

SIRTUINY – HISTONOVÉ DEACETYLASY OVLIVŇUJÍCÍ TRANSKRIPCI GENŮ

MARCELA DVOŘÁKOVÁ^{a,b}, MARIE
PŘIBYLOVÁ^a a TOMÁŠ VANĚK^a^a Laboratoř rostlinných biotechnologií, Ústav experimentální botaniky, AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, ^b Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha 2

vanek@ueb.cas.cz

Došlo 12.9.12, přepracováno 29.10.12, přijato 9.11.12.

Klíčová slova: sirtuiny, deacetylasy, histony, post-translační modifikace, transkripce

Obsah

1. Úvod
 - 1.1. Chromatin
 - 1.2. Histony
 - 1.3. Proteiny nehistonové povahy ovlivňující transkripci genů
2. Post-translační modifikace proteinů
 - 2.1. Acetylace
 - 2.1.2. Histonové deacetylasy
3. Sirtuiny (SIR)
 - 3.1. Deacetylační aktivita SIR
 - 3.2. Další reakce katalyzované SIR
 - 3.3. SIR v buněčných procesech
 - 3.3.1. Omezení příjmu kalorií (CR)
 - 3.3.2. Volné kyslíkaté radikály (ROS)
 - 3.4. Jednotlivé lidské homology SIR a jejich funkce
 - 3.5. Regulace SIR aktivity
 - 3.5.1. Post-translační modifikace
 - 3.5.2. Aktivátory SIR
 - 3.5.3. Inhibitory SIR
4. Závěr

1. Úvod

Sirtuiny jsou enzymy řadící se mezi histonové deacetylasy (HDAC), které deacetylují lysinové zbytky na amino-koncích histonů, proteinů vázajících DNA¹. Histony tvoří společně s DNA a nehistonovými proteiny strukturu chromatinu a jejich deacetylase vede k transkripčnímu umlčování genů vlivem vzniku těsně uspořádané formy chromatinu, tzv. heterochromatinu.

1.1. Chromatin

Chromatin, základní stavební jednotka chromosomů, nositelů genetické informace, se nachází v jádru eukaryotických buněk. Základem chromatinu je jádro nukleosomu, které se skládá z úseku DNA o délce 146 párů bází obtočeného kolem oktameru tvořeného čtyřmi histony (H2A, H2B, H3 a H4)^{2,3}. Jádra nukleosomů jsou navzájem propojena pomocí spojnicových částí DNA do nukleosomového řetězce, který s pomocí spojovacího histonu H1 tvoří chromosom, chromatinové vlákno o průměru 30 nm. Histon H1 chrání spojnicové části DNA mezi nukleosomy proti působení nukleas a zároveň umožňuje kondenzaci chromatinu tím, že k sobě těsně přitáhne jednotlivé nukleosomy³. Na toto 30 nm chromatinové vlákno se váží proteiny nehistonové povahy, jako jsou topoisomerasa II, HMG proteiny (*high mobility group proteins*, proteiny s vysokou pohyblivostí v elektroforetickém poli), či transkripční faktory, které společně s histony tvoří chromatin².

Dle stupně kondenzace chromatinových vláken můžeme rozlišit dva různé stavy chromatinu. V prvním stavu je vlákno rozvolněné (euchromatin), ve druhém je těsně uspořádané (heterochromatin). Heterochromatin je transkripčně neaktivní forma chromatinu, která byla poprvé popsána v roce 1928 (cit.⁴).

1.2. Histony

Histony jsou relativně malé bazické proteiny o 102 až 135 aminokyselinách, ve kterých jsou bohatě zastoupeny aminokyseliny lysin a arginin². Kladný náboj na postranních řetězcích těchto aminokyselin interaguje se záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA, čímž ovlivňuje strukturu chromatinu².

Postranní řetězce aminokyselin na amino-koncích histonů jsou přístupné různým kovalentním post-translačním modifikacím, jako jsou acetylase, methylase či fosforylace⁵. Tyto modifikace mohou mít vliv na distribuci náboje v chromosomu a tím ovlivňovat stupeň jeho kondenzace. Zároveň ovlivňují vazbu proteinů nehistonové povahy na chromatin².

1.3. Proteiny nehistonové povahy ovlivňující transkripci genů

Proteiny nehistonové povahy tvořící chromatin také podléhají post-translačním modifikacím, které modulují jejich aktivitu i funkci a ovlivňují tak transkripci genů^{1,6}.

Prvním nehistonovým proteinem, u něhož bylo prokázáno, že jeho aktivita je ovlivněna post-translačními modifikacemi, byl transkripční faktor p53. Protein p53 ovlivňuje zejména apoptózu a stárnutí buněk. Látky, které p53 aktivují, jsou schopné léčit rakovinu v podmínkách

*in vivo*⁶. Do skupiny p53 transkripčních faktorů patří také protein p73. Ten je schopen vazby na p53 a tím aktivace apoptózy buněk⁶.

Dalšími důležitými transkripčními faktory jsou Forkhead box O (FOXO) proteiny, které přímo ovlivňují zastavení buněčného cyklu v G1/S a G2/M fázi, detoxikují volné kyslíkaté radikály (reactive oxygen species, ROS), a indukují transkripci genů spojených s opravami poškozené DNA či metabolismem glukosy¹.

Kromě transkripčních faktorů mají na transkripci genů a buněčné procesy vliv i další proteiny podléhající post-translačním modifikacím, jako je nukleární faktor kappa B (NF-κB) modulující protizánětlivé procesy, nukleární protein Ku-70 zajišťující opravu poškozených DNA zlomů, poly-(ADP-ribosyl) polymerasa 1 (PARP1) vážící se na poškozené části DNA, které ADP-ribosyluje, AMP-aktivovaná protein kinasa (AMPK), stimulující produkci energie z glukosy a mastných kyselin, nukleární receptory zvané peroxisomální proliferaci-aktivované receptory α-γ (PPARα-γ) modulující ukládání tuků, PPAR-gamma koaktivátor-1α (PGC-1α), ovlivňující buněčný metabolismus a biogenezi mitochondrií, či endoteliální NO syntasa (eNOS) produkující NO a tím způsobující vasodilataci⁷.

2. Post-translační modifikace proteinů

Proteiny mohou být post-translačně modifikovány acetylací, methylací a ubiquitinací lysinů, methylací argininů, fosforylací či *N*-acetylglukosaminací serinů, threoninů a tyrosinů, ADP-ribosylací argininů, lysinů a glutamových kyselin či isomerizací prolinů⁵. Post-translační modifikace mají vliv na expresi a stabilitu proteinů a slouží jako signál v případě poškození DNA či jako signál pro další post-translační modifikace⁸.

2.1. Acetylace

Acetylace a deacetylace proteinů je velmi dynamický proces, který dokáže rychle reagovat na nastalé změny v organismu, a proto má tato modifikace zásadní vliv na okamžité transkripční umlčování genů a tím expresi proteinů⁸. Vliv acetylace na transkripci genů byl poprvé popsán již v roce 1964 Vincentem Allfreyem⁹.

K acetylaci dochází pomocí histonových acetyltransferas (HAT), které přenášejí acetyl z acetylkoenzymu A na ε-amino skupinu lysinu, a k deacetylaci pomocí histonových deacetylase (HDAC). Původně se za substráty HAT a HDAC považovaly pouze histony, ale dnes je známo, že tyto enzymy katalyzují acetylačně-deacetylační reakce i u celé řady proteinů nehistonové povahy¹.

Vliv acetylace ε-lysinových konců proteinů na transkripční umlčování genů se u histonů zpočátku vysvětloval neutralizací kladného náboje těchto lysinových konců a tím zamezením interakce se záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA vedoucí k rozvolnění struktury chromatinu, vzniku euchromatinu a zpřístupnění jeho DNA

transkripci^{2,8}. Nedávno byla vytvořena nová teorie, podle které má na umlčování genů vliv spíše dynamika celého procesu acetylace a následné deacetylace, a že HAT a HDAC fungují v tomto procesu současně⁸.

2.1.2. Histonové deacetylasy

HDAC jsou enzymy, evolučně zakonzervované v genomu řady organismů od bakterií až po člověka¹⁰. Lidské HDAC se dělí do čtyř skupin v závislosti na podobnosti jejich sekvence a typu kofaktoru. První 3 skupiny jsou klasifikovány dle podobnosti deacetylase s určitými typy histonových deacetylase izolovaných z kvasinek, s Rpd3 proteinem (třída I), Hda1 proteinem (třída II) a Sir2 proteinem (třída III, sirtuiny)¹. Nedávno objevený HDAC11 enzym je jediným zástupcem HDAC třídy IV, neboť podobnost jeho sekvence se sekvencemi ostatních HDAC třídy I a II není dostatečná¹¹. Funkce HDAC třídy I, II a IV je závislá na přítomnosti zinku jako kofaktoru, na rozdíl od funkce sirtuinů, která je závislá na přítomnosti NAD⁺ (cit.¹¹). HDAC třídy I, II a IV deacetyluje převážně histonové proteiny, na rozdíl od sirtuinů, jejichž substráty jsou především proteiny nehistonové povahy⁶.

3. Sirtuiny (SIR)

3.1. Deacetylační aktivita SIR

Sirtuiny (Silent information regulators, SIR) jsou specifickou skupinou HDAC, neboť vyžadují k hydrolyze přítomnost NAD⁺. Deacetylaci ε-acetyllysinových zbytků proteinů pomocí SIR vzniká z NAD⁺ nikotinamid (NAM) a nový metabolit, acetylovaná adenosin difosforibosa (OAADPR)^{10,12,13}.

Během deacetylace dochází na NAD⁺ k nukleofilnímu útoku uhlíku C1' ribosy kyslíkem acetylové skupiny proteinu za vzniku α-1'-*O*-alkylamidátového meziprojektu a uvolnění NAM (Schéma 1). Tento mechanismus byl potvrzen pomocí CH₃C¹⁸O značených proteinů, díky nimž bylo prokázáno, že ¹⁸O tvoří u produktu 1'-¹⁸OH skupinu¹³. Zda tento nukleofilní útok probíhá S_N1 nebo S_N2 mechanismem není zatím zcela jasné¹⁰. Následně po vzniku α-1'-*O*-alkylamidátového meziprojektu je 2'-hydroxylová skupina ribosy tohoto meziprojektu aktivována přes 3'-OH blízkým histidinem a atakuje uhlík alkylamidátu za vzniku 1',2'-cyklického intermediátu. Z něho pak po adici vody (poskytuje kyslík CO skupiny acetylu produktu) a eliminaci deacetylovaného proteinu vzniká 2'-*O*-acetyl-adenosin difosforibosa (2'-OAADPR), která okamžitě prochází neenzymovou konverzí na ekvimolární směs 2'-OAADPR (1) a 3'-OAADPR (2)^{10,13}.

3.2. Další reakce katalyzované SIR

Některé SIR katalyzují kromě deacetylase i další post-translační modifikace, a to ADP-ribosylace a deacetylační reakce.

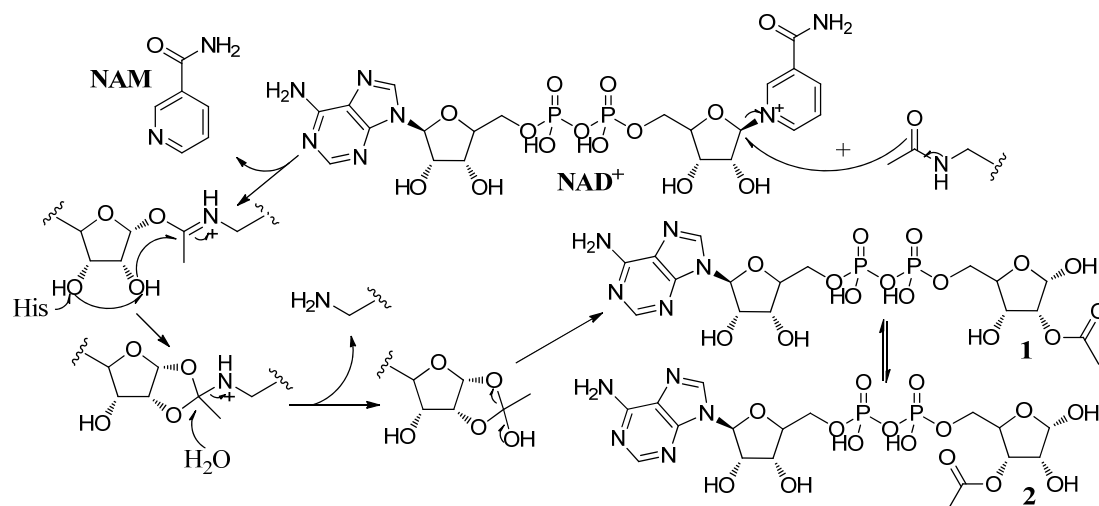


Schéma 1. Mechanismus deacetylace proteinů sirtuiny

ADP-ribosylační aktivita byla objevena u lidských homologů SIR, SIRT4 a SIRT6. Tato reakce je spojena s přenosem ADP-ribosy z NAD^+ na molekulu proteinu. ADP-ribosylací se zvyšuje negativní náboj proteinu, čímž může být ovlivněna jeho enzymová aktivita nebo schopnost interagovat s jinými proteiny¹⁰.

Deacylační reakce probíhají stejným mechanismem jako deacetylační. Bylo prokázáno, že z deacylačních reakcí probíhají u lidských homologů SIRT1-3 depropionylace a debutyrylace, u homologue SIRT5 demalonylace a desukcinylace a u PfSir2, homologue parazita *Plasmodium falciparum* způsobujícího malárii, demyristoylace¹⁴.

Je možné, že další, zatím neznámé, specifické acylační modifikace by mohly být deacylovány konkrétními homology SIR enzymů, pro něž acetylované substráty dosud nebyly identifikovány, jako například pro SIRT4.

3.3. SIR v buněčných procesech

3.3.1. Omezení příjmu kalorií (CR)

Vzhledem k tomu, že aktivita SIR přímo závisí na dostupném množství NAD^+ , které hraje klíčovou roli v buněčném metabolismu a produkci energie, je i funkce SIR spojena s těmito procesy. Pozornost se na SIR obrátila zejména díky zjištění, že SIR jsou odpovědné za prodloužení života buněk vyvolaného omezením příjmu kalorií (calorie restriction, CR)^{15,16}. CR je charakterizována sníženým příjmem glukosy, čímž dochází ke zpomalení metabolismu a snížení produkce ROS¹⁷. Při metabolismu glukosy dochází k její glykolýze na pyruvát, přičemž se NAD^+ redukuje na NADH ¹⁴. Protože během CR se příjem glukosy snižuje, snižuje se buněčná koncentrace NADH , zvyšuje se poměr NAD^+/NADH a aktivují se SIR¹⁵. CR je tak pomocí SIR spouštěčem buněčných procesů vedoucích ke zvýšení odolnosti buněk vůči stresu a poškození DNA

a tím zpomalení stárnutí a vzniku chorob spojených se stářím, jako jsou diabetes typu II, obezita, neurodegenerativní poruchy, srdeční selhání nebo rakovina.

3.3.2. Volné kyslíkaté radikály (ROS)

Akumulace ROS ($\text{OH}^\cdot$, $\text{O}_2^\cdot$), vedlejších produktů buněčného dýchání, během let je považována za hlavní příčinu stárnutí. Proti ROS působí celá řada enzymů, jako jsou dismutasy, katalasy, peroxidasy, i celá řada antioxidantů, jako jsou vitaminy C a E. Přesto ROS mohou způsobit poškození buňky, oxidativním poškozením makromolekul včetně DNA, a to zejména v mitochondriích, které jsou hlavním producentem ROS a vyprodukují až 90 % všech ROS organismu¹⁷. Z orgánů produkuje nejvíce ROS mozek, kde tyto reaktivní molekuly způsobují vznik neurodegenerativních poruch, jako je Alzheimerova choroba nebo roztroušená skleróza¹⁷.

Během zvýšené produkce nebo kumulace ROS se aktivují SIR, které jsou schopné ROS detoxikovat a snižovat tak oxidativní stres aktivací enzymů, jako je superoxid dismutasa MnSOD nebo antioxidantů jako je redukovaný glutathion¹⁷.

3.4. Jednotlivé lidské homology SIR a jejich funkce

Sirtuinů existuje u kvasinek pět homologů (ySir2, HST1-4) a u lidí sedm homologů (SIRT1-7). První objevený SIR enzym byl právě ySir2 u kvasinek¹⁸. Jednotlivé homology SIR se nacházejí v různých částech buňky a deacetylují různé substráty, čímž ovlivňují řadu buněčných funkcí (tab. I). Zároveň je ale aktivita jednotlivých SIR často závislá na aktivitě ostatních SIR, jak plyne z následujícího textu.

SIRT1 je 110kDa proteinem a nejvíce studovaným lidským homologem. SIRT1 se nachází v jádře nebo cyto-

Tabulka I
Substráty jednotlivých SIR homologů a důsledky jejich deacetylace

Sirtuin	Substrát	Aktivita ^a	Funkce	Vliv na nemoci	Lit.
SIRT1	p53/p73	↓	inhibice apoptózy	pro-rakovinné účinky	27
	Ku-70	↑	inhibice apoptózy	pro-rakovinné účinky	28
	FOXO	↑↓	indukce inhibice p53/Ku-70	pro-rakovinné účinky	1
	AcCS1	↑	regul. synt. mastných kys. a lipidů	snižuje riziko obezity	20
	HMGCS1	↑	regulace syntézy cholesterolu	snižuje riziko obezity	20
	LXR	↑	regulace syntézy cholesterolu	snižuje riziko obezity	21
	FXR	↓	zvýšení vylučování žlučových kys.	snižuje riziko obezity	22
	PPAR γ	↓	regulace ukládání tuků	snižuje riziko obezity	23
	UCP2	↓	zvýšení sekrece inzulinu	snižuje riziko obezity	24
	α -sekretasa	↑	snížení prod. a oligomerizace A β	snižuje riziko AD	17
	PGC-1 α	↑	udržování stálé hladiny glukosy	snižuje riziko srdečních chorob	25
	MnSOD	↑	aktivace detoxikace ROS	snižuje riziko srdečních chorob	19
	eNOS	↑	zvýšení produkce NO	snižuje riziko srdečních chorob	26
	H3K9, H4K16	–	regulace umlčování genů	–	18
SIRT2	α -tubulin	–	inhibice migrace gliomů v mozku	protirakovinné účinky	29
	FOXO3a	↑	aktivace MnSOD a detoxikace ROS	protirakovinné účinky	31
	H4K16	–	stabilizace chromatinu	protirakovinné účinky	30
SIRT3	CypD	↓	inh. metab. glukosy u nádor. buněk	protirakovinné účinky	40
	HIF1 α	↓	inh. vývoje rakoviny tlustého střeva	protirakovinné účinky	41
	SOD2/MnSOD	↑	aktivace detoxikace ROS	snižuje riziko chorob spoj. se stářím	34
	IDH2	↑	prod. red. glutathionu a detox. ROS	snižuje riziko chorob spoj. se stářím	35
	Komplex I	↑	regulace oxidativní fosforylace	snižuje riziko obezity	36
	SDH	↑	regulace oxidativní fosforylace	snižuje riziko obezity	38
	AcCS2	↑	zvýšení produkce AcCoA a ATP	snižuje riziko obezity	20
	HMGCS2	↑	regulace syntézy ketonů	snižuje riziko obezity	20
	LCAD	↑	zvýšení produkce AcCoA a ATP	snižuje riziko obezity	37
	GDH	↑	zvýšení sekrece inzulinu	snižuje riziko diabetu	35
SIRT4	GDH	↓	snížení sekrece inzulinu	zvyšuje riziko diabetu	39
SIRT5	CPS1	↑	zvýšení detoxikace amoniaku	snižuje riziko neurodegen. poruch	43
SIRT6	p53/p73	↑	stimulace apoptózy nádor. buněk	protirakovinné účinky	45
	H3K9	–	aktiv. oprav DNA, stab.chromatinu	protirakovinné účinky	44
	NF- κ B	↓	aktivace protizánětlivých faktorů	protirakovinné účinky	44
SIRT7	H3K18	–	zvýšení proliferace nádor. buněk	pro-rakovinné účinky	47
	RNAPol I	↓	inhibice apoptózy	pro-rakovinné účinky	46

^a ↑ substrát je deacetylací aktivován, ↓ substrát je deacetylací inhibován

plasmě v závislosti na typu buňky a přesunuje se mezi těmito dvěma buněčnými prostory v závislosti na stresu, kterému je buňka vystavena. Fosforylace SIRT1 pomocí JNK1 kinasy (c-Jun N-terminal kinase 1) zajišťuje jeho přemístění do jádra¹⁹.

SIRT1 deacetyluje celou řadu nehistonových proteinů, jako jsou p53, FOXO, NF- κ B, Ku-70, eNOS a jiné^{7,15}. Seznam proteinů, které jsou substrátem pro SIRT1, se

neustále rozšiřuje. Tyto proteiny ovlivňují celou řadu buněčných funkcí, jako je odolnost vůči stresu, protizánětlivé účinky, biogeneze mitochondrií, metabolismus glukosy a lipidů apod.¹².

SIRT1 ovlivňuje transkripční umlčování genů deacetylací lysinů 9 a 14 histonu H3 (H3K9, H3K14) a lysinu 16 histonu H4 (H4K16)¹⁸.

Zvýšená exprese SIRT1 snižuje riziko obezity, neboť

v játrech moduluje aktivitu AceCS1 (acetyl-CoA syntetasa 1), enzymu produkujícího acetyl-CoA pro syntézu mastných kyselin a lipidů²⁰, aktivitu enzymu HMGCS1 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntasa 1) regulujícího syntézu cholesterolu²⁰, aktivitu nukleárních faktorů LXR (liver-X-receptor) a FXR (farnesol-X-receptor), které jsou důležitými senzory koncentrace cholesterolu a žlučových kyselin^{21,22}, či aktivitu nukleárního receptoru PPAR γ , hlavního modulatoru ukládání tuků²³. SIRT1 brání i vzniku diabetu typu II inhibicí transkripce proteinu UCP2 (*uncoupling protein 2*), čímž zvyšuje toleranci glukosy β -buňkami slinivky a pozitivně tak reguluje sekreci inzulínu²⁴.

Zvýšená exprese SIRT1 v mozku zase chrání neurony a neurity (axony), které zajišťují komunikaci neuronů, před ischemickým poškozením⁷. Správná funkce SIRT1 je tak důležitá pro správné fungování mozku, schopnosti učení, a paměti.

Zvýšená exprese SIRT1 má vliv i na vznik a vývoj neurodegenerativních poruch. U Huntingtonovy choroby je zvýšená exprese SIRT1 nežádoucí, a proto v současné době prochází selektivní inhibitor SIRT1, EX-527, první fázi klinického testování⁷. U Alzheimerovy choroby naopak zvýšená exprese SIRT1 brání produkci a oligomerizaci Amyloidu- β (A β , oligomerizovaný A β je toxický pro neurony) tím, že zvyšuje expresi α -sekretasy, která zajišťuje správné štěpení prekursoru amyloid proteinu¹⁷.

Proti srdečním chorobám působí SIRT1 aktivací enzymů detoxikujících ROS a udržováním stálé hladiny glukosy. Zvýšená exprese SIRT1 vyvolává zvýšenou funkci dismutasu (MnSOD)¹⁹ a aktivaci transkripčního koaktivátoru PGC-1 α indukujícího glukoneogenezi a zvyšujícího oxidaci mastných kyselin²⁵. SIRT1 je důležitý také pro zachování rovnováhy endoteliálních buněk, které produkují NO pomocí eNOS a podněcují vasodilataci. ROS oxidují NO na toxický peroxynitrit (ONO₂⁻), který eNOS inhibuje. SIRT1 aktivuje eNOS jeho deacetylací na lysinu 496 a 506, čímž zvyšuje produkci NO, rozšiřuje cévy a snižuje riziko kornatění tepen a infarktu²⁶.

Úloha SIRT1 v prevenci rakoviny není zcela jasná. Je známo, že CR, která aktivuje SIR, vede u organismů ke snížení výskytu rakoviny. Na druhou stranu, zvýšená exprese SIRT1 je spojena se zvýšeným výskytem rakoviny vlivem inhibice transkripčních faktorů p53 či Ku-70, které vyvolávají apoptózu nádorových buněk^{27,28}. SIRT1 inhibuje proapoptotické faktory p53, p73, Ku-70, Bim nebo Puma buď přímou deacetylací nebo deacetylací FOXO proteinů^{1,6}. Se zvýšenou expresí SIRT1 se lze setkat u celé řady typů rakoviny, jako je např. rakovina prostaty, stěv, plic, kůže nebo leukémie⁶. Z tohoto důvodu byla velká pozornost zaměřena na výzkum inhibitorů SIRT1 jako potenciálních protirakovinných látek.

SIRT2 se nachází v cytoplasmě i jádře a jeho hlavním substrátem je α -tubulin, který SIRT2 deacetyluje na Lys-40 (cit.²⁹). SIRT2 má vliv na buněčný cyklus, během jehož G2/M fáze se přemísťuje z cytoplasmy do jádra, kde se váže na chromatin a deacetyluje H4K16, čímž chromatin stabilizuje³⁰. Stabilizaci chromatinu zabraňuje SIRT2

vzniku nádorů, jako jsou gliomy, které jsou charakteristické destabilizací chromatinu⁶. Na druhou stranu, schopnost SIRT2 deacetylovat α -tubulin vyvolává u některých typů nádorů rezistenci vůči chemoterapeutikům, zejména paklitaxelu, který je inhibitorem mikrotubulů⁶.

Mezi substráty SIRT2 patří i některé transkripční faktory, které jsou zároveň substrátem i pro SIRT1, mezi ně patří p53, NF- κ B a FOXO skupina proteinů. Například deacetylací FOXO3a aktivuje SIRT2 dismutasu MnSOD a působí tak proti genotoxickému a oxidativnímu stresu a snižuje množství ROS v buňkách³¹.

Zvýšenou expresi SIRT2 lze pozorovat především v mozku, v oligodendrocytech, gliových buňkách produkujících myelin, kde SIRT2 hraje klíčovou roli při vzniku myelinové pochvy, obalu neuronů, který zodpovídá za správnou funkci nervové soustavy³². Schopnost SIRT2 deacetylovat α -tubulin ovlivňuje také diferenciaci oligodendrocytů, hybnost neuronů, prodlužování neuritů a migraci buněk gliomů, čímž zabraňuje jejich šíření v mozku³².

SIRT3 je lokalizován v mitochondriích, buněčných organelách ovlivňujících energetický metabolismus buněk, apoptózu a stárnutí buněk³³, kde SIRT3 ovlivňuje detoxikaci ROS a snižuje tak riziko poškození makromolekul oxidativním stresem. SIRT3 aktivuje SOD2 gen, který aktivuje dismutasu MnSOD, jeho deacetylací na lysinech 53 a 89 (cit.³⁴). SIRT3 zvyšuje produkci redukovaného glutathionu, přirozeného antioxidantu, deacetylací a aktivací isocitrát dehydrogenasy 2 (IDH2)³⁵. SIRT3 také zabraňuje produkci ROS deacetylací částí komplexu I, který se účastní přenosu elektronů v dýchacím řetězci³⁶.

SIRT3 snižuje riziko obezity, neboť ovlivňuje acetylaci enzymů Krebsova cyklu nebo enzymů, které Krebsův cyklus nepřímou ovlivňují, jako je acetyl-CoA syntetasa 2 (AceCS2)²⁰, dehydrogenasa dlouhých acyl-CoA (LCAD) (cit.³⁷), sukcinát dehydrogenasa (SDH)³⁸, či 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntasa 2 (HMGCS2)²⁰, které regulují buněčné dýchání, tedy oxidativní fosforylaci a produkci ATP³³.

SIRT3 také působí proti vzniku diabetu typu II deacetylací a aktivací glutamát dehydrogenasy (GDH), čímž zvyšuje sekreci inzulínu³⁵. SIRT3 tak funguje opačně než SIRT4, který GDH inhibuje ADP-ribosylací³⁹. To také odpovídá tomu, že exprese SIRT3 při CR stoupá, kdežto exprese SIRT4 klesá.

SIRT3 také ovlivňuje metabolismus nádorových buněk. Nádorové buňky vykazují specifický metabolismus, kdy je u nich aktivována hexokinasa II, která zvyšuje glykolýzu a snižuje oxidativní fosforylaci (Warburg effect). SIRT3 deacetyluje cyklofilin D (cypD), který zabraňuje interakci hexokinasy II s aniontovým kanálem a tím zamezuje její schopnosti využívat ATP pro glykolýzu⁴⁰. Zvýšená exprese SIRT3 také inhibuje vznik rakoviny tlustého střeva nebo osteosarkomu inhibicí exprese HIF1 α (cit.⁴¹). HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) je kódován onkogénem a aktivuje transkripci genů spojených se vznikem nádorů a metastáz³³.

SIRT4 je také mitochondriální sirtuin. SIRT4 je scho-

pen ADP-ribosylace, ale jeho deacetylační aktivita nebyla prokázána. SIRT4 ADP-ribosyluje GDH a tato ADP-ribosylace vede k inhibici GDH, snížení sekrece inzulínu v β -buňkách slinivky a zvýšení rizika vzniku diabetu typu II (cit.³⁹).

SIRT4 je také negativním regulátorem oxidace mastných kyselin a tím metabolismu tuků v hepatocytech. Aktivita SIRT1 je důležitá pro schopnost SIRT4 regulovat oxidaci mastných kyselin, neboť aktivací SIRT4 se snižuje aktivita SIRT1 a tím i oxidace mastných kyselin⁴².

SIRT5 je také mitochondriální protein, který upřednostňuje záporně nabitě acyllysinové zbytky (malonyl či sukcinyl) jako své substráty¹⁴. SIRT5 např. desukcinyluje lysin 1291 enzymu karbamoyl fosfát syntetasy (CPS1), který katalyzuje úvodní krok močovinového cyklu, v němž se v organismu detoxikuje amoniak⁴³. Z toho, že SIRT5 je enzymem specificky regulujícím sukcinylaci a malonylaci proteinů vyplývá, že tyto modifikace mohou mít důležitý vliv na regulaci buněčných procesů.

Deacetylační aktivita SIRT5 byla prokázána pouze u cytochromu c, přenašeče elektronů při buněčném dýchání, ale přesný důsledek této deacetylce není znám³⁵.

SIRT6 je 36kDa protein lokalizovaný v jádře, kde je převážně vázán na chromatin¹⁵. Kromě auto-ADP-ribosylace je schopen také deacetylce. Deacetyluje například H3K9, a to po navázání se na nukleární faktor NF- κ B, a zabráňuje tak vazbě tohoto faktoru na chromatin⁴⁴. SIRT6 tak ovlivňuje expresi cílových genů tohoto faktoru, které jsou důležité pro apoptózu buněk vlivem genotoxického a oxidativního stresu⁶.

Zvýšená exprese SIRT6 v nádorových buňkách působí protirakovinně, neboť aktivuje pro-apoptotické faktory p53 a p73 a stimuluje tak apoptózu nádorových buněk, přičemž u normálních buněk k tomuto jevu nedochází⁴⁵. Bylo prokázáno, že na tento jev má vliv ADP-ribosylační

aktivita SIRT6 a nikoliv jeho deacetylační aktivita.

SIRT7 se nachází v jádru a ovlivňuje transkripci ribosomálních DNA genů vazbou na RNA Polymerasu I (cit.⁴⁶).

SIRT7 ovlivňuje také vývoj rakoviny, a to tím, že specificky deacetyluje lysin 18 histonu H3 (H3K18). Tato jeho funkce podněcuje proliferaci nádorových buněk. Volný H3K18 se totiž vyskytuje u agresivních typů rakoviny se špatnou prognózou pro pacienty a je spojen s epigenetickou změnou buněk způsobenou virovými onkogeny⁴⁷.

3.5. Regulace SIR aktivity

3.5.1. Post-translační modifikace

V rámci post-translační modifikace je aktivita SIR enzymů ovlivňována fosforylací jejich serinových a tyrosinových zbytků a sumoylací (small ubiquitin-like modifiers) lysinových zbytků. Například SIRT2 je fosforylován na Ser-368 a Ser-331, a tato fosforylace vede k inhibici jeho deacetylasové aktivity¹³. Naopak, fosforylace SIRT1 na Ser-27, Ser-47 a Thr-530 JNK1 kinasou vede k aktivaci jeho deacetylasové aktivity stejně jako jeho sumoylace na Lys-734 (cit.^{7,13}).

3.5.2. Aktivátory SIR

Aktivitu SIR může ovlivňovat řada sloučenin. Ze všech homologů SIR enzymů byly ale pouze u SIRT1 identifikovány jeho aktivátory (Schéma 2). Nejprostudovanějším aktivátorem SIRT1 je polyfenol resveratrol⁴⁸. Aktivací SIRT1 pomocí resveratrolu bylo například dosaženo prodloužení života u myši s vysokým příjmem kalorií. Resveratrol může ovlivňovat funkci SIRT1 buď přímo vazbou na SIRT1 nebo nepřímo aktivací AMPK (cit.^{12,48}).

Mezi aktivátory SIRT1 se řadí také syntetické molekuly SRT2183, SRT1460 a SRT1720, vyvinuté společnos-

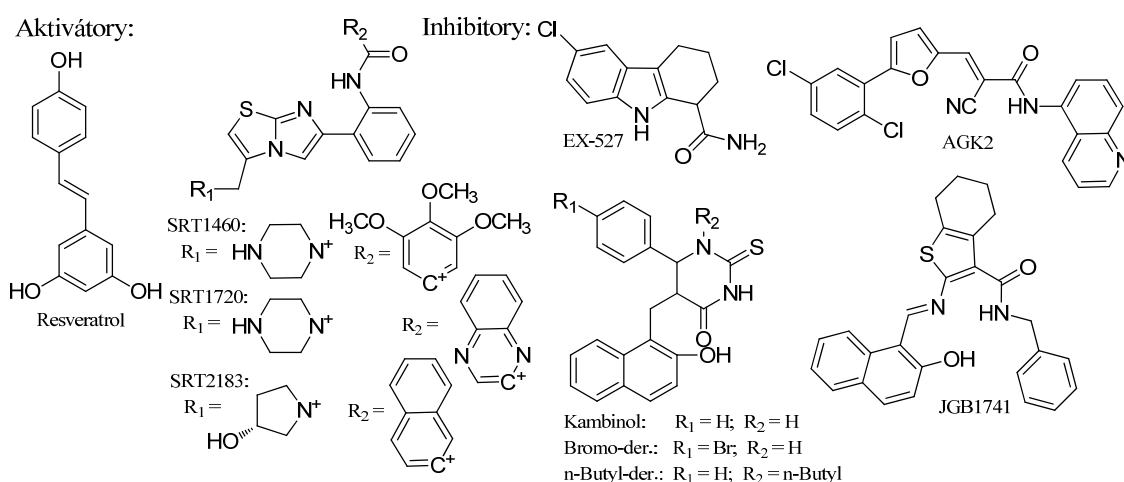


Schéma 2. Aktivátory a inhibitory SIR enzymů

tí Sirtris Pharmaceuticals, které aktivují SIRT1 zvýšením jeho schopnosti vázat acetylovaný substrát^{12,48}. Tyto látky jsou asi 1000× účinnější při aktivaci SIRT1 než resveratrol. Zároveň jsou tyto látky selektivní vůči SIRT1.

3.5.3. Inhibitory SIR

Hlavním inhibitorem SIR aktivity je produkt jejich deacetylační reakce, nikotinamid. Syntetické inhibitory SIR (Schéma 2) jsou zpravidla testovány pouze na aktivitu vůči SIRT1 a SIRT2, proto pro ostatní SIR není mnoho inhibitorů známo⁴⁹.

U inhibitorů je důležitá jejich selektivita. Selektivním inhibitorem SIRT1 je například derivát sirtinolu, JGB1741, který je schopen inhibovat proliferaci a indukovat apoptózu buněk rakoviny prsu, MDA-MB231 (cit.⁵⁰). Modifikacemi základní struktury neselektivního inhibitoru kambinolu byly připraveny bromo-derivát selektivní vůči SIRT1 a *N*-butyl-derivát selektivní vůči SIRT2 (cit.⁴⁹). Mezi selektivní inhibitory SIRT2 patří také inhibitor AGK2, který byl účinný proti Parkinsonově chorobě⁴⁹. Deriváty přirozených substrátů SIRT5, thiosukcinylované peptidy, jsou selektivními inhibitory SIRT5, neboť tvoří stabilní 1'-*S*-sukcinylimidáty nepodléhající dalšímu nukleofilnímu ataku⁵¹. Selektivní inhibitory dalších SIR nejsou známy.

4. Závěr

Sirtuiny jsou velice důležité enzymy regulující transkripci genů a zásadní buněčné funkce, jako je vývoj, stárnutí a apoptóza buněk a schopnost buněk odolávat stresu a poškození DNA. Spojení funkce sirtuinů se stechiometrickou spotřebou NAD⁺, molekuly, která je klíčovým kofaktorem v energetických metabolických pochodech a prekurzorem řady signálních molekul, připisuje sirtuinům jedinečnou pozici v buněčných procesech. Produkt reakce sirtuinů, OAADPR, může být také důležitou signální molekulou, přestože její přesná biologická funkce není doposud známa. Sirtuiny jsou důležité modulatory výskytu a vývoje metabolických a neurodegenerativních poruch a nádorových onemocnění. Selektivní ovlivnění aktivity jednotlivých sirtuinů jejich aktivátory či inhibitory tak může vést k léčbě těchto nemocí.

Autoři děkují za podporu projektu ME08070 od MŠMT České republiky.

Seznam symbolů

Aβ	amyloid-β
AceCS	acetyl-CoA syntetasa
AMPK	AMP-aktivovaná protein kinasa
CPS1	karbamoyl fosfát syntetasa 1
CR	omezení příjmu kalorií (calorie restriction)
cypD	cyklofilin D
eNOS	endoteliální NO syntasa
FOXO	forkhead box O proteiny
FXR	farnesol-X-receptor

GDH	glutamát dehydrogenasa
HAT	histonové acetyltransferasy
HDAC	histonové deacetylasy
HIF1α	hypoxií indukovaný faktor 1α
HMGCS	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA syntasa
IDH2	isocitrát dehydrogenasa 2
JNK1	c-Jun <i>N</i> -terminální kinasa 1
LCAD	dehydrogenasa dlouhých acyl-CoA (long-chain acyl-CoA dehydrogenase)
LXR	liver-X-receptor
MnSOD	manganová superoxid dismutasa
NAM	nikotinamid
NF-κB	nukleární faktor kappa B
OAADPR	acetylovaná adenosin difosforibosa
PARP1	poly-(ADP-ribosyl) polymerasa 1
PGC-1α	PPAR-gamma koaktivátor-1α
PPARα-γ	peroxisomální proliferací-aktivované receptory
ROS	volné kyslíkaté radikály (reactive oxygen species)
SIR	sirtuiny
SDH	sukcinát dehydrogenasa
UCP2	uncoupling protein 2

LITERATURA

- Rajendran R., Garva R., Krstic-Demonacos M., Demonacos C.: J. Biomed. Biotechnol. 2011, 368276.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Molecular Biology of the Cell*, 4. vyd. Garland Science, New York 2002.
- Zlatanova J., Leuba S. H., van Holde K.: Biophys. J. 74, 2554 (1998).
- Heitz E.: Jahrb. Wiss. Bot. 69, 762 (1928).
- Bannister A. J., Kouzarides T.: Cell Res. 21, 381 (2011).
- Olmos Y., Brosens J. J., Lam E. W. F.: Drug Resist. Updates 14, 35 (2011).
- Zhang F., Wang S., Gan L., Vosler P. S., Gao Y., Zigmond M. J., Chen J.: Prog. Neurobiol. 95, 373 (2011).
- Clayton A. L., Hazzalin C. A., Mahadevan L. C.: Mol. Cell 23, 289 (2006).
- Allfrey V. G., Faulkner R., Mirsky A. E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 51, 786 (1964).
- Sauve A. A.: Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics 1804, 1591 (2010).
- de Ruijter A. J. M., van Gennip A. H., Caron H. N., Kemp S., van Kuilenburg A. B. P.: Biochem. J. 370, 737 (2003).
- Dittenhafer-Reed K. E., Feldman J. L., Denu J. M.: ChemBioChem 12, 281 (2011).
- Smith B. C., Hallows W. C., Denu J. M.: Chem. Biol. 15, 1002 (2008).
- Lin H., Su X., He B.: ACS Chem. Biol. 7, 947 (2012).
- Li X., Kazkan N.: Int. J. Biol. Sci. 7, 575 (2011).
- Qiu X., Brown K. V., Moran Y., Chen D.: Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics 1804, 1576 (2010).

17. Braidy N., Jayasena T., Poljak A., Sachdev P. S.: *Curr. Opin. Psychiatr.* 25, 226 (2012).
18. Imai S., Guarente L.: *Nature* 403, 795 (2000).
19. Tanno M., Kuno A., Horio Y., Miura T.: *Basic Res. Cardiol.* 107, 273 (2012).
20. Hirschey M. D., Shimazu T., Capra J. A., Pollard K. S., Verdin E.: *Aging* 3, 635 (2011).
21. Li X., Zhang S., Blander G., Tse J. G., Krieger M., Guarente L.: *Mol. Cell* 28, 91 (2007).
22. Kemper J. K., Xiao Z., Ponugoti B., Miao J., Fang S., Kanamalluru D., Tsang S., Wu S. Y., Chiang C. M., Veenstra T. D.: *Cell Metab.* 10, 392 (2009).
23. Picard F., Kurtev M., Chung N., Topark-Ngarm A., Senawong T., de Oliveira R. M., Leid M., McBurney M. W., Guarente L.: *Nature* 429, 771 (2004).
24. Bordone L., Motta M. C., Picard F., Robinson A., Jhala U. S., Apfeld J., McDonagh T., Lemieux M., McBurney M., Szilvasi A., Easlon E. J., Lin S. J., Guarente L.: *PLoS Biol.* 4, e31 (2006).
25. Nemoto S., Fergusson M. M., Finkel T.: *J. Biol. Chem.* 280, 16456 (2005).
26. Mattagajasingh I., Kim C. S., Naqvi A., Yamamori T., Hoffman T. A., Jung S. B., de Ricco J., Kasuno K., Irani K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 148555 (2007).
27. Luo J., Nicolaev A. Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L., Gu W.: *Cell* 107, 137 (2001).
28. Jeong J., Juhn K., Lee H., Kim S. H., Min B. H., Lee K. M., Cho M. H., Park G. H., Lee K. H.: *Exp. Mol. Med.* 39, 8 (2007).
29. North B., Marshall B., Borra M., Denu J. M., Verdin E.: *Mol. Cell* 11, 437 (2003).
30. Vaquero A., Scher M. B., Lee D. H., Sutton A., Cheng H. L., Alt F. W., Serrano L., Sternglanz R., Reinberg D.: *Genes Dev.* 20, 1256 (2006).
31. Wang F., Nguyen M., Qin F. X., Tong Q.: *Aging Cell* 6, 505 (2007).
32. Harting K., Knoll B.: *Eur. J. Cell Biol.* 89, 262 (2010).
33. Giral A., Villarroya F.: *Biochem. J.* 444, 1 (2012).
34. Qiu X., Brown K., Hirschey M. D., Verdin E., Chen D.: *Cell Metab.* 12, 662 (2010).
35. Schlicker C., Gertz M., Papatheodorou P., Kachholz B., Becker C. F. W., Steegborn C.: *J. Mol. Biol.* 382, 790 (2008).
36. Ahn B. H., Kim H. S., Song S., Lee I. H., Liu J., Vasiliopoulos A., Deng C. X., Finkel T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 14447 (2008).
37. Hirschey M. D., Shimazu T., Goetzman E., Jing E., Schwer B., Lombard D. B., Grueter C. A., Harris C., Biddinger S., Ilkayeva O. R., Stevens R. D., Li Y., Saha A. K., Ruderman N. B., Bain J. R., Newgard C. B., Farese Jr. R. V., Alt F. W., Kahn C. R., Verdin E.: *Nature* 464, 121 (2010).
38. Cimen H., Han M. J., Yang Y., Tong Q., Koc H., Koc E. C.: *Biochemistry* 49, 304 (2010).
39. Haigis M. C., Mostoslavsky R., Haigis K. M., Fahie K., Christodoulou D. C., Murphy A. J., Valenzuela D. M., Yancopoulos G. D., Karow M., Blander G., Wolberger C., Prolla T. A., Weindruch R., Alt F. W., Guarente L.: *Cell* 126, 941 (2006).
40. Shulga N., Wilson-Smith R., Pastorino J. G.: *J. Cell Sci.* 123, 894 (2010).
41. Bell E. L., Emerling B. M., Ricoult S. J., Guarente L.: *Oncogene* 30, 2986 (2011).
42. Nasrin N., Wu X., Fortier E., Feng Y., Bare O. C., Chen S., Ren X., Wu Z., Streeper R. S., Bordone L.: *J. Biol. Chem.* 285, 31995 (2010).
43. Nakagawa T., Lomb D. J., Haigis M. C., Guarente L.: *Cell* 137, 560 (2009).
44. Kawahara T. L. A., Michishita E., Adler A. S., Damian M., Berber E., Lin M., McCord R. A., Ongai-gui K. C. L., Boxer L. D., Chang H. Y., Chua K. F.: *Cell*, 136, 62 (2009).
45. van Meter M., Mao Z., Gorbunova V., Seluanov A.: *Cell Cycle* 10, 3153 (2011).
46. Ford E., Voit R., Liszt G., Magin C., Grummt I., Guarente L.: *Genes Dev.* 20, 1075 (2006).
47. Barber M. F., Michishita-Kioi E., Xi Y., Tasseli L., Kioi M., Moqtaderi Z., Tennen R. I., Paredes S., Young N. L., Chen K., Struhl K., Garcia B. A., Gozani O., Li W., Chua K. F.: *Nature* 487, 114 (2012).
48. Camins A., Sureda F. X., Junyent F., Verdager E., Folch J., Pelegri C., Vilaplana J., Beas-Zarate C., Pallas M.: *Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech.* 1799, 740 (2010).
49. Cen Y.: *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1804, 1635 (2010).
50. Kalle A. M., Mallika A., Badiger J., Alinakhi, Talukdar P., Sachchidanand: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 401, 13 (2010).
51. He B., Du J., Lin H.: *J. Am. Chem. Soc.* 134, 1922 (2012).

M. Dvořáková^{a,b}, M. Příbylová^a, and T. Vaněk^a

^(a) *Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague,* ^(b) *Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague): Sirtuins – Histone Deacetylases Influencing Gene Transcription*

Sirtuins rank among class III histone deacetylases which deacetylate *N*^ε-acetyllysine residues in an unusual chemical reaction that consumes NAD⁺ and releases nicotinamide, the deacetylated substrate and a novel product, 2'-*O*-acetyladenosine diphosphoribose. Sirtuins influence a wide range of biological functions and are required for gene silencing. They are also responsible for lifespan extension by calorie restriction. Their mechanism of action, means of modulating their activity and enzymatic targets, with the focus on age-related diseases, are discussed.