

NAD - Immer für eine Überraschung gut: Lebensverlängerung, eine neue Funktion von NAD

NAD ist an vielen Stoffwechselreaktionen als Überträger von Reduktionsäquivalenten beteiligt und nimmt in der Nährstoffoxidation eine zentrale Rolle ein. Neben der Synthese des NAD sind Reaktionen bekannt, die mit dessen Spaltung einhergehen, in diesen tritt NAD nicht als Redoxpartner auf [1]. Eine dieser Reaktionen ist die NAD-abhängige Desacetylierung von Lysin in Histonen durch Sir2, einem Protein aus *S. cerevisiae*, von dem sich in allen Reichen des Lebens Homologe finden lassen. Für die Sir2-katalysierte Desacetylierung wurde gezeigt, dass NAD unter Spaltung der N-C glykosidischen Bindung Nicotinamid freisetzt und sich unter Aufnahme der von Lysin abgespaltenen Acetylgruppe 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose (2-OAADPR) bildet. Die Desacetylierung der Histone an ihren N-terminalen Abschnitten (tails) hat eine Änderung des Chromatins zur Folge, welches für Enzyme wie Methyltransferasen, Polymerasen oder Nukleasen schwer zugänglich ist. Gene in dieser Struktur werden nicht exprimiert, man spricht daher von stillem Chromatin. Sir2 konnte eine Bedeutung für die Lebensdauer von *S. cerevisiae* nachgewiesen werden; so erzeugt eine Deletion von SIR2 kurzlebige, eine Duplikation langlebige Hefestämme. Die Lebensdauer und damit die Ursache des Alterns in Hefe können mit dem Modell der ERC („external ring chromosomes“) erklärt werden. Diese entstehen aus rDNA-Wiederholungseinheiten durch Rekombination und akkumulieren in alternder Hefe. Sir2 ist ein essentieller Faktor für das "Silencing" dieser rDNA-Einheiten, was seinen Einfluss auf die Lebensdauer erklärbar macht. NAD ist für das durch Sir2 vermittelte "Silencing" essentiell, was zu der Annahme führt, dass Sir2 zwischen dem metabolischen Status der Zelle und der Kontrolle der Expression vermittelt und die Lebensdauer in Abhängigkeit der zugeführten Nährstoffe regulieren kann. Diese Erkenntnisse lassen sich im Modell der "Caloric Restriction" (CR) zusammenfassen, das auf ganz unterschiedliche Organismen anwendbar ist. Jedoch konnte der Nachweis, dass Sir2-Homologe in den jeweiligen Organismen den Effekt der CR vermitteln, nicht erbracht werden. Dennoch scheinen Sirtuine Teil eines konservierten Signalweges zu sein, der die Langlebigkeit unter Stress regulieren kann.*

1) Altern

Die Bedeutung des Alterns erstreckt sich in alle Bereiche des Lebens. Das Altern selbst ist ein komplexer Prozess der folgendermaßen definiert werden kann: „Allmähliche und generelle Abnahme der Funktionskapazität des Organismus, dies führt zum Verlust der Fähig-

keit, adaptiv auf Stress reagieren zu können und zu einem zunehmenden Risiko, an altersbezogenen Krankheiten zu leiden.“ [2]

Meist zeigen Arten bestimmte Merkmale wenn sie Altern, dennoch lassen sich allgemeine, konservierte Merkmale feststellen, allen voran den Tod des gealterten Individuums. Wichtig bei der Untersuchung des Alterungsprozesses ist die Abgrenzung von Krankheiten, die im Alter gehäuft auftreten. Diese betreffen nur einzelne Individuen einer Population, das Altern betrifft aber alle Individuen einer Population [3].

Es gibt eine Vielzahl von Theorien, die verschiedene biologische oder biochemische Prozesse als Ursache des Alterns annehmen (Übersicht: [4]) oder den Sinn des Alterns im Hinblick auf evolutionäre Aspekte zu beschreiben versuchen [5]. Zu den Ursachen des Alterns zählt man die Anhäufung von defekten oder durch Radikale geschädigten Biomolekülen [4], die Schädigung des Erbguts oder den Verlust von Reparatursystemen zur Aufrechterhaltung der Integrität des Erbgutes [4]. Auch wurde die Verkürzung der Telomere [4] oder der Verlust der Funktionskapazität der Mitochondrien als Ursache des Alterns ins Auge gefasst [6]. Darüber hinaus gibt es Theorien, die viele der möglichen Ursachen gemeinsam betrachten [4]. Man geht heutzutage davon aus, dass der Alterungsprozess selbst keiner Steuerung unterliegt, jedoch so genannte Langlebigkeitsgene ("longevity genes") existieren, welche den natürlichen Alterungsprozess unter bestimmten Bedingungen verlangsamten können [7]. Auf den möglichen Nutzen dieser Verlangsamung wird später eingegangen.

2) Altern in Hefe

Obwohl die Bäckerhefe *S. cerevisiae* einen einzelligen Organismus darstellt, ist ihr Einsatz als Modellorganismus für die Altersforschung weit verbreitet. Das liegt daran, dass Handhabung und genetische Manipulierbarkeit

*Abkürzungen: 2-OAADPR, 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose; Ac-K16 H4, an Lysin-16 acetyliertes Histon H4 oder histonanaloges Peptid; CR, Caloric Restriction; ERC, External Ring Chromosomes; H1-4, Histonprotein 1-4; hSIRT1-7, humane Sirtuine 1-7; NAM, Nicotinsäureamid; Sir2/SIR2, Sir2-Protein/Gen.

einfach sind und die kurze Lebensspanne schnell zu Ergebnissen führt. *S. cerevisiae* teilt sich asymmetrisch, was die Verwendung in der Altersforschung überhaupt erst rechtfertigt, denn nach der Teilung, also der Abknospung (*budding*) einer Tochterzelle kann noch zwischen dieser und der Mutterzelle unterschieden werden. Aufgrund dessen lässt sich die replikative Lebensspanne der Mutterzelle verfolgen, wobei untersucht wird, nach wie vielen Zellteilungen die Mutterzelle altert und stirbt.

Ein weiterer Modellorganismus ist der Röhrenwurm *C. elegans*, dessen chronologische Lebensspanne verfolgt werden kann. Außerdem werden Nager als Versuchstiere eingesetzt. Auch Versuche mit Rhesusaffen wurden begonnen, mit Ergebnissen kann hier jedoch erst nach ca. 40 Jahren (der ungefähren Lebensdauer der Affen) gerechnet werden [8-10]. Gealterte Hefezellen zeigen charakteristische Merkmale: Die bei Abknospung der Tochterzellen zurückbleibenden Narben (*buds*) akkumulieren (Abb. 1a). Anhand dieser lassen sich Hefezellen nach ihrem Alter sortieren (Abb. 1b).

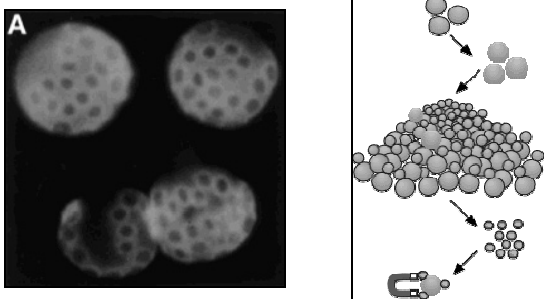


Abb. 1. (a) Alte Hefezellen mit erkennbaren Narben (aus [7]). (b) Isolation alter Hefezellen: Biotinmarkierung von Zellen, die Markierung wird auf Tochterzellen nicht übertragen. Inkubation von Zellsuspension mit Avidin-bedeckten Eisenkugeln. Mit Hilfe eines Magneten werden die an die Eisenkugeln gebundenen gealterten Zellen abgetrennt [11; 12].

Darüber hinaus vergrößert sich der Zellkörper und die Zellteilung wird zunehmend symmetrisch, auch werden die Hefezellen steril und der Nucleolus ist vergrößert und fragmentiert.

Ein Modell, das die Alterung von Hefe erklären kann, ist das Modell der äußeren Ringchromosomen (*External Ring Chromosomes*, ERC) [2; 13] (Abb. 3). Danach bilden sich ringförmige Chromosomen durch Excision einer oder mehrerer rDNA-Wiederholungseinheiten (Abb. 2).

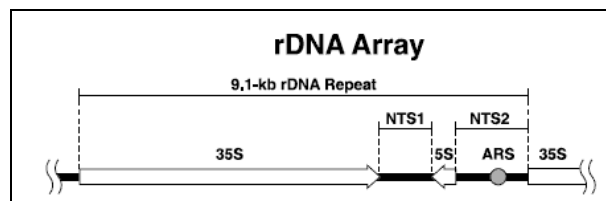


Abb. 2. Organisation der rDNA-Einheiten in *S. cerevisiae*. Das rDNA-Array besteht aus 9,1-kb-Wiederholungseinheiten, in denen die 35S- und die 5S-Sequenzen der rDNA kodiert sind; sowie aus zwei nicht-kodierenden Sequenzen NTS1 und NTS2. In NTS2 befindet sich ein Startpunkt für die Replikation (ARS) (aus [14]).

Die entsprechende Chromosomenregion befindet sich im Nucleolus, einem nukleären Kompartiment. Da jede rDNA-Wiederholungseinheit eine autonom replizierende Sequenz (ARS) besitzt (Abb. 2), können die ERC in der Zelle selbstständig akkumulieren. Wie diese jedoch zur Alterung und zum Tode der Zelle führen, ist nicht geklärt. Vermutet wird, dass die ERC dem Transkriptionsapparat essentielle Faktoren entziehen und diesen dadurch schwächen oder stoppen [15]. Die rDNA-Einheiten gehören neben den Telomeren und den *„mating type loci“* zu den Regionen des Hefegenoms, deren Expression (dauerhaft) unterdrückt wird, die also als größtenteils als stilles Chromatin vorliegen [2].

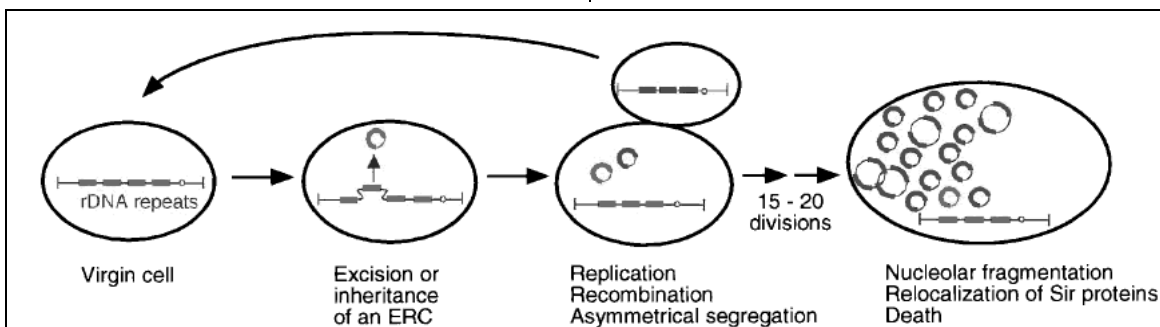


Abb. 3. ERC-Modell für die Alterung in Hefe (aus [7; 16]).

Die Chromatinstruktur ist hier gegenüber der offenen Form verändert, was durch posttranskriptionelle Modifikationen der Histone bedingt wird. Hierbei werden vor allem die N-terminalen Endstücke (Schwänze, "tails") der Histone verschiedenen Modifikationen unterzogen (Abb. 4).

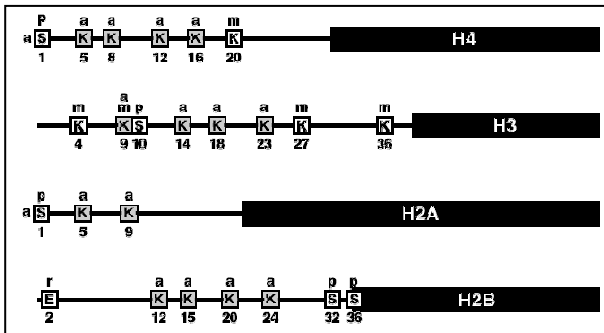


Abb. 4. Posttranslationale Histonmodifikationen. a: Acetylierung, m: Methylierung, p: Phosphorylierung, r: ADP-Ribosylierung (aus [17])

Die Modifizierung wird von verschiedenen Enzymen katalysiert, wie Histonacetyltransferasen (HAT) und Histon-desacetylasen (HDAC) zur Acetylierung bzw. Desacetylierung von Lysinresten der Histonschwänze.

Eine Gruppe von Histon-desacetylasen zeichnet sich durch einen besonderen Reaktionsmechanismus aus: Die Desacetylierungsreaktion ist NAD-abhängig [18]. Der paradigmatische Vertreter dieser Gruppe von NAD-abhängigen Histon-desacetylasen ist das Hefeprotein Sir2 (Abb. 5).

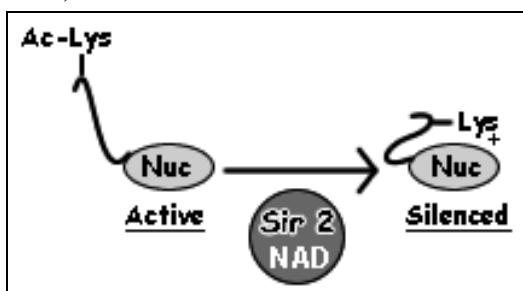


Abb. 5. Funktion von Sir2 (modifiziert aus [19])

3) Sir2

Sir2 wurde eine Beteiligung an allen "Silencing"-Prozessen in Hefe nachgewiesen [2]. An den Telomeren und den "mating type loci" liegt es dazu im Komplex mit Sir3 und Sir4 vor (Abb. 6), an der rDNA im Komplex mit Net1 und Cdc14 (Abb. 7) [20]. "Sir" steht daher für "Silent information regulator" oder

auch für "Sirtuin". Sir2 ist unter den erwähnten Proteinen einzigartig, da es als einziges Protein an allen "Silencing"-Prozessen teilnimmt und in allen Reichen des Lebens Homologe zu Sir2 existieren. Im Menschen wurden sieben Homologe (hSIRT1-7) nachgewiesen [21].

Zu Beginn der Untersuchungen an Sir2 wurde angenommen, dass dieses die ADP-Ribosylierung von Histonen katalysiert [18]. Im weiteren Verlauf wurde jedoch gefunden, dass Sir2 nicht die Übertragung von ADP-Ribose aus NAD auf das Histon, sondern die Desacetylierung unter Beteiligung von NAD und unter Bildung von 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose katalysiert [22]. Andere Nukleotide oder NAD-verwandte Substanzen, wie z.B. NADH können nicht als Substrat für Sir2 wirken [23] sondern allenfalls als Inhibitor (s.u.).

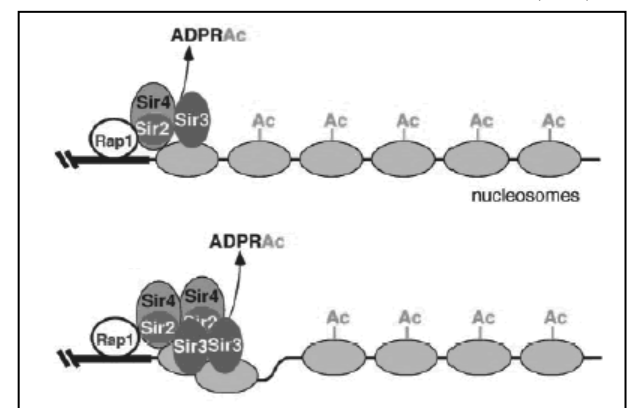


Abb. 6. Assoziation von Sir2 mit anderen Proteinen an Telomeren und mating type loci und Darstellung der Desacetylierungsfunktion (aus [20]).

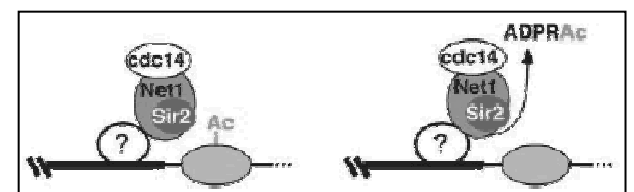


Abb. 7. Assoziation und Funktion von Sir2 an den rDNA-Einheiten (aus [20]).

a) *Reaktionsmechanismus*

Tanny und Moazed zeigten 2001 die direkte Beteiligung von NAD an der Desacetylierungsreaktion [22]. Auch konnte die Substratspezifität von Sir2 genauer untersucht werden. Im Folgenden sollen die durchgeführten Untersuchungen dargestellt werden.

Zur Erforschung der durch Sir2 katalysierten Reaktion durch Tanny und Moazed wurden

verschieden radioaktiv markierte NAD-Moleküle (Abb. 8) mit Sir2 inkubiert und die Produkte chromatographisch getrennt.

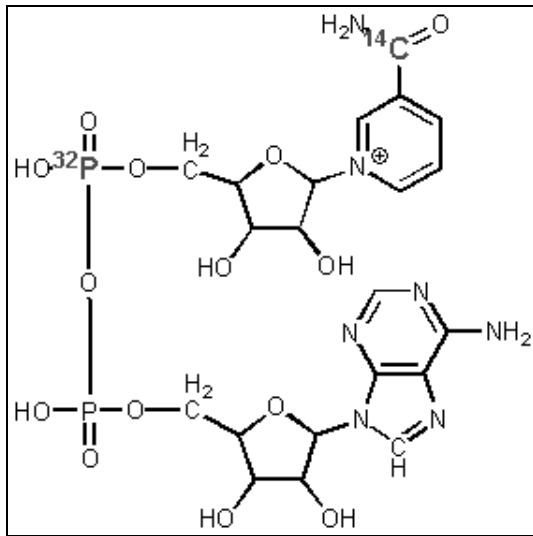


Abb. 8. Zum Studium des NAD-abhängigen Mechanismus der Histondesacetylierung verwendete radioaktiv markierte NAD-Moleküle [22]

Im ersten Versuch wurde [α - ^{32}P]NAD mit Sir2 und acetylierten Histonen inkubiert. Die Produkte wurden mittels Dünnschichtchromatographie getrennt und autoradiographisch nachgewiesen. Radioaktivität fand sich an zwei Stellen des Chromatogramms, was auf zwei phosphathaltige Produkte schließen ließ. Eines der Produkte wurde als ADP-Ribose identifiziert, das zweite Produkt wurde nicht identifiziert. Die Sir2-Mutante G-H364Y, welche keine "Silencing"-Aktivität *in vivo* zeigt, konnte im Test kein NAD abbauen, was auf eine Kopplung der beiden Funktionen hinweist. Auch wurde kein NAD-Abbau festgestellt, wenn unacetylierte Histone eingesetzt wurden.

Zur Untersuchung der Substratspezifität wurden Sir2, [α - ^{32}P]NAD und synthetische Peptide, deren Sequenz dem N-Terminus des Histons H4 entsprechen, inkubiert. Die Peptide waren nur an einem der Lysinreste 5, 8, 12 oder 16 acetyliert. Es zeigte sich, dass nur das Peptid den NAD-Abbau stimulierte, dass an Lysin 16 acetyliert war, also Ac-K16 H4 (Abb. 9)

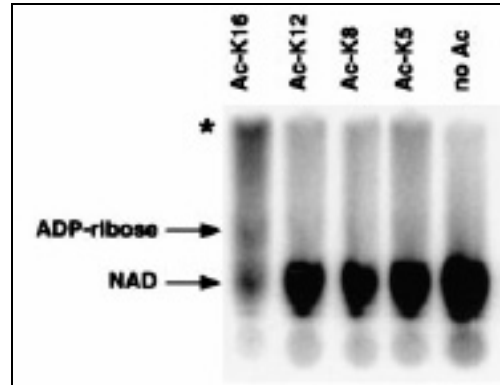


Abb. 9. Stimulation der NAD-Spaltung durch N-terminale Histonepeptide H4 in der dünnschichtchromatographischen Analyse mit anschließender Autoradiographie (* markiert das unidentifizierte Produkt)

Zur weiteren Untersuchung des noch nicht identifizierten Produktes wurden Ac-K16 H4, Sir2 und [$\text{carboxyl-}^{14}\text{C}$]-NAD inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden abermals mittels Dünnschichtchromatographie getrennt (Abb. 10). Es konnten NAD und Nicotinamid nachgewiesen werden, was zeigt, dass die C-N-Bindung des NAD zwischen Ribose und Nicotinamid bei der Reaktion gespalten wird. Das bisher unbekannte Produkt ist daher wahrscheinlich ein ADP-Ribose-Derivat.

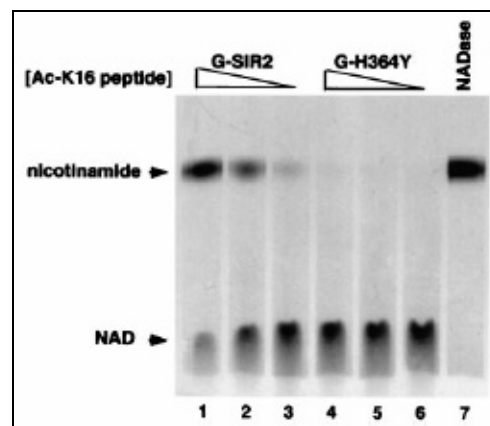


Abb. 10. Autoradiogramm der dünnschichtchromatographische Analyse der Spaltung von NAD durch Sir2 und die Sir2-Mutante H364Y in Gegenwart von acetyliertem Peptid Ac-K16 variierter Konzentration (Keile). NADase spaltet die Bindung zwischen Ribose und Nicotinamid und wurde zur Kontrolle eingesetzt.

Zum letztendlichen Nachweis der Kopplung von Desacetylierung und NAD-Abbau wurde von Tanny und Moazed [22] ein Versuch entwickelt, in dem sich beide Reaktionen gleichzeitig quantifizieren lassen. Dazu wurden die Reaktionsansätze nach der Inkubation zum

Nachweis der Nucleotide mittels Anionenaustauschchromatographie und zur Analyse der Peptide mittels HPLC aufgetrennt. Im Ionenaustausch-Chromatogramm (nicht gezeigt) konnte eine weitere Substanz neben NAD und ADP-Ribose nachgewiesen werden, die praktisch mit ADP-Ribose die Säule verließ. Die unbekannte Substanz und ADP-Ribose konnten dennoch unterschieden werden. Lag jedoch unacetyliertes Peptidsubstrat vor, wurde ausschließlich NAD nachgewiesen. In der Peptidanalyse mittels HPLC konnten acetyliertes und desacetyliertes Peptid nachgewiesen werden. Fehlte NAD im Testansatz, dann konnte nur das acetylierte Peptid nachgewiesen werden. Durch Variation der Zugabemengen und der Inkubationsdauer konnte mittels Integration der Gipfflächen ein stöchiometrisches Verhältnis zwischen NAD-Abbau und Desacetylierung abgeleitet werden.

Eine weitere Untersuchung [22] sollte Gewissheit über das Verhältnis zwischen NAD-Hydrolyse und Desacetylierung bringen. Theoretisch möglich wäre die Kopplung der beiden Reaktionen durch die Wirkung eines Substrates als allosterischer Effektor auf die andere Reaktion. In diesem Falle sollten die Reaktionen mechanistisch unabhängig voneinander sein und durch Mutationen sollte nur eine der beiden Aktivitäten gehemmt werden können. Andererseits ist eine mechanistische Kopplung der beiden Reaktionen möglich, was bedeuten würde, dass die Acetyl-Gruppe auf ein NAD-Abbauprodukt übertragen wird. Diese Möglichkeit wurde überprüft, indem [^3H -Acetyl]Histone und [^3H -Acetyl]Peptide im Test verwendet wurden. Hier zeigte sich, dass die Radioaktivität genau an der Stelle des nicht identifizierten Produkts eluiert wird. Dieses ist demzufolge ein phosphatragendes NAD-Abbauprodukt, welches aufgrund der Versuchsergebnisse als acetyl-tragendes ADP-Ribose-Derivat identifiziert wurde. Weitere Unterstützung für die Hypothese der gekoppelten Reaktionen gewannen Tanny und Moazed durch Versuche mit Sir2-Mutanten [22]. Bei diesen konnten immer nur beide Reaktionen ausgeschaltet werden, nicht aber die NAD-Hydrolyse oder die Desacetylierung allein (Abb. 10).

Unter Berücksichtigung der Stabilität des NAD-Derivats bei unterschiedlichen pH-Werten stellten Tanny und Moazed zwei Reaktionsmechanismen mit den möglichen acetyltragenden NAD-Derivaten 1'-O-Acetyl-ADP-Ribose (1-OAADPR) oder 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose (2-OAADPR) auf [22].

Nachdem das acetylierte NAD-Derivat mittels NMR als 2-OAADPR identifiziert war, konnte ein Reaktionsmechanismus formuliert werden (Abb. 11) [24].

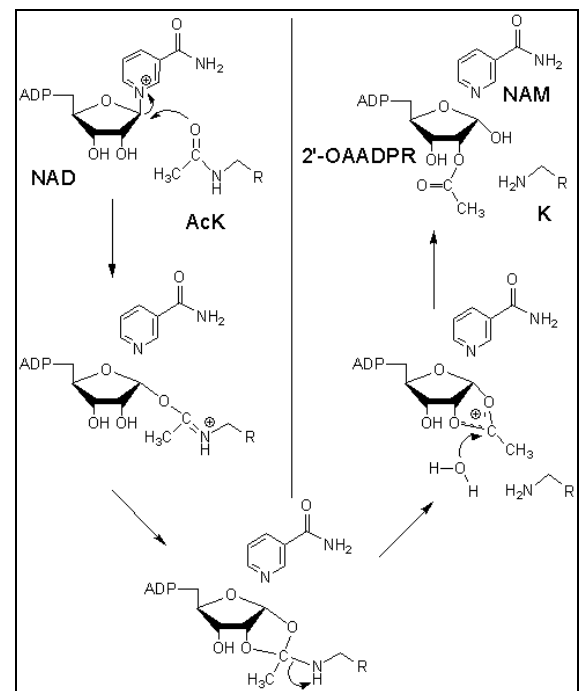


Abb. 11. Mechanismus der Sir2-katalysierten NAD-abhängigen Histondesacetylierung. AcK, K: Acetylierter bzw. desacetylierter Lysinrest des Histonsubstrates; NAM: Nicotinamid; 2-OAADPR: 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose (nach: [24]).

In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass neben dem Lysinrest H4 K16 auch die acetylierten Lysine K9 und K14 von H3 Substrate für Sir2 darstellen [25].

b) Effektoren

Bei der Durchmusterung von Substanzbibliotheken wurden Substanzen als Effektoren für Sir2 identifiziert (Tabelle 1).

Tabelle 1. Effektoren von Sir2 (nach [26; 27])

| Aktivatoren | Inhibitoren |
|-------------|-------------|
| Quercetin | Sirtinol |
| Picetannol | Splitomycin |
| Resveratrol | NADH, NAM |

Besonders hervorzuheben ist hier das Resveratrol, das unter anderem in Rotwein vorkommt und für dessen gesundheitsfördernde Wirkung mitverantwortlich gemacht wird [28]. Auch NADH und Nicotinamid (NAM) sind Inhibitoren der Sir2-Reaktion. Anhand von Lineweaver-Burk-Diagrammen lassen sich die Mechanismen erkennen, nach denen NADH und NAM die Reaktion hemmen. Aus Abb. 12 und 13 ist erkennbar, dass NADH einen kompetitiven Inhibitor und NAM einen unkompetitiven Inhibitor für die Sir2-katalysierte Reaktion darstellt.

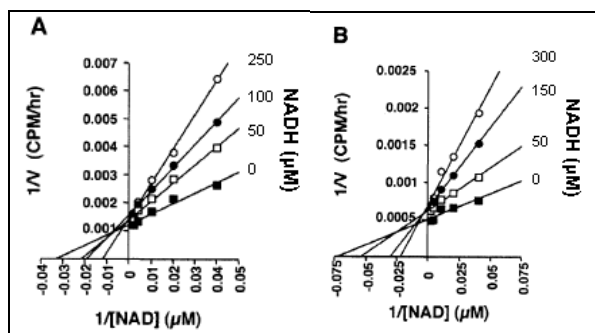


Abb. 12. Lineweaver-Burk-Diagramme zur Klärung des Mechanismus der durch NADH erzeugten Hemmung der Sir2-Aktivität (von Sir2, A und hSIRT1, B). Als Peptidsubstrat lag [³H-Acetyl]Peptid (analog zum N-Terminus des Histons H4) vor, die Geschwindigkeit ist daher als im Beobachtungszeitraum freigesetzte Radioaktivität angegeben [29].

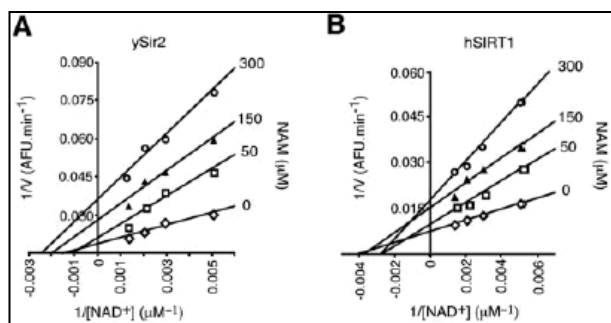


Abb. 13. Lineweaver-Burk-Diagramm zur Klärung des Mechanismus der durch Nicotinamid (NAM) erzeugten Hemmung der Sir2-Aktivität. Angabe der Geschwindigkeit in relativen Fluoreszenzeinheiten (Testbeschreibung siehe Referenz), als Substrat lag acetyliertes Histon vor [30].

c) Wirkung von Sir2 in *S. cerevisiae*

Sir2 konnte als NAD-abhängige Histondesacetylase identifiziert werden und trägt zum "Silencing" an allen betreffenden Chromosomenabschnitten bei. Zu diesem Zweck liegt es an diesen in Proteinkomplexen vor und verändert

die Chromatinstruktur durch Desacetylierung (Abb. 6, Abb. 7). Der genaue Mechanismus der Änderung der Chromatinstruktur ist gegenwärtig noch Gegenstand von Forschung und Diskussion [31].

Neben der Silencing-Funktion lässt sich eine eindeutige Beziehung zwischen Sir2 und der replikativen Lebensspanne von *S. cerevisiae* feststellen [32]: Liegt eine Duplikation des Gens SIR2 vor, ist die replikative Lebensspanne verlängert, liegt eine Deletion oder Mutation von SIR2 vor, ist die Lebensspanne verkürzt (Abb. 14).

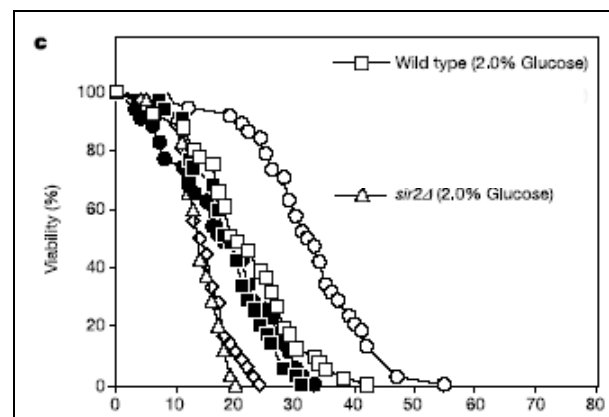


Abb. 14. Verkürzender Effekt der SIR2-Deletion auf die replikative Lebensspanne (modifiziert, aus [33]).

Ausgehend vom ERC-Modell zur Alterung in *S. cerevisiae* (Abb. 3) lässt sich der lebensverlängernde Effekt durch Sir2 erklären: Die rDNA-Einheiten werden durch Sir2 in die "stille" Form überführt und damit kann der Mechanismus, der zur Bildung der ERC führt, nicht wirken. Durch ein zusätzliches SIR2-Gen wird das "Silencing" verstärkt, durch Deletion oder Mutation wird das "Silencing" verhindert und die ERC-Bildung kann verstärkt stattfinden [34].

d) Sir2-Homologe

In einer Vielzahl von Organismen konnten Homologe von Sir2 nachgewiesen werden (Übersicht: [21; 35]). *S. cerevisiae* und *C. elegans* besitzen jeweils vier Homologe, Säugtiere (auch der Mensch) sieben (SIRT1-7) (Tabelle 2) [21]. Diese unterscheiden sich in ihrer Funktion, Lokalisation und ihren Substraten.

Tabelle 2. Sir2-Homologe in verschiedenen Organismen (aus [21]).

| Gene | Subcellular localization | Interactors | Targets | Activity |
|-----------------------------|--------------------------|--------------|----------------------------------|--|
| Sir2 (yeast) | Nucleolus | RAP1 | Histone H3 (K9) (K14) | Deacetylase |
| | Telomeres | SIR4 Net1 | H4 (K16) | |
| CobB | | | Acetyl-CoA-synthetase | Deacetylase |
| Archaeal Sir2 | | Alba | Alba | Deacetylase ADP ribosyl transferase |
| dSIR2 (<i>Drosophila</i>) | Nucleus | Hairy | Histone H4 (K5) (K8) (K12) (K16) | Deacetylase |
| SIRT1 (<i>Mammalia</i>) | Nucleus PML bodies | p53 | Histone H3 (K9 & 14) | Deacetylase |
| | | PML | | |
| | | PCAF/GCN5 | H4 (K16) | |
| | | CTIP2 | p53 (K382) | |
| | | HES1 | TAF168 | |
| | | PCAF/MyoD | | |
| SIRT2 | Cytoplasm | HDAC6 | Tubulin | Deacetylase |
| SIRT3 | Mitochondria | | | Deacetylase |
| SIRT4 | | | | not active |
| SIRT5 | | | | Deacetylase |
| SIRT6 | | | | not active |
| SIRT7 | | | | not active |

Bisher wurden vor allem die humanen Sirtuine 1-3 untersucht. Es zeigte sich, dass diese in unterschiedlichen Zellkompartimenten zu finden sind [21] (Abb. 15).

SIRT1 scheint ähnliche Funktionen zu erfüllen wie das Hefeprotein Sir2, da es im Zellkern vorkommt und Histone desacetyliert. Darüber

hinaus katalysiert es die Desacetylierung weiterer im Kern vorhandener Proteine. Unter diesen sind p53, Transkriptionsfaktoren und -repressoren sowie die RNA-Polymerase-I-Untereinheit Taf₁68, welche an die TATA-Box bindet [21]. SIRT1 scheint den Zellzyklus zu beeinflussen, reguliert die Muskeldifferenzierung und kann durch Desacetylierung von p53 den induzierten Zelltod nach DNA-Schädigung unterbinden (s.u.) [21].

SIRT2 kommt im Cytoplasma vor, dort interagiert es mit Tubulin und reguliert so eventuell dessen Stabilität und Funktion. Darüber hinaus wirkt es auf die Dauer der M-Phase des Zellzyklus [21].

SIRT3 findet sich in den Mitochondrien. Zum Eintransport in diese enthält SIRT3 eine Signalsequenz, welche in der mitochondrialen Matrix durch eine Protease entfernt wird. Substrate sind bisher nicht bekannt [21].

Ein direkter Einfluss auf die Lebensspanne oder den Alterungsprozess konnte im Hinblick auf das ERC-Modell in anderen Organismen als *S. cerevisiae* nicht nachgewiesen werden. Auch spielen in höher organisierten Lebewesen weit mehr Faktoren eine Rolle als in Hefe. So wird Langlebigkeit, z.B. durch "Caloric Restriction" (CR), in *C. elegans* über neuronale und humorale Signalwege reguliert [6; 15; 36].

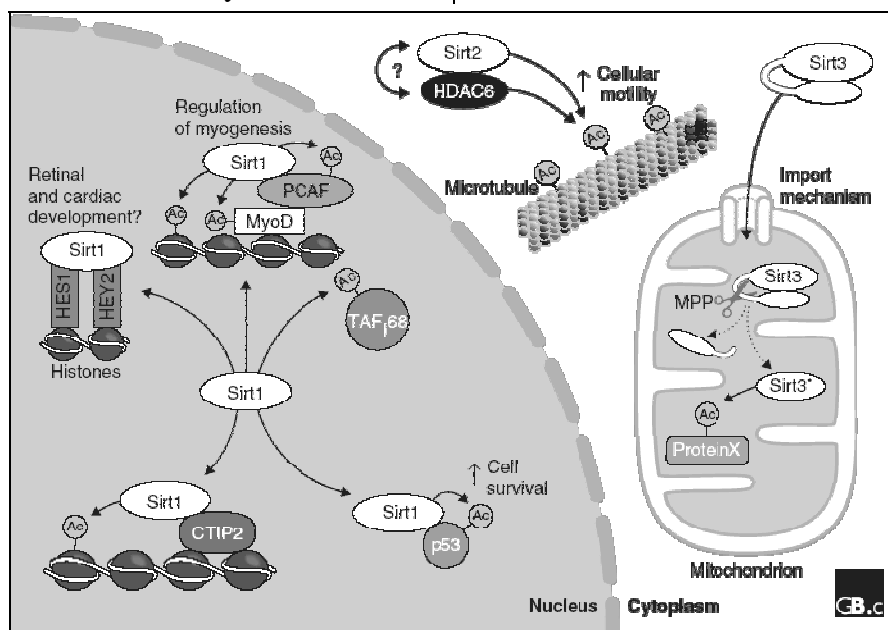


Abb. 15. Übersicht: Funktionen der humanen Sirtuine hSIRT1,2,3 (aus [21]).

4) Regulation von Sir2

Seit langem ist bekannt, dass durch "Caloric restriction" (CR) die Lebensspanne diverser Versuchsorganismen verlängert werden kann, was ebenso für Hefe wie für Säugetiere gilt. In einem 0.5 %igen Glucosemedium wachsende Hefe zeigt eine deutlich längere Lebensspanne als eine in 2%igem Glucosemedium wachsende (Abb. 16). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt nicht auftritt, wenn das Gen SIR2 deletiert oder mutiert wurde [34].

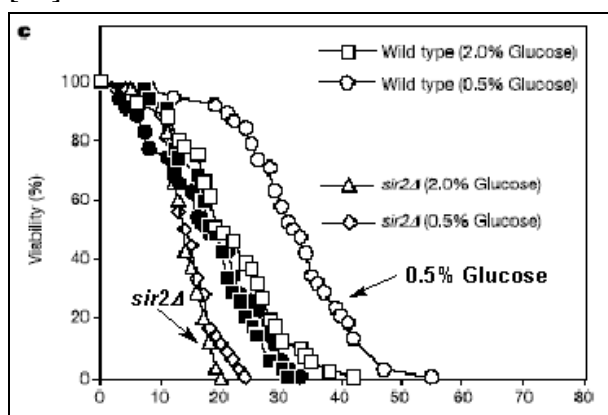


Abb. 16. Effekt von "Caloric restriction" auf *S. cerevisiae*, Wildtyp sowie *sir2Δ*-Mutanten in 0.5% und 2% Glucose (modifiziert, aus [33])

Die Wirkung der CR scheint daher von Sir2 abhängig zu sein, wobei sich die Frage stellt, wie Sir2 durch CR aktiviert werden kann. Hierfür wurden zwei Hypothesen entwickelt, welche die oben erwähnten inhibitorischen Effekte von NAM und NADH berücksichtigen [29; 30]. Zuerst wurde angenommen, dass die Aktivierung von Sir2 allein auf die Änderung des Konzentrationsverhältnisses [NAD] und [NADH] zurückgeht. Nunmehr ist jedoch gezeigt worden, dass der NAD-Spiegel von Hefen, die in 0.5 %iger oder 2%iger Glucose wachsen, identisch ist, der NADH-Spiegel jedoch bei Hefen in 0.5%iger Glucose absinkt [29]. Da mit sinkendem NADH-Spiegel ein Inhibitor für Sir2 verloren geht, wird dieses aktiver.

Eine zweite Hypothese für die lebensverlängernde Wirkung von Sir2 basiert auf der Beobachtung, dass bei CR das Enzym Pnc1 verstärkt exprimiert wird, das den Sir2-Inhibitor NAM abbaut. Pnc1 hydrolysiert NAM zu

Nicotinsäure, wodurch die inhibierende Wirkung aufgehoben wird. Es wird vermutet, dass das entsprechende Gen PNC1 durch CR und andere Formen des Stresses induziert werden kann (Abb. 17) [37].

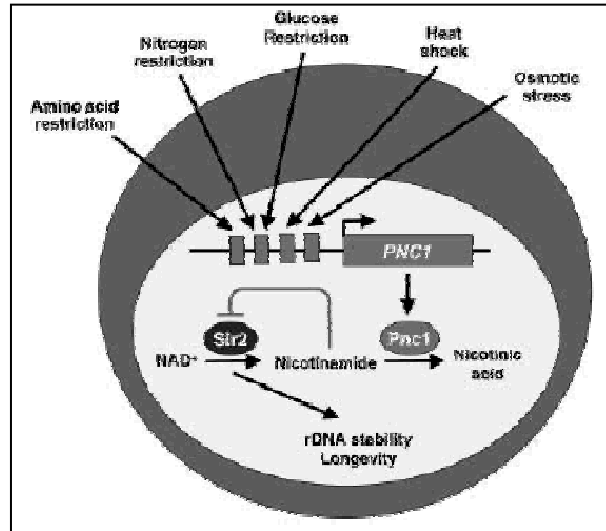


Abb. 17. Mechanismus der CR in *S. cerevisiae* (aus [37])

Im Hinblick auf den Nutzen der Wirkung von Sir2 auf Altern und Langlebigkeit unter Nährstoffrestriktion wurden von Kirkwood, Holliday und Masoro zwei evolutionsbezogene Theorien aufgestellt (Übersicht: [5]). Beide Theorien basieren in ihren Grundzügen auf der Annahme, dass einem Organismus nur ein begrenzter Energievorrat zur Verfügung steht und er mit diesem nur eine begrenzte Zahl von Aktivitäten, wie z.B. Wachstum, Reproduktion oder die Reparatur defekter Zellbausteine, Zellen, Gewebe oder Organe gleichzeitig ausführen kann. Da alle diese Aktivitäten große Mengen an Energie benötigen, müssen viele Aktivitäten zugunsten einer anderen vernachlässigt werden. Die Auswahl einer der Aktivitäten kann von Umweltfaktoren, wie z.B. dem Nahrungsangebot, bestimmt sein. Folglich kann der Organismus je nach Situation eine erhöhte Reproduktionsrate aufweisen, aber schneller altern, da keine Reparaturen vorgenommen werden können. Umgekehrt können bei Nahrungsmangel vor allem Wartung und Reparatur vorherrschen, sodass die Alterung verlangsamt wird und der Organismus sich auch trotz seines Alters noch reproduzieren kann. Der lebensverlängernde Effekt der CR stellt dementsprechend einen biologischen

Mechanismus dar, der erreichen soll, dass Reproduktion nachgeholt werden kann, wenn die Energiesituation dafür günstiger ist.

Diese Hypothesen wurden an Nagern geprüft [38]. Es konnte eine Verbindung zwischen CR und der Aktivierung von SIRT1 hergestellt werden. Die Autoren vermuten, dass die Aktivierung von Sirtuinen durch CR einen konservierten Mechanismus der Stressantwort darstellt, um Langlebigkeit sicherzustellen und den Zelltod kritischer Zelltypen zu verhindern. Dies soll durch die Aktivierung effektiver Reparatursysteme und die Wirkung auf Proteine geschehen, welche die Apoptose steuern. Deshalb verwundert es nicht, dass p53 ein Substrat für SIRT1 darstellt. Abb. 18 fasst die Ergebnisse ausführlicher Untersuchungen hierzu zusammen [39].

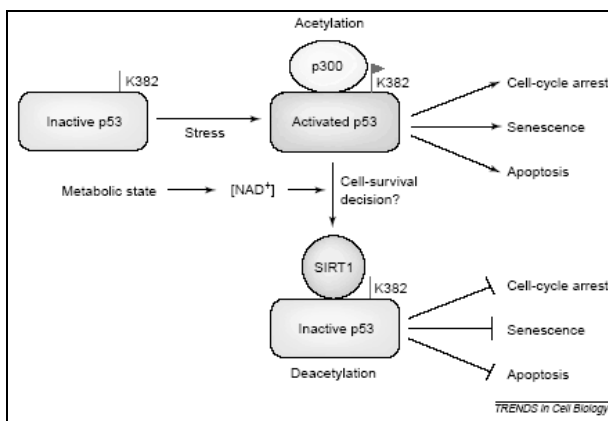


Abb. 18. Zelluläre Konsequenzen der Desacetylierung von p53 durch SIRT1 (aus [39])

5) Ausblick

Die lebensverlängernde Wirkung von Sir2 ist Gegenstand anhaltender Untersuchungen und Diskussionen. So wurden mittlerweile Mechanismen postuliert, in denen die lebensverlängernden Effekte der CR auf Hefe ohne Sir2-Beteiligung vermittelt werden [40]. Weitere wichtige Aspekte dürften sich aus der Erforschung von Sir2-Homologen der Hefe und anderer Arten (Mensch) ergeben. In Hefen scheint Sir2 eine zentrale Rolle bei der Bestimmung der Lebensspanne einzunehmen. Inwieweit Sir2-Homologe jedoch auch in komplexeren Organismen eine derartige Rolle erfüllen oder ob hier nicht eher übergeordnete Mechanismen die Lebensspanne beeinflussen, bleibt zu untersuchen.

Auch ist die Rolle der bei der Sir2-Reaktion entstehenden 2-OAADPR ungeklärt. Bisher wurde nur nachgewiesen, dass dieses nach der Injektion die Reifung von Seestern-Oocyten hemmt [41].

6) Bibliographie

- Berger F, Ramirez-Hernandez M H und Ziegler M (2004) *The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P)*. Trends Biochem Sci **29**, 111-118.
- Guarente L (1997) *Link between aging and the nucleolus*. Genes Dev **11**, 2449-2455.
- Reitz M (2004) *Prinzip Uhr-Gen: Wie unser Altern programmiert ist*. Hirzel, Stuttgart
- Weinert B T und Timiras P S (2003) *Invited review: theories of aging*. J Appl Physiol. **95**, 1706-1716.
- Masoro E J (2003) *Subfield history: caloric restriction, slowing aging, and extending life*. Sci Aging Knowledge Environ **2003**, RE2.
- Partridge L und Gems D (2002) *Mechanisms of aging: public or private?* Nat Rev Genet **3**, 165-175.
- Bitterman K J, Medvedik O und Sinclair D A (2003) *Longevity regulation in Saccharomyces cerevisiae: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin*. Microbiol Mol Biol Rev **67**, 376-399.
- Lane M A, Mattison J A, Roth G S, Brant L J und Ingram D K (2004) *Effects of long-term diet restriction on aging and longevity in primates remain uncertain*. J. Gerontol. Ser. A-Biol. Sci. Med. Sci. **59**, 405-407.
- Torre P R, Mattison J A, Fowler C G, Lane M A, Roth G S und Ingram D K (2004) *Assessment of auditory function in rhesus monkeys (Macaca mulatta): effects of age and calorie restriction*. Neurobiol Aging **25**, 945-954.
- Matochik J A, Chefer S I, Lane M A, Roth G S, Mattison J A, London E D und Ingram D K (2004) *Age-related decline in striatal volume in rhesus monkeys: assessment of long-term calorie restriction*. Neurobiol Aging **25**, 193-200.
- Sinclair D A (2005) *How do we isolate old yeast cells?* (http://www.hms.harvard.edu/pathol/sinclair/Pages/oldcell_isolation.html)
- Smeal T, Claus J, Kennedy B, Cole F und Guarente L (1996) *Loss of transcriptional silencing causes sterility in old mother cells of S. cerevisiae*. Cell **84**, 633-643.
- Sinclair D A und Guarente L (1997) *Extrachromosomal rDNA circles - a cause of aging in yeast*. Cell **91**, 1033-1042.
- Rusche L N, Kirchmaier A L und Rine J (2003) *The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in saccharomyces cerevisiae*. Annu Rev Biochem **72**, 481-516.
- Sinclair D A (1999) *Yeast aging research: recent advances and medical relevance*. CMLS **56**, 807-816.
- Guarente L, Ruvkun G und Amasino R (1998) *Aging, life span, and senescence*. Proc Natl Acad Sci USA **95**, 11034-11036.
- Fischle W (2001) *Histon-Desacetylasen der Klasse II: Entdeckung, Klonierung und funktionelle Charakterisierung der enzymatischen Aktivität einer neuen Gruppe hu-*

- maner HDACs* (Dissertation) Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 18 Frye R A (1999) *Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity.* Biochem Biophys Res Commun **260**, 273-279.
 - 19 Guarente L (2000) *Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging.* Genes Dev **14**, 1021-1026.
 - 20 Hoppe G J, Tanny J C, Rudner A D, Gerber S A, Danaie S, Gygi S P und Moazed D (2002) *Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation.* Mol Cell Biol **22**, 4167-4180.
 - 21 Blander G und Guarente L (2004) *The Sir2 family of protein deacetylases.* Annu Rev Biochem **73**, 417-435.
 - 22 Tanny J C und Moazed D (2001) *Coupling of histone deacetylation to NAD breakdown by the yeast silencing protein Sir2: evidence for acetyl transfer from substrate to an NAD breakdown product.* Proc Natl Acad Sci USA **98**, 415-420.
 - 23 Schmidt M T, Smith B C, Jackson M D und Denu J M (2004) *Coenzyme specificity of Sir2 protein deacetylases: implications for physiological regulation.* J Biol Chem **279**, 40122-40129.
 - 24 Jackson A D und Denu J M (2002) *Structural identification of 2'- and 3'-O-acetyl-ADP-ribose as novel metabolites derived from the Sir2 family of beta-NAD(+)-dependent histone/protein deacetylases.* J Biol Chem **277**, 18535-18544.
 - 25 Borra M T, Langer M R, Slama J T und Denu J M (2004) *Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD+-dependent histone/protein deacetylases.* Biochemistry **43**, 9877-9887.
 - 26 Howitz K T, Bitterman K J, Cohen H Y, Lamming D W, Lavu S, Wood J G, Zipkin R E, Chung P, Kisielewski A, Zhang L L, Scherer B und Sinclair D A (2003) *Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan.* Nature **425**, 191-196.
 - 27 Lamming D W, Wood J G und Sinclair D A (2004) *Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis.* Mol Microbiol **53**, 1003-1009.
 - 28 Hall S (2003) *Longevity research. In vino vitalis? Compounds activate life-extending genes.* Science **301**, 1165.
 - 29 Lin S J, Ford E, Haigis M, Liszt G und Guarente L (2004) *Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH.* Genes Dev **18**, 12-16.
 - 30 Bitterman K J, Anderson R M, Cohen H Y, Latorre Esteves M und Sinclair D A (2002) *Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1.* J Biol Chem **277**, 45099-45107.
 - 31 Chen L und Widom J (2005) *Mechanism of transcriptional silencing in yeast.* Cell **120**, 37-48.
 - 32 Tanny J C, Dowd G J, Huang J, Hilz H und Moazed D (1999) *An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing.* Cell **99**, 735-745.
 - 33 Anderson R M, Bitterman K J, Wood J G, Medvedik O und Sinclair D A (2003) *Nicotinamide and PNCl govern lifespan extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae.* Nature **423**, 181-185.
 - 34 Kaeberlein M, McVey M und Guarente L (1999) *The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms.* Genes Dev **13**, 2570-2580.
 - 35 North B J und Verdin E (2004) *Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases.* Genome Biol. **5**,
 - 36 Brunet A, Sweeney L B, Sturgill J F, Chua K F, Greer P L, Lin Y, Tran H, Ross S E, Mostoslavsky R, Cohen H Y, Hu L S, Cheng H L, Jedrychowski M P, Gygi S P, Sinclair D A, Alt F W und Greenberg M E (2004) *Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase.* Science **303**, 2011-2015.
 - 37 Quideau S (2004) *Plant "polyphenolic" small molecules can induce a calorie restriction-mimetic life-span extension by activating sirtuins: will "polyphenols" someday be used as chemotherapeutic drugs in western medicine?* Chembiochem **5**, 427-430.
 - 38 Cohen H Y, Miller C, Bitterman K J, Wall N R, Hekking B, Kessler B, Howitz K T, Gorospe M, De Cabo R und Sinclair D A (2004) *Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase.* Science **305**, 390-392.
 - 39 Smith J (2002) *Human Sir2 and the 'silencing' of p53 activity.* Trends Cell Biol **12**, 404-406.
 - 40 Kaeberlein M, Kirkland K T, Fields S und Kennedy B K (2004) *Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast.* PLoS Biology **2**, E296.
 - 41 Borra M T, O'Neill F J, Jackson M D, Marshall B, Verdin E, Foltz K R und Denu J M (2002) *Conserved enzymatic production and biological effect of O-acetyl-ADP-ribose by silent information regulator 2-like NAD(+)-dependent deacetylases.* J Biol Chem **277**, 12632-12641.