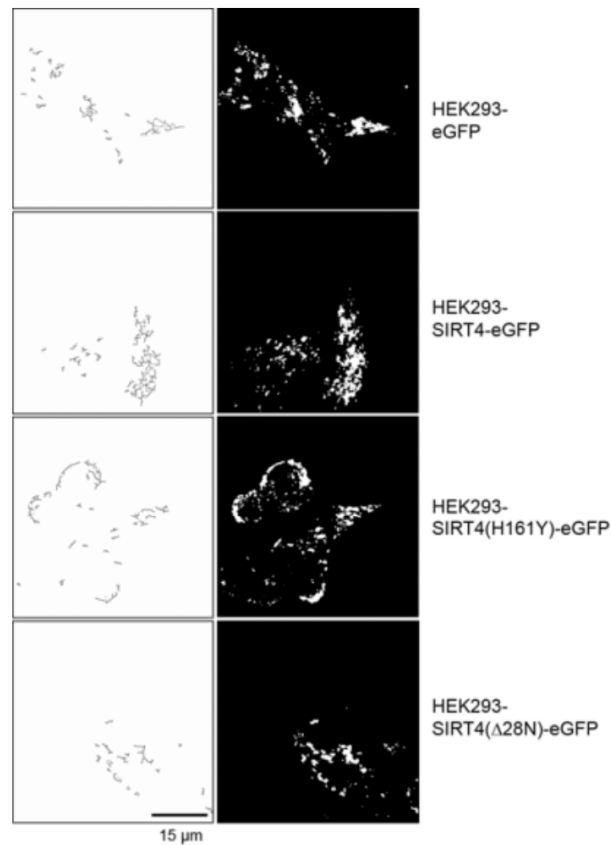
SUPPLEMENTARY FIGURES



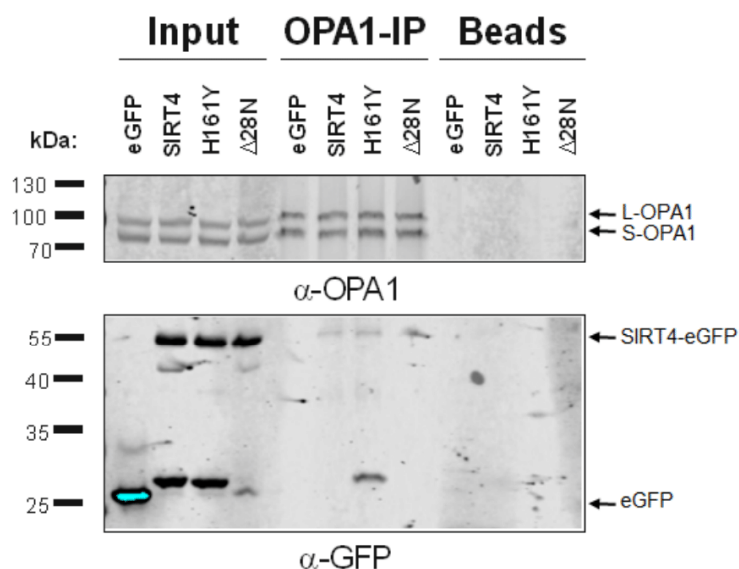
Supplementary Figure S1. Validation of subcellular localization and expression of eGFP, SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, and SIRT4(Δ28N)-eGFP in HEK293 cells. HEK293 cells expressing eGFP, SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ28N)-eGFP were subjected to confocal microscopic (A), immunoblot (B), and flow cytometric (C) analysis. MTS, mitochondrial translocation sequence. Representative experiments are depicted.



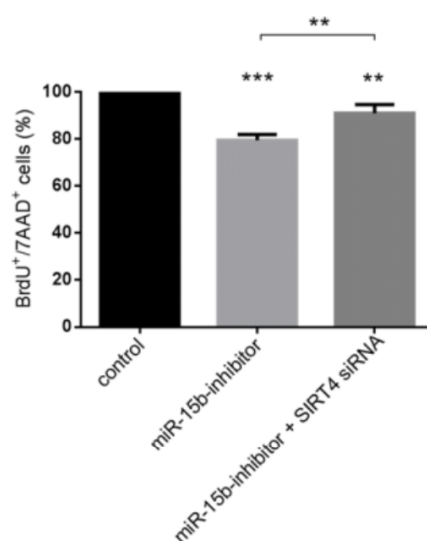
Supplementary Figure S2. SIRT4-eGFP expression results in a higher mitochondrial mass in HEK293 cells. (A) Representative flow cytometry profile of HEK293 cells expressing eGFP, SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ 28N)-eGFP stained with MitoTracker® Deep Red FM. (B) Quantitative analysis of MitoTracker® Deep Red FM signals. To evaluate statistical significance, two-way ANOVA followed-up Tukey's test was performed (* $p < 0.05$; $n = 3$ experiments).



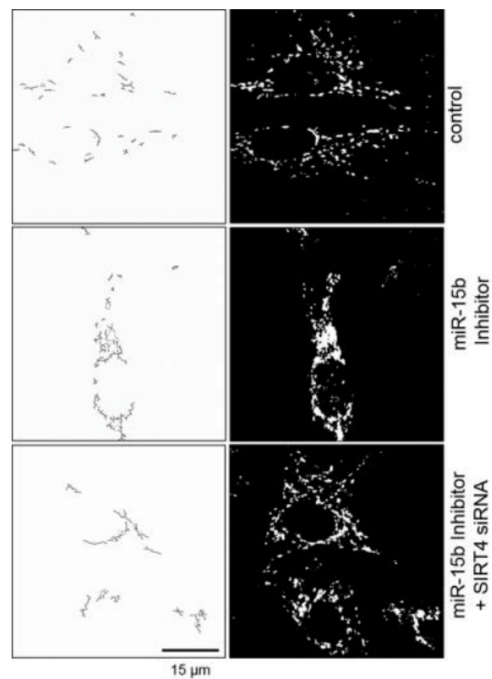
Supplementary Figure S3. Visualization and analysis of the length of fused mitochondria in HEK293 cells stably expressing SIRT4-eGFP or its mutants. Tracking of fused mitochondria which were detected by MTC02 staining (right panels) was analyzed by an ImageJ software based Macro (left panels; Material and Methods & suppl. Material and Methods).



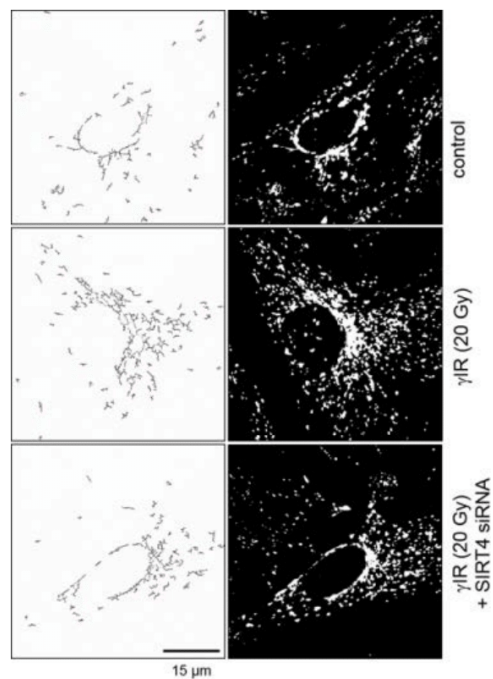
Supplementary Figure S4. Co-immunoprecipitation of OPA1 and SIRT4-eGFP. Total cell lysates from HEK293 cells stably expressing SIRT4-eGFP, SIRT4(H161Y)-eGFP, or SIRT4(Δ 28N)-eGFP were subjected to immunoprecipitation analysis (OPA1-IP) using a rabbit anti-OPA1 antibody (suppl. Material & Methods) followed by detection of co-immunoprecipitated SIRT4-eGFP. Total cell lysates were loaded as input control (5%) and samples w/o antibody employed as beads control.



Supplementary Figure S5. SIRT4 upregulation upon transfection of miR-15b inhibitors inhibits BrdU incorporation in primary human dermal fibroblasts. Primary human dermal fibroblasts were transfected with miR-15b inhibitors (or control oligonucleotides) in the presence or absence of siRNA duplexes against SIRT4 [35] and cultured for two days. Cells were thereafter pulsed with BrdU for another two days and thereafter subjected to FACS analysis. To evaluate statistical significance, two-way ANOVA followed by Tukey's test was performed (* p <0.05; n =3 experiments).



Supplementary Figure S6. Visualization and analysis of the length of fused mitochondria in primary human dermal fibroblasts upon SIRT4 upregulation through miR-15b inhibition. Tracking of fused mitochondria which were detected by MTC02 staining (right panels) was analyzed by an ImageJ software based Macro (left panels; Material and Methods & suppl. Material and Methods).



Supplementary Figure S7. Visualization and analysis of the length of fused mitochondria in primary human dermal fibroblasts upon γ -irradiation. Tracking of fused mitochondria which were detected by MTC02 staining (right panels) was analyzed by an ImageJ software based Macro (left panels; Material and Methods & suppl. Material and Methods).

SUPPLEMENTARY MOVIES

Please browse the Full text version of this manuscript to see the Supplementary Movies 1-10.

Suppl. Movie 1: 3D reconstruction of the mitochondrial network in HEK293-eGFP cells. Mitochondria were detected by MTC02 staining and spinning disk confocal microscopic analysis.

https://s3-us-west-1.amazonaws.com/paperchase-aging/supplemental_materials/7P7uWmgXvegQKWRjb_sd2.mp4

Suppl. Movie 2: 3D reconstruction of the mitochondrial network in HEK293-SIRT4-eGFP cells. Mitochondria were detected by MTC02 staining and spinning disk confocal microscopic analysis.

https://s3-us-west-1.amazonaws.com/paperchase-aging/supplemental_materials/7P7uWmgXvegQKWRjb_sd3.mp4

Suppl. Movie 3: 3D reconstruction of the mitochondrial network in HEK293-SIRT4(H161Y)-eGFP cells. Mitochondria were detected by MTC02 staining and spinning disk confocal microscopic analysis.

https://s3-us-west-1.amazonaws.com/paperchase-aging/supplemental_materials/7P7uWmgXvegQKWRjb_sd4.mp4

Suppl. Movie 4: 3D reconstruction of the mitochondrial network in HEK293-SIRT4(Δ 28N)-eGFP cells. Mitochondria were detected by MTC02 staining and spinning disk confocal microscopic analysis.

https://s3-us-west-1.amazonaws.com/paperchase-aging/supplemental_materials/7P7uWmgXvegQKWRjb_sd5.mp4

Suppl. Movie 5: 3D reconstruction of the mitochondrial network in primary human dermal fibroblasts. Mitochondria were detected by MTC02 staining and spinning disk confocal microscopic analysis.

https://s3-us-west-1.amazonaws.com/paperchase-aging/supplemental_materials/7P7uWmgXvegQKWRjb_sd6.mp4

Suppl. Movie 6: 3D reconstruction of the mitochondrial network in primary human dermal fibroblasts transfected with miR-15b inhibitors. Mitochondria were detected by MTC02 staining and spinning disk confocal microscopic analysis.

https://s3-us-west-1.amazonaws.com/paperchase-aging/supplemental_materials/7P7uWmgXvegQKWRjb_sd7.mp4

Suppl. Movie 7: 3D reconstruction of the mitochondrial network in primary human dermal fibroblasts transfected with miR-15b inhibitors and siRNA duplexes against SIRT4. Mitochondria were detected by MTC02 staining and spinning disk confocal microscopic analysis.

https://s3-us-west-1.amazonaws.com/paperchase-aging/supplemental_materials/7P7uWmgXvegQKWRjb_sd8.mp4

Suppl. Movie 8: 3D reconstruction of the mitochondrial network in primary human dermal fibroblasts (sham treated). Mitochondria were detected by MTC02 staining and spinning disk confocal microscopic analysis.

https://s3-us-west-1.amazonaws.com/paperchase-aging/supplemental_materials/7P7uWmgXvegQKWRjb_sd9.mp4

Suppl. Movie 9: 3D reconstruction of the mitochondrial network in primary human dermal fibroblasts subjected to γ -irradiation (20 Gy). Mitochondria were detected by MTC02 staining and spinning disk confocal microscopic analysis.

https://s3-us-west-1.amazonaws.com/paperchase-aging/supplemental_materials/7P7uWmgXvegQKWRjb_sd10.mp4

Suppl. Movie 10: 3D reconstruction of the mitochondrial network in primary human dermal fibroblasts subjected to transfection with siRNA duplexes against SIRT4 and γ -irradiation (20 Gy). Mitochondria were detected by MTC02 staining and spinning disk confocal microscopic analysis.

https://s3-us-west-1.amazonaws.com/paperchase-aging/supplemental_materials/7P7uWmgXvegQKWRjb_sd11.mp4

6.3. Analyse des SIRT4-Proteininteraktoms in mitotischen HEK293-Zellen

Lang A., Bergmann L., Altinoluk-Hambüchen S., Hänsel J., Iram A., Nakhaei-Rad S., Franke M., Stefanski A., Scheller J., Ahmadian MR., Stühler K., Piekorz RP. *Manuskript in Vorbereitung.*

In dieser Arbeit wurde das SIRT4-Interaktom in HEK293-Zellen, die SIRT4-eGFP oder die enzymatisch inaktive Mutante H161Y exprimieren, mittels massenspektrometrischer Analyse in zwei unabhängigen Versuchsreihen analysiert. Basierend auf früheren Arbeiten wurde vermutet, dass SIRT4 eine putative extramitochondriale Lokalisation an den Zentrosomen (Spindelpolen) und dem Mikrotubuligerüst aufweist und daher eine mögliche Funktion in der Mitose einnimmt [1, 2]. Mittels *live-cell-imaging* konnte gezeigt werden, dass erhöhte Mengen von SIRT4 (nicht aber SIRT4-H161Y) die Dauer der mitotischen Zellteilung signifikant verlängern. SIRT4 scheint des Weiteren eine inhibitorische Wirkung auf den Übergang von der G₂-Phase in die Mitose nach reversibler Inhibierung von CDK1 einzunehmen. Die Überexpression von SIRT4-eGFP verlängerte die Mitosephase in HEK293-Zellen. Insbesondere konnte eine Interaktion und subzelluläre Kolokalisation von SIRT4 mit Mikrotubuli beobachtet werden. Auf der Basis dieser Daten wurde die Analyse zwischen SIRT4 und dessen Interaktom mithilfe der Massenspektrometrie durchgeführt. Für die Analyse eines mitosespezifischen Interaktoms wurden daher SIRT4-überexprimierende HEK293-Zellen in der G₂-Phase reversibel arretiert und danach in die Mitose entlassen. Die Interaktionsanalyse wurde durch eine Immunpräzipitation mithilfe von GFP *single domain antibodies* 45 Minuten nach Induktion der Mitose durchgeführt (Abb. 5). Da bis dato nur Interaktionen zwischen mitochondrialem SIRT4 und anderen mitochondrialen Proteinen beschrieben wurden, wurde das gesamte zelluläre Interaktom von SIRT4 ausgewertet.

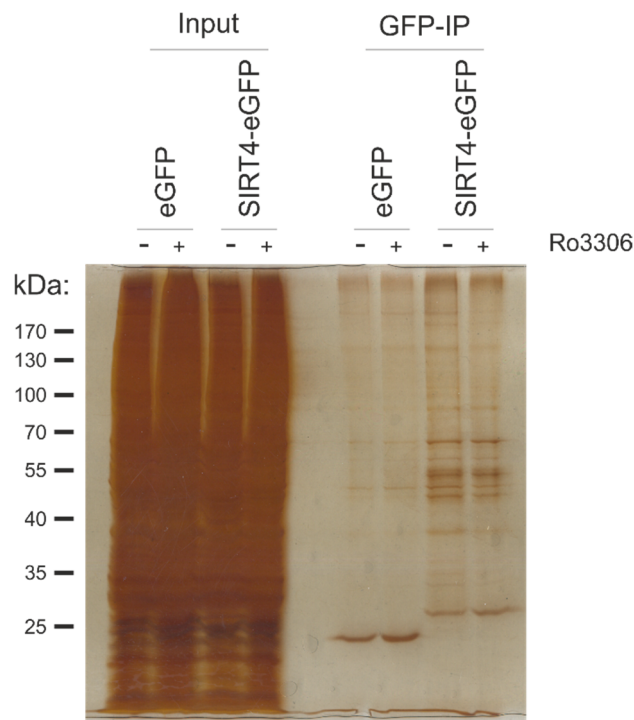


Abb. 5: Darstellung des SIRT4-eGFP-Interaktoms mittels einer Silbernitratfärbung.

Immunaufreinigung mit dem GFP *single domain antibody*-System aus HEK293-eGFP- und HEK293-SIRT4-eGFP-Zellen. Die Zellen wurden zuvor mit dem CDK1-Inhibitor Ro3306 (4 μ M) über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und nach einem Mediumwechsel und weiteren 45 min Inkubation lysiert. Die Immunaufreinigung wurde wie in Kapitel 6.2 beschrieben durchgeführt. Die Messung und Analyse der Massenspektrometrie folgte nach Denaturierung und kurzer Auftrennung der Immunpräzipitate mittels SDS-PAGE und Silberfärbung.

Mittels *Cytoscape* (www.cytoscape.org; Cytoscape Consortium), einem bioinformatisches Programm zur Darstellung von molekularen Protein-Protein-Interaktionen, und des Addons *ClueGO* [3, 4] konnte das SIRT4-Interaktom hinsichtlich biologischer Prozesse gegliedert werden (Abb. 6). Interessanterweise besteht das SIRT4-Interaktom in HEK293-Zellen aus mehr als 100 Proteinen. SIRT4 zeigte Interaktionen mit biologischen Prozessen wie den Glutaminmetabolismus, Interaktion mit Tubulinkomponenten, die mitochondriale Proteinlokalisierung und Organisation, mitochondrialer Atmungskette, tRNA-Aminoacylierung und der Antwort auf Proteindenaturierung (Abb. 5 und Abb. 6).



Um die Interaktion einzelner spezifischer Proteine zu untersuchen, wurde eine Immunpurifikation, wie im Kapitel 6.2 beschrieben, durchgeführt und verschiedene Proteine des Interaktoms im Westernblot detektiert. Interaktionen konnten zwischen SIRT4 und Bestandteilen der mitochondrialen ATP-Synthase-Untereinheit alpha (ATP5A1), der

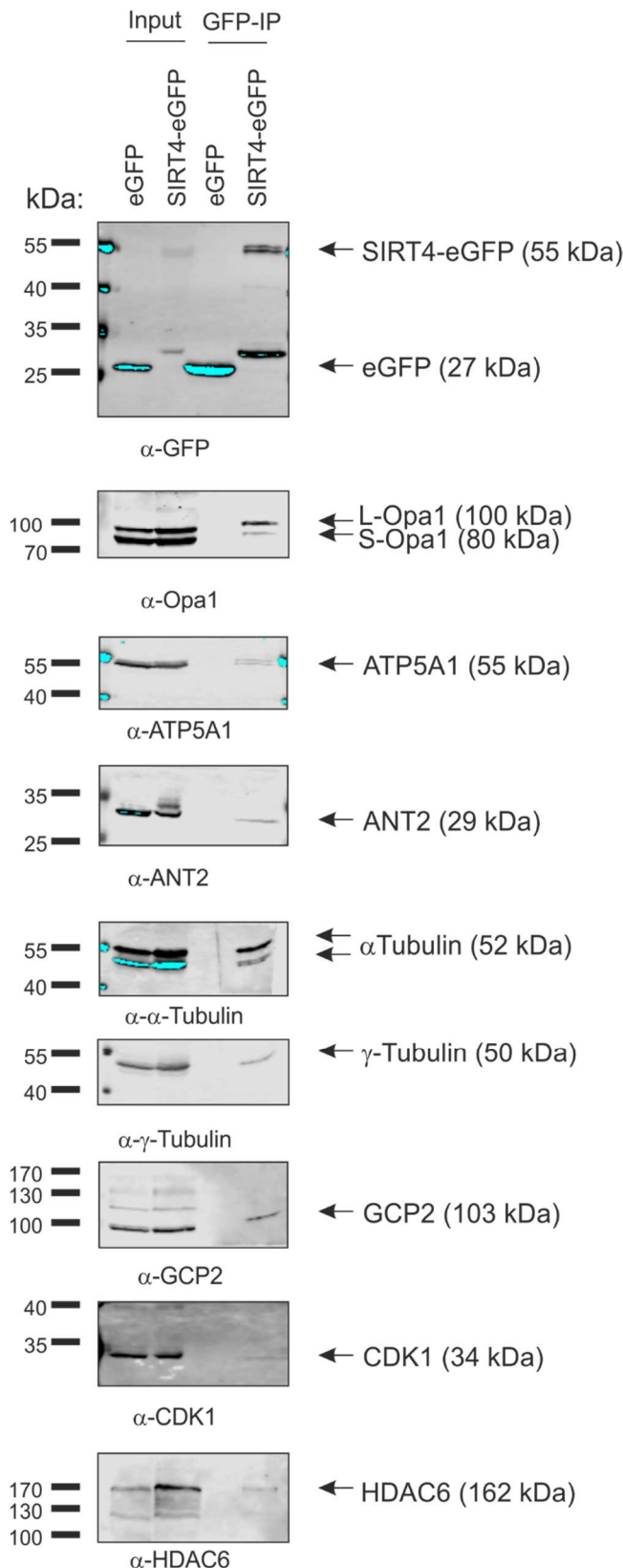


Abb. 7: SIRT4 interagiert mit verschiedenen Proteinen, die an der Mitose, ATP-Synthese oder mitochondrialen Qualitätskontrolle beteiligt sind oder diese Prozesse regulieren.

Die SIRT4-eGFP-Immunpräzipitation (IP) wurde mit Gesamtzelllysaten aus HEK293-Linien durchgeführt, die stabil eGFP oder SIRT4-eGFP exprimieren. Hierzu wurden *single-domain-antibodies* genutzt, die gegen eGFP gerichtet sind. Die IP wurde mit zwei mg Gesamtprotein durchgeführt und im Westernblot mit Antikörpern gegen das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP, 11814460001, Roche Molecular Systems), *optic atrophy protein 1* (OPA1, generiert durch die Verwendung eines C-terminalen Peptids von OPA1 [5]), *ATP synthase subunit alpha* (ATP5A1, 14676-1-AP, Proteintech), *ADP/ATP translocase 2* (ANT2, E2B9D, Cell Signaling Technology), α-Tubulin (EP1332Y, Abcam), γ-Tubulin (T6557, Sigma Aldrich), *gamma-tubulin complex component 2* (GCP2, GTX102281, GeneTex), *cyclin-dependent kinase 1* (CDK1, 610037, BD Pharmingen) und *Histone deacetylase 6* (HDAC6, SC 11420, Santa Cruz) analysiert.

ADP/ATP Translokase 2 (ANT2) und dem Mitochondrien-vernetzenden Regulator und GTPase *Optic atrophy protein 1* (OPA1) validiert werden. Ebenfalls konnte eine Interaktion von SIRT4 mit dem α -Tubulin-deacetylierenden Protein Histone Deacetylase 6 (HDAC6), α -Tubulin und γ -Tubulin, deren Regulator *gamma-tubulin complex component 2* (GCP2) und der G₂/Mitose-regulierenden Zellzykluskinase *cyclin-dependent kinase 1* (CDK1) bestätigt werden (Abb. 7). Dies eröffnete insbesondere die Frage für weitergehende Untersuchungen, welche Funktionen SIRT4 in diesen extra-mitochondrialen biologischen Prozessen (Zellzyklus, Mitose) einnimmt.

Diskussion

Das in dieser Arbeit beschriebene SIRT4-Interaktom lässt neue putative Funktionen von SIRT4 vermuten, die z. T. von dessen extramitochondrialer Lokalisation abhängig sein könnten (Abb. 6 und Abb. 7). Zum einen beinhaltet dieses Interaktom Proteine, die eine mitochondriale Lokalisation und Funktion besitzen und durch SIRT4 direkt (als Substrate) oder indirekt reguliert werden könnten. Zum anderen gibt es deutliche Hinweise darauf, dass SIRT4 eine extramitochondriale Funktion in der Mitose besitzen könnte [1, 2]). Das hier beschriebene SIRT4-Interaktom (Abb. 6 und Abb. 7) kann anhand der biologischen Aktivität in Funktionsgruppen unterteilt werden. Auf der einen Seite stehen die intramitochondrialen Aktivitäten, wie Regulation des Glutaminmetabolismus, mitochondriale Lokalisation und Organisation, tRNA-Aminoacylierung und natürlich die mitochondriale Atmungskette. Die extramitochondriale Seite besteht aus Prozessen wie die (De-)Polymerisierung von Tubulinen, die Interaktion mit Tubulinen und die Hitzeschock-Antwort.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass SIRT4 zwei Schlüsselenzyme in der Anaplerose des Zitratzyklus bzw. der zellulären Energiegewinnung inhibiert: die Glutamatdehydrogenase (GDH) [6] sowie die Pyruvatdehydrogenase (PDH) [7]. SIRT4 könnte auf diesem Wege durch Reduktion der Energieproduktion die Mitose der Zelle einschränken. In der vorliegenden Arbeit konnte in ersten Experimenten die Interaktion von SIRT4 mit dem GDH-Komplex bestätigt werden, nicht jedoch eine Interaktion mit dem PDH-Komplex. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass SIRT4 durch Interaktion mit dem ATP/ADP-Transporter ANT2 als negativer

Regulator der ATP-Synthese fungiert [8]. Als Erweiterung dieser Studien konnten in der vorliegenden Arbeit Interaktionen zwischen SIRT4 und Bestandteilen der Atmungskette beobachtet werden. Darunter befinden sich Proteine wie *NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2* und *3* (NDUFS2 und NDUFS3; Bestandteile des Komplex I der Atmungskette) und *ATP synthase subunit alpha* und *gamma* (ATP5A1 und ATP5C1; Bestandteile des Komplex V der Atmungskette). Die negative Wirkung der SIRT4-Überexpression auf die Atmungskette wurde bereits in Kapitel 6.2 beschrieben. Die Interaktion mit der ATP-Synthase wurde zwar bereits in früheren Studien beobachtet, jedoch bisher nicht analysiert ob ein Zusammenhang zwischen dieser Interaktion und einer möglichen physiologischen Dysfunktion existiert [9]. Die inhibierende Wirkung auf die Atmungskette, die ROS-Zunahme und die erhöhte Sensitivierung gegenüber dem Entkoppler CCCP könnten durch eine mögliche modulierende Funktion von SIRT4 auf diese biologischen Prozesse erklärt werden [10] (Kap. 6.2; [45]). Hierzu müssen jedoch weitere Studien durchgeführt werden. Im Gegensatz zu SIRT4 gibt es zu SIRT3 als Deacetylase bereits Beobachtungen bezüglich einer direkten regulierenden Funktion in der Atmungskette [9].

Eine andere Möglichkeit zur Regulation der Zellzyklusprogression und Mitose besteht in der Modulation der mitochondrialen ROS-Mengen. Die Zunahme von ROS wird mit einem verstärkten Arrest des G₂-M-Übergangs in Verbindung gebracht [11–13]. SIRT4 könnte auf zwei Wegen zur Zunahme von ROS beitragen: Zum einen könnte die Interaktion zwischen SIRT4 und den Komplexen der Atmungskette in letzterer zu Fehlfunktionen führen, welche ein Auslöser für die Entstehung von mehr ROS sein könnten. Zum anderen kann eine erhöhte Expression von SIRT4 die mitochondriale Qualitätskontrolle/Mitophagie durch die Stabilisierung von L-OPA1 unterdrücken (Kapitel 6.2, [45]). Die fehlende Qualitätskontrolle fördert eine Zunahme geschädigter und fehlfunktionierender Mitochondrien, die mehr ROS produzieren. Geschädigte Mitochondrien sind ein Kennzeichen gealterter/seneszenter Zellen und können über die Zeit eine große inhibitorische Wirkung auf die Zellproliferation ausüben.

Die Bereitstellung verschiedener tRNAs für die Translation erfordert einen Zwischenschritt, in welchem Aminoacyl-tRNA synthetisiert werden, d.h. tRNAs mit Aminosäuren beladen werden [14]. Die Möglichkeit, dass SIRT4 als Deacetylase die Translation in Mitochondrien durch die Regulation der tRNA-Synthese regulieren könnte, ist nicht auszuschließen [15]. In dieser Arbeit

konnte mithilfe der Massenspektrometrie eine SIRT4-Interaktion mit verschiedenen Aminosäuren-tRNA-Ligasen, wie *Aspartate-tRNA ligase* (SYDM; *DARS2*) und *Alanine-tRNA ligase* (SYAM; *AARS2*), beobachtet werden. Weitere Hinweise auf die Konsistenz dieser Interaktionen ist das vor kurzem publizierte Sirtuininteraktom in Mitochondrien, in denen diese SIRT4-Interaktoren ebenfalls mittels Co-Immunpräzipitation gefunden werden konnten [9]. Interessanterweise konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Defekten in der mitochondrialen tRNA-Synthese und Wachstumsdefekten in mitotischen Geweben in *Drosophila melanogaster* gefunden werden [16].

Die Modulation der Mitose könnte auch durch eine Interaktion von SIRT4 mit Proteinen erklärt werden, die zum großen Teil außerhalb des Mitochondriums lokalisieren. Eines der interessantesten Beispiele hierfür ist die Histoneacetylase 6 (HDAC6). Es ist in der Lage, α -Tubulin zu deacetylieren und so die Stabilität der Mikrotubuli-Komplexe zu reduzieren [17, 18]. Eine Möglichkeit eine mitotische Funktion von SIRT4 zu erklären, wäre eine Inhibition der HDAC6-Aktivität durch SIRT4 und somit eine Stabilisierung von acetylierten Tubulinen. Dadurch könnte die Mitosedauer verlängert werden, da der Spindelapparat nicht flexibel genug wäre, um die Segregation der Chromosomen effizient zu ermöglichen. Einen ähnlichen Effekt hat ein Mikrotubuli-stabilisierendes Gift (Paclitaxel), welches durch Stabilisierung der Mikrotubuli in der Mitose entweder Seneszenz oder Apoptose in Zellen auslösen kann [19]. Es wäre daher sinnvoll posttranslationale Modifikationen von HDAC6 und verschiedener Tubuline bedingt durch eine Überexpression von SIRT4 während der Mitose zu untersuchen. Dabei wäre die Überexpression von SIRT4, der zytoplasmatischen Form SIRT4(Δ 28N) und ein SIRT4-*Knockdown* mit shRNA ein möglicher Ansatz. Zwar gilt HDAC6 in den meisten Datenbanken als zytoplasmatische Deacetylase, doch gibt es vermehrt Studien, die eine Lokalisation dieses Proteins an Mitochondrien beobachten [20, 21]. Ebenfalls wurde HDAC6 in einer anderen massenspektrometrischen Studie, in der ausschließlich das Proteom isolierter Mitochondrien analysiert wurde, als Interaktor von SIRT4 identifiziert [7]. Des Weiteren nimmt HDAC6 eine wichtige regulatorische Rolle in der Mitophagie ein. Die Inhibition von HDAC6 reduziert den autophagischen Flux und somit auch die Mitophagie [22, 23]. In der Summe würde die Qualität der Mitochondrien sinken und die Zellalterung zunehmen. Die ähnliche Wirkung von SIRT4

auf die Mitophagie konnte bereits durch die Stabilisierung von L-OPA1 in Kapitel 6.2 beschrieben werden.

Ein weiterer wichtiger Interaktionspartner von SIRT4 scheint CDK1 zu sein. Diese Serin/Threonin-Kinase ist einer der wichtigsten Regulatoren des Zellzyklus und ihre Modifikationen, Acetylierungen [24] und Phosphorylierungen [25], sind von großer Bedeutung für die Einleitung der Mitose [26]. Aufgrund der Tatsache, dass die enzymatische Funktion von SIRT4 entscheidend für dessen negative Wirkung auf die Mitose ist, sollten mögliche posttranslationale Modifikationen von CDK1 durch SIRT4 untersucht werden. Eine der auffälligsten Modifikationen ist die Acetylierung von CDK1 an mehreren Aminosäuren [24]. Da Sirtuine primär als Deacetylasen beschrieben sind, könnte auch CDK1 als Substrat für SIRT4 dienen und so reguliert, möglicherweise inhibiert, werden. Die Tatsache, dass CDK1 ebenfalls in Mitochondrien nachgewiesen wurde, unterstreicht die Möglichkeit einer Interaktion mit SIRT4 [27, 28]. Das in den vorliegenden Untersuchungen relativ geringe Signal des interagierenden CDK1 verglichen mit dem Signal des Inputs könnte darauf schließen lassen, dass hier nur das mitochondrial-lokalisierte CDK1 mit SIRT4 interagiert (Abb. 7).

Eine weitere Gruppe von SIRT4-Interaktoren sind die Chaperone, wie beispielsweise *heat shock 70 kDa protein 1B* (HS71B; *HSPA1B*). Chaperone sind Bestandteile der zellulären Hitzeschock-Antwort und tragen zur korrekten Faltung von Proteinen oder andernfalls zu deren Abbau bei [29, 30]. Aber auch große Organellen wie Mitochondrien können durch die Chaperon-vermittelte Autophagie degradiert werden [31, 32]. Chaperon-Komplexe wie HSP70 und HSP90 kommen auch in Mitochondrien vor und regulieren dort die Faltung und Qualität von Proteinen [33–35]. Die Dysfunktion dieser Qualitätssicherung der Proteinfaltung ist ebenfalls ein Kennzeichen der Alterung [36]. Daher könnte sich eine mögliche Deregulation der Chaperon-basierten Qualitätskontrolle von Proteinen durch SIRT4 alterungsfördernd auswirken (Kapitel 6.2).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Interaktion von SIRT4 mit verschiedenen Tubulinen, insbesondere α - und β -Tubulin. Bei diesen handelt es sich um Proteine, die den mitotischen Spindelapparat aufbauen und in Interphasezellen die Organisation des mikrotubulibasierten zytoplasmatischen Transports sicherstellen [37]. Aber auch Proteine, welche die Zentrosomen (den Spindelapparat/Minuspole der Mikrotubuli) organisieren, sind unter den SIRT4-Interaktoren vertreten, z.B. γ -Tubulin und *gamma-tubulin complex component 2* und *3* (GCP2

und 3) [38]. Die Interaktion mit Tubulinen des zytoplasmatischen Transports könnte mit der Mitophagie zusammenhängen [39]. Tubuline, Lysinacetylasen, wie HDAC6, und Sirtuine können in der Modulation des Mitochondrientransports und der Mitophagie als Regulatoren beobachtet werden [40, 41]. Die Inhibition von Deacetylasen, wie HDAC6 im Alzheimermodell und SIRT2 im Huntingtonmodell, wirkt sich protektiv auf die Zelle aus, indem der Mitochondrientransport mithilfe stabilisierter Tubuline stressresistenter wird [42, 43]. Interagiert SIRT4 mit HDAC6, so könnte dies in einem Komplex mit α -Tubulin der Fall sein [18]. Hierbei ist jedoch noch offen, welche dieser zellulären Funktionen durch die SIRT4-Mikrotubuli-Achse primär reguliert werden.

Die mögliche SIRT4-Interaktion mit Proteinen des Spindelpols ist ein interessanter Ansatzpunkt für eine erweiterte Analyse der Vorarbeiten im Labor [1, 2]. Diese zeigten neben der inhibitorischen Wirkung der SIRT4-Überexpression auf die Mitose auch eine korrespondierende Lokalisation von endogenem SIRT4 an den Zentrosomen und dem Spindelapparat. Hierfür könnten die SIRT4-Interaktoren α/β -Tubulin, γ -Tubulin, GCP2 und GCP3 von besonderer Bedeutung sein. Eine extramitochondriale Lokalisation von SIRT4 an Zentrosomen und Mikrotubuli könnte dadurch erklärt werden, dass SIRT4 durch eine Modifikation im Mitochondrium und somit einem Transport aus diesem heraus sekundär am Spindelpol lokalisiert und dort durch seine enzymatische Aktivität eine Destabilisierung der Mitose hervorruft [1]. Alternativ existiert in der Zelle eine ungleichmäßige „Verteilung“ von SIRT4 zwischen Mitochondrien und Spindelpolen. So könnte sich der größte Anteil in Mitochondrien befinden und nur ein kleiner Teil zu einem bestimmten Zeitpunkt im Zellzyklus an den Spindelpolen lokalisieren. Letzteres könnte sogar durch CDK1-vermittelte Phosphorylierung von SIRT4 reguliert sein, da SIRT4 an der Position S36 eine putative CDK1-Phosphorylierungsstelle aufweist [44].

Der Autor der vorliegenden Dissertation erarbeitete ca. 90% der Daten dieser Studie. Alle Experimente wurden durch den Autor durchgeführt und ausgewertet. Dabei halfen die Koautoren bei der Durchführung komplexer Methoden wie der Massenspektrometrie und unterstützten durch konstruktive Diskussion das Voranschreiten der Arbeit.

Literaturverzeichnis

1. Altinoluk-Hambüchen, S.: Charakterisierung des humanen Sirtuins SIRT4 in der mitotischen Zellteilung. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Masterarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2015)
2. Kefalas, A.: Extramitochondriale Rolle des Sirtuins SIRT4 in der mitotischen Zellteilung. Westfälische Hochschule Recklinghausen. Masterarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2016)
3. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009;25:1091–3. doi:10.1093/bioinformatics/btp101.
4. Mlecnik B, Galon J, Bindea G. Comprehensive functional analysis of large lists of genes and proteins. *J Proteomics* 2017. doi:10.1016/j.jprot.2017.03.016.
5. Barrera M, Koob S, Dikov D, Vogel F, Reichert AS. OPA1 functionally interacts with MIC60 but is dispensable for crista junction formation. *FEBS Lett*. 2016;590:3309–22. doi:10.1002/1873-3468.12384.
6. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*. 2006;126:941–54. doi:10.1016/j.cell.2006.06.057.
7. Mathias RA, Greco TM, Oberstein A, Budayeva HG, Chakrabarti R, Rowland EA, et al. Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell*. 2014;159:1615–25. doi:10.1016/j.cell.2014.11.046.
8. Ho L, Titus AS, Banerjee KK, George S, Lin W, Deota S, et al. SIRT4 regulates ATP homeostasis and mediates a retrograde signaling via AMPK. *Aging (Albany NY)*. 2013;5:835–49. doi:10.18632/aging.100616.
9. Yang W, Nagasawa K, Munch C, Xu Y, Satterstrom K, Jeong S, et al. Mitochondrial Sirtuin Network Reveals Dynamic SIRT3-Dependent Deacetylation in Response to Membrane Depolarization. *Cell*. 2016;167:985–1000.e21. doi:10.1016/j.cell.2016.10.016.
10. Lang A, Grether-Beck S, Singh M, Kuck F, Jakob S, Kefalas A, et al. MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4. *Aging (Albany NY)*. 2016;8:484–505. doi:10.18632/aging.100905.

11. Sorokina IV, Denisenko TV, Imreh G, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Reactive oxygen species regulate a balance between mitotic catastrophe and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;81:133–6. doi:10.1016/j.biocel.2016.11.006.
12. Rao PC, Begum S, Jahromi MAF, Jahromi ZH, Sriram S, Sahai M. Cytotoxicity of withasteroids: Withametelin induces cell cycle arrest at G2/M phase and mitochondria-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer A549 cells. *Tumour Biol.* 2016;37:12579–87. doi:10.1007/s13277-016-5128-5.
13. Ashwaq A-AS, Al-Qubaisi MS, Rasedee A, Abdul AB, Taufiq-Yap YH, Yeap SK. Inducing G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis through Generation Reactive Oxygen Species (ROS)-Mediated Mitochondria Pathway in HT-29 Cells by Dentatin (DEN) and Dentatin Incorporated in Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (DEN-HP β CD). *Int J Mol Sci* 2016. doi:10.3390/ijms17101653.
14. Bonnefond L, Fender A, Rudinger-Thirion J, Giegé R, Florentz C, Sissler M. Toward the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: Characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry.* 2005;44:4805–16. doi:10.1021/bi047527z.
15. Anderson KA, Huynh FK, Fisher-Wellman K, Stuart JD, Peterson BS, Douros JD, et al. SIRT4 Is a Lysine Deacylase that Controls Leucine Metabolism and Insulin Secretion. *Cell Metab.* 2017;25:838-855.e15. doi:10.1016/j.cmet.2017.03.003.
16. Morris JZ, Bergman L, Kruyer A, Gertsberg M, Guigova A, Arias R, Pogorzelska M. Mutations in the *Drosophila* mitochondrial tRNA amidotransferase, *bene/gatA*, cause growth defects in mitotic and endoreplicating tissues. *Genetics.* 2008;178:979–87. doi:10.1534/genetics.107.084376.
17. Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003;100:4389–94. doi:10.1073/pnas.0430973100.
18. Steinhauser K, Kloble P, Kreis N-N, Ritter A, Friemel A, Roth S, et al. Deficiency of RITA results in multiple mitotic defects by affecting microtubule dynamics. *Oncogene.* 2017;36:2146–59. doi:10.1038/onc.2016.372.
19. Schmidt S, Schneider L, Essmann F, Cirstea IC, Kuck F, Kletke A, et al. The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program. *Oncogene.* 2010;29:6184–92. doi:10.1038/onc.2010.354.
20. Kim H-J, Nagano Y, Choi SJ, Park SY, Kim H, Yao T-P, Lee J-Y. HDAC6 maintains mitochondrial connectivity under hypoxic stress by suppressing MARCH5/MITOL

- dependent MFN2 degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;464:1235–40. doi:10.1016/j.bbrc.2015.07.111.
21. Boucherat O, Chabot S, Paulin R, Trinh I, Bourgeois A, Potus F, et al. HDAC6: A Novel Histone Deacetylase Implicated in Pulmonary Arterial Hypertension. *Sci Rep.* 2017;7:4546. doi:10.1038/s41598-017-04874-4.
 22. Lee J-Y, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao T-P. Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *The Journal of Cell Biology.* 2010;189:671–9. doi:10.1083/jcb.201001039.
 23. Guedes-Dias P, Proença J de, Soares TR, Leitão-Rocha A, Pinho BR, Duchen MR, Oliveira JMA. HDAC6 inhibition induces mitochondrial fusion, autophagic flux and reduces diffuse mutant huntingtin in striatal neurons. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852:2484–93. doi:10.1016/j.bbdis.2015.08.012.
 24. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science.* 2009;325:834–40. doi:10.1126/science.1175371.
 25. Yoon C-H, Miah MA, Kim KP, Bae Y-S. New Cdc2 Tyr 4 phosphorylation by dsRNA-activated protein kinase triggers Cdc2 polyubiquitination and G2 arrest under genotoxic stresses. *EMBO Rep.* 2010;11:393–9. doi:10.1038/embor.2010.45.
 26. Fisher D, Krasinska L, Coudreuse D, Novak B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *J Cell Sci.* 2012;125:4703–11. doi:10.1242/jcs.106351.
 27. Candas D, Qin L, Fan M, Li J-J. Experimental Approaches to Study Mitochondrial Localization and Function of a Nuclear Cell Cycle Kinase, Cdk1. *J Vis Exp.* 2016:53417. doi:10.3791/53417.
 28. Wang Z, Fan M, Candas D, Zhang T-Q, Qin L, Eldridge A, et al. Cyclin B1/Cdk1 coordinates mitochondrial respiration for cell-cycle G2/M progression. *Dev Cell.* 2014;29:217–32. doi:10.1016/j.devcel.2014.03.012.
 29. Gámez A, Yuste-Checa P, Brasil S, Briso-Montiano Á, Desviat LR, Ugarte M, et al. Protein misfolding diseases: Prospects of pharmacological treatment. *Clin Genet* 2017. doi:10.1111/cge.13088.
 30. Fernández-Fernández MR, Gragera M, Ochoa-Ibarrola L, Quintana-Gallardo L, Valpuesta JM. Hsp70: A master regulator in protein degradation. *FEBS Lett* 2017. doi:10.1002/1873-3468.12751.

31. Zhou J, Chong SY, Lim A, Singh BK, Sinha RA, Salmon AB, Yen PM. Changes in macroautophagy, chaperone-mediated autophagy, and mitochondrial metabolism in murine skeletal and cardiac muscle during aging. *Aging (Albany NY)*. 2017;9:583–99. doi:10.18632/aging.101181.
32. Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:193–224. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044908.
33. Atay C, Ugurlu S, Ozören N. Shock the heat shock network. *J Clin Invest*. 2009;119:445–8.
34. Anand R, Langer T, Baker MJ. Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833:195–204. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.025.
35. Messaoudi S, Peyrat JF, Brion JD, Alami M. Recent advances in Hsp90 inhibitors as antitumor agents. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008;8:761–82.
36. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153:1194–217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039.
37. Akhmanova A, Steinmetz MO. Control of microtubule organization and dynamics: Two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16:711–26. doi:10.1038/nrm4084.
38. Fujita H, Yoshino Y, Chiba N. Regulation of the centrosome cycle. *Mol Cell Oncol*. 2016;3:e1075643. doi:10.1080/23723556.2015.1075643.
39. Stoner MW, Thapa D, Zhang M, Gibson GA, Calderon MJ, St Croix CM, Scott I. α -Lipoic acid promotes α -tubulin hyperacetylation and blocks the turnover of mitochondria through mitophagy. *Biochem J*. 2016;473:1821–30. doi:10.1042/BCJ20160281.
40. Shida T, Cueva JG, Xu Z, Goodman MB, Nachury MV. The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:21517–22. doi:10.1073/pnas.1013728107.
41. Guedes-Dias P, Oliveira JMA. Lysine deacetylases and mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832:1345–59. doi:10.1016/j.bbadis.2013.04.005.
42. Govindarajan N, Rao P, Burkhardt S, Sananbenesi F, Schlüter OM, Bradke F, et al. Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med*. 2013;5:52–63. doi:10.1002/emmm.201201923.

43. Luthi-Carter R, Taylor DM, Pallos J, Lambert E, Amore A, Parker A, et al. SIRT2 inhibition achieves neuroprotection by decreasing sterol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:7927–32. doi:10.1073/pnas.1002924107.
44. Costantini S, Sharma A, Raucci R, Costantini M, Autiero I, Colonna G. Genealogy of an ancient protein family: The Sirtuins, a family of disordered members. *BMC Evol Biol*. 2013;13:60. doi:10.1186/1471-2148-13-60.
45. Lang A, Anand R, Altinoluk-Hambüchen S, Ezzahoini H, Stefanski A, Iram A, et al. SIRT4 interacts with OPA1 and regulates mitochondrial quality control and mitophagy. *Aging (Albany NY)*. 2017; 9:2160-2186. DOI: 10.18632/aging.101307

6.4. Intramitochondriale Prozessierung von SIRT4 am C-Terminus

Lang A., Bergmann L., Hänsel J., Iram A., Nouri K., Taha MS., Franke M., Altinoluk-Hambüchen S., Stefanski A., Stühler K., Scheller J., Ahmadian MR., Piekorz RP. *Manuskript in Vorbereitung.*

Zur Analyse der Langzeiteffekte von SIRT4 auf die mitochondriale Qualitätskontrolle wurden SIRT4-eGFP-exprimierende Zelllinien generiert (siehe Kapitel 6.2). In diesen Zellen konnte zwar eine Verlängerung der Mitose in Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von SIRT4 beobachtet werden, nicht jedoch eine Lokalisation von SIRT4-eGFP an den Zentrosomen, obwohl endogenes SIRT4 mittels Immunmarkierung an diesen nachgewiesen werden konnte [1, 2]. Die Diskrepanz zwischen diesen Daten könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass in SIRT4-eGFP-exprimierenden Zellen ein C-terminales SIRT4-Peptid beobachtet wurde, welches nur aus der mitochondrialen Form von SIRT4-eGFP entsteht. Dieses Peptid wurde Fragment X benannt und konnte nur mit Antikörpern, die entweder GFP oder den C-Terminus von SIRT4 (Abcam) detektieren, im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 8).

Parallel dazu konnte in Lysaten neben Fragment X ein weiteres Fragment Y detektiert werden, welches nur von einem gegen den Großteil von SIRT4 gerichteten Antikörper (Santa Cruz) detektiert werden konnte und welches wenige kDa kleiner als SIRT4-myc war (Abb. 8B). Die Auftrennung von Zelllysaten in mitochondriale und zytoplasmatische Fraktionen zeigte, dass sich das Fragment X nur in den mitochondrialen Fraktionen detektieren lässt (Abb. 9).

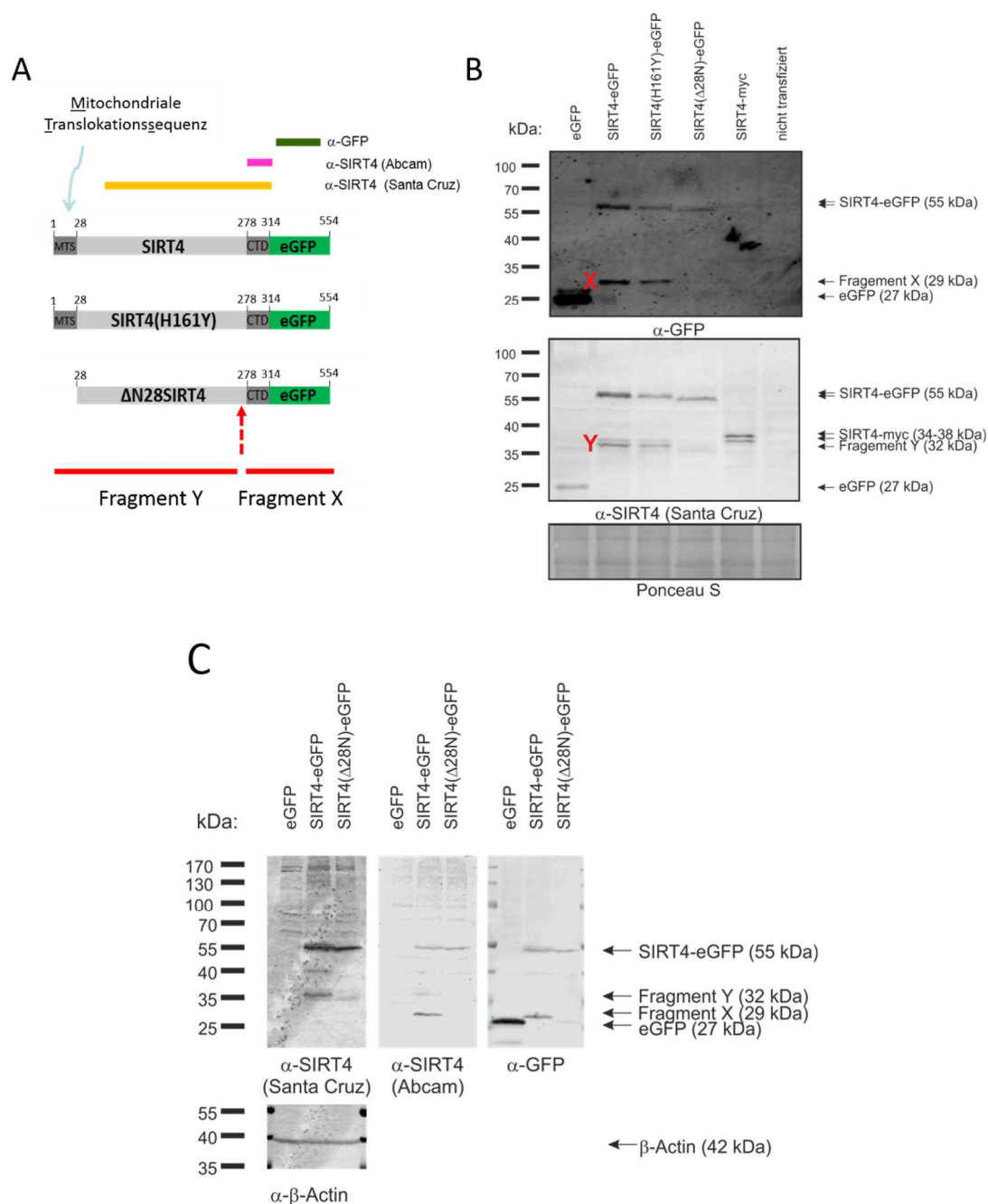


Abb. 8: SIRT4-eGFP wird im Mitochondrium am C-Terminus gespalten.

Die Detektion von SIRT4 ist mit Antikörpern von Santa Cruz (sc-135053) und Abcam (ab10140, erkennt nur den C-Terminus) im Westernblot in stabil transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt worden. Die eGFP-Detektion wurde mit einem Antikörper von Roche (11814460001, Roche Molecular Systems) durchgeführt. Es ist eine SIRT4-eGFP-Form von allen Antikörpern detektierbar. Das Fragment X, welches in Mitochondrien durch einen Schnitt im C-Terminus entsteht, wird jedoch nur vom eGFP- und dem SIRT4-Abcam-Antikörper detektiert. Fragment Y, welches den Gegenpart bildet, wird nur vom Antikörper von Santa Cruz detektiert und ist wenige kDa kleiner als SIRT4-myc. A: Schematische Darstellung der verschiedenen SIRT4-eGFP-Konstrukte und der Epitope der verwendeten Primärantikörper (GFP, Abcam, Santa Cruz). B: Detektion der Expression der eGFP und SIRT4-Konstrukte im Westernblot. Als Ladungskontrolle wurde Ponceau S verwendet. Entnommen aus der Masterarbeit von Simone Altinluk-Hambüchen [1]. C: Verwendung aller drei Antikörper, die eine Kartierung des Fragments X ermöglichen. Die Ladekontrolle wurde mit einem Antikörper gegen β -Actin (MAB1501, Millipore) sichergestellt.

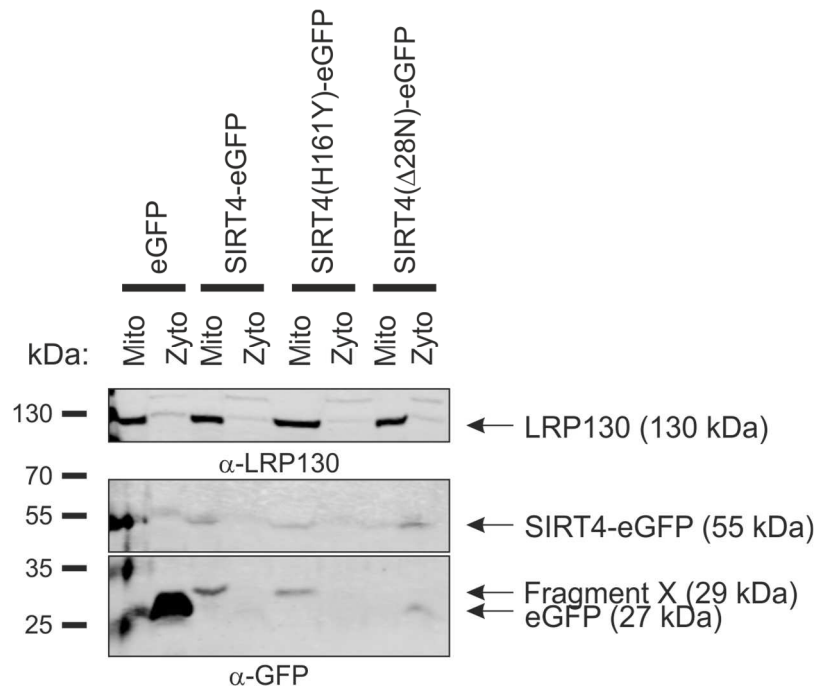


Abb. 9: SIRT4-eGFP wird im Mitochondrium C-terminal prozessiert.

Der Translation von SIRT4-eGFP in HEK293-Zellen folgt die Translokation ins Mitochondrium und darauf der proteolytische Verdau am C-Terminus, sodass unter anderem ein Fragment entsteht, welches etwas größer als GFP ist (Fragment X). Mithilfe der zellulären Fraktionierung von Zytoplasma (Zyto) und Mitochondrien (Mito) kann die Lokalisation von SIRT4-eGFP und des C-terminalen Fragments charakterisiert werden. SIRT4 wird unabhängig von dessen enzymatischer Aktivität prozessiert. Das Fragment fehlt allerdings in Zellen, die die zytoplasmatische Form von SIRT4 (Δ 28N) exprimieren. Das mitochondriale Protein LRP130 (sc-166178, Santa Cruz) wurde als Marker für die mitochondriale Fraktionierung verwendet.

Die SIRT4-Variante, der das mitochondriale Translokationssignal fehlt [SIRT4(Δ 28N)-eGFP], konnte nur im Zytoplasma beobachtet werden, wobei das Fragment X hier nicht detektierbar war (Abb. 8 und Abb. 9.) Neben der Kartierung des Fragments X mit verschiedenen Primärantikörpern wurde im nächsten Schritt eine Immunaufreinigung mittels GFP *single domain antibody* durchgeführt. Mit einer Silbernitratfärbung wurden daraufhin alle mit eGFP interagierenden Peptide detektiert (Abb. 5). Der Gelbereich um 29 kDa wurde isoliert und mithilfe eines Trypsinverdaus und anschließender Massenspektrometrie analysiert. Die Analyse ergab eine nahezu vollständige Detektion der Sequenz des Proteins eGFP und eines Teils des C-Terminus von SIRT4 (Abb. 10).

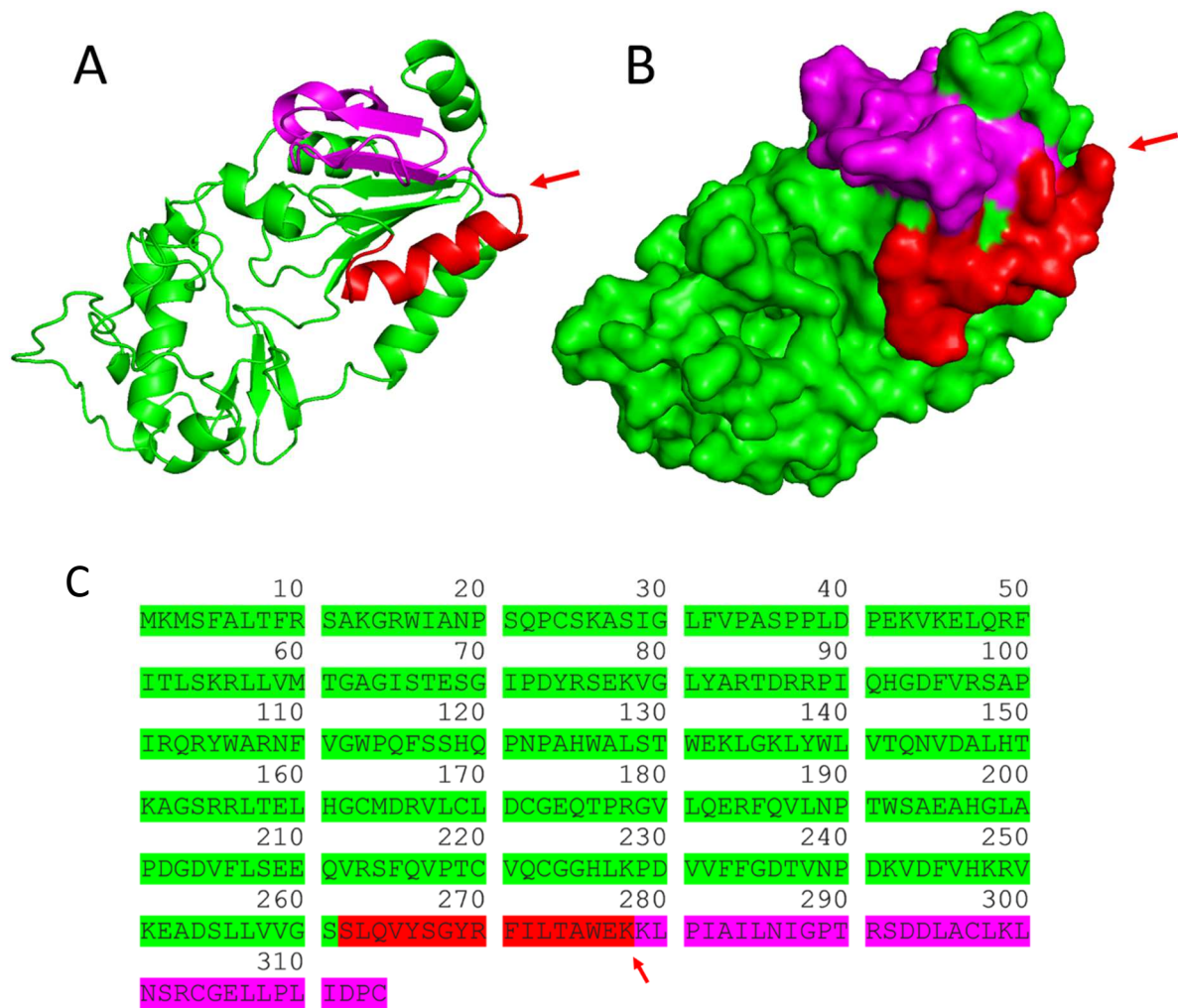


Abb. 10: Darstellung der vermuteten C-terminalen Schnittstelle von SIRT4 im 3D-Modell.

Die SIRT4-Struktur wurde mithilfe des Programms SWISS-MODEL [3] generiert und umfasst die Sequenz der AS 41 bis 310. Das Modell wurde auf Basis der Homologie zu SIRT5 (PDB: 2b4y) generiert. A: Cartoon-Darstellung der α -Helices und β -Faltblätter. B: Darstellung der Oberflächenstruktur. C: Sequenz des mitochondrialen SIRT4. In Grün wird das SIRT4-Protein gezeigt. In Pink wird der C-Terminus, der mit der Kartierung durch den SIRT4-Antikörper und der Detektion in der Massenspektrometrie charakterisiert wurde, dargestellt. In Rot ist die α -Helix abgebildet, an der die Prozessierung vermutet wird. Mit dem roten Pfeil ist das erste Lysin markiert, das in der Massenspektrometrie nicht mehr detektiert werden konnte.

Mit diesen Informationen wurde in einem *in silico* erstellten dreidimensionalen Modell von SIRT4, welches auf Basis der Kristallstruktur von SIRT5 (PDB: 2b4y) generiert wurde, eine α -Helix ermittelt, die an der Oberfläche des Proteins lokalisiert ist und ein wahrscheinliches Ziel für eine proteolytische Spaltung darstellen könnte (Abb. 10A und B).

Diskussion

Das Mitochondrium ist aufgrund seines kleinen Genoms nicht in der Lage, alle für seine Funktionen notwendigen Proteine zu kodieren. Zwar exprimieren Mitochondrien selbst 37 eigene Gene, doch wird angenommen, dass sie in höherentwickelten Organismen bis zu 1.500 verschiedene Proteine beinhalten [4]. Die meisten dieser Proteine kodierenden Gene befinden sich im Zellkern. Mithilfe einer mitochondrialen Translokationssequenz (MTS), typischerweise am N-Terminus dieser Proteine befindlich, können diese in das Mitochondrium transportiert werden. Die MTS ist in der Regel eine 15–50 Aminosäuren-lange α -Helix, die nach dem Transport ins Mitochondrium entfernt wird [5, 6]. Komplexe Proteine mit hydrophoben Bereichen oder Aktivitäten, die im Zytoplasma unterdrückt werden sollten, werden dabei oft durch Chaperone stabilisiert [7, 8].

Zwar werden die meisten mitochondrial lokalisierten Proteine als pre-Peptide nach der Translation in die Mitochondrien transportiert, doch gibt es auch Beispiele für Proteine, die über Ribosomen, die an Mitochondrien anhaften, direkt in das Mitochondrium translatiert werden [9–11]. Das Haupteintrittstor in Mitochondrien ist der *translocase of the outer mitochondrial membrane* (TOM) Komplex. Um die Proteine an die korrekte Position im Mitochondrium zu transportieren, gibt es ein Netzwerk aus verschiedenen Komplexen, welche die Lokalisation anhand verschiedener Signalpeptide an den Proteinen ermöglichen. Proteine können an die äußere mitochondriale Membran durch die *sorting and assembly machinery* (SAM) und die innere mitochondriale Membran durch den *translocase of the inner membrane 22* (TIM22)-Komplex geleitet werden. In den Intermembranraum dringen Proteine durch das *mitochondrial intermembrane space import and assembly* (MIA). Um in die Matrix des Mitochondriums zu gelangen, werden die Komplexe *translocase of the innermembrane 23* (TIM23) und *presequence translocase-associated import motor* (PAM), welcher ATP-abhängig ist, benötigt [12]. Der normale Ablauf ist die kontinuierliche Aufnahme der mitochondrialen Proteine aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien und der gleichzeitige Abbau der Proteine, die sich bereits im Mitochondrium befinden.

Die Beobachtung, dass eine C-terminale Prozessierung von SIRT4 nur im Mitochondrium stattfindet, kann durch mehrere Theorien erklärt werden. Nach der Synthese mitochondrialer

Proteine im Zytoplasma und dem Transport dieser in das Mitochondrium werden diese unter anderem durch proteasomalen Abbau im Mitochondrium degradiert [12]. Über diesen Weg werden inkorrekt gefaltete Proteine entsorgt. Die SIRT4-Interaktion mit verschiedenen Chaperonproteinen (Kapitel 6.3, Abb. 6) könnte auch auf einen regulatorischen Abbau von SIRT4 hindeuten. Dabei könnte das Fragment X durch Degradation des künstlichen Fusionsproteins SIRT4-eGFP entstehen. Entgegen dieser Theorie steht die Detektion des Fragments Y, die durch einen proteasomalen Abbau von SIRT4-eGFP nicht erklärt werden kann (Abb. 8).

Eine weitere mögliche Erklärung für die mitochondriale Prozessierung von SIRT4 ist die spezifische Aktivierung oder Inaktivierung von SIRT4 durch C-terminale proteolytische Spaltung. Gegen eine Aktivierung durch Spaltung spricht, dass eine normale enzymatische Aktivität von SIRT4 bei bakteriell exprimiertem, rekombinantem SIRT4 beobachtet wurde [13–15]. Hingegen kann eine Inaktivierung durch Spaltung nicht ausgeschlossen werden. Viele Proteine werden in Mitochondrien durch proteolytische Spaltung inaktiviert und somit reguliert. Eines der bekanntesten Beispiele ist OPA1, welches durch die Peptidase OMA1 N-terminal gespalten wird und somit die Fusion von Mitochondrien nicht mehr fördern kann [16, 17]. Die Regulation der Mitophagie über den PINK1/Parkin-Signalweg wird ebenfalls wesentlich durch gezielte Spaltung von PINK1 in der mitochondrialen Matrix reguliert [18]. Dadurch wird sichergestellt, dass dieses Protein nicht aus gesunden Mitochondrien exportiert wird und somit deren Abbau induziert [19]. Es wird vermutet, dass nach der Spaltung von PINK1 Teile des Proteins in das Zytoplasma exportiert und dort proteasomal abgebaut werden [20].

Eine weitere logische Erklärung für die biologische Funktion der C-terminalen Prozessierung von SIRT4 ist ein möglicher aktiver Export von prozessiertem SIRT4 aus dem Mitochondrium. Auch dieser ist bereits für andere Proteine beschrieben, bisher jedoch nicht für mitochondriale Sirtuine. Ein Beispiel ist das Protein Apocytochrom C, welches aus dem mitochondrialen Intermembranraum mithilfe des Komplexes TOM40 in das Zytoplasma gelangt [21, 22]. Es wird angenommen, dass bereits eine leichte Proteinfehlfaltung in Mitochondrien erkannt wird und dass das Protein durch den Rücktransport ins Zytoplasma entsorgt wird [23]. Besonders kleine Proteine sollen die Möglichkeit besitzen, effizienter über diesen Prozess hinaustransportiert zu werden. Dies könnte eine mögliche Folge der Spaltung von mitochondrialem SIRT4 in die

Fragmente X und Y sein (Abb. 8). Da das Fragment X im Mitochondrium spezifisch detektiert werden kann, könnte ein Transport von Fragment Y aus dem Mitochondrium möglich sein. Dadurch könnten die widersprüchlichen Befunde der Lokalisation von endogenem SIRT4 am Spindelpol und der fehlenden Detektion von SIRT4-eGFP am Spindelpol erklärt werden.

Da das Mitochondrium die meisten Proteine durch Proteasen, wie z. B. LONP1 [24], PARL [25, 26] oder auch das Proteasom [27], degradiert und SIRT4 zumindest mit verschiedenen Untereinheiten des Chaperons HSP70 interagiert (Abb. 6), ist es nicht unwahrscheinlich, dass der Abbau von SIRT4 im Mitochondrium durch HSP70 reguliert wird. *In silico*-Studien der SIRT4-Sequenz identifizierten keine bekannten Sequenzen, die von einer spezifischen Peptidase detektiert werden könnten. Doch sollte die spezifische Generierung von Fragment X und Fragment Y intensiver untersucht werden, um einen möglichen selektiven Abbau und/oder Transport von SIRT4 aus dem Mitochondrium weitergehend analysieren und die putative Lokalisation von SIRT4 am Spindelpol erklären zu können.

Der Autor der vorliegenden Dissertation erarbeitete ca. 85% der Daten dieser Studie. Alle Experimente wurden durch den Autor durchgeführt und ausgewertet. Dabei halfen die Ko-Autoren bei der Durchführung komplexer Methoden, wie der Massenspektrometrie von SIRT4 und SIRT4-Fragmenten inkl. bioinformatischer Analyse und unterstützten durch konstruktive Diskussion das Voranschreiten der Arbeit.

Literaturverzeichnis

1. Altinoluk-Hambüchen S. Charakterisierung des humanen Sirtuins SIRT4 in der mitotischen Zellteilung. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Masterarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II (2015).
2. Kefalas A. Extramitochondriale Rolle des Sirtuins SIRT4 in der mitotischen Zellteilung. Westfälische Hochschule Recklinghausen. Masterarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2016).
3. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006;22:195–201. doi:10.1093/bioinformatics/bti770.
4. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong S-E, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*. 2008;134:112–23. doi:10.1016/j.cell.2008.06.016.
5. Vögtle F-N, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gevaert K, et al. Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell*. 2009;139:428–39. doi:10.1016/j.cell.2009.07.045.
6. Mossmann D, Meisinger C, Vögtle F-N. Processing of mitochondrial presequences. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819:1098–106. doi:10.1016/j.bbagr.2011.11.007.
7. Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*. 2003;112:41–50.
8. Zara V, Ferramosca A, Robitaille-Foucher P, Palmieri F, Young JC. Mitochondrial carrier protein biogenesis: Role of the chaperones Hsc70 and Hsp90. *Biochem J*. 2009;419:369–75. doi:10.1042/BJ20082270.
9. Yogev O, Karniely S, Pines O. Translation-coupled translocation of yeast fumarate into mitochondria in vivo. *J Biol Chem*. 2007;282:29222–9. doi:10.1074/jbc.M704201200.
10. Kellems RE, Allison VF, Butow RA. Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *The Journal of Cell Biology*. 1975;65:1–14.
11. Garcia M, Delaveau T, Goussard S, Jacq C. Mitochondrial presequence and open reading frame mediate asymmetric localization of messenger RNA. *EMBO Rep*. 2010;11:285–91. doi:10.1038/embor.2010.17.

12. Dudek J, Rehling P, van der Laan M. Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833:274–85. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.028.
13. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*. 2006;126:941–54. doi:10.1016/j.cell.2006.06.057.
14. Mathias RA, Greco TM, Oberstein A, Budayeva HG, Chakrabarti R, Rowland EA, et al. Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell*. 2014;159:1615–25. doi:10.1016/j.cell.2014.11.046.
15. Anderson KA, Huynh FK, Fisher-Wellman K, Stuart JD, Peterson BS, Douros JD, et al. SIRT4 Is a Lysine Deacylase that Controls Leucine Metabolism and Insulin Secretion. *Cell Metab*. 2017;25:838–855.e15. doi:10.1016/j.cmet.2017.03.003.
16. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:872–84. doi:10.1038/nrm3013.
17. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012;337:1062–5. doi:10.1126/science.1219855.
18. Lazarou M, Jin SM, Kane LA, Youle RJ. Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell*. 2012;22:320–33. doi:10.1016/j.devcel.2011.12.014.
19. Thomas RE, Andrews LA, Burman JL, Lin W-Y, Pallanck LJ. PINK1-Parkin pathway activity is regulated by degradation of PINK1 in the mitochondrial matrix. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004279. doi:10.1371/journal.pgen.1004279.
20. Anand R, Langer T, Baker MJ. Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833:195–204. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.025.
21. Mayer A, Neupert W, Lill R. Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem*. 1995;270:12390–7.
22. Diekert K, Kroon AI de, Ahting U, Niggemeyer B, Neupert W, Kruijff B de, Lill R. Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *EMBO J*. 2001;20:5626–35. doi:10.1093/emboj/20.20.5626.
23. Bragoszewski P, Wasilewski M, Sakowska P, Gornicka A, Böttinger L, Qiu J, et al. Retrotranslocation of mitochondrial intermembrane space proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:7713–8. doi:10.1073/pnas.1504615112.

24. Lu B, Yadav S, Shah PG, Liu T, Tian B, Pukszta S, et al. Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance. *J Biol Chem*. 2007;282:17363–74. doi:10.1074/jbc.M611540200.
25. Sík A, Passer BJ, Koonin EV, Pellegrini L. Self-regulated cleavage of the mitochondrial intramembrane-cleaving protease PARL yields Pbeta, a nuclear-targeted peptide. *J Biol Chem*. 2004;279:15323–9. doi:10.1074/jbc.M313756200.
26. Jeyaraju DV, Xu L, Letellier M-C, Bandaru S, Zunino R, Berg EA, et al. Phosphorylation and cleavage of presenilin-associated rhomboid-like protein (PARL) promotes changes in mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103:18562–7. doi:10.1073/pnas.0604983103.
27. Bragoszewski P, Turek M, Chacinska A. Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin-proteasome system. *Open Biol* 2017. doi:10.1098/rsob.170007.

7. Abschlusdiskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der SIRT4-Expression und -Funktion in der zellulären Seneszenz und Alterung. Wie einleitend beschrieben, kann Alterung zwar durch verschiedene Kennzeichen (*hallmarks*) beschrieben werden [1], doch stellt diese einen sehr umfangreichen und komplexen Prozess dar und ist, abhängig vom Organ und Zelltyp, unterschiedlich stark ausgeprägt. Zudem können alterungsindizierende Stressoren die Ausprägung und Intensität der Kennzeichen der Alterung modulieren [1]. Die Veränderung des SASP, welcher für die Modulation der Zellmatrix oder auch die parakrine Interaktion mit Zellen verantwortlich ist, kann je nach Stärke des Stressors unterschiedlich ausfallen [2]. Walderalupa *et al.* zeigten z. B., dass ionisierende Gammastrahlung einen stärker auf isolierte primäre Hautfibroblasten wirkt als „kontinuierliche“ Alterung durch proliferativen Stress.

Der Startpunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass die Expression von SIRT4 in verschiedenen Modellen der zellulären Seneszenz und Hautalterung hochreguliert wird. Hierbei konnte eine Korrelation zwischen der Reduktion der Expression der mikroRNA miR-15b und der Zunahme von SIRT4-Transkriptionsmengen in Modellen der extrinsischen Alterung (UV-Strahlung, ionisierende Gammastrahlung), aber auch der intrinsischen Alterung (mitotischer Arrest [3], Erreichen des Hayflick-Limits [4]) beschrieben werden [5]. Die aktivierende Wirkung von miR-15b auf die Regulation der Proliferation wurde in der Literatur diskutiert [6–10]. Die Funktion von mitochondrialem SIRT4 wird hingegen als Tumorsuppressor und Inhibitor der Proliferation anerkannt [11–13]. Die Befunde der vorliegenden Arbeit sprechen für eine Rolle der miR-15b-SIRT4-Achse in der Regulation der zellulären Seneszenz und Alterung. Diese zeigt sich insbesondere in der SIRT4-abhängigen Veränderung der mitochondrialen Morphologie hin zu einer Aggregation bzw. erhöhten Fusion [5, 50]. Ebenfalls sprechen die Zunahme von mitochondrialem ROS, die Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials, aber auch die Reduktion der Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren, wie *transcription factor A* (TFAM) und *nuclear respiratory factor 1* (NRF1), beschrieben in Kapitel 6.1 [5] und konsistent mit der Literatur [14–17], für eine Dysfunktion der Mitochondrien nach SIRT4-Expression. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die veränderte Expression primär proinflammatorischer Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, INF γ) die miR-15b-SIRT4-

Achse mit einem weiteren wichtigen Kennzeichen der Seneszenz/Alterung verbindet, dem SASP.

Neben der transienten Hochregulation von SIRT4 durch Inhibition von miR-15b ermöglichte ein moderates SIRT4-eGFP HEK293-Überexpressionsmodell die Analyse der langfristigen zellulären Wirkung von SIRT4. Die hier beobachteten Effekte der SIRT4-Überexpression (Reduktion des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, Aggregation der Mitochondrien und Zunahme der mitochondrialen Masse) können wahrscheinlich nur bedingt durch die beschriebene Funktion von SIRT4 als Inhibitor der GDH [18], PDH [19] oder MCD [20, 21] erklärt werden, da nötige *Knockout*- und *Knockdown*-Experimente dieser Proteine nicht durchgeführt wurden. Zwar kann eine Inhibition dieser metabolischen Schlüsselenzyme eine Reduktion der Proliferation [22] oder der Atmungsaktivität [23] hervorrufen, jedoch nicht die nach SIRT4-Überexpression beobachteten Veränderungen der mitochondrialen Morphologie (Kapitel 6.2, [50]). Diese basierten eher auf der SIRT4-vermittelten Veränderung der Proteinmengen der aktiven und somit fusionsfördernden L-OPA1 (Zunahme), *vs.* der „inaktiven“ S-OPA1-Form [24, 25]. Co-Immunpräzipitationsstudien zeigten, dass SIRT4 direkt oder indirekt mit OPA1 interagiert [50]. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass mitochondriales SIRT3 ebenfalls OPA1 bindet, deacetyliert und dadurch aktiviert [26]. Die mögliche Modulation von OPA1 durch die enzymatische Aktivität von SIRT4 und somit Verzerrung des „Tauziehens“ in Richtung L-OPA1 und mitochondriale Fusion würde eine Reduktion der mitochondrialen Qualitätskontrolle (Mitophagie) zur Folge haben. Dementsprechend bewirkt die Überexpression von SIRT4-eGFP einen Anstieg der Mitochondrienmasse. Ein weiterer Hinweis auf eine reduzierte mitochondriale Qualität war die verstärkte Reaktion auf CCCP, einem Entkoppler der Atmungskette, in Form einer verstärkten Zunahme der ROS-Produktion in SIRT4-eGFP exprimierenden HEK293-Zellen. Des Weiteren ist die mitochondriale Atmung, gemessen am Sauerstoffverbrauch pro Zelle, in Zellen mit SIRT4-eGFP-Überexpression deutlich reduziert (Kapitel 6.2). Interessanterweise nahm die Menge der Mitochondrien mit Parkin-Markierung nach SIRT4-Überexpression zu, doch verglichen mit der Zunahme der Mitochondrienmasse nahm die Parkin-Lokalisation an Mitochondrien in der Gesamtheit ab (Kapitel 6.2, [50]). Diese Beobachtungen führten im Abgleich mit der Literatur zu der Schlussfolgerung, dass SIRT4 durch die Stabilisierung von L-

OPA1 und somit durch Stabilisierung des mitochondrialen Netzwerks die Qualitätskontrolle (Mitophagie) hemmt und somit zu einer mitochondrialen Dysfunktion in der Zelle (d.h. Akkumulation defekter Mitochondrien) über die Zeit führt [27, 28].

Eine erhöhte mitochondriale Dysfunktion in SIRT4-eGFP exprimierenden Zellen könnte die in dem hier vorgestellten SIRT4-Überexpressionsmodell auftretende Abnahme der Leistung der Atmungskette erklären. Dies kann unter anderem mit der Reduktion der mitochondrialen Qualitätskontrolle zusammenhängen, die durch die Mitophagie gesteuert wird [29–31]. Eine Studie in humanen Hautfibroblasten von Patienten verschiedenen Alters konnte zwar eine Zunahme der Mitochondrien und eine stärkere Vernetzung dieser im Alter beobachten [32]. Eine Reduktion in der Funktion der mitochondrialen Atmungskette, wie bei SIRT4-Überexpression (Kapitel 6.2), konnten Son *et al.* jedoch nicht beobachten. Mithilfe des in dieser Arbeit analysierten SIRT4-Interaktoms (Kapitel 6.3) konnten weitere biologische Mechanismen in die Diskussion eingebracht werden. Die negative Wirkung von SIRT4 auf den Sauerstoffverbrauch wurde durch *Knockdown*-Experimente bereits angedeutet [33]. Mittels Massenspektrometrie wurden die ersten Interaktionen zwischen SIRT4 und Teilen der Atmungskette gefunden [34]. Zwar konnte solch ein Protein-Interaktom der mitochondrialen Sirtuine aufgebaut werden, doch wurde der Zusammenhang zwischen SIRT4 und dessen möglicher Wirkung auf die mitochondriale Atmung nicht diskutiert. In weiteren Experimenten konnte in dieser Arbeit eine Interaktion zwischen SIRT4 und Teilen des Komplex I und V der Atmungskette gefunden werden (Kapitel 6.3, Abb. 6, Abb. 7). Die Möglichkeit besteht, dass SIRT4 als Enzym Komplexe der Atmungskette modifizieren und so in ihrer Funktion regulieren, d.h. inhibieren, könnte. Diese Annahme wird indirekt durch die Beobachtung verstärkt, dass die Expression der zytoplasmatischen Mutante von SIRT4 ($\Delta 28N$), die eine dominant negative Wirkung auf die Lokalisation von SIRT4 in Mitochondrien haben könnte, eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs in der Zelle zeigt. Ähnliche Effekte konnten auch in *Knockout*-Modellen von SIRT4 beobachtet werden [33]. Neben der negativen Regulation der mitochondrialen Qualitätskontrolle/Mitophagie durch SIRT4, würde die SIRT4-vermittelte Inhibition verschiedener Komplexe der Atmungskette „schneller wirken“ und könnte so die Reduktion der mitochondrialen Qualität und die rasche Zunahme von mitochondrialem ROS im experimentellen miR-15b-SIRT4-Modell erklären (Kapitel 6.1; Kapitel 6.2).

Die SIRT4-Interaktion mit verschiedenen tRNA-Ligasen (Kapitel 6.3, Abb. 6) im Mitochondrium könnte einen weiteren Mediator der mitochondrialen Dysfunktion darstellen. Die Analyse des SIRT4-Interaktoms durch Yang *et al.* zeigte, dass SIRT4 auch mit tRNA-Ligasen interagiert [34]. Die Inhibition der Aminosäuresynthese in Mitochondrien reduziert die Qualität der Mitochondrien und induziert Neuropathien [35, 36] und Encephalomyopathien [37]. Somit könnte die SIRT4-vermittelte Inhibition von mitochondrialen tRNA-Ligasen negative Effekte der Alterung über eine mitochondriale Dysfunktion erklären.

Die Interaktion von SIRT4 mit Chaperonen und Teilen des Proteasoms, die eine wichtige Funktion in der Regulation der Proteomqualität besitzen [38], kann in zwei Hypothesen zusammengefasst werden: Zum einen könnte SIRT4 bei Überexpression durch das Proteasom gezielt abgebaut werden, da eine große Menge des Proteins schädlich für die Zelle ist, zum anderen könnte SIRT4 mit Chaperonen interagieren, diese modifizieren und dadurch deren Aktivität beeinflussen. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass Chaperone durch Modifikationen, wie Acetylierung und Phosphorylierung aktiviert oder inaktiviert werden können [39–41]. Die Funktion von Chaperonen ist für die Qualitätssicherung von Proteinen von großer Bedeutung. Diese Qualitätssicherung ist auch eines der Kennzeichen der Alterung und muss bei langlebigen Zellen besonders gut reguliert werden [1, 42, 43]. Die Funktion von SIRT4 als Enzym wäre als Regulator nicht unwahrscheinlich und die Modulation von Chaperonen könnte ein weiterer mechanistischer Hinweis auf eine Rolle von SIRT4 in mitochondrialer Dysfunktion und Alterung sein.

Mikrotubuli-Komponenten, aber auch Proteine des Spindelpols/Zentrosoms konnten im SIRT4-Interaktom beobachtet werden. Vorarbeiten zeigten, dass SIRT4 die Mitose-Dauer signifikant verlängert [44, 45]. Die Lokalisation von endogenem SIRT4 an den Zentrosomen war ein weiteres Indiz für eine mögliche Regulation der mitotischen Mikrotubulidynamik durch SIRT4. Im Gegensatz dazu konnte SIRT4-eGFP jedoch nicht an den Spindelpolen detektiert werden. Diese unterschiedlichen Beobachtungen können durch zwei Hypothesen erklärt werden. Zum einen könnte SIRT4 zum großen Teil in Mitochondrien vorliegen und extramitochondrial nur in geringen Mengen und auch nur zu bestimmten Zeitpunkten an den Spindelpolen lokalisieren. Diese Hypothese müsste mit Hilfe eines N-terminal markierten SIRT4-Konstruktes (z.B. Flag-SIRT4(Δ 28N)), das nicht in Mitochondrien translozieren kann, untersucht werden. Zum

anderen könnte SIRT4 nach der Translation ins Mitochondrium gelangen und dort proteolytisch gespalten werden. Es könnte ein C-terminales Fragment entstehen, welches im Mitochondrium verbleibt und dort abgebaut wird und ein N-terminales Fragment, welches aus dem Mitochondrium exportiert wird und dann am Spindelpol lokalisieren kann. Für diese Theorie spricht, dass ein C-terminales SIRT4-Fragment nur in Mitochondrien detektiert werden kann (Abb. 9). Wird diese Hypothese auf SIRT4-eGFP übertragen, so würde dieses möglicherweise das fehlende GFP-Signal am Spindelpol erklären. Ein entsprechendes C-terminales Fragment konnte in Mitochondrien charakterisiert werden (Abb. 8, Abb. 9). Mithilfe der Massenspektrometrie wurde hierbei eine putative α -Helix definiert, an der die C-terminale proteolytische Prozessierung von SIRT4 stattfinden könnte (Abb. 10).

Die Analyse des SIRT4-Interaktoms in der Mitose (Kapitel 6.3) zeigt eine klare Verbindung zu zentrosomalen und mikrotubuli-assoziierten Proteinen. Die negative Wirkung von SIRT4 auf den Progress der Mitose könnte über einen inhibierenden Einfluss von SIRT4 auf diese Interaktoren erklärt werden. Die zeitlich und räumlich korrekte Organisation der Spindelpole ist entscheidend für die Mitose [46, 47] und die Interaktion zwischen SIRT4 und Proteinen wie γ -Tubulin, GCP2 und GCP3 (Abb. 6) könnten die Stabilisierung und Dynamik der Mikrotubuli am Spindelpol in der Mitose entscheidend beeinflussen [48, 49].

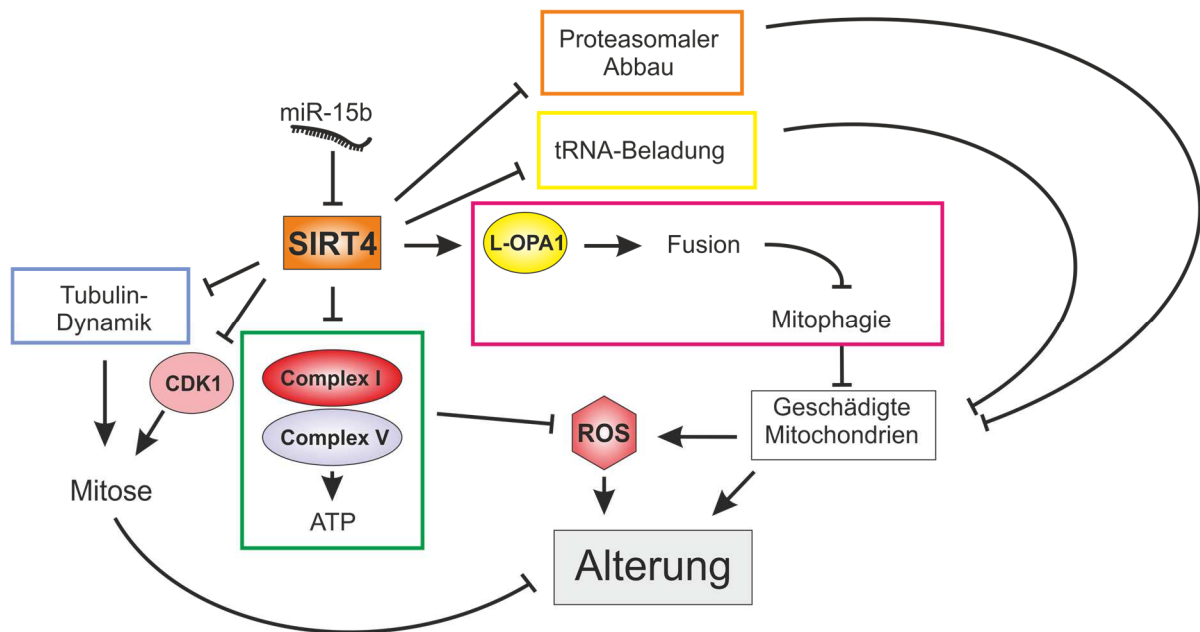


Abb. 11: Zusammenfassende Darstellung einer möglichen Rolle von SIRT4 und dessen Interaktoms in der Alterung.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Regulation von mitochondrialem SIRT4 durch miR-15b und dessen negative Wirkung auf die Alterung. Dabei könnte die Induktion der Alterung durch SIRT4 mithilfe verschiedener Interaktoren von SIRT4 beschrieben werden, die die mitochondriale Funktion, mitochondriale Qualität, ROS-Produktion oder Mitose regulieren.

Die Effekte der SIRT4-Überexpression zeigen, dass SIRT4 mit verschiedenen Aspekten der zellulären Alterung assoziiert ist. Dabei sollten die verschiedenen Kennzeichen der Alterung nicht unabhängig voneinander betrachtet werden. Es ist wichtig zu betonen, dass viele dieser beobachtbaren Effekte zusammenhängend und dass mitochondriales SIRT4, ein metabolischer Tumorsuppressor, als Teil des alterungsorganisierenden Systems betrachtet werden können. Dabei könnte SIRT4 als ein Induktor der mitochondrialen Dysfunktion, ein Inhibitor der Mitophagie durch OPA1, oder ein Modulator der Atmungskette und der tRNA-Ligasen fungieren (Abb. 11). Die Möglichkeit, dass SIRT4 die Qualität der Proteine durch Regulation von Chaperonen oder die Zellteilung durch Translokation aus dem Mitochondrium und darauffolgende Interaktion mit Proteinen im Zentrum des Spindelapparats moduliert, fügt sich in die Theorie der verschiedenen Kennzeichen der Alterung ein.

Literaturverzeichnis

1. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153:1194–217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039.
2. Waldera Lupa DM, Kalfalah F, Safferling K, Boukamp P, Poschmann G, Volpi E, et al. Characterization of Skin Aging-Associated Secreted Proteins (SAASP) Produced by Dermal Fibroblasts Isolated from Intrinsically Aged Human Skin. *J Invest Dermatol*. 2015;135:1954–68. doi:10.1038/jid.2015.120.
3. Schmidt S, Schneider L, Essmann F, Cirstea IC, Kuck F, Kletke A, et al. The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program. *Oncogene*. 2010;29:6184–92. doi:10.1038/onc.2010.354.
4. HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585–621.
5. Lang A, Grether-Beck S, Singh M, Kuck F, Jakob S, Kefalas A, et al. MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4. *Aging (Albany NY)*. 2016;8:484–505. doi:10.18632/aging.100905.
6. Li J, Chen Y, Guo X, Zhou L, Jia Z, Tang Y, et al. Inhibition of miR-15b decreases cell migration and metastasis in colorectal cancer. *Tumour Biol*. 2016;37:8765–73. doi:10.1007/s13277-015-4396-9.
7. Arakawa F, Kimura Y, Yoshida N, Miyoshi H, Doi A, Yasuda K, et al. Identification of miR-15b as a transformation-related factor in mantle cell lymphoma. *Int J Oncol*. 2016;48:485–92. doi:10.3892/ijo.2015.3295.
8. Vimalraj S, Selvamurugan N. Regulation of proliferation and apoptosis in human osteoblastic cells by microRNA-15b. *Int J Biol Macromol*. 2015;79:490–7. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.05.017.
9. Zhang Y, Huang F, Wang J, Peng L, Luo H. MiR-15b mediates liver cancer cells proliferation through targeting BCL-2. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:15677–83.
10. Luo H, Li Y, Liu B, Yang Y, Xu Z-QD. MicroRNA-15b-5p targets ERK1 to regulate proliferation and apoptosis in rat PC12 cells. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:1023–9. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.140.

11. Shi Q, Liu T, Zhang X, Geng J, He X, Nu M, Pang D. Decreased sirtuin 4 expression is associated with poor prognosis in patients with invasive breast cancer. *Oncol Lett.* 2016;12:2606–12. doi:10.3892/ol.2016.5021.
12. Nakahara Y, Yamasaki M, Sawada G, Miyazaki Y, Makino T, Takahashi T, et al. Downregulation of SIRT4 Expression Is Associated with Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology.* 2016;90:347–55. doi:10.1159/000445323.
13. Jeong SM, Xiao C, Finley LWS, 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;23:450–63. doi:10.1016/j.ccr.2013.02.024.
14. Boengler K, Kosiol M, Mayr M, Schulz R, Rohrbach S. Mitochondria and ageing: Role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2017;8:349–69. doi:10.1002/jcsm.12178.
15. Tigges J, Krutmann J, Fritsche E, Haendeler J, Schaal H, Fischer JW, et al. The hallmarks of fibroblast ageing. *Mech Ageing Dev.* 2014;138:26–44. doi:10.1016/j.mad.2014.03.004.
16. Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1819:921–9. doi:10.1016/j.bbarm.2012.03.002.
17. Hock MB, Kralli A. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:177–203. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163119.
18. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell.* 2006;126:941–54. doi:10.1016/j.cell.2006.06.057.
19. Mathias RA, Greco TM, Oberstein A, Budayeva HG, Chakrabarti R, Rowland EA, et al. Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell.* 2014;159:1615–25. doi:10.1016/j.cell.2014.11.046.
20. Laurent G, German NJ, Saha AK, Boer VCJ de, Davies M, Koves TR, et al. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol Cell.* 2013;50:686–98. doi:10.1016/j.molcel.2013.05.012.
21. Mathias RA, Greco TM, Cristea IM. Identification of Sirtuin4 (SIRT4) Protein Interactions: Uncovering Candidate Acyl-Modified Mitochondrial Substrates and

- Enzymatic Regulators. *Methods Mol Biol.* 2016;1436:213–39. doi:10.1007/978-1-4939-3667-0_15.
22. Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, et al. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem.* 2007;282:33583–92. doi:10.1074/jbc.M705488200.
 23. Stacpoole PW. The pyruvate dehydrogenase complex as a therapeutic target for age-related diseases. *Aging Cell.* 2012;11:371–7. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00805.x.
 24. Jones E, Gaytan N, Garcia I, Herrera A, Ramos M, Agarwala D, et al. A threshold of transmembrane potential is required for mitochondrial dynamic balance mediated by DRP1 and OMA1. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74:1347–63. doi:10.1007/s00018-016-2421-9.
 25. Chiong M, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Mondaca-Ruff D, Morales PE, García-Miguel M, Mellado R. Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:72. doi:10.3389/fcell.2014.00072.
 26. Samant SA, Zhang HJ, Hong Z, Pillai VB, Sundaresan NR, Wolfgeher D, et al. SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress. *Mol Cell Biol.* 2014;34:807–19. doi:10.1128/MCB.01483-13.
 27. Weber TA, Reichert AS. Impaired quality control of mitochondria: Aging from a new perspective. *Exp Gerontol.* 2010;45:503–11. doi:10.1016/j.exger.2010.03.018.
 28. Twig G, Shirihai OS. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:1939–51. doi:10.1089/ars.2010.3779.
 29. Fivenson EM, Lautrup S, Sun N, Scheibye-Knudsen M, Stevnsner T, Nilsen H, et al. Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Neurochem Int* 2017. doi:10.1016/j.neuint.2017.02.007.
 30. Dengjel J, Abeliovich H. Roles of mitophagy in cellular physiology and development. *Cell Tissue Res.* 2017;367:95–109. doi:10.1007/s00441-016-2472-0.
 31. Gaziev AI, Abdullaev S, Podlutsky A. Mitochondrial function and mitochondrial DNA maintenance with advancing age. *Biogerontology.* 2014;15:417–38. doi:10.1007/s10522-014-9515-2.

32. Son JM, Sarsour EH, Kakkerla Balaraju A, Fussell J, Kalen AL, Wagner BA, et al. Mitofusin 1 and optic atrophy 1 shift metabolism to mitochondrial respiration during aging. *Aging Cell*. 2017;204:919. doi:10.1111/ace.12649.
33. Wang D, Green MF, McDonnell E, Hirschey MD. Oxygen flux analysis to understand the biological function of sirtuins. *Methods Mol Biol*. 2013;1077:241–58. doi:10.1007/978-1-62703-637-5_16.
34. Yang W, Nagasawa K, Munch C, Xu Y, Satterstrom K, Jeong S, et al. Mitochondrial Sirtuin Network Reveals Dynamic SIRT3-Dependent Deacetylation in Response to Membrane Depolarization. *Cell*. 2016;167:985-1000.e21. doi:10.1016/j.cell.2016.10.016.
35. Gonzalez M, McLaughlin H, Houlden H, Guo M, Yo-Tsen L, Hadjivassiliou M, et al. Exome sequencing identifies a significant variant in methionyl-tRNA synthetase (MARS) in a family with late-onset CMT2. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2013;84:1247–9. doi:10.1136/jnnp-2013-305049.
36. Hyun YS, Park HJ, Heo S-H, Yoon BR, Nam SH, Kim S-B, et al. Rare variants in methionyl- and tyrosyl-tRNA synthetase genes in late-onset autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Clin Genet*. 2014;86:592–4. doi:10.1111/cge.12327.
37. Diodato D, Melchionda L, Haack TB, Dallabona C, Baruffini E, Donnini C, et al. VARS2 and TARS2 mutations in patients with mitochondrial encephalomyopathies. *Hum Mutat*. 2014;35:983–9. doi:10.1002/humu.22590.
38. Sontag EM, Samant RS, Frydman J. Mechanisms and Functions of Spatial Protein Quality Control. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:97–122. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014616.
39. Park YH, Seo JH, Park J-H, Lee HS, Kim K-W. Hsp70 acetylation prevents caspase-dependent/independent apoptosis and autophagic cell death in cancer cells. *Int J Oncol*. 2017;51:573–8. doi:10.3892/ijo.2017.4039.
40. Kim H-J, Lee J-J, Cho J-H, Jeong J, Park AY, Kang W, Lee K-J. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K inhibits heat shock-induced transcriptional activity of heat shock factor 1. *J Biol Chem* 2017. doi:10.1074/jbc.M117.774992.
41. Seo JH, Park J-H, Lee EJ, Vo TTL, Choi H, Kim JY, et al. ARD1-mediated Hsp70 acetylation balances stress-induced protein refolding and degradation. *Nat Commun*. 2016;7:12882. doi:10.1038/ncomms12882.

42. Matsuda M, Hoshino T, Yamakawa N, Tahara K, Adachi H, Sobue G, et al. Suppression of UV-induced wrinkle formation by induction of HSP70 expression in mice. *J Invest Dermatol.* 2013;133:919–28. doi:10.1038/jid.2012.383.
43. Haarmann-Stemmann T, Boege F, Krutmann J. Adaptive and maladaptive responses in skin: Mild heat exposure protects against UVB-induced photoaging in mice. *J Invest Dermatol.* 2013;133:868–71. doi:10.1038/jid.2012.435.
44. Altinoluk-Hambüchen S. Charakterisierung des humanen Sirtuins SIRT4 in der mitotischen Zellteilung. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Masterarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II (2015).
45. Kefalas A. Extramitochondriale Rolle des Sirtuins SIRT4 in der mitotischen Zellteilung. Westfälische Hochschule Recklinghausen. Masterarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2016).
46. Janski N, Masoud K, Batzenschlager M, Herzog E, Evrard J-L, Houlné G, et al. The GCP3-interacting proteins GIP1 and GIP2 are required for γ -tubulin complex protein localization, spindle integrity, and chromosomal stability. *Plant Cell.* 2012;24:1171–87. doi:10.1105/tpc.111.094904.
47. Fujita H, Yoshino Y, Chiba N. Regulation of the centrosome cycle. *Mol Cell Oncol.* 2016;3:e1075643. doi:10.1080/23723556.2015.1075643.
48. Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:709–21. doi:10.1038/nrm3209.
49. Vardy L, Toda T. The fission yeast gamma-tubulin complex is required in G(1) phase and is a component of the spindle assembly checkpoint. *EMBO J.* 2000;19:6098–111. doi:10.1093/emboj/19.22.6098.
50. Lang A, Anand R, Altinoluk-Hambüchen S, Ezzahoini H, Stefanski A, Iram A, et al. SIRT4 interacts with OPA1 and regulates mitochondrial quality control and mitophagy. *Aging (Albany NY).* 2017; 9:2160-2186. DOI: 10.18632/aging.101307

8. Abkürzungsverzeichnis

(e)GFP:	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>
3'-UTR:	<i>3'-untranslated region</i>
AARS2:	<i>Alanine-tRNA ligase</i>
ACAD9:	<i>Acyl-CoA dehydrogenase family member 9</i>
Acetyl-CoA:	Acetyl-Coenzym A
AIFM1:	<i>apoptosis-inducing factor 1</i>
AMPK	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha
ANT2 / SLC25A5:	ADP/ATP Translokase 2
AS:	Aminosäure
ATG:	<i>Autophagy-related gene</i>
ATP5A1:	<i>ATP-synthase-subunit alpha</i>
BafA1:	Bafilomycin A1
BAG2:	<i>BAG family molecular chaperone regulator 2</i>
BCL2:	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>
BNIP3:	<i>Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3</i>
BNIP3L:	<i>Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 like</i>
CCCP:	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorphenylhydrazon
CDK:	<i>Cyclin-dependent-kinase</i>
CLPB:	<i>Caseinolytic peptidase B protein homolog</i>
CPS1:	<i>Carbamoyl phosphate synthetase 1</i>
CTD:	C-terminale Domäne
CTPS1:	<i>CTP synthase 1</i>
CytC:	Cytochrom c
DARS2:	<i>Aspartate-tRNA ligase</i>
DGCR8:	<i>Microprocessor complex subunit DGCR8</i>
DLAT:	<i>PDH-subunit E2</i>

DNA:	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNAJA:	<i>DnaJ homolog subfamily A member</i>
DNAJC10:	<i>DnaJ homolog subfamily C member 10</i>
DROSHA:	<i>Ribonuclease 3</i>
DRP1:	<i>Dynamin-1-like protein</i>
ETC:	<i>Electron transport chain</i>
ETS:	<i>Electron transport system capacity</i>
FARSA:	<i>Phenylalanine-tRNA ligase alpha subunit</i>
FUDNC1:	<i>FUN14 domain-containing 1</i>
GCP:	<i>Gamma-tubulin complex component</i>
GDH:	Glutamatdehydrogenase
Gst:	Glutathione S-transferase
HDAC6:	Histondeacetylase 6
HNRNPF:	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F</i>
HS71B:	<i>Heat shock 70 kDa protein 1B</i>
HSPA:	<i>Heat shock 70 kDa protein</i>
IARS2:	<i>Isoleucine-tRNA ligase</i>
IL-6:	Interleukin-6
IL-8:	Interleukin-8
IL-1 α :	Interleukin-1 α
IL-1 β :	Interleukin-1 β
LIR:	<i>LC3-interacting region</i>
LPCAT1:	<i>Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1</i>
LSD1:	Lysin-spezifische Histon-Demethylase 1A
MARS:	<i>Methionine-tRNA ligase</i>
MCCA:	<i>Methylcrotonyl-CoA carboxylase A</i>
MCD:	Malonyl-CoA-Decarboxylase
MFN:	Mitofusin
miR-15b:	MikroRNA-15b

miRNA:	MikroRNA
Mitophagie:	Mitochondrienspezifischen Autophagie
MKK4:	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>
mRNA:	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MRPL37:	<i>39S ribosomal protein L37</i>
MTHFD2:	<i>Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase</i>
MTS:	Mitochondriales Translokationssignal
NDUFS:	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein</i>
NEFL:	<i>Neurofilament light polypeptide</i>
NELF:	<i>Negative elongation factor</i>
NRF1:	<i>Nuclear respiratory factor 1</i>
NUP43:	Nucleoporin 43
OAT:	<i>Ornithine aminotransferase</i>
OPA1:	<i>Optic atrophy protein 1</i>
PDH:	Pyruvatdehydrogenase
PGC-1 α :	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PLEC:	Plectin
PSMC2:	<i>26S proteasome regulatory subunit 7</i>
PSMD2:	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2</i>
PYCR2:	<i>Pyrroline-5-carboxylate reductase 2</i>
qPCR:	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RACK1:	<i>Receptor of activated protein C kinase 1</i>
RISC:	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA:	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS:	<i>Reactive oxygen species</i>
RPS3:	<i>40S ribosomal protein S3</i>
SASP:	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
SDHA:	<i>Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit</i>

SIRT(1-7):	Sirtuin(1-7)
SOD:	<i>Superoxide dismutase</i>
SYAM:	<i>Alanine-tRNA ligase</i>
SYDM:	<i>Aspartate-tRNA ligase</i>
TARS2:	<i>Threonine-tRNA ligase</i>
TCP1:	<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>
TELO2:	<i>Telomere length regulation protein TEL2 homolog</i>
TERT:	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TFAM:	Mitochondrialen Transkriptionsfaktor A
TIMM50:	<i>Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50</i>
TOMM70:	<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM70</i>
TUBA:	Tubulin α
TUBB:	Tubulin β
TUFM:	<i>Elongation factor Tu</i>
UGGT1:	<i>UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1</i>
VEGF:	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIM:	Vimentin
$\Delta\Psi_m$:	<i>Mitochondrial membrane potential</i>
γ IR:	<i>Ionising γ-radiation</i>

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexander Lang
Geburtsdatum	07. Mai 1987
Geburtsort	Krasnoarmejka (Kasachstan)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Hochschulbildung

02.2014 bis 11.2017	Promotion an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Institut für Molekularbiologie und Biochemie II <u>Titel:</u> „Die Rolle des Sirtuins SIRT4 in mitochondrialer Funktion und Qualitätskontrolle, zellulärer Seneszenz und Alterung“
10.2013 bis 09.2017	Bachelorstudium der Chemie (B.Sc.) Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09.2011 bis 08.2013	Masterstudium der Biologie (M.Sc.) Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Masterarbeit am Institut für Molekulare Medizin I <u>Titel:</u> „Charakterisierung der Interaktion von der Autophagie-induzierenden Kinase Ulk1 mit p53, deren Regulation und Einfluss auf die Autophagie“
Notendurchschnitt	1,13
erreichter Abschluss	Master of Science (M.Sc.)

10.2008 bis 09.2011

Bachelorstudium der Biologie (B.Sc.)

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Bachelorarbeit am Institut für Umweltmedizinische
Forschung (IUF) der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Titel: „Untersuchung der Funktion des Ah-Rezeptors in
Dendritischen Zellen“

Notendurchschnitt

1,5

erreichter Abschluss

Bachelor of Science (B. Sc.)

Publikationen

Alexander Lang*, Susanne Grether-Beck*, Madhurendra Singh*, Fabian Kuck, Sascha Jakob, Andreas Kefalas, Simone Altinoluk-Hambüchen, Nina Graffmann, Maren Schneider, Anja, Lindecke, Heidi Brenden, Ingo Felsner, Hakima Ezzahoini, Alessandra Marini, Sandra Weinhold, Andrea Vierkotter, Julia Tigges, Stephan Schmidt, Kai Stühler, Karl Köhrer, Markus Uhrberg, Judith Haendeler, Jean Krutmann* and Roland P. Piekorz* (2016): **MicroRNA-15b regulates mitochondrial ROS production and the senescence-associated secretory phenotype through sirtuin 4/SIRT4.** *Aging (Albany NY)*. 2016; 8:484-505. <https://doi.org/10.18632/aging.100905>. (*shared first/last authorships)

Alexander Lang, Ruchika Anand, Simone Altinoluk-Hambüchen, Hakima Ezzahoini, Anja Stefanski, Afshin Iram, Laura Bergmann, Jennifer Urbach, Philip Böhler, Jan Hänsel, Manuel Franke, Kai Stühler, Jean Krutmann, Jürgen Scheller, Björn Stork, Andreas S. Reichert und Roland P. Piekorz: **SIRT4 interacts with OPA1 and regulates mitochondrial quality control and mitophagy.** *Aging (Albany NY)*. 2017; 9:2160-2186. DOI: 10.18632/aging.101307

Madhurendra Singh, Alexander Lang, Katja Pexa, Fabian Kuck, Dennis Stibane, Linda Janke, Hakima Ezzahoini, Antje Lindecke, Constanze Wiek, Helmut Hanenberg, Karl Köhrer, Charlotte von Gall, Hans Reinke, Roland P. Piekorz: **Gαi3 signaling is associated with sexual dimorphic expression of the Clock-controlled output gene Dbp in murine liver.** *Oncotarget* (in Revision)

10. Danksagung

Ich freue mich sehr diese Arbeit mit einem guten Gefühl abzuschließen und in einen neuen Abschnitt meines Lebens einzutauchen. Es fällt mir jedoch sehr schwer den vielen Unterstützern und Motivatoren, die mir sehr viel geholfen haben und gute Freunde wurden, in dieser Danksagung eine gebührende Anerkennung zu geben. Ich hoffe, dass sich die meisten umarmt fühlen, denen ich bereits meinen Dank persönlich ausgesprochen habe und hier aus Platzgründen nicht erwähnt werden können.

Einige wenige will ich jedoch namentlich benennen. Großzügig danke ich Reza Ahmadian und William Martin, die Als Gutachter dieser Arbeit eine wichtige Anerkennung verdienen und für die Unterstützung gelobt werden sollen. Jürgen Scheller danke ich für die offene und motivierende Art die wissenschaftliche Diskussion im Institut aufblühen zu lassen. Andreas Reichert will ich danken, weil er sich so klar und weise mit mir und dem Thema dieser Arbeit auseinandergesetzt hat.

Viele Teile meiner Familie und meiner Freunde haben mir in den Jahren, die diese Arbeit gedauert hat, Unterstützung und Verständnis gegeben. Dabei danke ich besonders Philip, Marta, Cordula, Christine, Niklas und Dennis, die sich viele Probleme angehört und ihren Senf(t) dazugegeben haben. Christoph, Antje und Björn haben mir die Welt der Wissenschaft neu eröffnet. Ich danke Paul, Jutta, Larissa, Manuel, Nastaran und Erika für all die spontanen und hilfreichen Einwände und Hinweise, die das Laborleben leichter gemacht haben. Ohne Saiedeh und Kazem hätte ich deutlich weniger gelacht. Aber Marcel, Olli, Jana und Nirina haben es immer geschafft, dass ich bei ihrem Anblick bereits lächeln musste. Zwar sollte ich Simone, Laura, Rebecca, Andreas, Jan und Afshin etwas beibringen, doch habe ich von diesen wahrscheinlich mehr gelernt als ich je aufzählen könnte. Unglaublich viel verdanke ich Hakima, Feri, Petra, Ilse, Nadine und Zeynep, die sich vom Anfang bis zum Ende um mich gekümmert haben. Auch wenn ich viele der hier erwähnten seit Jahren kenne, gibt es Momente, die Menschen zusammenwachsen lassen. Diese Momente sind kostbar und können von einem Schreiber meines Kalibers nicht in Text gefasst werden. Doch will ich dabei Cristina, Moritz, Raphi, Linda, Lilli, Camilla, Ulf und vielen weiteren danken, die es schaffen, dass Zeit kostbar wirkt und doch um deren Vergänglichkeit nicht schade ist.

Zum Schluss will ich die Menschen erwähnen, die bei weitem den größten Dank verdient haben. Wichtig ist mir Roland, mit dem ich viel Spaß und Freude an Diskussionen hatte. Ohne ihn wäre mein Denken sicherlich nicht so gewachsen, wie es heute ist. Ohne meine Eltern, Leo und Clementina, und meine Schwester Jessi würde ich garantiert nicht so viel Verständnis für die wichtigen Dinge im Leben und in der Wissenschaft haben. Meine Tochter Maja ist die, die mich auch ohne ein klares Wort aus ihrem Mund, sofort glücklich machen kann. Mit einem Blick und einem „Patutt“ kann ich alles vergessen und so unglaublich glücklich sein. Und Kathy, die Person, die mich versteht und unterstützt. Sie gibt mir das Gefühl ein Gespräch mit ihr könnte alle Probleme lösen. In all diesen Jahren gab es keinen Moment, egal wie verwirrend meine Welt wirkte, in dem ich nicht sicher war, dass sie mir helfen kann. Ich hoffe nur, dass ich ihr, wenn auch nur zu einem kleinen Bruchteil, etwas Ähnliches bieten kann.

Vielen Dank euch allen ...

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter der Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den

Alexander Lang