

STRESZCZENIE

Sirtuiny to – u ssaków – rodzina siedmiu enzymów (sirtuina 1-7) uczestniczących w post-translacyjnej modyfikacji białek (przede wszystkim deacetylacji, ale także: poliADP-rybozylacji, demalonylacji czy lipoamidacji), a tym samym – w regulacji wielu procesów metabolicznych. Aktywność wszystkich sirtuin jest zależna od dostępności NAD⁺. Natomiast funkcja poszczególnych izoform jest różna, a nawet wzajemnie antagonistyczna. W pracy szczegółowo omówiono rolę sirtuin w regulacji metabolizmu glukozy i lipidów oraz w mechanizmach naprawy DNA. Przedstawiono także znaczenie tych enzymów w patogenezie chorób, ze szczególnym uwzględnieniem cukrzycy i nowotworów, wskazując na możliwe terapeutyczne zastosowanie modulatorów aktywności sirtuin.

WPROWADZENIE

Gen, którego produkt wpływa na stabilność genomu, a dzięki temu na długość życia, początkowo odkryto u drożdży. Nazwano go ang. *Silent Information Regulator 2 (SIR2)*. W późniejszych badaniach homologi drożdżowego genu *SIR2* zidentyfikowano u większości organizmów, w tym również u ssaków [1]. U tych ostatnich opisano siedem białek należących do rodziny sirtuin (SIRT1-SIRT7). Występują one w różnych przedziałach komórkowych [2]. W cytoplazmie jest obecna głównie sirtuina 2, w mitochondriach dominują sirtuina 3, sirtuina 4 i sirtuina 5, natomiast w jądrze komórkowym zlokalizowane są sirtuina 1, sirtuina 6 oraz sirtuina 7 (Ryc. 1) [3].

Sirtuiny biorą udział w potranslacyjnej obróbce białek poprzez ich deacylację (najczęściej), poliADP-rybozylację, demalonylację oraz lipoamidację [4]. Dzięki temu sirtuiny mogą wpływać na wiele procesów komórkowych, takich jak metabolizm glukozy oraz lipidów, karcinogeneza, apoptoza, naprawa DNA czy starzenie się komórki. Aktywność wszystkich sirtuin jest zależna od dostępności kofaktora – NAD⁺ [5].

BUDOWA I MECHANIZM DZIAŁANIA SIRTUIN

Domena katalityczna sirtuin składa się z około 260 reszt aminokwasowych i wykazuje bardzo wysokie podobieństwo pomiędzy enzymami pochodzącymi od różnych gatunków. Masa sirtuin waha się od trzydziestu kilku kDa do nawet 120 kDa w przypadku sirtuiny 1. Poszczególne izoformy sirtuin różnią się między sobą składem reszt aminokwasowych na N- i C-końcu, co wpływa na odmienną lokalizację komórkową, aktywność enzymatyczną oraz specyficzność substratową (Ryc. 1) [5].

W obrębie domeny katalitycznej sirtuin występują dwie subdomeny. Subdomena zwana foldem Rossmanna, która jest charakterystyczna dla enzymów wykorzystujących jako kofaktory FAD lub NAD⁺ oraz druga, mniejsza, subdomena zdolna do wiązania cynku. Pomiedzy subdomenami tworzy się miejsce aktywne enzymu, w którym wiąże się substrat, oraz kieszeń, w której lokuje się NAD⁺ [6]. Miejsce wiązania substratu różni się między poszczególnymi izoformami sirtuin. W przypadku najczęściej przeprowadzanej przez sirtuiny reakcji deacetylacji ważną rolę odgrywa reszta histydy, która uczestniczy w przekształceniu produktu pośredniego w deacetylowany substrat.

Po związaniu się substratu z miejscem aktywnym enzymu zamyka się szczelina między subdomenami, subdomena wiążąca cynk zbliża się do subdomeny Rossmanna. Taka zamknięta struktura enzymu umożliwia przyłączenie się NAD⁺. Kieszeń, do której przyłącza się kofaktor, posiada trzy charakterystyczne miejsca. Jest to region A, w którym znajduje się reszta adeniny, region B, gdzie lokuje się reszta rybozy, oraz miejsce C, przeznaczone dla nikotynoamidowej

Zuzanna Frydzińska

Aleksandra Owczarek

Katarzyna Winiarska ✉

Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

✉ Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: 22 5543208, e-mail: k.winiarska@biol.uw.edu.pl

Artykuł otrzymano 6 listopada 2018 r.
Artykuł zaakceptowano 10 stycznia 2019 r.

https://doi.org/10.18388/pb.2019_254

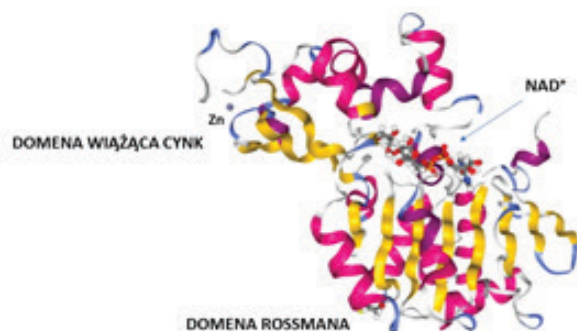
Słowa kluczowe: sirtuiny, metabolizm, cukrzyca, nowotwory

Wykaz skrótów: AMPK – kinaza białkowa zależna od AMP; BER – naprawa DNA przez wycięcie zasad; FOXO1 – czynnik transkrypcyjny z rodziny forkhead; HIF-1 – czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją 1; HR – rekombinacja homologiczna; NER – naprawa DNA przez wycięcie nukleotydów; NHEJ – naprawa DNA przez łączenie niehomologicznych końców; PGC-1 α – koaktywator receptorów aktywowanych proliferatorami peroksyosomów 1 α ; PPAR γ – receptory aktywowane przez proliferatory peroksyosomów γ

Podziękowania: Pracę sfinansowano ze środków pochodzących z grantu Narodowego Centrum Nauki nr 2016/21/B/NZ3/00365.

NAZWA	STRUKTURA	LOKALIZACJA
SIRT1		747aa JĄDRO KOMÓRKOWE
SIRT2		389aa CYTOPLAZMA
SIRT3		399aa MITOCHONDRIMUM
SIRT4		314aa MITOCHONDRIMUM
SIRT5		310aa MITOCHONDRIMUM
SIRT6		355aa JĄDRO KOMÓRKOWE
SIRT7		400aa JĄDRO KOMÓRKOWE

Rycina 1. Budowa oraz lokalizacja wewnątrzkomórkowa ssaczych sirtuin. Ciemny obszar obrazuje domenę katalityczną. aa - aminokwasy (opracowano na podstawie [5]).



Rycina 2. Struktura sirtuiny 1 związanej z NAD⁺ (opracowano na podstawie [6]).

części NAD⁺. Region C kieszeni formuje się z pętli łączącej dwie subdomeny enzymu dopiero po związaniu NAD⁺ (Ryc. 2) [4].

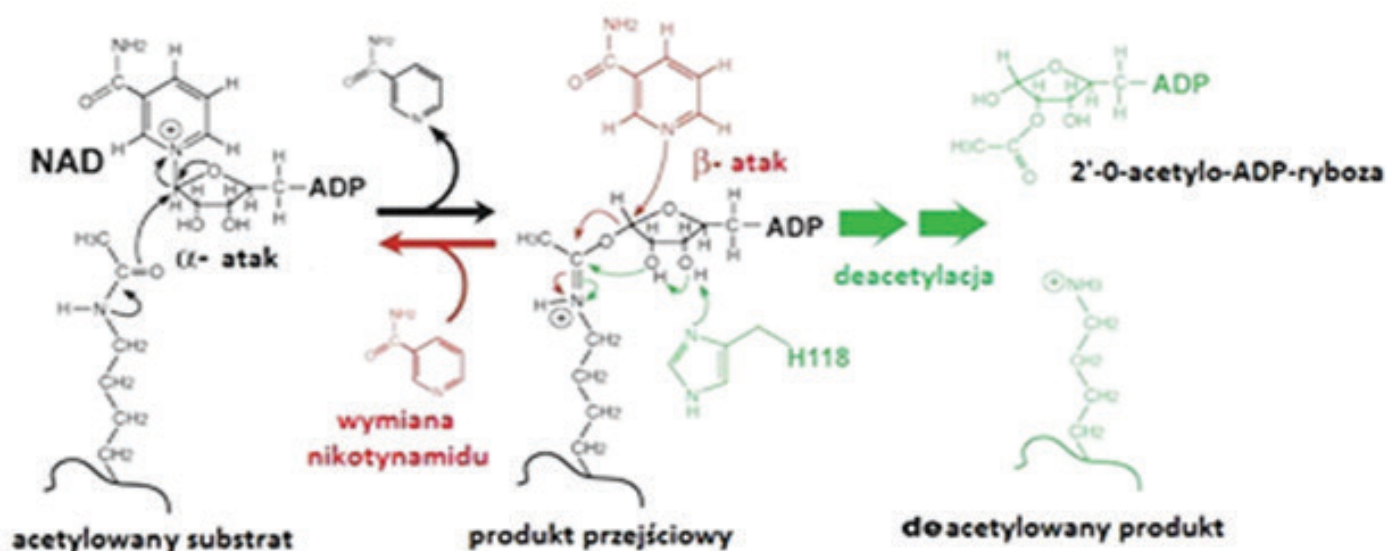
Lokalizacja nikotynamidowej części NAD⁺ w miejscu C jest niezbędna w procesie katalizy reakcji deacetylacji, podczas którego karbonylowy atom O acetylolizyny atakuje po-

zycję C1' rybozy, pozwalając na uwolnienie nikotynamidu i utworzenie pośredniego produktu reakcji, którego hydrolyza ostatecznie prowadzi do uwolnienia deacetylowanego białka oraz 2'-O-acetylo-ADP-rybozy (Ryc. 3) [7].

MODULACJA AKTYWNOŚCI SIRTUIN

Aktywność enzymatyczna sirtuin i stan energetyczny komórki są ze sobą ściśle powiązane, ze względu na wykorzystywanie przez sirtuiny NAD⁺ jako kofaktora. Sirtuiny są uważane za czujniki zmian stanu redoks w komórce [8]. Podstawowym mechanizmem aktywującym wszystkie izoformy sirtuin jest rosnący stosunek NAD⁺/NADH, który występuje m.in. podczas głodu lub wysiłku fizycznego. Gdy do organizmu dostarczana jest duża ilość kalorii, w komórce intensywnie zachodzi glikoliza i zużywany jest NAD⁺. Natomiast w okresie głodu zwiększa się aktywność łańcucha oddechowego, wzrasta stosunek NAD⁺ do NADH i dochodzi do aktywacji sirtuin [9]. Aktywność sirtuin jest także regulowana przez kinazę białkową zależną od AMP (AMPK), poprzez zwiększenie poziomu NAD⁺ i stosunku NAD⁺/NADH. AMPK jest enzymem odpowiedzialnym za utrzymywanie równowagi energetycznej w komórce [10]. Badania Wang i wsp. [11] dowiodły, że restrykcje kaloryczne wzmagają aktywność AMPK, a co za tym idzie, doprowadzają również do aktywacji sirtuin. Wysoki poziom NAD⁺, aktywujący sirtuiny, jest utrzymywany m.in. dzięki aktywności fosforybozylotransferazy nikotynamidowej (NAMPT, ang. *nicotinamide phosphoribosyltransferase*), zwanej też wiatyną. Enzym ten przekształca nikotynamid w prekursor NAD⁺ - mononukleotyd nikotynamidowy. Badania Fulco i wsp. [12] wykazały, że AMPK aktywuje NAMPT, zwiększając to stosunek NAD⁺ do NADH i wzrost aktywności sirtuin.

Najbardziej znanym inhibitorem sirtuin jest nikotynamid. Jest to endogenny związek powstający podczas reakcji deacetylacji. Nikotynamid działa na wszystkie izoformy ssaczych sirtuin, hamując ich aktywność deacetylazy. Nikotynamid blokuje, niezbędną do aktywności katalitycznej sirtuin, hy-



Rycina 3. Reakcja deacetylacji katalizowana przez sirtuiny oraz działanie nikotynamidu jako inhibitora tej reakcji. Nikotynamid będący produktem reakcji deacetylacji prowadzi do odwrócenia pierwszego jej etapu. Atom azotu nikotynamidu przeprowadza atak nukleofilowy na produkt pośredni reakcji, prowadząc do odwrócenia acetylowanego substratu i NAD⁺, a w konsekwencji do zahamowania reakcji deacetylacji (opracowano na podstawie [7]).



Rycina 4. Wzory strukturalne aktywatorów sirtuin.

drolizę NAD^+ , wiążąc się z enzymem tuż obok miejsca wiązania NAD^+ [13]. Jak wcześniej opisano, przeprowadzana przez sirtuiny reakcja deacetylacji rozpoczyna się atakiem nukleofilowym tlenu z grupy karbonylowej acetylowanej lizyny substratu na atom węgla C1' rybozy. Prowadzi to do hydrolizy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego i powstania nikotynamidu. Jednak na etapie produktu przejściowego może dojść do tzw. wymiany nikotynamidu, polegającej na przyłączeniu się tego inhibitora do enzymu i odwróceniu ataku nukleofilowego, który zapoczątkował reakcję deacetylacji. Zarówno NAD^+ jak i acetylowana lizyna substratu zostają odtworzone, a cała reakcja zatrzymana (Ryc. 3) [7].

Szczególne zainteresowanie wzbudzają jednak egzogenne aktywatory sirtuin, takie jak resweratrol, SRT1460, SRT2183 czy SRT1720 (Ryc. 4). Ich działanie dotyczy przede wszystkim aktywacji sirtuiny 1, jednak wpływają również na aktywność jej najbliższych homologów – sirtuiny 2 i sirtuiny 3. Wyjątkiem jest SRT1720, który działa wyłącznie jako inhibitor sirtuiny 3. Najsilniej na sirtuinę 1 działa SRT1460, podnosząc jej aktywność enzymatyczną o blisko 500%. Wymienione powyżej aktywatory łączą się do kompleksu enzym-substrat w miejscu allosterycznym enzymu i determinują konformację sprzyjającą aktywności katalitycznej sirtuin. Gdy substrat nie jest związany z enzymem, aktywator nie może się przyłączyć. Dopiero związanie substratu odsłania miejsce wiązania aktywatora [14]. Oddziaływanie aktywatora z kompleksem enzym-substrat jest możliwe dzięki reszcie glutaminy, znajdującej się w pozycji 230 białka sirtuiny 1. Wszystkie wymienione aktywatory wiążą się w tym samym miejscu do kompleksu enzym-substrat [15].

Resweratrol jest roślinnym polifenolem występującym naturalnie m.in. w ciemnych winogronach. Kiedy stwierdzono, że podanie resweratrolu ma wpływ na stabilność genomu i wydłużenie życia organizmów takich jak *C. elegans* czy *D. melanogaster*, rozpoczęły się badania na komórkach ssaczych. Wyniki uzyskane *in vitro* potwierdziły, że resweratrol wzmacnia aktywność ssaczej sirtuiny 1. Jednak wyniki dalszych badań nad działaniem tego związku sugerują, że wpływ resweratrolu na aktywność sirtuin *in vivo* jest kontrowersyjny [16].

FUNKCJE SIRTUIN

Sirtuiny występujące u ssaków można podzielić na 4 klasy (I-IV). Sirtuiny 1-3 należą do I klasy. Cechują się one

bardzo szeroką aktywnością enzymatyczną. Oprócz podstawowej aktywności, czyli deacetylacji, wykazują również zdolność do usuwania z białek reszt acylowych, takich jak grupa mirystoilowa [4]. Sirtuiny 1-3 posiadają hydrofobową kieszeń, w której lokuje się grupa mirystoilowa przed odcięciem od modyfikowanego białka. Podobną kieszeń posiada również sirtuina 6, która wraz z sirtuiną 7 należy do klasy IV [17]. Badania przeprowadzone przez Jing i wsp. [6] wykazały, że sirtuina 6 charakteryzuje się wyższą aktywnością deacylacji niż deacetylaza. Autorzy ci dowiedli, że usuwanie przez sirtuinę 6 łańcuchów acylowych z reszty lizyny w pozycji 19 i 20 czynnika martwicy nowotworu (TNF α) prowadzi do jego podwyższonego wydzielania. Z kolei badania zespołu Barbera i wsp. [18] nad sirtuiną 7 udowodniły, że enzym ten jest zdolny do deacetylacji reszty lizyny w pozycji 18 histonu H3. Taka modyfikacja powoduje wyciszenie transkrypcji genów zlokalizowanych w pobliżu deacetylowanego histonu.

W III klasie znajduje się sirtuina 5. W miejscu aktywnym tego enzymu znajdują się reszty argininy i tyrozyny, co umożliwia odcinanie m.in. grup malonylowych oraz sukcylnylowych, posiadających ujemne ładunki [19]. Istotne dla metabolizmu związki posiadające grupę malonylową lub sukcylnową to m.in. malonylo-CoA, będący prekursorem w biosyntezie kwasów tłuszczowych oraz sukcynylo-CoA, metabolit cyklu Krebsa. Poprzez modyfikacje wyżej wymienionych związków sirtuina 5 wpływa zatem na tempo podstawowych procesów metabolicznych w komórkach ssaków [20].

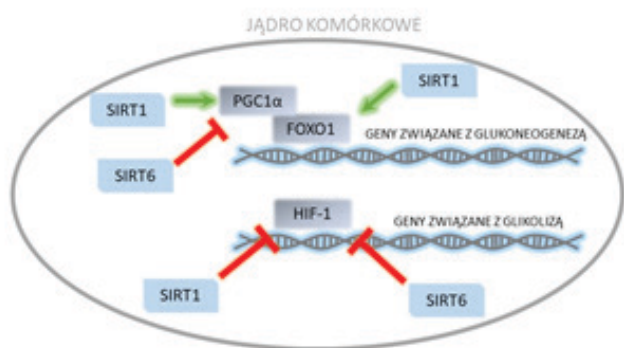
Sirtuina 4 zaliczana jest do II klasy i jest enzymem zdolnym do deacetylacji, poliADP-rybozylacji oraz lipoamidacji. Poprzez deacetylację dekarboksylazy malonylo-CoA (MCD) przyczynia się do utrzymania odpowiedniego poziomu lipidów w organizmie. Zdeacetylowana MCD traci swoją aktywność, a co za tym idzie, biosynteza kwasów tłuszczowych zostaje zatrzymana [21].

Poniżej szczegółowo scharakteryzowano znaczenie sirtuin w metabolizmie glukozy i lipidów oraz w mechanizmach naprawy DNA.

REGULACJA METABOLIZMU GLUKOZY

Sirtuiny, poprzez kontrolę procesów glukoneogenezy i glikolizy, biorą bezpośredni udział w utrzymywaniu homeostazy glukozy w organizmie, regulując także wydzielanie insuliny [2].

Proces glukoneogenezy jest regulowany przez sirtuinę 1. Może ona jednak mieć różne działanie, w zależności od długości okresu głodu, który należy do czynników aktywujących sirtuinę 1 [22]. Podczas głodu w komórkach wątroby podnosi się poziom pirogronianu, natomiast spada poziom mleczanu, tym samym wzrasta stosunek NAD^+ do NADH . Jak wielokrotnie wspomniano, NAD^+ jest kofaktorem sirtuiny 1, a więc jego podniesiony poziom przyczynia się do aktywacji tego enzymu [23]. Podczas krótkotrwałego okresu głodu sirtuina 1 deacetyluje CRT2 (ang. *CREB-regulated Transcription Coactivator 2*), będący aktywatorem transkrypcji genów kodujących enzymy glukoneogenezy. Powoduje



Rycina 5. Wpływ sirtuiny 1 oraz 6 na aktywność czynników transkrypcyjnych regulujących transkrypcję genów, których produkty biorą udział w procesach glukoneogenezy i glikolizy. Zielonymi strzałkami zaznaczono aktywujące działanie sirtuiny na dany czynnik, natomiast czerwone strzałki oznaczają negatywną regulację. Sirtuina 1 może stymulować transkrypcję genów związanych z glukoneogenezą zarówno za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego PGC1α (hamowanego przez sirtuinę 6), jak i bezpośrednio wpływając na czynnik transkrypcyjny FOXO1. Transkrypcja genów związanych z glikolizą może być obniżona wskutek negatywnej regulacji czynnika HIF-1 przez sirtuiny 1 i 6 (opracowano na podstawie [5]).

to degradację CRTC2, a tym samym również spowolnienie procesu powstawania glukozy *de novo* w wątrobie. Jednak gdy okres głodu się przedłuża, sirtuina 1 może pobudzać transkrypcję genów glukoneogenezy, aktywując poprzez deacetylację czynnik transkrypcyjny FOXO1 (ang. *Forkhead Box Protein O1*) oraz PGC-1α (ang. *Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Coactivator 1a*), będący jego koaktywatorem [2]. FOXO1 jest czynnikiem transkrypcyjnym kontrolującym transkrypcję genów kodujących kluczowe enzymy glukoneogenezy: glukozo-6-fosfatazę (G6Pa-za) i karboksykinazę fosfoenolopirogronianową (PEPCK) (Ryc. 5) [24].

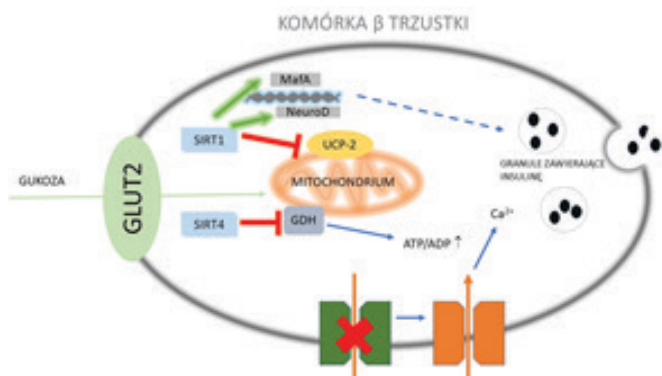
Sirtuina 6 ma poniekąd działanie przeciwstawne względem sirtuiny 1, spowalnia przebieg glukoneogenezy poprzez hamowanie działania czynnika PGC-1α. Aktywność PGC-1α zależy od stopnia jego acetylacji. Proces ten jest kontrolowany przez acetylotransferazę GCN5. Sirtuina 6 powoduje deacetylację i fosforylację GCN5, co wzmacnia jej aktywność acetylazową. Nadmiernie acetylując PGC-1α, acetylotransferaza prowadzi do obniżenia jego aktywności, w konsekwencji do zahamowania glukoneogenezy [25].

Sirtuina 1, oprócz glukoneogenezy, reguluje również proces glikolizy. Deacetyluje czynnik indukowany hipoksją HIF-1, który z kolei odpowiada m.in. za transkrypcję genów kodujących enzymy glikolizy [26]. Pod kontrolą czynnika HIF-1 znajdują się geny takie jak: gen dehydrogenazy mleczanowej (LDH), izomerazy glukozo-6-fosforanowej, fosfofruktokinazy (PFK-1) czy kinazy fosfoglicerynianowej 1 (PGK-1). Oprócz genów kodujących enzymy glikolizy, HIF-1 reguluje również transkrypcję genów transporterów glukozy: GLUT1 i GLUT3 [27]. Deacetylacja HIF-1 powoduje jego unieczynnienie, a tym samym osłabienie transkrypcji genów będących pod kontrolą tego czynnika transkrypcyjnego, w tym również genów kodujących enzymy glikolizy (Ryc. 5) [5]. Podczas niedoboru tlenu zmniejsza się ilość NAD^+ , a więc spada również aktywność sirtuiny 1. HIF-1 nie jest wtedy deacetylowany i zachodzi transkrypcja re-

gulowanych przez ten czynnik genów [28]. Sirtuina 1 spowalnia przebieg glikolizy również przez bezpośrednią deacetylację i hamowanie aktywności jednego z jej enzymów, fosfogliceromutazy-1 (PGAM-1). W momencie niedoboru glukozy zwiększa się aktywność sirtuiny 1, następuje deacetylacja PGAM-1 i zahamowanie glikolizy [29].

Sirtuina 6 również blokuje działanie czynnika transkrypcyjnego HIF-1. Badania przeprowadzone przez Zhong i wsp. [26] wykazały, że komórki o obniżonej zawartości sirtuiny 6 wykazywały wyższą aktywność czynnika HIF-1, a w konsekwencji również zwiększoną aktywność glikolityczną, w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Dowiedziono, że sirtuina 6 deacetyluje lizynę 9 histonu 3 (H3K9), co ma wpływ na strukturę chromatyny w rejonie promotorów genów kodujących enzymy glikolizy. Gdy komórka jest odpowiednio zaopatrzona w substancje odżywcze, sirtuina 6 deacetyluje czynnik transkrypcyjny HIF-1 oraz H3K9, co prowadzi do obniżonej transkrypcji genów kodujących enzymy glikolizy. Natomiast podczas gdy komórka doświadcza niedoboru składników odżywczych, sirtuina 6 traci aktywność i HIF-1 zostaje z powrotem aktywowany. Następuje również ponowna acetylacja H3K9. Dzięki temu możliwa jest transkrypcja genów kodujących enzymy glikolizy [26].

Sirtuina 1 oraz sirtuina 4 wpływają na wydzielanie insuliny z komórek β trzustki. Gdy wzrasta poziom glukozy we krwi, cząsteczki tego cukru wnikają do komórek β trzustki przez transportery GLUT2, a następnie są wykorzystywane w procesie glikolizy. Podnosi to wewnątrzkomórkowe stężenie ATP, co skutkuje zablokowaniem kanałów błonowych dla jonów potasu. Następuje depolaryzacja błony, otwarcie kanałów dla jonów wapnia, które zaczynają napływać do komórki i pozwalają na uwolnienie granul zawierających insulinę poza komórkę [17]. Rola sirtuiny 1 w zwiększaniu wydzielania insuliny polega na blokowaniu syntezy mitochondrialnego białka UCP2 (ang. *Uncoupling Protein 2*). Zwiększa to wewnątrzkomórkową produkcję ATP, które jest niezbędne, aby zamknęły się kanały potasowe i do komórki mógł napłynąć wapń, potrzebny do uwolnienia granul z insuliną [30]. UCP2 jest białkiem zlokalizowanym w wewnętrznej błonie mitochondrium. Działa jako transporter protonów, uwalniając je do matriksu mitochondrialnej. Oddziela w ten sposób proces fosforylacji oksydacyjnej od procesu syntezy ATP. Towarzyszą temu jednak straty energetyczne. Wiadomo, że UCP2 hamuje wydzielanie insuliny z komórek β trzustki ze względu na obniżanie poziomu ATP w komórce [31]. Badania Bordone i wsp. [30] wykazały, że podczas spadku poziomu glukozy w komórkach β trzustki spada poziom NAD^+ , co powoduje obniżenie aktywności sirtuiny 1. Nie blokuje ona już syntezy białka UCP2, w komórce podnosi się poziom ATP i insulina może zostać wydzielona. Sirtuina 1 dodatkowo aktywuje ekspresję czynników transkrypcyjnych, pod kontrolą których znajduje się gen insuliny: MafA i NeuroD. Ekspresja MafA oraz NeuroD jest kontrolowana przez inny czynnik transkrypcyjny, wspomniany już wcześniej FOXO1. Sirtuina 1, deacetylując FOXO1, pozwala na aktywację transkrypcji genów MafA i NeuroD. Ekspresja tych czynników z kolei umożliwia transkrypcję genu insuliny (Ryc. 6) [32].



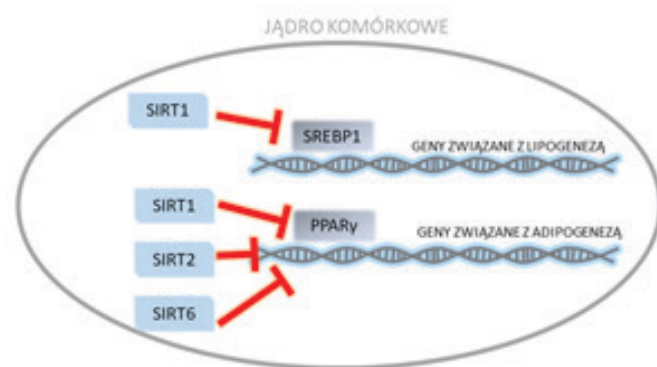
Rycina 6. Rola sirtuiny 1 i sirtuiny 4 w uwalnianiu insuliny z komórek β trzustki. Zielonymi strzałkami zaznaczono aktywujące działanie sirtuiny na dany czynnik, natomiast czerwone strzałki oznaczają negatywną regulację. Sirtuina 1 zwiększa ekspresję czynników regulujących transkrypcję genu insuliny oraz obniża aktywność mitochondrialnego białka UCP2, co zwiększa stężenie ATP w komórce. Dochodzi do zamknięcia kanałów potasowych i otwarcia kanałów wapniowych. Podniesienie poziomu wapnia skutkuje uwolnieniem granул z insuliną poza komórkę. Sirtuina 4 natomiast blokuje aktywność dehydrogenazy glutaminianowej (GDH), co również sprzyja podniesieniu poziomu ATP w komórce (opracowano na podstawie [3]).

Sirtuina 4 natomiast ogranicza wydzielanie insuliny poprzez zahamowanie działania dehydrogenazy glutaminianowej (GDH) (Ryc. 6). Jest to enzym katalizujący odwracalną reakcję przekształcenia glutaminianu do 2-oksoglutaranu, który jest włączany do cyklu Krebsa. Zahamowanie działania GDH zmniejsza ilość dostępnych intermediatów cyklu Krebsa, a tym samym obniża stężenie wewnątrzkomórkowego ATP. Skutkuje to zmniejszeniem wydzielania insuliny z komórek β trzustki [33]. Sirtuina 4 ponadto hamuje aktywność kompleksu enzymatycznego dehydrogenazy pirogronianowej (PDH), katalizującego reakcję przekształcenia pirogronianu w acetylo-CoA, konieczną, aby ten mógł zostać wykorzystany w cyklu Krebsa. Sirtuina 4 funkcjonuje w tym przypadku jako lipoamidaza, odcinając reszty lipoilowe, będące kofaktorem dla jednego z komponentów kompleksu PDH - DLAT (transacetylaaza dihydroilipoilowa) [34].

Pozostałe sirtuiny również są zaangażowane w metabolizm glukozy. Sirtuina 2 przyczynia się do nasilenia glukoneogenezy poprzez deacetylację i aktywację karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej (PEPCK) w warunkach obniżonego stężenia glukozy. Sirtuina 3 promuje włączanie aminokwasów w proces glukoneogenezy, aktywując GDH poprzez deacetylację [59], hamuje natomiast glikolizę. Przeciwnie działanie na proces glikolizy na sirtuina 5, która wzmacnia go dzięki swojej aktywności demalonylasy. Usunięcie reszt malonylowych z dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), jednego z enzymów glikolitycznych, zwiększa jego aktywność [35].

REGULACJA METABOLIZMU LIPIDÓW

Sirtuiny uczestniczą także w kontroli gospodarki lipidowej. Synteza cholesterolu i kwasów tłuszczowych jest spowalniana przez sirtuinę 1 podczas okresu głodu. Enzym ten deacetyluje i przez to zaburza działanie czynnika transkrypcyjnego SREBP-1 (ang. *Sterol Regulatory Element*



Rycina 7. Rola sirtuin w regulacji transkrypcji genów związanych z metabolizmem lipidów. Zielonymi strzałkami zaznaczono aktywujące działanie sirtuiny na dany czynnik, natomiast czerwone strzałki oznaczają negatywną regulację. Sirtuina 1 hamuje ekspresję genów związanych z lipogenezą poprzez deacetylację czynnika transkrypcyjnego SREBP-1. Podobnie jak sirtuina 6, sirtuina 1 hamuje również ekspresję genów związanych z adipogenezą poprzez obniżenie aktywności receptora PPAR γ . Sirtuina 2 wpływa pośrednio na ograniczenie ekspresji genów kontrolowanych przez PPAR γ (opracowano na podstawie [5]).

Binding Protein 1), regulującego ekspresję genów, których produkty są niezbędne w procesie lipogenezy i syntezy cholesterolu (Ryc. 7). Czynnikiem SREBP-1 jest najbardziej aktywny, gdy do organizmu ssaka zostanie dostarczona duża ilość składników odżywczych. Jest to sygnał do tego, aby nadmiar pokarmu został zmagazynowany w postaci tłuszczów. Badania wykazały, że aktywowana w okresie głodu sirtuina 1 deacetyluje SREBP-1, czym przyczynia się do obniżenia ekspresji genów kontrolowanych przez ten czynnik transkrypcyjny [36]. Badania przeprowadzone na myszach, z genomu których usunięto gen sirtuiny 1 [37], wykazały, że zwierzęta posiadające taką mutację cierpiały na stłuszczenie wątroby, bez względu na to, czy ich dieta była uboga czy bogata w tłuszcze. Myszy zaczynały chorować, gdy osiągały wiek około dwóch miesięcy. Wraz z wiekiem zwierząt stłuszczenie wątroby postępowało, pomimo iż dieta, którą były karmione, nie była dietą wysokolipidową. Po roku od narodzin 78% myszy pozbawionych sirtuiny 1 wykazywało stłuszczenie wątroby, podczas gdy w grupie kontrolnej odsetek chorych osobników wynosił jedynie 17%. Opisane powyżej badania potwierdzają kluczową rolę sirtuiny 1 w utrzymywaniu prawidłowej gospodarki lipidowej.

Sirtuina 1 wykazuje również zdolność do regulacji działania innego czynnika transkrypcyjnego zaangażowanego w metabolizm lipidów, jakim jest jądrowy receptor PPAR γ (ang. *Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ*). Pod kontrolą PPAR γ znajdują się geny, których produkty uczestniczą w adipogenezie oraz wychwycie lipidów do tkanki tłuszczowej. Jest to m.in. gen białka FABP (ang. *Fatty Acid Binding Protein*), należącego do białek transportujących kwasy tłuszczowe. Ponadto PPAR γ może promować również swoją własną ekspresję. Ligandami receptorów z rodziny PPAR są lipidy oraz ich pochodne. Gdy do receptora zwiąże się ligand, może on wtedy zadziałać jako czynnik transkrypcyjny, uruchamiając ekspresję kontrolowanych przez siebie genów. W czasie, gdy do organizmu nie jest dostarczana odpowiednia ilość składników odżywczych, sirtuina 1 hamuje aktywność PPAR γ poprzez oddziaływanie z jego kofaktorami - NcoR (ang. *Nuclear Receptor Co-repressor*) oraz SMRT (ang. *Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormone Receptors*). Sirtuina 1

blokuje także ekspresję PPAR γ poprzez przyłączenie się do promotora genu tego receptora [38]. Ekspresja genów kontrolowanych przez PPAR γ jest również spowalniana przez sirtuinę 6. Badania prowadzone na myszach wykazały, że nadekspresja sirtuiny 6 przyczynia się do dwukrotnego obniżenia transkrypcji genów kontrolowanych przez PPAR γ , natomiast nie wykazano zmniejszenia ilości samego receptora, w porównaniu z grupą kontrolną myszy. Sirtuina 6 działa w ten sam sposób co sirtuina 1, a więc blokuje transkrypcję genów zależnych od PPAR γ , przyłączając kofaktory tego czynnika transkrypcyjnego. Do inhibitorów adipogenezy należy również sirtuina 2. Podczas głodu aktywowana sirtuina 2 deacetyluje FOXO1, co prowadzi do jego związania z PPAR γ . Uniemożliwia to przyłączenie PPAR γ do promotora genów kontrolowanych przez ten czynnik transkrypcyjny, a w konsekwencji obniża ich ekspresję. Aktywowany przez deacetylację FOXO1 przyłącza się również do promotora receptora PPAR γ , czym blokuje jego ekspresję. Aby udowodnić, że deacetylacja FOXO1 przez sirtuinę ogranicza ekspresję genów kodujących enzymy adipogenezy, przeprowadzono eksperyment, w którym niedojrzałe adipocyty inkubowano z nikotynamidem, inhibitorem sirtuin. Okazało się, że po zahamowaniu działania sirtuin w komórkach oddziaływania pomiędzy FOXO1 i PPAR γ zostają znacznie ograniczone [37].

UDZIAŁ W MECHANIZMACH NAPRAWY DNA

Wszystkie organizmy żywe poddawane są działaniu wielu czynników, które mogą zaburzyć strukturę DNA. Do takich czynników należy m.in. promieniowanie UV oraz jonizujące, reaktywne formy tlenu (ROS) oraz wirusy. Aby zapobiec skutkom takich uszkodzeń, organizmy zwierząt wykształciły procesy naprawy DNA. Do czterech głównych systemów naprawy DNA należą: naprawa przez wycięcie zasad (BER, ang. *Base Excision Repair*), naprawa przez wycięcie nukleotydów (NER, ang. *Nucleotide Excision Repair*), rekombinacja homologiczna (HR, ang. *Homologous Recombination*) oraz łączenie niehomologicznych końców (NHEJ, ang. *Non-homologous End Joining*) [39]. System BER opiera się na naprawie jednoniciowych pęknięć w DNA. Enzymem uczestniczącym w tym procesie jest glikozydaza DNA, która, przecinając wiązanie β -N-glikozydowe, usuwa błędnie sparowaną zasadę. Miejsce, w którym brakuje zasady azotowej, jest rozpoznawane przez endonukleazę AP (APE1), która z kolei przecina wiązanie fosfodiesterowe, tworząc miejsce działania polimerazy DNA β (Pol β). Ten ostatni enzym syntetyzuje odpowiednią zasadę na matrycy drugiej nici DNA. Na koniec ligaza DNA łączy nowo zsyntetyzowany nukleotyd z sąsiednimi nukleotydami, zapewniając ciągłość nici [40]. Dla efektywnego zachodzenia systemu BER ważna jest odpowiednia acetylacja reszty lizyny w pozycjach 6 i 7 APE1. Za regulację poziomu tej modyfikacji odpowiedzialna jest sirtuina 1. Badania Yamamori i wsp. [41] wykazały, że aktywacja sirtuiny 1 zmniejsza stopień acetylacji endonukleazy i promuje jej wiązanie do białka XRCC1 (ang. *X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 1*) w miejscu występowania błędnie dopasowanej zasady. XRCC1 jest białkiem pozbawionym aktywności enzymatycznej, ułatwiającym wiązanie się innych białek do DNA. Użycie inhibitora sirtuiny 1 powoduje słabsze wiązanie się APE1 do DNA. Deacetylacja APE1, katalizowana przez sirtuinę 1, wzmacnia również aktywność

enzymatyczną endonukleazy, zwiększając tym samym efektywność działania systemu BER.

System NER pozwala na naprawę bardziej rozległych błędów w DNA poprzez wycinanie wielu nukleotydów. Takie wielonukleotydowe pomyłki w parowaniu mogą prowadzić do nieprawidłowego związania się podwójnej helisy DNA. Uszkodzone miejsce jest rozpoznawane przez białko XPC, które wiąże się w tym miejscu do DNA. Następuje rozplecenie helisy dzięki przyłączeniu się czynnika transkrypcyjnego TFIIH, który wykazuje aktywność helikazy zarówno w kierunku w kierunku od 3' do 5' jak i od 5' do 3'. Pojawienie się odcinków jednoniciowego DNA powoduje przyłączenie się białek XPA i RPA, które stabilizują rozplecione DNA. Następnie białka XPG i XPF, należące do rodziny endonukleaz, nacinają uszkodzoną nić tuż przed oraz tuż za uszkodzonym miejscem. Uszkodzony fragment zostaje usunięty, a na jego miejsce dzięki polimerazie DNA na matrycy nieuszkodzonej nici dołączane są odpowiednie nukleotydy. Na koniec, podobnie jak w przypadku systemu BER, ligaza I łączy nowo zsyntetyzowany fragment DNA z sąsiednimi fragmentami nici [42]. Sirtuina 1 uczestniczy również w tym systemie naprawy jednoniciowych błędów w DNA, deacetylując białka XPA i XPC. Taka modyfikacja ułatwia ich rekrutację do uszkodzonego fragmentu DNA [43]. Negatywna regulacja sirtuiny 1, w wyniku zastosowania siRNA, zwiększa wrażliwość DNA na promieniowanie UV. W przypadku białka XPA sirtuina 1 katalizuje deacetylację lizyn w pozycjach 63 i 67. Jeśli sirtuina 1 działa prawidłowo, deacetylacja białka XPA nasila się pod wpływem tego czynnika mutagennego. Co więcej, deacetylacja białka XPA wzmacnia jego oddziaływanie z białkiem RPA. Stabilizuje to kompleks enzymów uczestniczący w naprawie DNA i zwiększa efektywność systemu NER [44]. Jeśli zaś chodzi o białko XPC, to jest ono niezbędne do rozpoznania uszkodzonego fragmentu DNA i rekrutacji pozostałych czynników biorących udział w systemie NER. Deacetylacja tego białka przez sirtuinę 1 umożliwia jego przyłączenie do DNA w uszkodzonym miejscu [43]. Ekspresja białka XPC również jest regulowana przez sirtuinę 1. Badania Ming i wsp. [45] dowiodły, że sirtuina 1 blokuje dostęp represora transkrypcji białka XPC do jego promotora, przez co przyczynia się do wzmocnienia ekspresji tego białka. Linie komórkowe pozbawione genu sirtuiny 1 wykazują niższy poziom białka XPC niż komórki typu dzikiego. Transkrypcja genu białka XPC jest hamowana przez kompleks represora E2F4-p130. Białko E2F4 występuje w jądrze komórkowym, natomiast białko p130 jest białkiem cytosolowym. Aby doszło do wytworzenia kompleksu i hamowania transkrypcji genu białka XPC, białko p130 musi zostać przetransportowane do jądra komórkowego. Sirtuina 1 zaburza ten transport, hamując fosforylację kinazy AKT poprzez deacetylację supresora nowotworowego, PTEN (ang. *Phosphatase and Tensine Homolog*). Deacetylacja PTEN powoduje jego aktywację i defosforylację kinazy AKT [46]. Z kolei defosforylowana kinaza, niezbędna do przetransportowania białka p130 z cytozolu do jądra komórkowego, traci swoją aktywność. Brak białka p130 w jądrze uniemożliwia wytworzenie kompleksu represora i przyczynia się do zwiększonej ekspresji białka XPC. W ten sposób sirtuina 1 powoduje wzmocnienie transkrypcji białka XPC [45]. Podobnie jak w przypadku białka XPA, promieniowanie UV wzmacnia deacetylację białka XPC przez sirtuinę 1, co powoduje przyłączenie się białka do

uszkodzonych fragmentów DNA. W przypadku komórek nieposiadających genu sirtuiny 1, po zadziałaniu promieniowania UV wzrost ilości białek XPC związanych z DNA jest wyraźnie niższy [47].

Naprawa DNA przez łączenie niehomologicznych końców (NHEJ) umożliwia odbudowę prawidłowej struktury DNA, gdy błędy występują na obu niciach. Przy rekombinacji homologicznej (HR) uszkodzony fragment DNA jest naprawiany na matrycy chromosomu homologicznego lub chromatydy siostrzanej. W przypadku systemu NHEJ nie jest konieczny homologiczny fragment DNA, na podstawie którego uszkodzony materiał genetyczny mógłby zostać naprawiony. System NHEJ naprawia dwuniciowe pęknięcia w DNA, dzięki aktywności kompleksu enzymatycznego naprowadzającego ligazę DNA na miejsce pęknięcia. W skład kompleksu wchodzi kinaza białkowa DNA-PKCS (ang. *DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit*), białko Ku, złożone z dwóch podjednostek: Ku70 i Ku80, oraz białko XRCC4 (ang. *X-Ray Cross Complementing Protein 4*). Białko Ku przyłącza się do zakończeń DNA, które mają zostać zligowane i rekrutuje kinazę zależną od DNA (DNA-PKCS). Dopiero powstanie takiego kompleksu nadaje kinazie aktywność enzymatyczną. Kompleks złożony z białka Ku i kinazy DNA-PKCS znajdujący się na jednym pękniętym końcu DNA oddziałuje z kompleksem znajdującym się na drugim końcu pękniętej cząsteczki. Pozwala to na zbliżenie się obu końców DNA do siebie. Następnie przez białko Ku rekrutowana jest ligaza IV DNA wraz z jej kofaktorem XRCC4. Następuje zligowanie pękniętych nici [48]. Badania Mao i wsp. [49] dowiodły, że nadekspresja sirtuiny 6 zwiększa efektywność systemu naprawy DNA typu NHEJ. Nieco słabsze działanie wykazuje sirtuina 7. Natomiast dodanie nikotynamidu, inhibitora sirtuin, niweluje pozytywny wpływ nadekspresji sirtuin na mechanizmy naprawy DNA. Sirtuina 6 wykazuje zdolność wiązania się do DNA w miejscu podwójnego pęknięcia nici i tworzy kompleks z kinazą DNA-PKCS, zaangażowaną w system naprawy DNA NHEJ. Takie połączenie promuje naprawę niehomologicznych pęknięć poprzez rekrutację katalitycznej podjednostki kinazy DNA-PKCS oraz jej stabilizację w miejscu pęknięcia DNA [50]. Sirtuina 6 jest niezbędna do prawidłowej naprawy dwuniciowych pęknięć w DNA. Myszy pozbawione genu sirtuiny 6 są wrażliwe na ten rodzaj uszkodzeń DNA i wykazują niestabilność genomu, prowadzącą do śmierci po około 4 tygodniach życia [51]. Ponadto sirtuina 6 wykazuje zdolność do poliADP-rybozylacji PARP1 (ang. *Poly-ADP Ribose Polymerase*), enzymu biorącego udział we wczesnych etapach systemów naprawy DNA zarówno jedno- jak i dwuniciowych uszkodzeń. Gdy dojdzie do uszkodzenia części genomu, PARP1 przyłącza się w zmodyfikowanym miejscu do DNA i promuje jego naprawę m.in. przez wzmocnienie rekrutacji czynników uczestniczących w tym procesie [52]. ADP-rybozylacja PARP1 przez sirtuinę 6 wzmacnia jej aktywność, a co za tym idzie, efektywność procesów naprawy DNA [49].

SIRTUINY A CHOROBY - MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA SIRTUIN W TERAPII

Jak wcześniej omówiono, sirtuiny regulują bardzo wiele procesów zachodzących w komórkach ssaków, zaburzona aktywność tych enzymów może więc skutkować pojawia-

niem się różnych chorób. Do takich schorzeń należą m.in. nowotwory, cukrzyca, choroby neurodegeneracyjne czy sercowo-naczyniowe [5]. Poniżej skupiono się na znaczeniu sirtuin w patogenezie nowotworów i cukrzycy typu 2, uwzględniając potencjalne zastosowanie aktywatorów sirtuin w terapii tych chorób.

NOWOTWORY

Stwierdzono, że sirtuina 6 hamuje rozwój nowotworów. Badania Sebastian i wsp. [53] wykazały, że delecja genu sirtuiny 6 przyczynia się do powstawania u myszy większej liczby guzów; są one większe i częściej mają charakter nowotworów złośliwych niż w przypadku myszy kontrolnych. Sirtuina 6 jest odpowiedzialna za regulację glikolizy w komórkach nowotworowych. Komórki nowotworowe szybko się dzielą i charakteryzują się podwyższonym wychwytem glukozy oraz zwiększoną syntezą i aktywnością enzymów takich jak fosfofruktokinaza 1 (PFK-1) czy dehydrogenaza mleczanowa (LDH). Ten ostatni enzym jest potrzebny w komórkach nowotworowych ze względu na to, że pozyskują one energię z oddychania beztlenowego, nawet jeśli nie znajdują się w warunkach deficytu tlenu. Sirtuina 6, deacetylując histon H3 i blokując działanie czynnika transkrypcyjnego HIF-1, powoduje spadek intensywności pobierania glukozy oraz zachodzenia glikolizy [26]. W przypadku komórek nowotworowych, które uzależniły swój rozwój od energii pochodzącej z glikolizy, uniemożliwia to szybki rozrost guza. Sirtuina 6 zmienia metabolizm w kierunku pobierania energii z oddychania tlenowego, hamuje transkrypcję kinazy dehydrogenazy pirogronianowej (PDHK-1). Enzym ten unieczynnia przez fosforylację dehydrogenazę pirogronianową (PDH), katalizującą reakcję przekształcenia pirogronianu w acetylo-CoA, który następnie uczestniczy w cyklu Krebsa. Zahamowanie transkrypcji PDHK-1 przez sirtuinę 6 uniemożliwia represję PDH i zahamowanie cyklu Krebsa, co ma miejsce w przypadku rozwoju komórek nowotworowych [54].

Poza spadkiem wydajności glikolizy, sirtuina 6 ogranicza również glukoneogenezę, co dodatkowo utrudnia wzrost komórek nowotworowych. Jak opisano poprzednio, sirtuina 6, pośrednio, powoduje nadmierną acetylację koaktywatora czynnika transkrypcyjnego FOXO1 - PGC-1 α . FOXO1 ma pod kontrolą kluczowe enzymy glukoneogenezy, dlatego zahamowanie jego działania prowadzi do spadku intensywności glukoneogenezy. Czynniki transkrypcyjne p53, znany jako supresor nowotworowy, wzmacnia ekspresję sirtuiny 6, czym przyczynia się do silniejszego hamowania glukoneogenezy i supresji wzrostu komórek nowotworowych [55]. Sirtuina 6 oddziałuje także z czynnikiem transkrypcyjnym MYC, który odgrywa ważną rolę w procesie nowotworzenia. Mutacje w jego genie powodują nadekspresję wielu białek, co prowadzi do transformacji zdrowych komórek w komórki nowotworowe [56]. MYC jest między innymi aktywatorem transkrypcji genów białek oraz RNA budujących rybosomy, czym przyczynia się do biogenezy rybosomów, a więc pośrednio również do wzrostu komórek. Natomiast sirtuina 6 ma przeciwne działanie, hamuje transkrypcję tych genów. Deacetylacja, przez sirtuinę 6, reszty lizyny 56 histonu 3, zmienia strukturę chromatyny w miejscu, gdzie znajduje się promotor genów kodujących rybosomalne białka i RNA, uniemożliwia przyłączenie się czynnika transkrypcyjnego MYC do promotora.

Zahamowana jest więc ekspresja tych genów i wzrost komórek nowotworowych [53]. Jest jednak wiele czynników transkrypcyjnych, które powodują zahamowanie ekspresji sirtuiny 6. Do takich należy m.in. RUNX2 (ang. *Runt-related Transcription Factor 2*), aktywny w przypadku nowotworów piersi, oraz E2F1. RUNX2 hamuje działanie sirtuiny 6 zarówno na poziomie transkrypcji jak i obróbki potranskrypcyjnej. Badania Choe i wsp. [54] wykazały, że w komórkach, w których jest ekspresjonowany RUNX2, obserwuje się wyższy poziom ubikwitylowanej sirtuiny 6 niż w komórkach, w których nie dochodzi do ekspresji tego czynnika. W komórkach, w których zachodziła ekspresja RUNX2, obserwowano również niższe stężenie białka i mRNA sirtuiny 6, co sugeruje, że RUNX2 hamuje transkrypcję genu sirtuiny 6. W promotorze genu sirtuiny 6 znajdują się dwa miejsca, do których może się przyłączyć RUNX2. Takie przyłączenie wywołuje zahamowanie ekspresji genu kodującego enzym. Podobne działanie obserwowano w przypadku czynnika transkrypcyjnego E2F1. Wiąże się on do promotora genu sirtuiny 6 i hamuje ekspresję tego enzymu [57].

W odróżnieniu od sirtuiny 6, sirtuina 7 stabilizuje transformację nowotworową komórek, promując tworzenie się nowotworów. Sirtuina 7 katalizuje reakcję deacetylacji reszty lizyny 18 histonu 3 (H3K18Ac) [18]. Badania Seligson i wsp. [58] wykazały, że obecność hipoacetylacji H3K18Ac skorelowana jest z występowaniem u pacjentów nowotworów złośliwych. Z kolei Barber i wsp. [18] udowodnili, że zmniejszona zawartość sirtuiny 7 w ludzkich komórkach nowotworowych hamuje rozwój guza. Deacetylacja H3K18 prowadzi również do zahamowania ekspresji miR-34a. Jest to microRNA zaangażowane w zahamowanie wzrostu oraz indukcję apoptozy komórek nowotworowych. Zaburzenia w ekspresji miR-34a są oznaką powstawania nowotworu [59].

CUKRZYCA

Jako regulatory procesów wpływających na homeostazę glukozy w organizmie, sirtuiny są obiecującym celem w leczeniu cukrzycy typu 2. Najszerze badania są prowadzone nad sirtuiną 1 i jej aktywatorami [60]. Rozwój cukrzycy typu 2 jest poprzedzony rozwojem insulinooporności, zwiększonym wydzielaniem tego hormonu i występowaniem hiperinsulinemii. Badania Sun i wsp. [61] wykazały, że podwyższony poziom sirtuiny 1 w komórkach tkanki mięśniowej przywraca ich wrażliwość na insulinę. Sirtuina 1 hamuje transkrypcję PTP1B (ang. *Protein Tyrosine Phosphatase 1B*). Jest to fosfataza inaktywująca kinazy tyrozynowe, w tym receptory insulinowe, w wyniku ich defosforylacji. Deacetylacja PTP1B powoduje unieczynnienie tego enzymu i zwiększenie wrażliwości tkanek na insulinę [62]. Sirtuina 1, deacetylując PTP1B, zapobiega zatem pojawieniu się insulinooporności. Zaobserwowano również spadek poziomu mRNA PTP1B w jej obecności, co sugeruje, że sirtuina 1 hamuje także transkrypcję fosfatazy. Sun i wsp. [61] potwierdzili, że deacetylacja histonu 3 przez sirtuinę 1 przyczynia się do zmniejszonej ekspresji PTP1B. Aktywatory sirtuiny 1, takie jak SRT1720, są badane w kierunku zastosowania jako leków na cukrzycę typu 2. Badania Milne i wsp. [14], prowadzone *in vivo* na otyłych myszach, wykazały, że już po tygodniu podawania SRT1720 obniżył się poziom glukozy we krwi zwierząt w stanie sytości. Nie wykazano jed-

nak, aby podawanie SRT1720 obniżało glikemię na czczo, co sugeruje, że jest to bezpieczne dla zdrowia i nie jest obciążone ryzykiem wystąpienia hipoglikemii podczas terapii. Dalsze badania nad SRT1720 wykazały, że związek ten po 4 tygodniach podawania myszom cierpiącym na insulinooporność łagodzi hiperinsulinemię. Wyniki te są zbliżone do efektów leczenia rozyglitazonem, związkiem powszechnie stosowanym w terapii cukrzycy typu 2. Co więcej, okazuje się, że mechanizm działania innego znanego leku przeciwcukrzycowego, metforminy także może obejmować aktywację sirtuiny 1 [63]. Jednak z drugiej strony, jak już wcześniej nadmieniono, sirtuina 1, deacetylując FOXO1 i PGC-1 α , wzmacnia ekspresję genów kodujących enzymy glukoneogenezy podczas długich okresów głodu. Nadmierna aktywność sirtuiny 1 wywołana podaniem jej aktywatorów mogłaby więc wiązać się, paradoksalnie, z ryzykiem nasilenia hiperglikemii [64].

Badania Hirschey i wsp. [65] wykazały, że niedobór sirtuiny 3 również może się przyczynić do występowania zaburzeń metabolicznych charakterystycznych dla cukrzycy typu 2. Myszy pozbawione genu kodującego sirtuinę 3, karmione pokarmem wysokotłuszczowym, wykazywały większą insulinooporność, nadwagę oraz hiperlipidemię niż myszy z grupy kontrolnej, ekspresyjące sirtuinę 3. Ponadto stwierdzono, że podawanie myszom diety wysokotłuszczowej przez długi okres (13 tygodni) powoduje obniżenie aktywności sirtuiny 3, w porównaniu ze stosowaniem standardowej diety. Spadek aktywności sirtuiny 3 w komórkach trzustki jest charakterystyczny zarówno dla ludzi jak i myszy cierpiących na cukrzycę typu 2. Badania *in vitro* prowadzone na komórkach β trzustki wyizolowanych od ludzi chorych na cukrzycę typu 2, wykazały, że usunięcie genu kodującego sirtuinę 3 powoduje indukcję apoptozy tych komórek oraz obniżenie wydzielania insuliny. Dowodzi to, że aktywność sirtuiny 3 jest niezbędna do prawidłowego działania trzustki, sugerując, że podniesienie aktywności tego enzymu mogłoby zostać wykorzystane w celach terapeutycznych u pacjentów z cukrzycą typu 2 [66].

PODSUMOWANIE

Sirtuiny to enzymy o wielu funkcjach. Biorą udział w licznych procesach komórkowych, regulując metabolizm ssaków. Substratami sirtuin są nie tylko enzymy szlaków metabolicznych, ale również czynniki transkrypcyjne oraz histony. Sirtuiny mogą więc przyczyniać się do wzmocnienia lub osłabienia aktywności enzymatycznej białek, jak również do zmian w ich ekspresji. Nic więc dziwnego, że zaburzenie działania sirtuin może prowadzić do rozwoju poważnych chorób, takich jak cukrzyca czy nowotwory.

Znanych jest wiele związków regulujących aktywność sirtuin, które są rozważane pod kątem zastosowania w terapii. Jest to jednak trudne zadanie, gdyż sirtuiny regulują tak wiele procesów zachodzących w komórkach, że zmiana ich aktywności może pozytywnie wpływać na jeden z objawów choroby, a negatywnie na inny. Niemniej jednak w dalszym ciągu trwają intensywne badania nad terapeutycznym wykorzystaniem sirtuin i ich aktywatorów.

PIŚMIENICTWO

- Hagis MC, Sinclair DA (2010) Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 5: 253-95
- Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J (2012) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 225-238
- Ye X, Li M, Hou T, Gao T, Zhu W, Yang Y (2017) Sirtuins in glucose and lipid metabolism. *Oncotarget* 8: 1845-1859
- Schiedel M, Robaa D, Rumpf T, Sippl W, Jung M (2017) The current state of NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins) as novel therapeutic targets. *Med Res Rev* 37: 1-54
- Mei Z, Zhang X, Yi J, Huang J, He J, Tao Y (2016) Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer. *J Exp Clin Res* 35: 182
- Jing H, Lin H (2015) Sirtuins in epigenetic regulation. *Chem Rev* 115: 2350-2375
- Avalos JL, Bever KM, Wolberger C (2005) Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD⁺ cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol Cell* 17: 855-868
- Madsen AS, Andersen C, Daoud M, Anderson KA, Laursen JS, Chakraborty S, Huynh FK, Colaco AR, Backos DS, Fristrup P, Hirschey MD, Olsen CA (2016) Investigating the sensitivity of NAD⁺-dependent sirtuin deacetylation activities to NADH. *J Biol Chem* 291: 7128-7141
- Wang Y (2014) Molecular links between caloric restriction and Sir2/SIRT1 activation. *Diabetes Metab J* 38: 321-329
- Park S, Mori R, Shimokawa I (2013) Do Sirtuins Promote Mammalian Longevity?: A critical review on its relevance to the longevity effect induced by calorie restriction. *Mol Cell* 35: 474-480
- Wang P, Zhang RY, Song J, Guan YF, Xu TY, Du H, Viollet B, Miao CY (2012) Loss of AMP-activated protein kinase- α 2 impairs the insulin-sensitizing effect of calorie restriction in skeletal muscle. *Diabetes* 61: 1051-1061
- Fulco M, Sartorelli V (2008) Comparing and contrasting the roles of AMPK and SIRT1 in metabolic tissues. *Cell Cycle* 7: 3669-3679
- Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA (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
- Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng P, Nunes J, Lynch A, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W, Iffland A, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliot PJ, Westphal CH (2007) Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450: 712-716
- Hubbard BP, Gomes AP, Dai H, Li J, Case AW, Considine T, Riera TV, Lee JE, Yen ES, Lamming DW, Pentelute BL, Schuman ER, Stevens LA, Ling AJ, Aemour SM, Michan S, Zhao H, Jiang Y, Sweitzer SM, Blum CA, Disch JS, Ng PY, Howitz KT, Rolo AP, Hamuro Y, Moss J, Perni RB, Ellis JL, Vlasuk GP (2013) Sinclair DA; Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science* 339: 1216-1219
- Kaerberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, Napper A, Curtis R, DiStefano PS, Fields S, Bedalov A, Kennedy BK (2005) Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem* 280: 17038-17045
- Susumu S, Tadao S, Kohtaro M (2010) Pancreatic beta-cell signalling: toward better understanding of diabetes and its treatment. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86: 563-577
- Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, Tasselli L, Kioi M, Moqtaderi Z, Tennen RI, Paredes S, Young NL, Chen K, Struhl K, Garcia BA, Gozani O, Li W, Chua KF (2012) SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature* 487: 114-118
- Teng YB, Jing H, Aramsangtienchai P, He B, Khan S, Hu J, Lin H, Hao Q (2015) Efficient demyristoylase activity of SIRT2 revealed by kinetic and structural studies. *Sci Rep* 5: 8529
- Du J (2011) Sirt5 is an NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science* 334: 806-809
- Laurent G, German NJ, Saha AK, de Boer VCJ, Davies M, Koves TR, Dephore N, Fischer F, Boanca G, Vaitheesvaran B, Lovitch SB, Sharpe AH, Kurland IJ, Steegborn C, Gygi SP, Muoio DM, Ruderman NB, Hagis MC (2013) SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol Cell* 50: 686-698
- Noriega LG (2011) CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. *EMBO Rep* 12: 981-1084
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 424: 113-118
- Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S, Milne J, Mayers DJ, Cole P, Yates J, Olefsky J, Guarente L, Montminy M (2008) A fasting Inducible Switch Modulates Gluconeogenesis Via Activator-Coactivator Exchange. *Nature* 456: 269-273
- Dominy J, Lee Y, Jedrychowski MP, Chim H, Jurczak MJ, Camporez JP, Ruan HB, Feldman J, Pierce K, Mostoslavsky R, Denu JM, Clish CB, Yang X, Shulman GI, Gygi SP, Puigserver P (2012) The deacetylase Sirt6 activates the acetyltransferase GCN5 and suppresses hepatic gluconeogenesis. *Mol Cell* 48: 900-13
- Zhong L, Mostoslavsky R (2010) SIRT6: A master epigenetic gatekeeper of glucose metabolism. *Transcription* 1: 17-21
- Hu CJ, Iyer S, Sataur A, Covello KL, Chodosh LA, Simon MC (2006) Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in stem cells. *Mol Cell Biol* 26: 3514-3526
- Lim JH, Lee YM, Chen J, Kim JE, Park JW (2010) Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell* 38: 864-878
- Hallows WC, Yu W, Denu JM (2012) Regulation of glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase-1 by Sirt1 protein-mediated deacetylation. *J Biol Chem* 287: 3850-3858
- Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A (2006) Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic cells. *Plos Biology* 4: e31
- Grimm AA, Plueger MM, Bernal E (2005) Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhanced glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2: 105-117
- Kitamura YI, Kitamura T, Kruse JP, Raum JC, Stein R, Wei G, Accili D (2005) FoxO1 protects against pancreatic cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab* 2: 153-163
- Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahine K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Vaenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L (2006) SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 126: 941-954
- Mathias RA, Greco TM, Oberstein A, Budayeva HG, Chakrabarti R, Rowland EA, Kang Y, Shenk T, Cristea IM (2014) Sirtuin 4 is a lipamide regulating pyruvate dehydrogenase complex activity *Cell* 159: 1615-1625
- Nishida Y, Rardin MJ, Carrico C, He W, Sahu AK, Gut P, Najjar R, Fitch M, Hellerstein M, Gibson BW, Verdin E (2015) SIRT5 regulates both cytosolic and mitochondrial protein malonylation with glycolysis as a major target. *Mol Cell* 59: 321-322
- Walker AK, Yang F, Jiang K, Ji JY, Watts JL, Purushotham A, Boss O, Hirsch ML, Ribich S, Smith JJ, Israelian K, Westphal CH, Rodgers JT, Shioda T, Elson SL, Mulligan P, Najafi-Shoushtari H, Black JC, Thakur J, Kadyk LC, Whetstone JR, Mostoslavsky R, Puigserver P, Li X, Dyson NJ, Hart AC, Naar AM (2014) Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP. *Genes Dev* 24: 1403-1417
- Wang F, Tong Q (2009) SIRT2 suppresses adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with PPAR γ . *Mol Biol Cell* 20: 801-808
- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado de Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L (2004) Sirt1 promotes fat metabolism in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature* 429: 771-776

39. Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374
40. Wallace SS (2014) Base excision repair: A critical player in many games DNA. *Repair* 19: 14-26
41. Yamamori T, DeRicco J, Naqvi A, Hoffman TA, Mattagajasingh I, Kasuno K, Jung SB, Kim CS, Irani K (2010) SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair. *Nucleic Acids Res* 38: 832-845
42. Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T (2011) DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 94: 166-200
43. Choi JE, Mostoslavsky R (2014) Sirtuins, Metabolism, and DNA repair. *Curr Opin Genet Dev* 26: 24-32
44. Fan W, Luo J SIRT1 (2010) regulates UV-induced DNA repair through deacetylating XPA. *Mol Cell* 39: 247-58
45. Ming M, Shea CR, Guo X, Li X, Soltani K, Han W, He YY (2010) Regulation of global genome nucleotide excision repair by SIRT1 through xeroderma pigmentosum C. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 22623-22628
46. Okumura K, Mendoza M, Bachoo RM, DePinho RA, Cavenee WK, Furnari FB (2006) PCAF modulates PTEN activity. *J Biol Chem* 281: 26562-26568
47. Ming M, Soltani K, Shea CR, Li X, He Y (2015) Dual role of SIRT1 UVB-induces skin tumorigenesis. *Oncogene* 34: 357-363
48. Davis AJ, Chen DJ (2013) DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res* 2: 130-143
49. Mao Z, Hine C, Tian X, Van Meter M, Au M, Vaudya A, Seluanov A, Gorbunova V (2011) SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science* 332: 1443-1446
50. McCord RA, Michishita E, Hong T, Berber E, Boxer LD, Kusumoto R, Guan S, Shi X, Gozani O, Burlingame AL, Bohr VA, Chua KF (2009) SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging* 1: 109-121
51. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, Mills KD, Patel P, Hsu JT, Hong AL, Ford E, Cheng HL, Kennedy C, Nunez N, Bronson R, Frendewey D, Auerbach W, Valenzuela D, Karow M, Hottiger MO, Hursting S, Barrett JC, Guarente L, Mulligan R, Demple B, Yancopoulos GD, Alt FW (2006) Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124: 315-329
52. Ahel D, Horejsí Z, Wiechens N, Polo SE, Garcia-Wilson E, Ahel I, Flynn H, Skehel M, West SC, Jackson SP, Owen-Hughes T, Boulton SJ (2009) Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science* 325: 1240-1243
53. Sebastian C, Zwaans BMM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, Ram O, Truelove J, Guimaraes AR, Toiber D, Cosentino C, Greenson JK, Mac Donald AI, McGlynn L, Maxwell F, Edwards J, Giacosa S, Guccione E, Weissleder R, Bernstein BE, Regev A, Shiels PG, Lombard DB, Mostoslavsky R (2012) The histone deacetylase SIRT6 is a novel tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell* 151: 1185-1199
54. Choe M, Brusgard JL, Chumsri S, Bhandary L, Zhao XF, Lu S, Goloubeva OG, Polster BM, Fiskum GM, Girmun GD, Kim MS, Passaniti A (2015) The RUNX2 transcription factor negatively regulates SIRT6 expression to alter glucose metabolism in breast cancer cells. *J Cell Biochem* 116: 2210-2226
55. Zhang P, Tu B, Wang H, Cao Z, Tang M, Zhang C, Gu B, Li Z, Wang L, Yang Y, Zhao Y, Wang H, Luo J, Deng CX, Gao B, Roeder RG, Zhu WG (2014) Tumor Suppressor p53 cooperates with SIRT6 to regulate gluconeogenesis by promoting FOXO1 nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 10684-10689
56. Lyssiotis CA, Cantley LC (2012) SIRT6 puts cancer metabolism in the driver's seat. *Cell* 151: 1155-1156
57. Wu M, Seto E, Zhang J (2015) E2F1 enhances glycolysis through suppressing SIRT6 transcription in cancer cells. *Oncotarget* 6: 11252-11263
58. Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, Mah V, Yu H, Tze S, Wang Q, Chia D, Goodglick L, Kurdastani SK (2009) Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *A J Pathol* 174: 1619-1628
59. Zhang S, Chen P, Huang Z, Hu X, Chen M, Hu S, Hu Y, Cai T (2015) SIRT7 promotes gastric cancer growth and inhibits apoptosis by epigenetically inhibiting miR-34a. *Sci Rep* 5: 9787
60. Kitada M, Kume S, Kanasaki K, Takeda-Watanabe A, Koya D (2013) Sirtuins as possible drug targets in type 2 diabetes. *Curr Drug Targets* 14: 622-636
61. Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, Zhai Q (2007) SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab* 6: 307-319
62. Elcheby M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy A, Normandin D, Cheng AM, Himms-Hagen J, Chan C, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283: 1544-1548
63. Rogacka D, Audzeyenka I, Rychłowski M, Rachubik P, Szejder M, Angielski S, Piwkowska A (2018) Metformin overcomes high glucose-induced insulin resistance of podocytes by pleiotropic effects on SIRT1 and AMPK. *Biochim Biophys Acta* 1864: 115-125
64. Turkmen K, Karagoz A, Kucuk A (2014) Sirtuins as novel players in the pathogenesis of diabetes mellitus. *World J Diabetes* 5: 894-900
65. 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, Bass NM, Kuusisto J, Laakso M, Alt FW, Newgard CB, Farese RV, Kahn CR, Verdin E (2011) SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome *Mol Cell* 44: 177-190
66. Caton PW, Richardson SJ, Kieswich J, Bugliani M, Holland ML, Marchetti P, Morgan NG, Yagoob MM, Holness MJ, Sugden MC (2013) Sirtuin 3 regulates mouse pancreatic beta cell function and is suppressed in pancreatic islets isolated from human type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 56: 1068-1077

Sirtuins and their role in metabolism regulation

Zuzanna Frydzińska, Aleksandra Owczarek, Katarzyna Winiarska ✉

Department of Metabolic Regulation, Institute of Biochemistry, Faculty of Biology, University of Warsaw, 1 I. Miecznikowa St., 02-096 Warsaw, Poland

✉ e-mail: k.winiarska@biol.uw.edu.pl

Key words: sirtuins, metabolism, diabetes, cancer

ABSTRACT

Sirtuins are – in mammals – a family of seven enzymes (sirtuin 1-7) involved in post-translational modification of proteins (mainly deacetylation, but also: polyADP-ribosylation, demalonylation or lipoamidation), and thus – in the regulation of many metabolic processes. The activity of all sirtuins depends on the availability of NAD⁺. However, the function of individual isoforms is different, even mutually antagonistic. In this article the role of sirtuins in the regulation of glucose and lipid metabolism and in DNA repair mechanisms is described in detail. The significance of these enzymes in diseases pathogenesis, with particular emphasis on diabetes and cancer, is also discussed, indicating the possible therapeutic use of sirtuin activity modulators.