

Сплайсинговые изоформы *SIRT1* в печени у пациентов с метаболическим синдромом – ожидание/реальность

Горбачёва А.М.*, Воронова С.С., Бограя М.М., Вульф М.А., Литвинова Л.С.
Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Калининград, Россия
* anmigorbacheva@gmail.com

Ключевые слова: SIRT1, изоформы SIRT1, метаболический синдром

Мотивация и цель: Сиртуин 1 (SIRT1) – НАД+/НАДФН-зависимая деацетилаза, участвующая в модуляции липогенеза и липолиза, биогенеза митохондрий через регуляцию активности транскрипционных факторов PGC-1 α , PPAR- α и PPAR- γ . SIRT1 многократно рассматривался в контексте метаболического синдрома (МС), но его изоформы практически не изучены [1]. Изоформы SIRT1 образуются в результате альтернативного сплайсинга: изоформа 1 (V1) имеет два ядерных сигнала локализации, две другие изоформы (V2 и V3) располагаются в цитоплазме. Таким образом, *целью* данной работы явилось биоинформатическое предсказание взаимодействий изоформ SIRT1 с транскрипционными факторами PGC-1 α , PPAR- α , PPAR- γ , изучение уровня экспрессии изоформ *SIRT1* и перечисленных транскрипционных факторов в печени у пациентов с МС.

Методы и алгоритмы: Белок-белковые взаимодействия были предсказаны с помощью инструмента PEPPI [2]. Использовались аминокислотные последовательности из UniProt: SIRT1 V1 (Q96EB6), SIRT1 V2 (E9PC49), SIRT1 V3 (B0QZ35), PGC-1 α (Q9UBK2), PPAR- α (Q07869), PPAR- γ (P37231) [3]. Были исследованы биоптаты печени от 63 доноров (средний возраст = 45 $\pm$ $\pm$ 8.48 года, 40 женщин и 23 мужчины), которые были разделены на две группы: 1) контрольная группа (среднее значение ИМТ = 19.8 $\pm$ 1.4 кг/м², 6 женщин, 8 мужчин); 2) пациенты с МС (среднее значение ИМТ = 44.3 $\pm$ 12.3 кг/м², 34 женщины, 15 мужчин), критерии включения: минимум два компонента МС в анамнезе и кроме того, тощаксовая глюкоза в крови >5.5 ммоль/л и индекс атерогенности >3. Уровень экспрессии генов интереса изучали с помощью количественной ОТ-ПЦР с использованием SYBR Green (Evrogen, Россия).

Результаты: Было предсказано, что все 3 изоформы SIRT1 связываются с транскрипционным фактором PPAR- α . В то же время V2 и V3 связываются с PGC-1 α , PPAR- γ (табл. 1).

Таблица 1. Биоинформатический и экспериментальный анализ взаимодействия изоформ SIRT1 с транскрипционными факторами; зеленым цветом отмечены взаимодействия, которые подтверждаются на уровне экспрессии мРНК

Белок-белковые взаимодействия	СТ ¹			Корреляции уровней мРНК	Коэффициент корреляции Спирмена (r)			
	SIRT1 V1	SIRT1 V2	SIRT1 V3		<i>SIRT1</i> общий	<i>SIRT1</i> V1	<i>SIRT1</i> V2	<i>SIRT1</i> V3
PGC-1α	0.029	0.738	0.882	PGC-1α	0.437*	0.307	0.613*	0.717*
PPAR-α	0.642	0.963	0.953	PPAR-α	0.216	0.357*	0.630*	0.403
PPAR-γ	0.096	0.942	0.954	PPAR-γ	0.081	0.190	0.400	0.333

¹ СТ – показатель вероятности белок-белкового взаимодействия, основанный на машинном обучении. Чем ближе СТ к 1, тем выше вероятность взаимодействия; * $p < 0.05$

На уровне экспрессии мРНК были обнаружены положительные взаимосвязи ($p < 0.05$) между *PGC-1 α* и *V2*; *PGC-1 α* и *V3*, что согласуется с данными биоинформатического анализа. Однако белок-белковые взаимодействия между *PPAR- α* и цитоплазмными изоформами *V2* и *V3* подтверждаются на уровне экспрессии мРНК частично: *PPAR- α* положительно взаимосвязан с *V1* и *V2*, но не *V3*. Было предсказано взаимодействие между *PPAR- γ* и *V2*, *V3*, однако положительных корреляций между *PPAR- γ* и изоформами *SIRT1* в ходе исследования выявлено не было. Стоит отметить, что между *SIRT1* общим – канонической формой *SIRT1* – не было обнаружено положительной корреляции с мРНК *PPAR- α* . Из этого следует, что изучение только канонической формы *SIRT1* недостаточно (см. табл. 1).

Соотношение уровней мРНК изоформ *SIRT1* статистически не различалось между группами больных МС и здоровых доноров (рис. 1, а). Из всех изоформ только *V3* была повышена в печени больных МС (см. рис. 1, б). Несмотря на стабильную экспрессию референсного гена, у 16 доноров, вне зависимости от ИМТ, не было обнаружено экспрессии как *SIRT1* общего, так и его изоформ. У пяти доноров в обеих группах была обнаружена дискондартная экспрессия *SIRT1*: детектировался общий *SIRT1*, но не его изоформы.

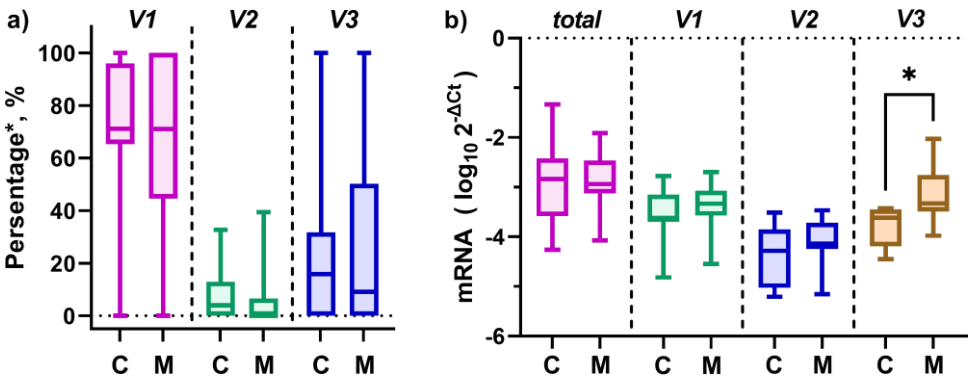


Рис. 1. Результаты анализа экспрессии изоформ в печени: а) соотношение изоформ, U-критерий Манна–Уитни, ($p < 0.05$); б) уровни экспрессии *SIRT1* общего, *V1*, *V2*, *V3*. Т-критерий Уэлча, ($p < 0.05$); * $p < 0.05$

Выводы: Основываясь на результатах биоинформатического анализа и оценке уровня экспрессии мРНК изоформ *SIRT1* и перечисленных транскрипционных факторов, мы предполагаем, что изоформа *V1* деацетилюет гистоны промоторов *PPAR- α* и *PPAR- γ* в ядре клетки, в то время как *V2* и *V3* воздействуют непосредственно на *PGC-1 α* , *PPAR- α* в цитоплазме (рис. 2) [4]. Были предсказаны белок-белковые взаимодействия *PPAR- γ* и изоформ *SIRT1*, однако на уровне экспрессии мРНК положительных корреляций выявлено не было. Выявленные изменения могут быть опосредованы корепрессорным взаимодействием между *SIRT1* и *PPAR- γ* : *SIRT1* деацетилюет промотор *PPAR- γ* , дестабилизируя его, *PPAR- γ* подавляет экспрессию *SIRT1* как транскрипционный фактор (см. рис. 2) [5].

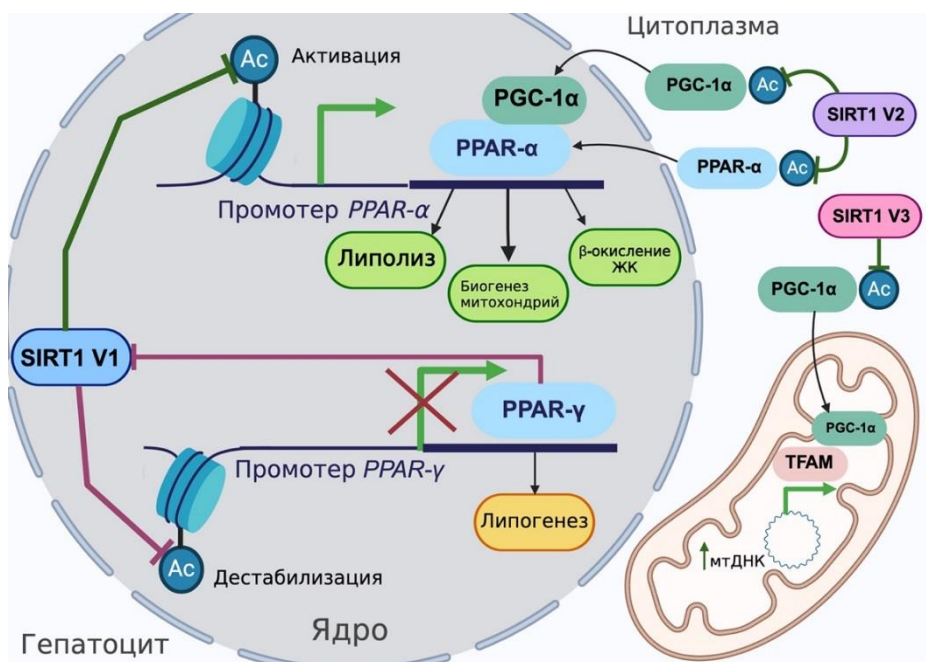


Рис. 2. Регуляция экспрессии транскрипционных факторов изоформами SIRT1 в печени

Соотношение уровней мРНК изоформ *SIRT1* в печени у контрольной группы и группы с МС не различалось, однако экспрессия V3 была выше у больных МС. Таким образом, изоформы *SIRT1* могут различно модулировать биогенез митохондрий, липогенез и липолиз, что указывает на необходимость дальнейших исследований в этой области.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-15-00061).

Splicing isoforms of SIRT1 in the liver of patients with metabolic syndrome – expectation/reality

Gorbacheva A.M.*, Voronova S.S., Bograya M.M., Vulf M.A., Litvinova L.S.

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

* anmigorbacheva@gmail.com

Key words: SIRT1, SIRT1 isoforms, metabolic syndrome

Motivation and Aim: Sirtuin 1 (SIRT1) is an NAD⁺/NADPH-dependent deacetylase involved in the modulation of lipogenesis and lipolysis as well as mitochondrial biogenesis by regulating the activity of the transcription factors PGC-1α, PPAR-α and PPAR-γ. SIRT1 has been extensively studied in context of metabolic syndrome (MetS), but its isoforms remain largely unexplored [1]. SIRT1 isoforms are generated by alternative splicing: isoform 1 (V1) has two nuclear localization signals, while the other two isoforms (V2 and V3) are localized in the cytoplasm. Therefore, the aim of current study was to perform a bioinformatic prediction of the protein-protein interactions (PPIs)

between the SIRT1 isoforms and the transcription factors PGC-1 α , PPAR- α and PPAR- γ and to investigate the expression levels of the *SIRT1* isoforms and the listed transcription factors in the liver of patients with MetS.

Methods and Algorithms: PPIs were predicted using the PEPPi tool [2]. Amino acid sequences were used from UniProt: SIRT1 V1 (Q96EB6), SIRT1 V2 (E9PC49), SIRT1 V3 (B0QZ35), PGC-1 α (Q9UBK2), PPAR- α (Q07869), PPAR- γ (P37231) [3].

Liver biopsies from 63 donors (mean age = 45 $\pm$ 8.48 years, 40 women and 23 men) were analyzed. The donors were divided into two groups: 1) control group (mean BMI = 19.8 $\pm$ 1.4 kg/m², 6 women, 8 men); 2) patients with MetS (mean BMI = 44.3 $\pm$ 12.3 kg/m², 34 women, 15 men), inclusion criteria: a history of at least two MetS components, fasting blood glucose >5.5 mmol/L and an atherogenic index >3. The expression level of the genes of interest was analyzed by quantitative RT-PCR using SYBR Green (Evrogen, Russia).

Results: All three SIRT1 isoforms were predicted to bind with the transcription factor PPAR- α . In addition, V2 and V3 bind to PGC-1 α and PPAR- γ (Table 1).

At the level of mRNA expression, positive correlations ($p < 0.05$) were observed between *PGC-1 α* and V2, *PGC-1 α* and V3, which is consistent with the bioinformatic analysis data. However, PPIs between PPAR- α and cytoplasmic isoforms V2 and V3 are partially supported at the level of mRNA expression: *PPAR- α* is positively correlated with V1 and V2, but not with V3. Interactions between PPAR- γ and V2, V3 were predicted, but no positive correlations were found between *PPAR- γ* and the *SIRT1* isoforms during the study. It is worth noting that no positive correlation was found between total *SIRT1* – the canonical form of *SIRT1* – and *PPAR- α* . This indicates that the study of only the canonical form of SIRT1 is insufficient (Table 1).

Table 1. Bioinformatic and experimental analysis of the interaction of SIRT1 isoforms with transcription factors; interactions confirmed at the mRNA expression level are highlighted in green

PPIs	CT ¹			Correlation of mRNA expression	Spearman correlation coefficient (r)			
	SIRT1 V1	SIRT1 V2	SIRT1 V3		<i>SIRT1</i> общий	<i>SIRT1</i> V1	<i>SIRT1</i> V2	<i>SIRT1</i> V3
PGC-1α	0.029	0.738	0.882	PGC-1α	0.437*	0.307	0.613*	0.717*
PPAR-α	0.642	0.963	0.953	PPAR-α	0.216	0.357*	0.630*	0.403
PPAR-γ	0.096	0.942	0.954	PPAR-γ	0.081	0.190	0.400	0.333

¹ CT – a machine learning based indicator for the probability of PPI. The closer CT is to 1, the higher the probability of interaction. * $p < 0.05$

The ratio of mRNA levels of *SIRT1* isoforms did not differ statistically between the groups of patients with MetS and healthy donors (Fig. 1a). Of all isoforms, only V3 was elevated in the livers of patients with MetS (Fig. 1b). Despite the stable expression of the reference gene, no expression of both total *SIRT1* and its isoforms was detected in 16 donors, regardless of BMI. Inconsistent expression of *SIRT1* was detected in 5 patients in both groups: total *SIRT1* was detected, but not its isoforms.

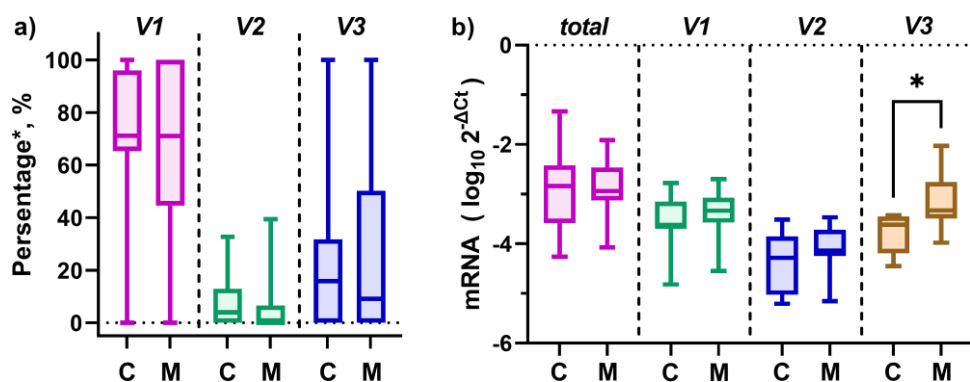


Fig. 1. Results of the analysis of the isoforms' expression in the liver: a) the ratio of isoforms, Mann–Whitney U test, ($p < 0.05$); b) the expression levels of total *SIRT1*, V1, V2, V3. Welch's t-test, ($p < 0.05$); * p -value < 0.05

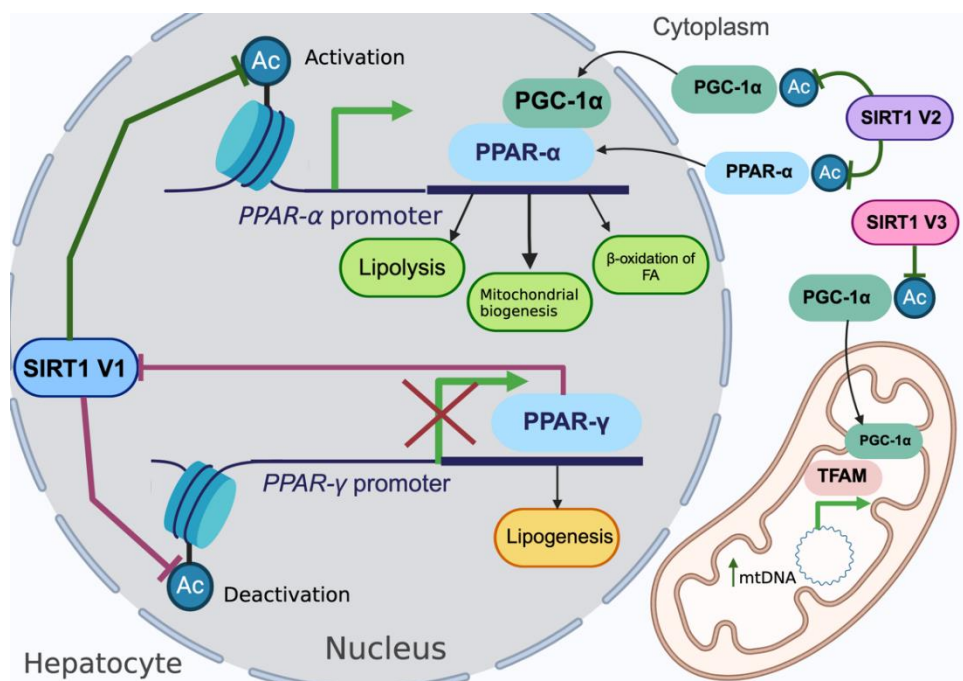


Fig. 2. Expression regulation of transcription factors by SIRT1 isoforms in the liver

Conclusion: Based on the results of bioinformatic analysis and evaluation of the mRNA expression levels of SIRT1 isoforms and the listed transcription factors, we suggest that isoform V1 deacetylates the histones of PPAR-α and PPAR-γ promoters in the cell nucleus, whereas V2 and V3 directly interact with PGC-1α and PPAR-α in the cytoplasm (Fig. 2) [4]. PPIs between PPAR-γ and SIRT1 isoforms were predicted, but no positive

correlations were observed at the level of mRNA expression. The observed changes could be mediated by a corepressor interaction between SIRT1 and PPAR- γ : SIRT1 deacetylates the PPAR- γ promoter and destabilizes it, while PPAR- γ represses SIRT1 expression as a transcription factor (Fig. 2) [5].

The ratio of mRNA levels of *SIRT1* isoforms in the liver did not differ between the control group and the group with MetS. However, the expression of V3 was higher in patients with MetS. Thus, SIRT1 isoforms may differentially modulate mitochondrial biogenesis, lipogenesis and lipolysis, indicating the need for further research in this area. *Funding*: This research was funded by the Russian Science Foundation (Project No. 23-15-00061).

Список литературы/References

1. Zhang X., Ameer F.S., Azhar G., Wei J.Y. Alternative splicing increases sirtuin gene family diversity and modulates their subcellular localization and function. *Int J Mol Sci.* 2021;(2):473. doi 10.3390/ijms22020473
2. Bell E.W., Schwartz J.H., Freddolino P.L., Zhang Y. PEPPi: whole-proteome protein-protein interaction prediction through structure and sequence similarity, functional association, and machine learning. *J Mol Biol.* 2022;434(11):167530. doi 10.1016/j.jmb.2022.167530
3. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D523-D553. doi 10.1093/nar/gkac1052
4. Islam H., Edgett B.A., Gurd B.J. Coordination of mitochondrial biogenesis by PGC-1 α in human skeletal muscle: A re-evaluation. *Metabolism.* 2018;79:42-51. doi 10.1016/j.metabol.2017.11.001
5. Picard F., Kurtev M., Chung N. et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature.* 2004;429(6993):771-776. doi 10.1038/nature02583