

**LIKUNNAN JA HERA- TAI PROTEINIJUOMADIEETIN
VAIKUTUKSET SIRTUIINIEN 1-7 ILMENTYMISEEN LCR-
ROTTIEN RAAJALIHAKSESSA**

Anne Mäkinen

Liikuntafysiologia
Pro Gradu -tutkielma
Syksy 2014
Liikuntabiologian laitos
Jyväskylän yliopisto

TIIVISTELMÄ

Anne Mäkinen (2014). Liikunnan ja hera- tai proteiinijuomadieettien vaikutukset sirtuiinien 1-7 ilmentymiseen LCR -rottien raajalihaksessa. Liikuntabiologian laitos, Jyväskylän yliopisto, Liikuntafysiologian pro gradu-tutkielma, 41 s.

Histonit ja muut kromosomaaliset proteiinit pakkautuvat DNA:n (deoksiribonukleiinihapon) tumaan. Histonideasetylaasit kontrolloivat osaltaan geenien ilmentymistä. Ryhmän III histonideasetylaaseja nimitetään sirtuiineiksi, joita on seitsemän kappaletta ja niiden toiminta on riippuvainen NAD⁺:sta (nikotiinihappoamidadieniidinukleotidi). Tutkimuksissa on todettu liikunnan lisäävän joidenkin sirtuiinien ilmentymistä, mutta proteiinin tai heran vaikutuksia sirtuiinien ilmentymiseen ei ole tutkittu. Tässä tutkimuksessa tutkittiin miten hera- ja proteiinijuomadieetit sekä liikunta vaikuttavat sirtuiinien ilmentymiseen rottien raajalihaksessa.

Tutkimuksessa oli 47 Yhdysvalloista hankittua LCR -kannan (low capacity runner) rottia, joilla metabolisen oireyhtymän riskitekijät olivat koholla. Rotat jaettiin kuuteen ryhmään; kontrolliryhmä K, heraryhmä H, proteiinijuomaryhmä P ja näiden juoksijakontrollit eli juoksupyöräryhmät K+J, H+J sekä P+J. Juoksuintervention aikana rotilla oli ravintoa rajattomasti ja juomana dieettiensä mukaisesti joko vesi, hera- tai proteiinijuoma. Interventio kesti 23 viikkoa, jonka jälkeen rotat lopetettiin ja kudokset kerättiin talteen. Proteiinimääritykset tehtiin plantaris -lihaksesta Western Blotting -menetelmällä.

Sirtuiinien 1 ja 2 ilmentymisessä ei ollut tilastollisia merkitsevyyksiä. Sirtuiini 3 osalta kaikki juoksijaryhmät (K+J: $p=0.05$; P+J: $p<0,001$ ja H+J: $p<0,001$) erosivat merkitsevästi kontrolliryhmistään K, P ja H. Liikunta lisäsi sirtuiini 4:n ilmentymistä erittäin merkittävästi kontrolliryhmässä K ($p<0,001$) sekä heran juoksijaryhmässä H+J ($p<0,01$). Liikunta yksin ei nostanut sirtuiini 5:n ilmentymistä, sitä vastoin kaikissa muissa ryhmissä tapahtui merkitsevää ($p<0,001$) ilmentymisen nousua. Sirtuiini 6: n ilmentymisessä K erosi merkitsevästi ryhmästä K+J, P ja H+J ($p<0,01$; $p<0,001$; $p<0,05$). Sirtuiini 7:n ilmentymiseen ei liikunnalla ollut vaikutusta. Merkitseviä eroja oli P+J, H sekä H+J ryhmissä kontrolliin K verrattuna ($p<0,001$). Tämä tutkimus osoitti, että liikunnalla oli voimakkaita vaikutuksia erityisesti mitokondriaalisten sirtuiinien ilmentymiseen ja myös dieetit vaikuttivat sirtuiinien ilmentymiseen.

Avainsanat: Histonideasetylaasit, proteiinit, sirtuiinit

KÄYTETYT LYHENTEET

ATP	Adenosiinitrifosfaatti
ADP	Adenosiinidifosfaatti
BCAA	Haaraketjuinen aminohappo
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
GAPDH	Gyseraldehydi-3-fosfaatti-dehydrogenaasi
HAT	Histoniasetylaasi
HDAC	Histonideasetylaasi
mRNA	messenger RNA = lähetti-RNA
NAD ⁺	Nikotiinihappoamidiadeniinidinukleotidi
SIRT	Sirtuiini

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ

1 JOHDANTO	4
2 PROTEIINIT.....	6
2.1 Aminohapot.....	6
2.2 Heraproteiini	8
3 NUKLEOSOMIT.....	9
3.1 Nukleotidit	9
3.2 Histonit.....	10
4 HISTONIDEASETYLAASIT	11
5 SIRTUIINIT.....	14
5.1 SIRT1	16
5.2 SIRT2.....	17
5.3 SIRT3	18
5.4 SIRT4.....	19
5.5 SIRT5.....	20
5.6 SIRT6.....	20
5.7 SIRT7.....	22
6 SIRTUIINIT JA LIIKUNTA	23
7 TUTKIMUKSEN TARKOITUS	25
8 TUTKIMUSMENETELMÄT.....	26

8.1	Koe-eläimet ja olosuhteet.....	26
8.2	Koeasetelma	27
8.3	Proteiinimääritykset	29
8.4	Tilastomenetelmät.....	30
9	TULOKSET	31
9.1	Sirtuiini 1.....	31
9.2	Sirtuiini 2.....	32
9.3	Sirtuiini 3.....	33
9.4	Sirtuiini 4.....	34
9.5	Sirtuiini 5.....	35
9.6	Sirtuiini 6.....	36
9.7	Sirtuiini 7.....	38
10	POHDINTA	39
11	LÄHTEET.....	42

1 JOHDANTO

Proteiineilla eli valkuaisaineilla on elimistössä useita erilaisia tehtäviä; ne ovat elimistön rakenneosasia, ne voivat toimia entsyymeinä, kuljetuksessa, solujen välisessä ja solun sisäisessä viestinnässä, puolustautumisessa vieraita aineita vastaan ja ne mahdollistavat solujen liikkeen. Puolet solun kuivapainosta on proteiinia. Proteiinit koostuvat pääasiassa aminohapoista, joiden järjestys määrittää proteiinin kolmiulotteisen rakenteen ja samalla sen toiminnan. Aminohapot jaotellaan välttämättömiin ja ei-välttämättömiin aminohappoihin. Haaraketjuisia aminohappoja (branched chain amino acids = BCAAs) ovat leusiini, isoleusiini sekä valiini, jotka kaikki kuuluvat ihmiselle välttämättömiin aminohappoihin.

Hyviä proteiininlähteitä ovat esimerkiksi maitotaloustuotteet, kananmunanvalkuainen, liha, kala ja kana. Maidon proteiineista 20 % on heraa ja 80 % kaseiinia. Heraproteiini tarkoittaa proteiineja, jotka jäävät juuston valmistuksessa muodostuvaan nesteeseen. Heraproteiini sisältää useita eri proteiineja ja peptidejä, esimerkiksi β -laktoglobuliinia, α -laktalbumiinia, immunoglobuliinia ja laktoferriniä, ja se sisältää runsaasti välttämättömiä ja haaraketjuisia aminohappoja. Ihmisen lihakset ovat aminohappokoostumukseltaan hyvin samankaltaiset kuin heran aminohappokoostumus; hera sisältääkin miltei kaikki aminohapot, joita lihasten toimintaan ja kasvuun tarvitaan.

Histonit koostuvat positiivisesti varautuneista aminohapoista lysiinistä ja arginiinista, ne ovat proteiineja, jotka yhdessä muiden kromosomaalisten proteiinien kanssa pakkautuvat deoksiribonukleiinihapon (DNA) tumaan. Histonien varauksen aiheuttaa sen ytimestä ulostuleva N-terminaalinen aminohappopää, joka on alttiina translaation jälkeiseen kovalenttiseen modifikaatioon, kuten esimerkiksi lysiinien tai arginiinien metylaatioon ja lysiinien asetylaatioon. Histonien asetylaatiota kontrolloivat histoniasetylaasit (HAT) ja histonideasetylaasit (HDAC), jotka joko poistavat tai lisäävät asetyyliryhmiä. Eräs histonideasetylaasien ryhmä on sirtuiini-entsyymit, joita on seitsemän kappaletta ja joiden toiminta on riippuvainen nikotiinihappoamidiadeniininidinukleotidista eli NAD^+ :sta. Sirtuiinit vaimentavat geenien ilmenemistä osittain tai kokonaan.

Liikunnalla on todettu olevan sirtuini 1:n ilmentymistä lisääviä vaikutuksia. Tässä opin-
näytetyössä, joka on osa laajempaa tutkimusta, tutkittiin liikunnan sekä hera- ja prote-
iinijuomadieettien vaikutuksia sirtuiniin 1-7 ilmentymiseen rottien raajalihaksessa.

2 PROTEIINIT

2.1 Aminohapot

Proteiinit koostuvat pääasiassa aminohapoista; ne ovat molekyyliä, joissa samaan hiilirunkoon on liittynyt vedyn lisäksi aminoryhmä – NH₂ ja karboksyyliiryhmä -COOH. Runkoon voi lisäksi kiinnittyä erilaisia sivuketjuja, joiden mukaan eri aminohapot eroavat toisistaan ja joiden perusteella aminohappoja voidaan luokitella ei-polaarisiin, polaarisiin ja varauksellisiin aminohappoihin. Ei-polaariset aminohapot ovat hydrofobisia ja ne sijaitsevat proteiinin sisäosissa, näitä ovat glysiini, alaniini, valiini, leusiini, isoleusiini ja proliini. Polaarisia aminohappoja ovat seriini, treoniini, kysteiini, tyrosiini, asparagiini ja glutamiini. Negatiivisesti varautuneita aminohappoja ovat glutamiini ja asparagiini, positiivisesti varautuneita aminohappoja ovat lysiini, arginiini ja histidiini. Proteiineissa voi olla 20 erilaista aminohappoa joista 9 on välttämättömiä eli ne on saatava ravinnosta. Loput ovat ei-välttämättömiä aminohappoja, jotka voidaan syntetisoida muista aminohapoista (Taulukko 1). (Nelson & Cox 2008, 71–82.)

TAULUKKO 1. Välttämättömät ja ei-välttämättömät aminohapot (Nelson & Cox 2008).

Välttämättömät aminohapot	Ei-välttämättömät aminohapot
Fenyylialaniini	Alaniini
Histidiini	Arginiini*
Isoleusiini	Asparagiini
Leusiini	Aspartaatti
Lysiini	Glutamaatti
Metioniini	Glutamiini
Treoniini	Glysiini
Tryptofaani	Kysteiini
Valiini	Prolini
	Seriini
	Tyrosiini

* Arginiini on välttämätön aminohappo kasvuikäisille, mutta ei aikuisille

Aminohappojen välille muodostuu peptidisidos; kaksi aminohappoa muodostaa dipeptidin ja kolme aminohappoa muodostavat tripeptidin. Kun aminohappoja on peräkkäin satoja tai tuhansia, muodostuu polypeptidi, joista proteiinit rakentuvat. Aminohappojärjestys määrittelee proteiinin laskostumisen ja samalla sen konformaation, joka määrittelee proteiinin ominaisuudet, tehtävät ja toiminnan. Proteiinit voivat toimia mm. kudosten rakenneosina, kuljetustehtävissä, hormoneina, vasta-aineina ja entsyymeinä. (Nelson & Cox 2008, 71–82.)

Haaraketjuisia aminohappoja (BCAA) ovat leusiini, isoleusiini sekä valiini, jotka kaikki kuuluvat ihmiselle välttämättömiin aminohappoihin (Nelson & Cox 2008, 74–75). Leusiini aktivoi 70-kDa ribosomaalisen proteiini S6 kinaasin fosforylaatiota lisäten proteiinisynteesiä luurankolihasessa ja toimien siten avainsignaalina translaation aloituksessa (Anthony ym. 2000; Ha & Zemel 2003; Hutson ym. 2005). Leusiinilla on tärkeä rooli lihaskudosten kasvussa ja korjaamisessa (Marshall, 2004).

Haaraketjuiset aminohapot hajotetaan energiaksi lihaksissa, rasvakudoksessa ja munuaisissa, kun aminohapot yleensä hajotetaan maksassa. Lisäksi ne ovat aminohapoista ainoita, jotka käyttävät samoja entsyymejä proteiinien hajotuksen alkuvaiheessa. (Matthews 2005, Hutson ym. 2005.) Haaraketjuiset aminohapot, erityisesti leusiini, säätelevät osaltaan glukoosi- ja lipidimetaboliala (Arakawa ym. 2010). Leusiini ja isoleusiini stimuloivat glukoosista riippumatonta glukoosinottoa luurankolihasessa (Doi ym 2005).

2.2 Heraproteiini

Heraproteiini on yleinen termi, joka tarkoittaa proteiineja, jotka jäävät juuston valmistuksessa muodostuvaan nesteeseen. Maidon proteiineista 20 % on heraa ja 80 % kaseiinia. Heraproteiini sisältää runsaasti välttämättömiä ja haaraketjuisia aminohappoja, ja siinä on runsaasti mineraaleja ja vitamiineja. Heralla tarkoitetaan myös soijasta saatua heraproteiinia. (Hoffman & Falvo 2004.)

Ihmisen lihakset ovat aminohappokoostumukseltaan samankaltaiset kuin heran aminohappokoostumus; hera sisältääkin miltei kaikki aminohapot, joita lihasten toimintaan ja kasvuun tarvitaan (Ha & Zemel 2003).

3 NUKLEOSOMIT

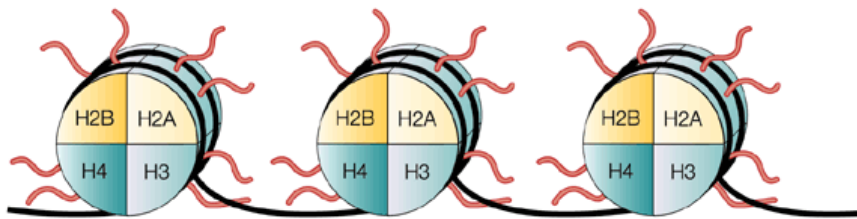
3.1 Nukleotidit

Nukleiinihapot koostuvat nukleotideista. Nukleotidit ovat muodostuneet sokeri-, fosfaatti- ja emäsosasta. DNA:n eli deoksiribonukleiinihapon sokeriosana on deoksiriboosi, johon on liittynyt vety. DNA:n emäsosia ovat adeniini (A), tymiini (T), guaniini (G) ja sytosiini (C). RNA:n eli ribonukleiinihapon sokeriosaan riboosiin on liittynyt OH-ryhmä ja tymiinin tilalla on urasiili (U). (Alberts ym 2004, 171.)

Nukleotidit muodostavat DNA-juosteen liittymällä toisiinsa peräkkäin. DNA-molekyylillä on kaksijuosteinen, emäkset ovat asettuneet vetysidoksilla vastinpareittain, joita ovat adeniini-tymiini ja guaniini-sytosiini. Sokeriosiin kiinnittyneet emäsosat ovat DNA:n rungosta ulospäin eli ne kiinnittyvät toisiinsa kierteen sisäpuolella vastakkain. Pyrimidiiniemäkset sisältävät yhden heterosyklisen 6-renkaan ja puriiniemäksissä näitä heterosyklisiä renkaita on kaksi kappaletta. (Alberts ym 2004. 170–176.) Suurempien puriiniemästen adeniinin ja guaniinin vastapareina ovat pienemmät pyrimidiiniemäkset tymiini ja sytosiini, sokerifosfaattirunkojen etäisyys toisistaan on aina sama joten DNA-kaksoiskierre laskostuu ilman ohuempia kohtia. (Alberts ym. 2004, 175.)

3.2 Histonit

Eukaryoottisolussa, pois lukien verihiutaleet ja punasolut, on runsaasti DNA:ta, jonka histoniproteiinit pakkaavat tumaan. Histonit ja muut kromosomaaliset proteiinit yhdessä DNA:n kanssa muodostavat nukleosomeja joiden ympärille DNA kiertyy kromatiiniksi. Histoniproteiineja on nukleosomissa 8 kappaletta, kaksi kutakin päätyyppiä H3, H4, H2A ja H2B. Histonit H3 ja H4 sitoutuvat toisiinsa muodostaen dimeerin, johon DNA sitoutuu. Kaksi H2A-H2B dimeeriä lisätään H3-H4 tetrameeriin, jolloin muodostuu histonioktameeri, jonka ympärille DNA kietoutuu kahdesti. Muita histoniproteiineja suurempi H1 (linker histone) kiinnittyy histonin sivulle ja lukitsee nukleosomin rakenteen (Kuva 1). Histonien N-terminaaliset aminohappopäät jäävät rakenteen ulkopuolelle. Histonilla H2 on myös C-terminaalinen aminohappopää, joka jää nukleosomin ulkopuolelle. (Alberts ym. 2008, 211–214, 217–218.)

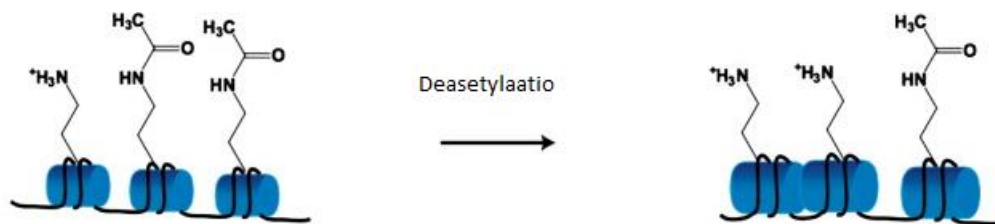


Kuva 1. Histonit H2B, H2A, H3 ja H4 muodostavat nukleosomin. Kuvassa kolme nukleosomia (Mukaiillen Breslow ym. 2001).

4 HISTONIDEASETYLAASIT

Histonit koostuvat positiivisesti varautuneista aminohapoista lysiinistä ja arginiinista. Varauksen aiheuttaa histonin ytimeistä ulos tuleva N-terminaalinen aminohappopää. (Grant 2001.) Histonien N-terminaaliset aminohappopäät ovat alttiina translaation jälkeiseen kovalenttiseen modifikaatioon, joista tunnetuimpia ovat seriinien fosforylaatio, lysiinien asetylaatio, ubikinaatio ja sumoylaatio, lysiinien tai arginiinien metylaatio ja arginiinien sitrullinaatio, jossa arginiini muuttuu sitrulliiniksi PAD-entsyymin avustuksella (Grant 2001; Hakala ym. 2012; Denu & Smith 2009).

Modifikaatiot ovat luonteeltaan dynaamisia, ja ne perustuvat proteiinien varauksen muuttamiseen, esimerkiksi asetylaatio poistaa lysiinien positiivista varausta. Deasetylointi tiivistää kromatiinin rakennetta, jolloin DNA kietoutuu tiiviimmin nukleosomin ympärille. Mitä vähemmän asetyloitu histoni on, sitä tiukemman kromatiinirakenteen se muodostaa DNA:n kanssa, ja lopulta deasetylointi estää transkription aloituksen. (Kuva 2). Histonien fosforylointi ja asetylointi mahdollistavat geenien luennan aktivoimalla kromatiinin avautumista ja metylointi estää luentaa tiivistämällä kromatiinin rakennetta. (Grant 2001.)



Kuva 2. Lysiinin deasetylointi (Mukaiillen Denu & Tong 2010).

Histonien lysiiniin post-translaationaallista muokkausta katalysoivat entsyymit jakautuvat neljään luokkaan; lysiiniin metyyli transferaasit, lysiinispesifiset histonidemetylaasit, histoniasetyyli transferaasit ja histonideasety laasit (Denu & Smith 2008).

Histonien asetylaatiota kontrolloivat histoniasety laasit (HAT, histone asetylace) ja histonideasety laasit (HDAC, histone deasetylace), jotka joko poistavat tai lisäävät asetyyli ryhmiä. Histonideasety laasit muodostavat 18 entsyymin perheen, joka jakautuu neljään luokkaan; I, II, III ja IV. Luokkia I, II ja IV pidetään klassisina histonideasety laaseina ja näihin luokkiin kuuluu 11 kpl Zn^{2+} -riippuvaisia entsyymejä. Luokan III histonideasety laaseja nimitetään sirtuiineiksi, näitä entsyymejä on 7 kpl ja niiden toiminta on riippuvainen NAD^+ :sta. (Deubzer ym. 2009.)

Hapettuminen on elektronien luovuttamista ja pelkistyminen niiden vastaanottamista. Solun hapetus-pelkistysreaktioissa elektronit siirtyvät hapetus-pelkistyskoentsyymien avulla. Yksi keskeinen hapetus-pelkistyskoentsyymi on niasiinista saatava nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi eli NAD. Sen hapettunut muoto on NAD^+ , joka ottaa vastaan hapettuvalta aineelta kaksi elektronia ja yhden protonin muuttuen pelkistyneeseen muotoon NADH. Hapettuvalta aineelta irronnut protoni siirtyy vety-ioniksi liuokseen. NADH luovuttaa elektronit mitokondrion sisäkalvon elektroninsiirtoketjuun. (Campbell 1995, 392–393.)

Transkriptiotekijät säätelevät RNA:n synteesin aloitusta. Histoniasetyyli transferaaseihin sitoutuvat transkriptiotekijät avaavat kromatiinia mahdollistaen RNA-polymeraasien toiminnan. Kun kromatiinirakenne on avautunut, transkriptiotekijät voivat kiinnittyä DNA:han, jolloin geenien toiminta aktivoituu. RNA-polymeraasit sitoutuvat DNA:n promoottorikohtaan eli koodattavan geenin aloittavan eksonin edessä olevalle alueelle.

Esimerkiksi mRNA-molekyylin transkription käynnistää RNA-polymeraasi II, ja reaktiossa tarvitaan myös muita proteiineja, joita kutsutaan perustranskriptiotekijöiksi. Perustranskriptiotekijät ohjaavat RNA-polymeraasin aloittamaan luennan kiinnittymällä promottorialueessa sijaitsevaan TATA-boxiin. Alueita, joihin transkriptiotekijät kiinnittyvät, kutsutaan sääte-

lyalueiksi, ja ne joko vahvistavat tai vaimentavat geenien luentaa. Säätelalueiden ei tarvitse olla transkription aloituskohdan välittömässä läheisyydessä, koska DNA:n rakenne pystyy taipumaan.

Geenien ilmenemistä voidaan kontrolloida säätelemällä transkription osallistuvia säätelyproteiineja, sekä vaikuttamalla kromatiinin modifikaatioon. Histonideasetyylaasit esimerkiksi poistavat asetyyliiryhmiä ja vähentävät siten geenien ilmentymistä. (Alberts ym 2004, 271–273.)

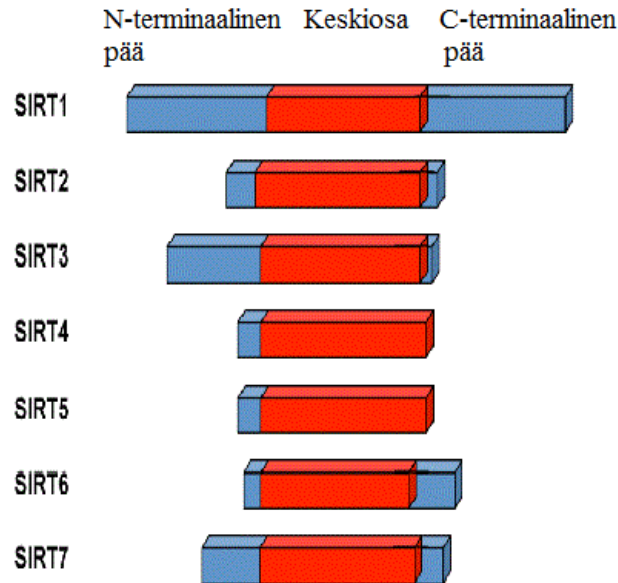
5 SIRTUIINIT

Silent Information Regulators 2 eli Sir2-proteiini löydettiin ensimmäisen kerran *Saccharomyces cerevisiae* hiivasolusta. SIR2-geenin, joka koodaa tätä entsyymiä, huomattiin kasvattavan hiivasolun elinikää lisäämällä sen perimän stabiliteettia. (Haigis & Sinclair 2010; Haigis ym. 2009.) Samankaltaisia havaintoja tehtiin myöhemmin myös monimutkaisimmilla eliöillä kuten esimerkiksi *Caenorhabditis elegans* sukkulamadolla ja *Drosophila melanogaster* kärpäsillä (Kelly 2010).

SIR2-homologeja eli sirtuiineja on löydetty useimmista organismeista kuten esimerkiksi bakteereista, kasveista ja nisäkkäistä (Haigis & Sinclair 2010). Sirtuiini nimitys tulee sanoista "sir-two-ins" (Bay ym 2009). Sirtuiinit vaimentavat geenien ilmenemistä osittain tai kokonaan eli ne ovat regulatorisia geenejä (Gregory & Kelly 2010).

Nisäkkäiltä ensimmäiseksi löydetty Sir2-homologi oli SIRT1-geeni, joka tuottaa SIRT1-entsyymiä (Kelly 2010). Myöhemmin löydettiin vielä kuusi muuta sirtuiinia. Ihmisen sirtuiiniperheessä esiintyy yhteensä 7 sirtuiinia SIRT1-SIRT7, jotka eroavat toisistaan kudospesifisyytensä, solunsisäisen sijaintinsa, entsyymaattisen aktiivisuutensa sekä vaikutuskohteidensa puolesta. Läheisin Sir2-homologi on SIRT1 ja muut ovat kaukaisesti homologisia Sir2-proteiinille. (Auwerx ym. 2012; Haigis & Sinclair 2010; Haigis ym. 2009.) Sirtuiinit kuuluvat luokan III histonideasetylaaseihin HDAC (histone deacetylase). Muista histonideasetylaaseista poiketen sirtuiinit ovat NAD⁺ riipuvaisia entsyymejä, ja niiden aktiivisuutta säätelevät solujen NAD⁺ pitoisuus sekä NAD⁺/NADH konsentraatio. NAD⁺ toimii aktivaattorina, jota NADH inhiboi. (Altucci ym. 2012.) Sirtuiinit deasetyloivat myös muita proteiineja kuin sirtuiineja, esimerkiksi transkriptionaalisia säätelijöitä ja kontrolloivat siten niiden aktiivisuutta (Auwerx ym. 2012).

Kuvan 3 mukaisesti sirtuiineilla on samankaltainen, 275 aminohaposta koostuva ydinosa keskellä ja toisistaan poikkeavat sivuissa olevat N- ja C-terminaaliset päät, joiden perusteella sirtuiineilla on erilaiset kohdeproteiinit, substraatit ja solunsisäinen sijainti (Katzgan & Li 2011).



KUVA 3. SIRT1 on Sir2-homologi ja muut sirtuiinit eroavat siitä rakenteellisesti. Esimerkiksi SIRT7, joka on rakenteeltaan hyvin samankaltainen kuin SIRT6, on vain kaukainen homologi Sir2-proteiinille. (Katzgan & Li 2011; Letzel ym 2005.)

Fylogeneettisen rakenteensa perusteella sirtuiinit on jaettu neljään luokkaan I - IV; SIRT1 (62,0 kDa), SIRT2 (41,5 kDa) ja SIRT3 (43,6 kDa) kuuluvat luokkaan I, SIRT4 (35,2 kDa) kuuluu luokkaan II, SIRT5 (39,1 kDa) kuuluu luokkaan III sekä SIRT6 (39,1 kDa) ja SIRT7 (44,8 kDa) kuuluvat luokkaan IV. Ensimmäiseen luokkaan kuuluvat sirtuiinit SIRT1-3 ovat läheisimmin homologisia Sir2:lle, ja niissä ilmeneekin voimakkainta deasetylaasiaktiivisuutta. Vaikka sirtuiinit kokonaisuutena kuuluvatkin luokan III histonideasetylaaseihin, kaikilla sirtuiineilla ei esiinny NAD⁺ aktiivista toimintaa eli ne eivät ole deasetylaaseja kuten

esimerkiksi SIRT4, jonka vaikutus perustuu ADP-ribosylaatioon. (Letzel ym 2005; Lu ym 2011.)

Tumassa sijaitsevia sirtuiineja ovat SIRT1, SIRT2, SIRT6 ja SIRT7. Näistä SIRT7 sijaitsee tumajyväsessä. Sirtuiinit SIRT3-5 sijaitsevat mitokondrioissa, solulimassa esiintyviä sirtuiineja ovat SIRT1 ja SIRT2. (Kelly 2010.)

5.1 SIRT1

SIRT1 (62,0 kDa) on sirtuiineista tutkituin ja tunnetuin. Se deasetyloi sekä kromatiinia että kromosomaalisia proteiineja, ja sillä on vaikutusta useisiin fysiologisiin tekijöihin kuten esimerkiksi geenien ilmenemiseen, metaboliaan, tuumorigeneesiin ja ikääntymiseen liittyviin sairauksiin kuten osteoporoosiin. (Altucci ym. 2012; Atalay ym. 2010.)

SIRT1 vaikuttaa heterokromatiinin muokkaukseen deasetyloimalla histoni H1:n lysiinin K26, histoni H3:n lysiinin K9, histoni H4:n lysiinin K16 sekä deasetyloimalla myös kromosomaalisia proteiineja. Kromosomaaliset proteiinit voidaan jakaa 3 ryhmään; DNA:ta korjaavat proteiinit, signalointiin liittyvät proteiinit sekä transkriptiotekijät kuten esimerkiksi p53, FOXO, E2F1, BCL6, p73 ja Rb. (Altucci ym. 2012.)

SIRT1:stä ilmenee mm. sydämessä, munuaisissa, maksassa, luurankolihasessa ja valkeassa rasvakudoksessa. Se vaikuttaa lihavuuteen ja diabetekseen mm. deasetyloimalla PGC-1 α -geenin, joka puolestaan vaikuttaa useaan transkriptiotekijään ja säätelee siten mm. insuliiniaineenvaihduntaa ja vaikuttaa aerobiseen energiantuotto-kykyyn. Sitoutumalla FoxO:n kanssa SIRT1:llä on vaikutusta rasvojen metaboliaan ja oksidatiiviseen stressiin. (Baur 2010; Kelly 2010.)

Kalorirajoituksen on jo pitkään tiedetty lisäävän elinikää, se pidentää elinikää n. 20 - 50% (Auwerx ym. 2012; Kumagai ym 2009). Kalorirajoitus puolestaan aktivoi sirtuiinien toimin-

taa. Muita sirtuiiniaktivaattoreita ovat esimerkiksi resveratrol, tryptofaani sekä liikunta. (Kelly 2010.) Tutkimuksissa SIRT1:n aktivaatio lisää insuliiniherkkyyttä ja pienentää gluukoosi- ja insuliinipitoisuuksia. SIRT1 inhiboi PPAR: γ :aa, jolloin lipolyysi kiihtyy ja rasvakudos vähenee. PGC-1 α :n aktivoituminen lisää glukoneogeneesiä, mitokondrioiden määrää ja kokoa sekä lisää β -oksideaatiota. (Laakso 2007.)

5.2 SIRT2

SIRT2 (41,5 kDa) esiintyy pääasiassa solulimassa, vaikka sitä on jonkin verran löydetty myös tumasta. SIRT2 ilmenee sekä valkeassa että ruskeassa rasvakudoksessa, sydämessä, kiveksissä, luurankolihasessa ja aivoissa. (Bay ym. 2009; Gregory & Kelly 2010; Lebiendzinska ym. 2011.) Kuten SIRT1 myös SIRT2 deasetyloi histonia H4. SIRT2 deasetyloi myös transkriptionaalista koaktivaattoria p300 vaikuttaen solusykliin, sekä α -tubuliinia stabiloiden mikrotubuluksia. Mikrotubulukset vaikuttavat mm. solun muotoon, liikkumiseen, jakautumisen säätelyyn sekä solunsisäiseen kuljetukseen. (Lebiendzinska ym. 2011; Kiviranta 2008; Moniot ym. 2012.)

SIRT2:n ilmentyminen lisääntyy solunjakautumisen aikana järjestäen kromatiinia siirryttäessä G₂-vaiheesta M-vaiheeseen, joten SIRT2 voi osallistua solusyklin säätelyyn (Lebiendzinska ym. 2011). SIRT2 säätelee gliasolujen kehitystä, oligodentrosyyttien toimintaa ja sillä voi siten olla vaikutuksia neurodegeneratiivisten sairauksien, kuten esimerkiksi Parkinsonin ja Alzheimerin tautien hoitoon, mikäli SIRT2:n toimintaa voitaisiin lääkkeillä modifioida. SIRT2 deasetyloi PAR3:sta (partitioning defective homologue 3) joka vähentää aPKC:n aktiivisuutta ja muuttaa myeliinin koostumusta Schwannin soluissa. (Auwerx ym. 2012.) Useiden aivokasvaimien muodostuminen ja kehittyminen on yhdistetty häiriöihin SIRT2:n deasetylaasiaktiivisuudessa. Eläinmalleilla tehdyillä tutkimuksilla SIRT2:a on vaikutusta myös Huntingtonin taudissa. (Lebiendzinska ym. 2011.) SIRT2 deasetyloi ja aktivoi Foxo1:sta, jolla on vaikutusta adipogeneesiin. Lisäksi se deasetyloi ja lisää glykoneogeneettisen entsyymin PEPCK:n aktiivisuutta glukoosin saannin ollessa vähäistä. (Auwerx ym. 2012.)

5.3 SIRT3

SIRT3 on mitokondrioiden matriksissa sijaitseva sirtuiini. Sitä esiintyy luurankolihasissa, aivoissa, ruskeassa ja valkeassa rasvakudoksessa, sydämessä, munuaisissa, maksassa ja muissa metabolisesti aktiivisissa kudoksissa. (Bay ym. 2009; Kelly 2010.) Mitokondriaaliset sirtuiinit aistivat NAD^+/NADH -konsentraatiota seuraten ja säädellen siten energiametaboliaa. SIRT3 säätelee aineenvaihduntaan ja energiantuotantoon osallistuvien proteiinien toimintaa ja on pääasiallinen mitokondriaalinen deasetylaasi. SIRT3 edistää oksidatiivista fosforylaatiota stimuloimalla syklistä adenosiinimonofosfaattia (cAMPK), säätelee asetyylikoentsyymi A:n syntetaasin (AceCS1) aktiivisuutta ja deasetyloi UCP1:tä ja PGC-1 α :a sekä osallistuu mm. rasvahappojen pilkkomiseen säätelemällä LCAD:ta (long-chain acyl-CoA dehydrogenase). (Auwrex ym. 2012; Bay ym. 2009; Gregory & Kelly 2010.)

SIRT3:lla (28 kDa) on tumassa alatyypipi (44 kDa), jonka toimintaa ei vielä tarkasti tiedetä, mutta on ehdotettu, että normaalitilassa SIRT3 voi esiintyä sekä mitokondriossa että tumassa, mutta erilaisissa elimistön stressitilanteissa sitä esiintyisi ainoastaan mitokondrioissa (Lebiendzinska ym. 2011). SIRT3 parantaa hermokudosten toimintaa vaikuttamalla UCP4:n toimintaan, deasetyloimalla p53:a ja muita mitokondrioiden patologisia proteiineja ja lisäämällä hermostollisten solujen mitokondrioiden hapenkäyttöä (Bay ym. 2009).

Solulimassa sijaitseva SIRT1 deasetyloi PGC-1 α :a joka vaikuttaa mitokondriossa sijaitsevaan SIRT3:n ERRE:n (estrogen-related receptor binding element) kautta. Näin ollen SIRT1 voi epäsuorasti säädelä SIRT3:n ilmentymistä PGC-1 α :n deasetyloinnin kautta. (Katzgan & Li 2011.) SIRT3 on mitokondriaalisista sirtuiineista (SIRT3, SIRT4, SIRT5) vahvin deasetylaasi (Letzel ym 2005).

5.4 SIRT4

SIRT4 (35 kDa) sijaitsee mitokondrion matriksissa ja sitä esiintyy mm. aivoissa, munuaisissa, maksassa sekä haiman Lagerhansin saarekkeissa. SIRT4 vaikuttaa aminohappovälitteeseen insuliinin eritykseen inhiboimalla insuliinin erittymistä ja β -solujen aktiivisuutta. SIRT4 on erityinen sirtuiini, jolla ei ole NAD⁺ riippuvaista deasetylaatioaktiivisuutta, vaan se käyttää NAD⁺:a ADP-ribosylaatioon glutamaatin dehydrogenaatioissa, ja sen ainoa tunnettu substraatti onkin glutamaattidehydrogenaasi (GDH). SIRT4 poistaa ADP-riboosin NAD⁺:lta kohdeproteiinille. GDH on mitokondriaalinen entsyymi, joka muuttaa glutamaattia α -ketoglutaraatiksi ja kontrolloi siten glukoosin tuottoa sitruunahappokierron kautta ja säätelee aminohappojen käyttöä energiantuotannossa. ADP-ribosyloimalla GDH:ta SIRT4 vaimentaa sen toimintaa edistäen aminohappojen käyttöä energianlähteenä. (Altucci ym. 2012; Auwrex ym. 2012; Bay ym 2009; Gregory & Kelly 2010; Haigis & Sinclair 2010; Hirschey ym. 2010.)

SIRT4 on oksidatiivisen metabolian negatiivinen säätelijä toisin kuin sirtuiinit 1 ja 3, jotka lisäävät kudosten oksidatiivista kapasiteettia. SIRT4 esimerkiksi säätelee GDH:ta ja rasvahappojen oksidaatiota SIRT3:n kanssa päinvastaisella tavalla. Tarkkaa mekanismia, jolla SIRT4 vaikuttaa lipidimetaboliaan ei vielä tunneta. (Auwrex ym. 2012; Bare ym. 2010.) SIRT3 voi deasetyloid a GDH:ta, vaikka ADP-ribosylaation ja deasetylaation välistä yhteyttä ei vielä täysin ymmärretä (Lebiendzinska ym. 2011).

5.5 SIRT5

SIRT5 (33,8 kDa) sijaitsee mitokondrion matriksissa sekä myös mitokondrion ulko- ja sisäkalvon välisestä tilasta ja sitä ilmentyy useissa kudoksissa kuten esimerkiksi maksassa, sydämessä, munuaisissa, aivoissa ja luurankolihaksissa (Gregory & Kelly 2010). SIRT5:n on ehdotettu toimivan lähinnä desukkinylaasina tai demalonylaasina enemmän kuin deasetyylaasina (Lu ym. 2011). Tämä sirtuiini vaikuttaa sytokromi c:n ilmenemiseen, jolla on keskeinen rooli aerobisessa energiantuotannossa (Gregory & Kelly 2010). SIRT5:n substraattina toimii karbamoyylifosfaattisyntetaasi CPS1, joka on ureasykliä säätelevä entsyymi. SIRT5 lisää CPS1:n aktiivisuutta ja urean muodostumista niukkaravinteisissa olosuhteissa, jolloin aminohappojen hajotus ja ammoniakkin tuotto on runsasta. (Hirschey ym. 2010.)

5.6 SIRT6

SIRT6 (39,1 kDa) sijaitsee tumassa ja sitä ilmentyy rasvakudoksessa, luurankolihaksissa, aivoissa ja sydämessä. SIRT6 deasetyloi histonin H3 lysiiniin K9. (Kelly 2010.) Perimän säilyttäminen stabiilina ja erityisesti DNA:n rakenteen virheiden korjaaminen ovat tärkeitä kaikkien eliöiden säilymiselle (Gorbunova ym. 2010). SIRT6:n on todettu vaikuttavan ikääntymiseen osallistumalla DNA:n korjaamiseen ja säätelemällä kromatiinin rakennetta (Berber ym. 2009).

SIRT6 vaikuttaa DNA:n korjaantumiseen säätelemällä emäseksiisiokorjausta (BER= Base excision repair) korjaten vaurioita, jotka ovat syntyneet ionisoivan säteilyn kautta. Toinen tärkeä korjausmekanismi on DNA:n kaksoissäikeen katkeamisen korjaus (DSB=DNA double-strand break), johon SIRT6 osallistuu muodostamalla makromolekulaarisen kompleksin DNA-PK:n (DNA-dependent protein kinase) kanssa. (Jia ym. 2012.)

DNA:n kaksoisäikeen korjaus tapahtuu joko DNA:n homologisella rekombinaatiolla (HR= Homologous Recombination) tai ei-homologisella säikeitten päiden yhteen liittämällä (NHEJ= Non-homologous DNA End Joining). SIRT6 on osa homologista rekombinaatiota, jota pidetään NHEJ-korjausjärjestelmää luotettavampana. Myös SIRT1:n on raportoitu osallistuvan DNA:n korjaukseen. (Gorbunova ym. 2012; Gorbunova ym. 2011.) SIRT6 mono-ADP-ribosyloi PARP1:stä edistäen yksisäikeisen DNA:n korjaamista (Gorbunova ym. 2011).

Telomeerit ovat kromosomien päissä olevia suojaavia emäsjaksoja, jotka lyhenevät aina solun jakautuessa. SIRT6 pystyy säätelemään telomeerien toimintaa esimerkiksi histonin H3 lysiniin K56 asetylaation tasoa säätelemällä. Tutkimuksissa, joissa SIRT6 tehtiin toimimattomaksi, havaittiin että telomeereille muodostui samankaltainen toimintahäiriö kuten Wernerin syndroomassa, joka aiheuttaa ennenaikaista vanhenemista. SIRT6:n on raportoitu aiheuttavan apoptoosia syöpäsoluissa, mutta ei normaaleissa soluissa. (Jia ym. 2012; Altucci ym. 2012.)

SIRT6 inhiboi hypoksiainduoituva tekijä 1 α :aa (Hif1 α = Hypoxia-inducible factor 1 α), joka säätelee glykolyysiin osallistuvien geenien aktiivisuutta (Clish ym. 2010). SIRT6:n alhaiset tasot tehostavat glukoositransporttereiden GLUT1 ja GLUT4 toimintaa (Deng ym. 2010). SIRT6 on tärkein energiatasapainoa säätelevä sirtuiini, joka vaikuttaa histonin H3 lysineihin K9 ja K56 säädellen glukoositasapainoa inhiboimalla glykolyyttisiä geenejä (Clish ym. 2010; Auwerx ym. 2012). SIRT6:a esiintyy runsaasti aivokudoksessa, jossa se osallistuu kasvuhormonin GH ja insuliinin kaltaisen kasvutekijä 1:n pitoisuuksien säätelyyn (Alt ym. 2010).

5.7 SIRT7

SIRT7 (44,8 kDa) sijaitsee tumajyväsessä. SIRT7 ilmenee mm. aivoissa, maksassa, munuaisissa, keuhkoissa, rasvasoluissa sekä kardiomyosyyteissä. Sitä ilmenee vähäisissä määrin myös munasarjoissa ja luutankoliuksessa. (Gregory & Kelly 2010; Lebiendzinska ym. 2011; Letzel ym. 2005.) SIRT7 deasetyloi RNA-polymeraasi I:stä ja p53- proteiinia säädel- len rRNA transkriptiota ja solusykliä olemalla keskeinen osa RNA-polymeraasi I:n toiminta- ta (Auwerx ym. 2012; Ford ym 2006; Kelly 2010; Lebiendzinska ym. 2011).

SIRT7 deasetyloi histonin H3 lysiinin 18 (H3K18) stabiloiden syöpäsolujen fenotyyppiä ja sillä onkin keskeinen rooli kromatiinin säätelyssä ja syöpäsolujen kehittymisessä. SIRT7 ilmeneminen on liitetty onkogeeniin muutoksiin ja potilaan huonoon ennusteeseen. (Al- tucci ym 2012.)

6 SIRTUIINIT JA LIIKUNTA

Liikunta lisää mitokondrioiden toimintaa nostamalla mitokondriaalisten entsyymien aktiivisuutta ja kasvattamalla PGC-1 α -proteiinin aktiivisuutta lihassoluissa. PGC-1 α vaikuttaa useiden transkriptiotekijöiden aktiivisuuteen, jotka säätelevät mitokondriaalisia proteiineja. Liikunta lisää lihasten sirtuiini 1-aktiivisuutta, ja aktivoi PGC-1 α :n ja mitokondriaalisten entsyymien aktiivisuutta. Sirtuiini 1:n roolia luurankolihasessa ei vielä täysin tiedetä. (Bonen ym 2010.)

Atalay ym. liikunnan vaikutuksia SIRT1, SIRT6, NAD ja NAMPT proteiinien tasoihin ikääntyneiden ja nuorien rottien luurankolihasessa, ja selvittivät, että liikunta lisää NAD⁺, NAMPT:n ja UCP3:n (mitochondrial uncoupling protein-3, irtikytkentäproteiini) aktiivisuutta ikääntyneillä rotilla samalle tasolle nuorien rottien kanssa. Tutkimuksessaan he toteivat, että säännöllinen liikunta lisäsi sirtuiini 1:n aktiivisuutta sekä nuorilla että ikääntyneillä eläimillä, ja että samalla se hidastaa ikääntymisen vaikutuksia luurankolihasessa NAMPT-NAD⁺-sirtuiini 1-signaaloinnin vaikutuksesta.

Ikääntymisen myötä kudokset kärsivät enenevässä määrin oksidatiivisista vaurioista. Säännöllinen liikunta vähentää oksidatiivisia vaurioita lisäämällä antioksidanttien pitoisuuksia lihaksissa SIRT1:n säädellässä näiden muutoksien tasoja. (Atalay ym 2010.) Liikunta vähentää ikääntymisen negatiivisia vaikutuksia stimuloimalla NAD⁺:n biosynteesiä sirtuiini 1 aktivaation kautta. Liikunta myös vähentää ikääntymisen aiheuttamaa sirtuiini 6 aktiivisuuden nousua, joka vaikuttaa glukoosimetabolialla heikentävästi. (Jia ym. 2012.)

Sirtuiini 1:llä on todettu olevan positiivinen vaikutus oksidatiiviseen kapasiteettiin erilaisissa lihassoluissa. Tutkimuksessaan Bonen ym. (2011) totesivat, että sirtuiini 1:n ilmeneminen luurankolihasen tumassa ja mitokondriaalinen biogeneesi lisääntyvät liikunnan vaikutuksesta sekä ihmisillä että rotilla. Tuman lisääntynyt sirtuiini 1:n aktiivisuus korreloi hyvin

sirtuiini 1:n proteiinitason aktiivisuuden kanssa. Sirtuiini 1:llä on positiivinen vaikutus mitokondriaaliseen biogeneesiin deasetylaation ja PGC-1 α :n aktivaation kautta.

Sirtuiini 1 ilmenee enemmän punaisissa, hitaissa oksidatiivisissa lihassoluissa kuin valkeissa nopeissa glykolyttisissä lihassoluissa. Luurankolihasen sirtuiini1-pitoisuus nousee sekä nopeus- että kestävyystyypisten harjoittelumuotojen seurauksena. (Kumagai ym. 2008.)

Kalorirajoituksen tiedetään nostavan keskimääräistä ja maksimielinikää, jota myös säännöllinen liikunta lisää. Sirtuiinit vaikuttavat molempiin, erityisesti sirtuiini 1 säätelee osaltaan kalorirajoituksesta aiheutuvaa eliniän pitenemistä. Kalorirajoituksella ja säännöllisellä liikunnalla on terveyttä edistäviä vaikutuksia. (Boldogh ym. 2013.)

7 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, miten liikunta ja hera- tai proteiinijuomadieetti vaikuttaa sirtuiinien 1-7 ilmentymiseen rottien raajalihaksessa.

Aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu, että liikunta lisää joidenkin lihaksien sirtuiini 1-aktiivisuutta. Dieettien vaikutuksista sirtuiinien ilmentymiseen ei ole aikaisempia tutkimustuloksia. Heran aminohappokoostumuksen tiedetään kuitenkin vaikuttavan suotuisasti lihaksen toimintaan.

8 TUTKIMUSMENETELMÄT

8.1 Koe-eläimet ja olosuhteet

Tämä opinnäytetyö oli osa laajempaa tutkimusta, ja tässä työssä tutkittiin sirtuiinien ilmentymistä rottien raajalihaksessa. Koe-eläiminä käytettiin LCR (low capacity runner) rottia (Michigan, USA), jotka olivat tutkimuksen alussa noin 5 kuukauden ikäisiä. Näillä LCR rotilla metabolisen oireyhtymän riskitekijät olivat koholla. Rotat oli yksilöity korvamerkillä ja hännän värikoodilla. Rottien saavuttua koe-eläintilalle niiden terveydentila tarkastettiin. Rotat painoivat tutkimuksen alussa n. 290 g.

Rottia pidettiin koe-eläintiloissa, jossa lämpötila oli 21 astetta ja ilmankosteus keskimäärin 50 %. Rottien vuorokausirytmien vuoksi huoneessa on valoisaa 8.00–20.00 ja pimeää 20.00–08.00. Rottia pidettiin polykarbonaattilaatikoissa, aluksi kaksi rottaa samanaikaisesti ja mittauksien alettua jokainen rotta sijoitettiin omaan häkkiinsä. Ravintona oli rehua (R36, Labfor/Lactamin, Tukholma, Ruotsi). Ravintosisällöltään rehun koostumus oli; 300 kcal/100 g ja sen koostumus oli proteiinia 18.5 %, rasvaa 4.0 %, NFE (nitrogen free extracts) 55.7 %, kuitua 3.5 %, tuhkaa 6.3 % ja vettä < 12 %. Vettä oli saatavilla koko ajan. Tutkimukselle oli koe-eläinten eettisen toimikunnan puoltava lausunto.

8.2 Koeasetelma

Tutkimukseen osallistuvat 47 rottaa jaettiin 6 ryhmään, joissa kussakin oli 8 eläintä, paitsi P+J-ryhmässä jossa eläimiä oli 7 kappaletta. Intervention aikana puolet rotista sijoitettiin häkkeihin, joissa oli juoksupyörä (Ø 38 cm) vapaaehtoiseen liikuntaan ja toiset suunnilleen samankokoisiin juoksupyörättömiin häkkeihin. Ryhmät olivat; kontrolliryhmä K ja sen kontrolliryhmä K+J eli kontrollijuoksijat, sekä hera- ja proteiinijuomaryhmät H ja P juoksijakontrolleineen H+J ja P+J.

Ryhmät:

- kontrolliryhmä K
- juoksijakontrolliryhmä K+J, juoksupyörä vapaaehtoiseen liikuntaan
- heraryhmä H
- heraryhmä H+J juoksupyörä
- maitopohjainen proteiinijuomaryhmä P
- maitopohjainen proteiinijuomaryhmä P+J juoksupyörä

Tutkimuksen aikana rotilla oli ravintoa saatavilla rajattomasti ja juomana dieettiensä mukaisesti joko vesi, hera-vesiseos tai proteiinijuoma. Proteiinijuoman ravintosisältö oli 73 kcal/100 g ja sen koostumuksesta oli proteiinia 8 %, hiilihydraattia 8 % ja rasvaa 1 %. Suklaanmakuinen proteiinijuoma laimennettiin samaan määrään vettä ja sitä annosteltiin proteiiniryhmälle P 1 dl ja proteiinijuoksijaryhmälle P+J 1,2 dl, koska kontrolliproteiiniryhmä joi kaiken. Hera-vesiliuos valmistettiin herajauheesta ja vedestä. Hera-vesiliuoksen pitoisuus oli juoksijaryhmällä suurempi, koska ne joivat vähemmän, liuosta annosteltiin 1-1,2 dl kerrallaan. Heran annostelu rotilla oli 5 g/kg. Dieetit valmistettiin ja edellisen päivän kulutus mitattiin päivittäin. Rotat ja rottien rehu punnittiin 3 vrk:n välein.

23 viikon pituisen intervention jälkeen rotat lopetettiin vaivuttamalla ne syvään anestesiaan, jonka jälkeen suoritettiin niskamurto. Veri kerättiin talteen. Rotilta otettiin veren lisäksi

talteen valkoinen ja ruskea rasvakudos, raajojen luut, aivot, sydän, maksa ja lihaksista soleus, plantaris, gastrocnemius, EDI, MQF. Tässä tutkimuksessa proteiininmääritykset tehtiin plantaris-lihaksesta.

8.3 Proteiinimääritykset

Tässä tutkimuksessa analysoin sirtuiinien 1, 3, 6 ja 7 ilmentymistä. Sirtuiinit 2,4 ja 5 analysoitiin toisaalla. Tutkimuksessa käytettyjen primäärivasta-aineiden laimennokset olivat: Sirt1 (Abcam, Cambridge, UK) 1:5000; Sirt3 (Abcam) 1:400; Sirt6 (Abcam) 1:500, Sirt7 (Abnova, Atlanta, GA, USA) 1:500 ja GAPDH (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 1:40 000. Sekundäärivasta-aineiden laimennokset olivat HRP-anti-rabbit IgG, Sigma Aldrich (1:40 000) ja Odyssey anti-rabbit IRDye 800 ja 600 CW (1:20 000).

Lihasnäytteet homogenisoitiin jääkylmässä [20 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM Mg₂Cl, 100 mM β-glyserofosfaatti, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT, 1 % Triton-X-100] liuoksessa, johon oli lisätty proteaasi- ja fosfataasi-inhibiittoreita (molemmat Sigma Aldrichilta). Totaaliproteiinien konsentraatio määritettiin käyttäen kaupallista Piercen (Thermo Scientific, Rockford, IL; USA) valmistamaa kolorimetriseen mittaukseen perustuvaa kittiä.

40 µg lihasnäytettä sekoitettiin Laemmli näytepuskuriin ja lämmitettiin 95 °C lämpötilassa 10 minuutin ajan. Näytteiden proteiinit eroteltiin SDS-PAGE menetelmällä; 30 minuuttia 250 V käyttäen 4-20 % gradienttigeelä (Criterion electrophoresis cell, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Proteiinit siirrettiin nitroselluloosakalvoille 300-mA jatkuvalla virralla 4 °C lämpötilassa. Proteiinien siirtyminen varmistettiin värjäämällä membraanit Ponceau S-värjäyksellä. Epäspesifistä taustaa poistettiin inkuboimalla membraaneja 5 % rasvattomassa maito/TBS-liuoksessa 1 tunnin ajan huoneenlämmössä, jonka jälkeen niitä inkuboitiin yön yli 4 °C lämpötilassa primäärivasta-aineessa. Kaikki vasta-aineet laimennettiin TBS-5 % rasvaton maito-liuokseen yllämainituilla laimennossuhteilla.

Inkubaation jälkeen membraanit pestiin 0.1 % TBS/Tween-20:llä (TBS-T) 4x5min ja inkuboitiin 1.5 tuntia sekundääri vasta-aineella. Inkubaation jälkeen membraanit pestiin kuten yllä, ja kehitettiin kemiluminesenssin avulla (Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit, GE Healthcare, UK) ja kvantitoitiin ChemiDoc XRS sekä Quantity One oh-

jelmistolla (version 4.6.3. Bio-Rad Laboratories), tai Odyssey CLX Infrared Imager LICOR laitteistolla ja valmistajan ohjelmistolla.

Tarvittaessa membraanit stripattiin 0.2 M NaOH 10 min ajan huoneenlämmössä ja pestiin TBS-Tweenillä, jonka jälkeen ne blokattiin ja käsiteltiin primääri- ja sekundääri vastaaineilla sekä kehitettiin kuten edellä on kuvattu. Kaikki näytteet ja tulokset normalisoitiin omaan GAPDH-määrän mukaan. Jos näytteet ajettiin eri geeleillä, käytettiin normalisoinnissa kontrollinäytettä, joka toistettiin jokaisella geelillä.

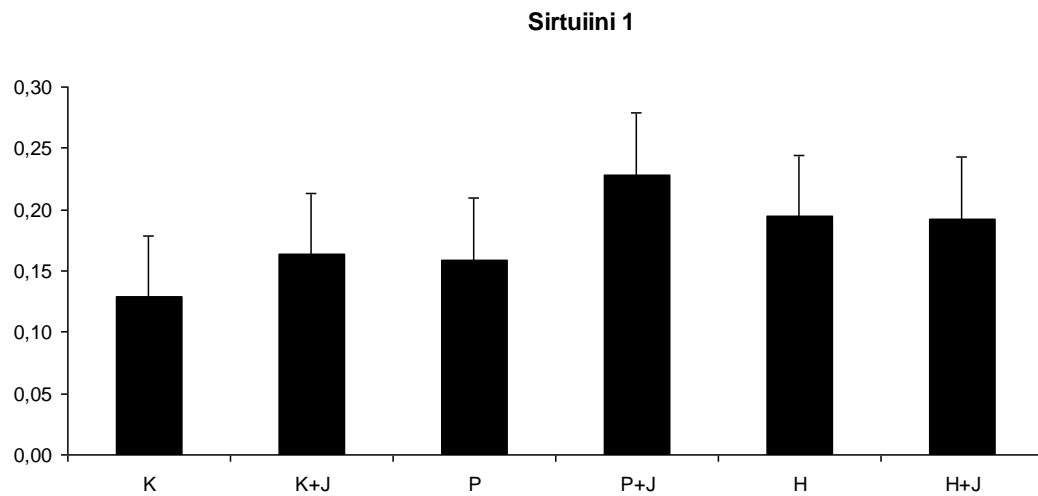
8.4 Tilastomenetelmät

Tilastolliset analyysit suoritettiin SPSS-ohjelman versiolla 13.0. Tulokset on ilmoitettu keskiarvoina. Datan normaalijakautuneisuus testattiin, ja ryhmien välisiä eroja tutkittiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä ANOVA Bonferroni-korjausta käyttäen. Merkitsevyyden rajaksi asetettiin $p \leq 0,05$.

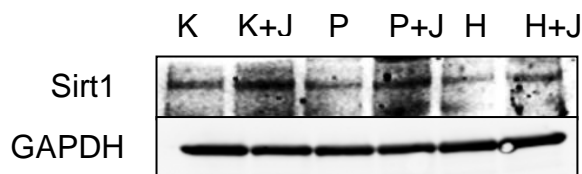
9 TULOKSET

9.1 Sirtuiini 1

Sirtuiini 1 ilmenemisessä ei todettu tilastollisia merkitsevyyksiä (Kuva 4a).



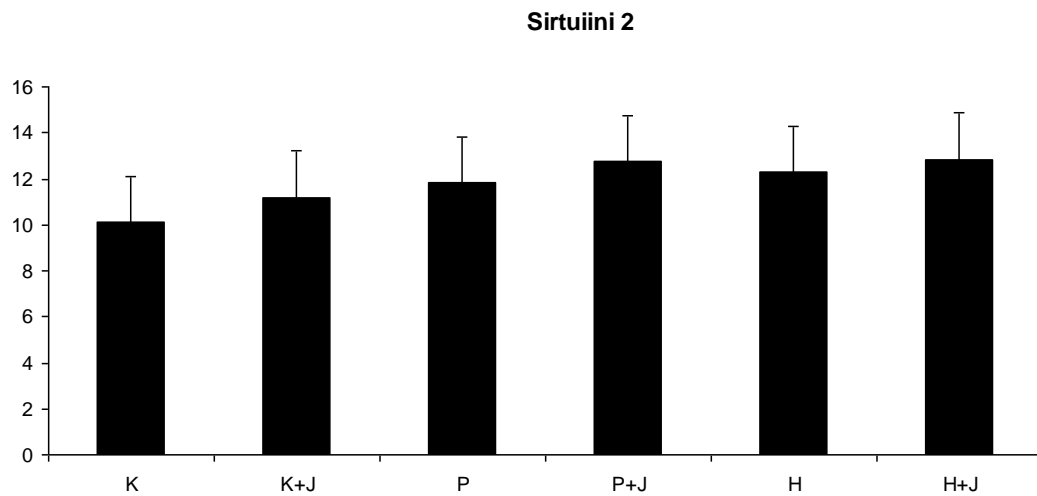
KUVA 4 a. Sirtuiini 1:n ilmeneminen. K=Kontrolli, K+J= Juoksijakontrolli, P=Proteiinijuoma, P+J= Proteiinijuomaryhmän juoksijat, H=Heraryhmä, H+J= Heraryhmän juoksijat. Ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja.



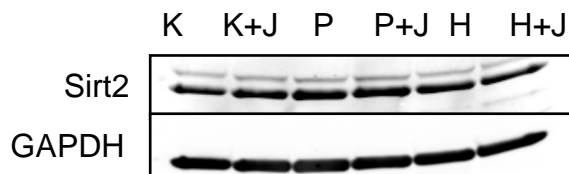
KUVA 4b. Western Blot-kalvo sirtuiini 1:n ilmentymisestä. Ryhmät ovat samat kuin edellä.

9.2 Sirtuini 2

Sirtuini 2 ilmenemisessä ei todettu tilastollisia merkitsevyyksiä (Kuva 5a).



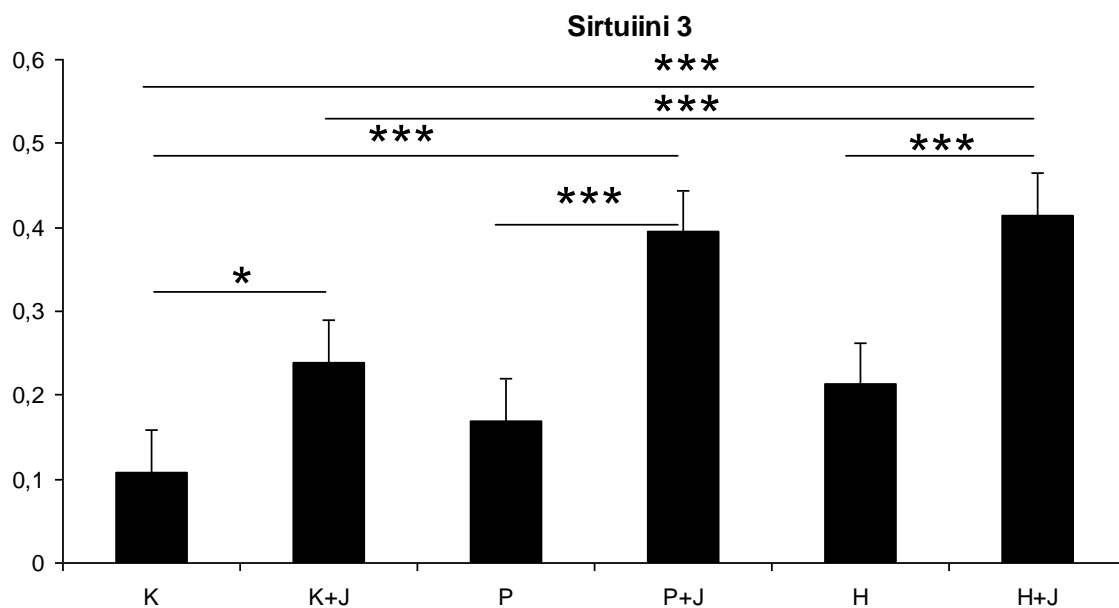
KUVA 5a . Sirtuini 2:n ilmeneminen. K=Kontrolli, K+J= Juoksijakontrolli, P=Proteiinijuoma, P+J= Proteiinijuomaryhmän juoksijat, H=Heraryhmä, H+J= Heraryhmän juoksijat. Ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja.



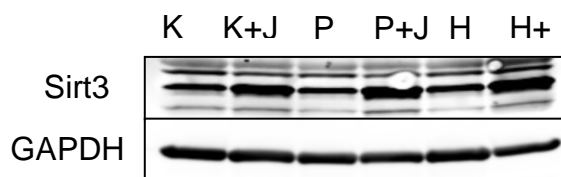
KUVA 5b. Western Blot-kalvo sirtuini 2:n ilmentymisestä.

9.3 Sirtuiini 3

Sirtuiinin 3 ilmenemisessä oli merkittäviä eroja. Kaikki juoksijaryhmät (K+J: $p=0.05$; P+J: $p<0,001$ ja H+J: $p<0,001$) erosivat merkittävästi kontrolliryhmistään K, P ja H. Eroja ilmeni proteiiniryhmän juoksijoiden P+J että heraryhmän juoksijoiden H+J ja kontrolliryhmän K välillä ($p<0,001$). Erittäin merkitseviä eroja oli kontrollijuoksijaryhmän ja heraryhmän juoksijoiden välillä ($p<0,001$) (Kuva 6a).



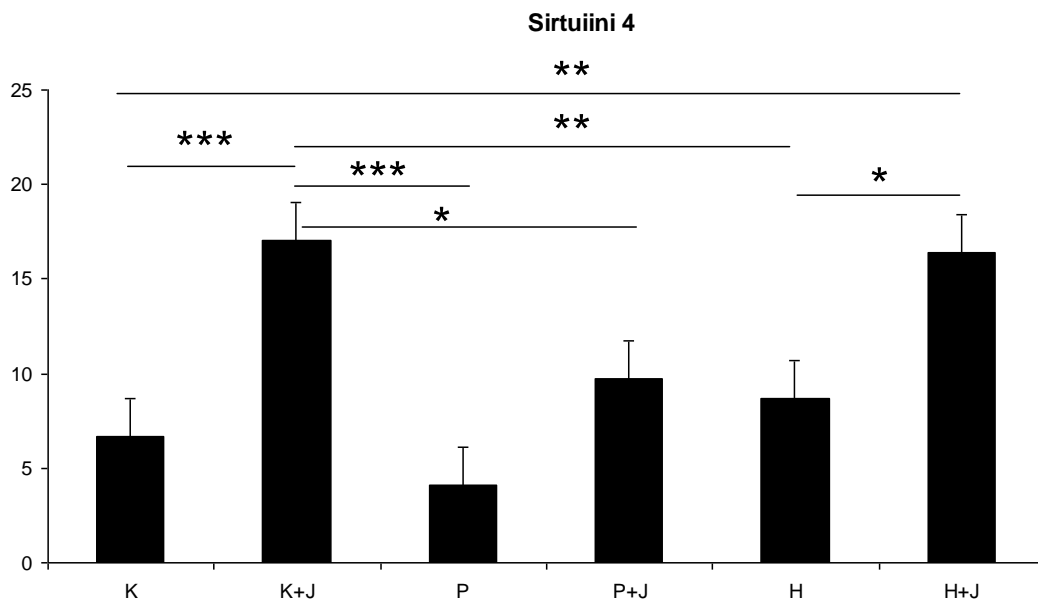
KUVA 6a. Sirtuiini 3:n ilmeneminen. K=Kontrolli, K+J= Juoksijakontrolli, P=Proteiinijuoma, P+J= Proteiinijuomaryhmän juoksijat, H=Heraryhmä, H+J= Heraryhmän juoksijat. (* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$)



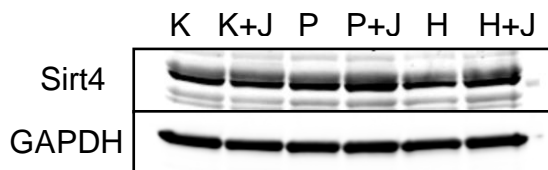
KUVA 6b. Western Blot-kalvo sirtuiini 3:n ilmentymisestä.

9.4 Sirtuiini 4

Sirtuiini 4 ilmentymisessä kontrolliryhmän K ja juoksijaryhmän K+J välillä oli tilastollisesti erittäin merkitsevä ero ($p < 0,001$). Kontrolliryhmä erosi merkittävästi heraryhmän juoksijoista H+J ($p < 0,01$). Heraryhmä H erosi juoksijaryhmästään H+J merkittävästi ($p < 0,01$), mutta proteiiniryhmällä P ei ilmennyt samanlaista vaikutusta. Kontrolliryhmän juoksijoilla K+J oli erittäin merkitsevä ero proteiiniryhmään P ($p < 0,001$), merkittävä ero proteiiniryhmän juoksijoihin P+J ($p < 0,05$), ja merkittävä ero heraryhmään H ($p < 0,01$). Eri dieettiryhmien välillä ei ollut eroja eivätkä ne eronneet kontrolliryhmästä K (Kuva 7a).



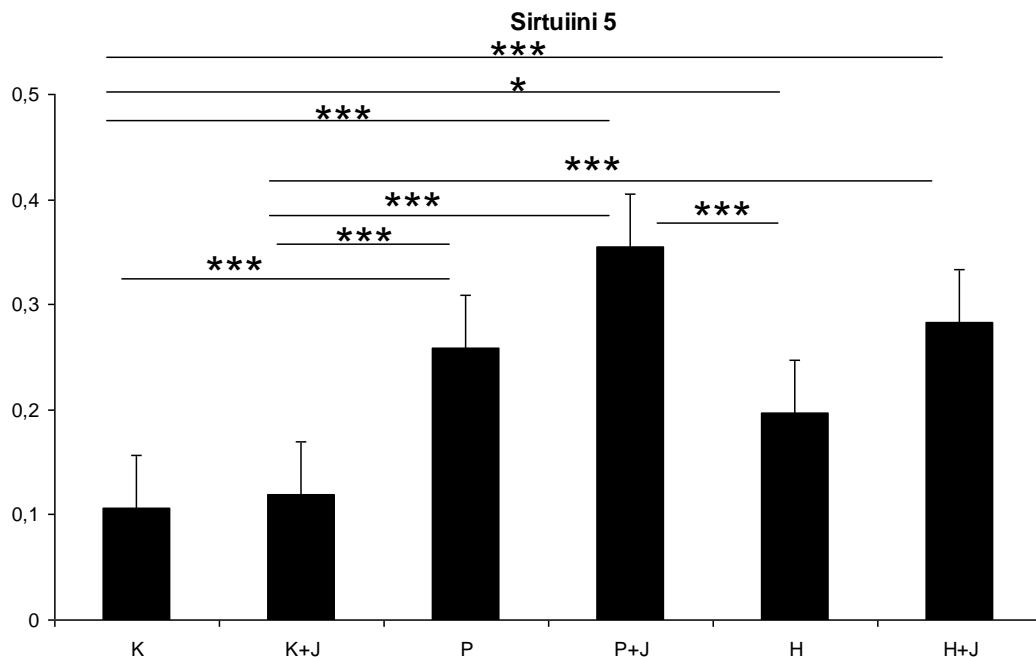
KUVA 7a. Sirtuiini 4:n ilmeneminen. K=Kontrolli, K+J= Juoksijakontrolli, P=Proteiinijuoma, P+J= Proteiinijuomaryhmän juoksijat, H=Heraryhmä, H+J= Heraryhmän juoksijat. (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$)



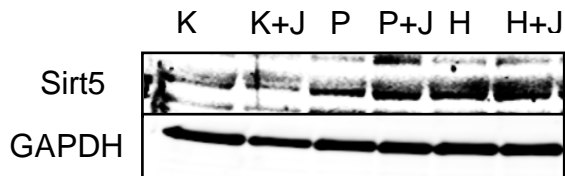
KUVA 7b. Western Blot-kalvo sirtuiini 4:n ilmentymisestä.

9.5 Sirtuiini 5

Sirtuiini 5 ilmentymisessä dieettiryhmät ja niitä vastaavat juoksijaryhmät eivät eronneet keskenään. Kontrolliryhmä K erosi heraryhmästä H merkitsevästi ($p < 0,05$) ja proteiiniryhmästä P erittäin merkitsevästi ($p < 0,001$). Molempien dieettiryhmien juoksijat H+J ja P+J erosivat erittäin merkittävästi kontrolliryhmästä K ($p < 0,001$). Juoksijaryhmä K+J erosi erittäin merkitsevästi proteiiniryhmästä P sekä proteiiniryhmän ja heraryhmän juoksijoista P+J ja H+J ($p < 0,001$). Eri dieettiryhmät eivät eronneet toisistaan (Kuva 8a).



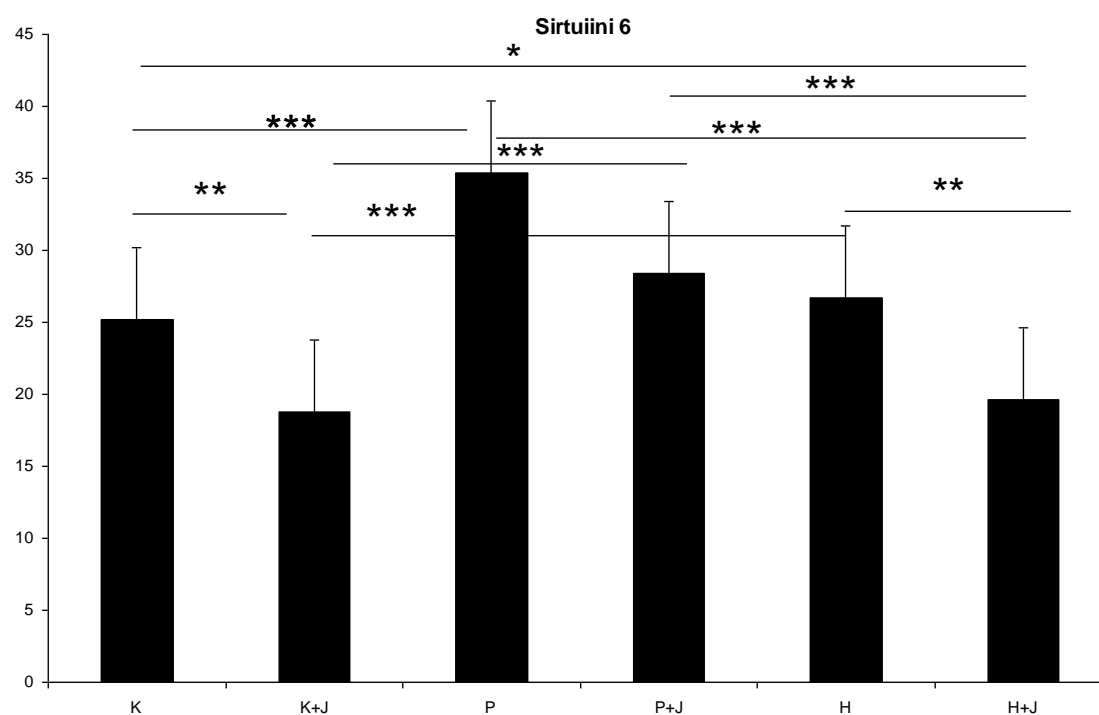
KUVA 8a. Sirtuiini 5:n ilmeneminen. K=Kontrolli, K+J= Juoksijakontrolli, P=Proteiinijuoma, P+J= Proteiinijuomaryhmän juoksijat, H=Heraryhmä, H+J= Heraryhmän juoksijat. (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)



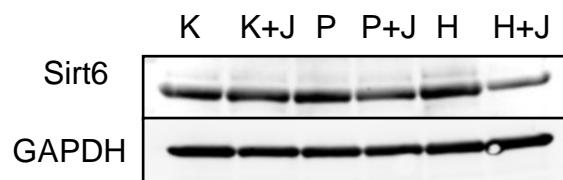
KUVA 8b. Western Blot-kalvo sirtuiini 5:n ilmentymisestä.

9.6 Sirtuini 6

Kontrolliryhmä K erosi juoksijaryhmästä K+J merkittävästi ($p < 0,01$), proteiiniryhmästä P erittäin merkittävästi ($p < 0,001$) ja heraryhmän juoksijoista H+J merkittävästi ($p < 0,05$). Juoksijaryhmä K+J erosi erittäin merkitsevästi proteiiniryhmästä P, proteiiniryhmän juoksijoista P+J ja heraryhmästä H ($p < 0,001$), mutta eroa heraryhmän juoksijoihin H+J ei ilmennyt. Proteiiniryhmällä P oli erittäin merkittävä ero heraryhmän juoksijoihin H+J ($p < 0,001$) ja merkittävä ero heraryhmään H ($p < 0,01$). Proteiiniryhmän juoksijat P+J erosivat heraryhmän juoksijoista H+J erittäin merkittävästi ($p < 0,001$). Heraryhmä H erosi merkittävästi heraryhmän juoksijoista H+J ($p < 0,01$) (Kuva 9a).



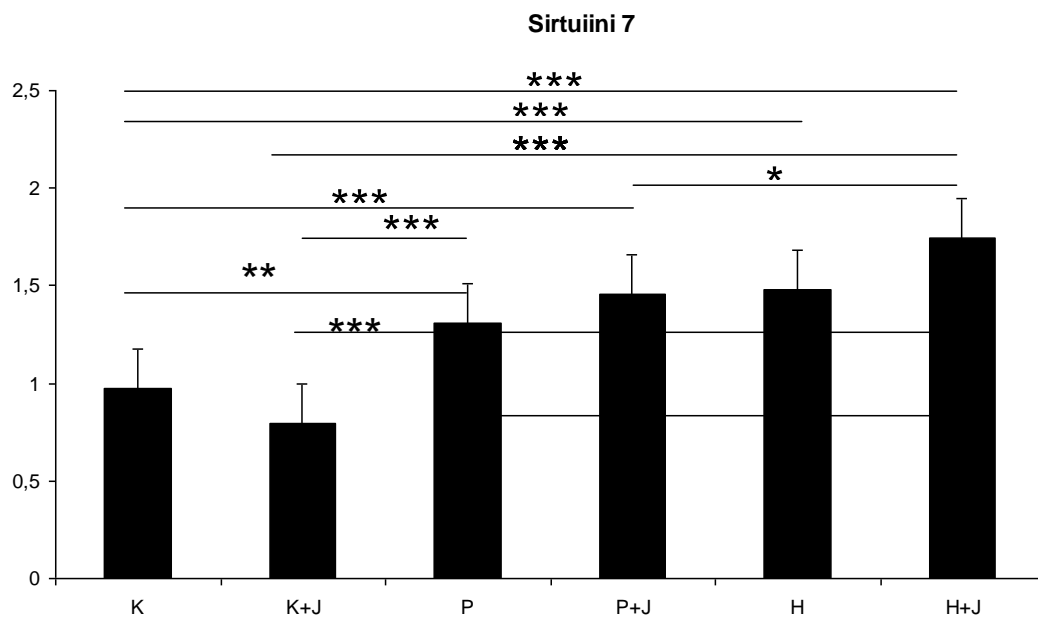
KUVA 9a. Sirtuini 6:n ilmeneminen. K=Kontrolli, K+J= Juoksijakontrolli, P=Proteiinijuoma, P+J= Proteiinijuomaryhmän juoksijat, H=Heraryhmä, H+J= Heraryhmän juoksijat. (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$)



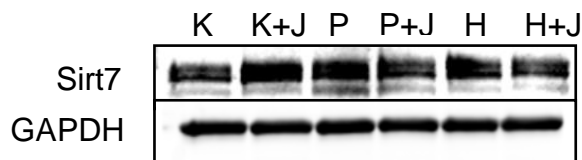
KUVA 9b. Western Blot-kalvo sirtuini 6:n ilmentymisestä.

9.7 Sirtuini 7

Kontrolliryhmästä erittäin merkitsevästi erosivat proteiiniryhmän juoksijat, heraryhmä sekä heraryhmän juoksijat ($p < 0,001$). Proteiiniryhmä erosi kontrolliryhmästä merkittävästi ($p < 0,01$). Juoksijakontrolliryhmä erosi erittäin merkitsevästi sekä proteiini- että heraryhmistä ja niiden juoksijaryhmistä ($p < 0,001$). Proteiiniryhmän juoksijoiden ja heraryhmän juoksijoiden välinen ero oli merkittävä ($p < 0,05$). Dieettiryhmät eivät eronneet toisistaan eivätkä juoksijaryhmistään. (Kuva 10a).



KUVA 10a. Sirtuini 7:n ilmeneminen. K=Kontrolli, K+J= juoksijakontrolli, P=proteiinijuoma, P+J= Proteiinijuomaryhmän juoksijat, H=heraryhmä, H+J= Heraryhmän juoksijat. (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$)



KUVA 10b. Western Blot-kalvo sirtuini 5:n ilmentymisestä.

10 POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, miten liikunta ja valitut dieetit vaikuttavat sirtuiinien ilmenemiseen rottien raajalihaksessa. Lähtöoletuksena oli, että sirtuiini 1:n ilmentyminen nousee merkittävästi juoksijaryhmillä niiden kontrolliryhmiin verrattuna. Bonen ym. totesivat tutkimuksessaan 2010 liikunnan lisäävän lihaksien Sirtuiini 1-aktiivisuutta. Myös Atalay ym. (2010) totesivat säännöllisen liikunnan lisäävän sirtuiini 1:n aktiivisuutta ja lihasten oksidatiivista kapasiteettia. Dieettien vaikutuksesta sirtuiinien ilmentymiseen ei ole aikaisempia tutkimustuloksia. Heran aminohappokoostumuksen tiedetään kuitenkin vaikuttavan suotuisasti lihaksen toimintaan kuten Ha & Zemel (2003) tutkimuksessaan totesivat.

Tutkimuksen tulos oli odotusten vastainen, sillä liikunta ei lisännyt sirtuiini 1:n ilmentymistä. Myöskään sirtuiini 2:n ilmentymisessä ei havaittu tilastollisia eroavaisuuksia. Sirtuiini 2 on sirtuiini 1:stä huomattavasti vähemmän tutkittu ja tunnettu, joten lähtöoletusta liikunnan ja dieettien vaikutuksista tämän sirtuiinin ilmentymiselle ei ollut.

Sirtuiini 3, joka on mitokondriaalisista sirtuiineista vahvin deasetylaasi, ilmentymisessä oli merkitseviä eroja kaikkien juoksijaryhmien ja vastaavien dieetikontrollien välillä, eli liikunnalla oli selvästi dieettejä suurempi vaikutus sirtuiini 3:n ilmentymiseen, ja sen vaikutus tulee esiin liikunnan kautta.

Sirtuiini 4 ilmentymisessä kontrolliryhmän ja juoksijaryhmän välillä oli erittäin merkitsevä ero ja molemmat dieettiryhmät erosivat merkitsevästi kontrolleistaan mutta dieetit eivät eronneet keskenään. Vaikka dieetit eivät eronneet toisistaan, niin dieetit yhdistettyinä liikuntaan toivat tilastollisesti merkitseviä eroja; proteiiniryhmän juoksijoilla ero oli merkitsevä ja heraryhmän juoksijoilla erittäin merkitsevä. Kyseinen sirtuiini kuuluu mitokondriaalisiin sirtuiineihin, ja koska se edistää aminohappojen käyttöä energianlähteenä (Auwrex. ym 2012; Haigis & Sinclair 2010), heraryhmän erittäin merkitsevä ero kontrolliryhmään verrat-

tuna on looginen. Sirtuiini 4 ilmentymisen nousu tapahtuu liikunnan kautta ja heran aminohappokoostumus lisää ilmentymistä edelleen.

Sirtuiini 5 ilmentymisessä liikunnalla ei ollut vaikutusta kontrolliryhmään verrattuna, mutta sekä dieetit että dieettien juoksijaryhmät erosivat kontrollista. Sirtuiini 5 ilmentymisen nousu johtuu näin ollen dieeteistä eikä liikunnalla ole siihen suoraa vaikutusta. Koska dieettiryhmät eivät eronneet toisistaan, voi päätellä että dieetin ravintosisällöllä sinällään ei ollut merkittävää vaikutusta.

Sirtuiini 6 on tärkein energiatasapainoa säätelevä sirtuiini inhiboiden glykolyysiin osallistuvien geenien aktiivisuutta. Juoksijaryhmät erosivat kontrolliryhmistään, ja liikunta vähensi SIRT6:n aktiivisuutta merkittävästi. Koska sirtuiini 6:n alhaiset tasot tehostavat glukoositransporttereiden toimintaa (Clish ym. 2010), voidaan päätellä, että liikunnalla on suotuisa vaikutus solujen glukoosimetaboliaan.

Liikunta ei lisännyt sirtuiini 7:n ilmentymistä kontrolliryhmällä eikä dieettiryhmillä. Kontrolliryhmästä erittäin merkitsevästi erosivat proteiiniryhmän juoksijat, heraryhmä sekä heraryhmän juoksijat. Proteiiniryhmä erosi merkittävästi kontrolliryhmästä. Ilmeisesti ilmentymisen nousu johtuu heraryhmällä ja heraryhmän juoksijoilla siis dieetistä eikä liikunnasta. Proteiiniryhmän kohdalla liikunta kuitenkin nosti ilmentymistä samalle tasolle kuin heraryhmällä ja heraryhmän juoksijoilla. Sirtuiini 7 ilmenee vain vähäisessä määrin luurankoliaksessa; se säätelee rRNA transkriptiota ja solusykliä ja sillä on keskeinen rooli kromatiinin säätelyssä ja syöpäsolujen kehittämisessä. (Altucci ym 2012.) Näin ollen ei ole yllättävää, että raajalihaksen sirtuiini 7-pitoisuus ei reagoanut liikunnan vaikutuksiin.

Tutkittavalla lihaksella voi olla merkitystä tutkimuksen tulokseen. Tutkimuksessaan 2008 Kumagai ym. ovat osoittaneet, että luurankoliaksen sirtuiini 1-pitoisuus on suurempi punaisissa hitaissa lihassoluissa, kuin nopeissa valkoisissa lihassoluissa. Toisaalta, jos liikunta ei vaikuta sirtuiinien ilmentymiseen, tai jos kyseistä sirtuiinia ilmenee tutkittavassa luurankoliaksessa vain vähäisiä määriä, niin tutkittavalla lihaksella ei ole suurta vaikutusta.

Vaikka sirtuiinien ja liikunnan välisiä yhteyksiä onkin tutkittu, lisätutkimuksia tarvitaan. Liikunnan avulla sirtuiinit saavat geenejämme ilmentymään suotuisasti, ja se on asia, jolla on vaikutusta meille kaikille. Tässä tutkimuksessa mukana olleet maitopohjainen proteiinijuoma- ja heradieetti osoittivat niiden olevan esimerkkejä ruokavalioista, joilla saattaisi olla suotuisia vaikutuksia sirtuiinien ilmentymiseen.

Useat sirtuiinit itsessäänkin kaipaavat vielä lisätutkimuksia, jotta ymmärtäisimme niiden toimintamekanismeja. Sirtuiinit nousevat esiin lukuisissa eri tutkimusyhteyksissä, ja ne ovat varmasti yksi tämän hetken ja tulevaisuuden kiehtovimmista tutkimusaiheista. Kun tiedetään enemmän sirtuiinien toiminnasta, ja ennen kaikkea siitä, miten niihin voidaan vaikuttaa, ja millaisia mahdollisuuksia niiden toimintaa modifioimalla saavutetaan, sirtuiinien avulla voidaan vaikuttaa useaan elämänlaatuun liittyvään mekanismiin.

11 LÄHTEET

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2004. *Essential cell biology*. Garland Science, New York.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 2008. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science.
- Alt, F.W, Bronson, R.T., Chai, H. , Deng, C., Gao, J., Kurtev, M.V., Lombard, D.B., Schneider, J.I, Schumacher, B., Schwer, B., Tsai, L., Xiao, C. 2010. Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity. *PNAS*. 107, 21790–21794.
- Altucci, L., Carafa, V., Nebbioso, A. 2012. Sirtuins and disease: The road ahead. *Front Pharmacol*, 3, 4.
- Allouche, L., Chapot, P.A., Heberlein, U., Kong, K. Moore, E.C, Vranizan, M.S. Wolf, F.W. 2010. Ethanol-Regulated Genes That Contribute to Ethanol Sensitivity and Rapid Tolerance in *Drosophila*. *Alcohol Clin Exp Res*. 34, 302–316.
- Anthony, J.C., Anthony, T.G., Yoshizawa, F., Vary, T.C., Jefferson L.S., Kimball, S.R. 2000. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *The Journal of Nutrition*. 10, 2413–2419.
- Arakawa, M., Masaki, T., Nishimura, J., Seike, M., Yoshimatsu, H. 2010. Isoleucine prevents the accumulation of tissue triglycerides and unregulates the expression of PPAR α and uncoupling protein in diet-induced obese mice. *The Journal on Nutrition* 3, 496-500.
- Atalay, M., Boldogh, I., Goto, S., Naito, H., Koltai, E., Nyakas, C., Radak, Z., Szabo, Z. 2010. Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development*. 131, 21–28.
- Auwerx, J., Houtkooper, R.H., Pirinen E. Sirtuins as regulators of metabolism and health-span. *Nature Reviews Molecular cell biology*, 13, 225–238.

- Bare, O.L., Bordone, L., Chen, S., Feng, Y., Fortier, E., Nasrin, N., Ren, X., Streeper R.S., Wu, Z., Wu X. 2010. Sirt4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells. *The journal of biological chemistry*. 285, 31995–32002.
- Baur. J. 2010. *Pathways™ Magazine*. Sirtuins and oxidative stress. 12, 12–13.
- Bardag-Gorce, F., Fu, P., French B.A., French S.W., Li, J., Oliva J. 2008. Sirt1 is involved in energy metabolism: The role of chronic ethanol feeding and resveratrol. *Experimental and Molecular Pathology*, 3, 155-159.
- Bay, B., Ling, L.S., Lwin, Z.M., Kumar, S.D, Shoba, B., Yip, G.W. 2009. Function of Sirtuins in Biological Tissues. *The anatomical record*, 292, 536-543.
- Berber, E., Bohr, V.A., Boxer, L.D., Burlingame, A.L., Chua, K.F., Gozani, O., Guan, S., Hong, T., Kusumoto, R., McCord, R.A., Michishita, E., Shi, X. 2009. SIRT6 stabilizes DNA-dependent Protein Kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *AGING*, 1, 109-121.
- Biswas, M., Iyer, K.R, Kumaran, S.P., Laloraya S., Maqani, N., Rai, R., Sendinc, E., Smith, J.S. 2009. Limiting the extent of the RDN1 heterochromatin domain by a silencing barrier and Sir2 protein levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 10, 2889–2898.
- Boldogh, I., Goto, S., Higuchi, M., Koltai, E., Kumagai, S., Ohno, H., Radak, Z., Taylor, A.W. 2013. Redox-regulating sirtuins in aging, caloric restriction, and exercise. *Free Radical Biology and Medicine* 58, 87-97.
- Bonen, A., Gurd, B.J, Heigenhause, G.J.F, Holloway, G.P, McFarlan, J.T, Moyes, C.D, Spriet, L., Yoshida, Y. 2011. Nuclear SIRT1 activity, but not protein content, regulates mitochondrial biogenesis in rat and human skeletal muscle. *American Journal of Physiology* 301: R67-R75.
- Bonen, A., Gurd, B.J., Heigenhauser, G.J.F., Perry, C.G.R., Spriet, L.L. High-intensity interval training increases SIRT1 activity in human skeletal muscle. 2010. *Appl. Physiol. nutr. Metab.* 35, 350–357.

- Bonen, A., Gurd, B.J., Holloway G.P., Lally J., Yoshida, Y., 2009. The deacetylase enzyme SIRT1 is not associated with oxidative capacity in rat heart and skeletal muscle and its overexpression reduces mitochondrial biogenesis. *The Journal of Physiology* 587, 1817–1828.
- Breslow, R., Kelly, W.K., Marks, P.A., Miller, T., Richon, V., Rifkind, R.A. 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Reviews Cancer* 1, 194–202.
- Campbell, M. 1995. *Biochemistry*. Saunders College Publishing, Florida.
- Clish, C.B., Dor, y., D'Urso, A., Ellisen, L.W., Espinosa, J.M., Guimaraes, A., Henry, R.E., Iliopoulos, O., Kurland, I., Marinelli, B., Mostoslavsky, R., Nir, T., Sebastian, C., Shirihai, o.S., Toiber, D., Vadysirisack, D.D., Vaitheesvaran, B., Weissleder, R., Wikstrom, J.D., Zhong, L. 2010. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1 α . *Cell* 140, 280–293.
- Deng, C., Finkel, T., Mostoslavsky R. 2009. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 450, 587–591.
- Deng, C., Gavrilova, O., Gius, D., Jou, W., Kim, H., Lahusen, T., Wang, R., Xiao, C., Xu, X. 2010. SIRT6 deficiency results in severe hypoglycemia by enhancing both basal and insulin-stimulated glucose uptake in mice. *The journal of biological chemistry*. 47, 36776–36784.
- Denu, J.M., Smith, B. 2008. Chemical mechanisms fo histone lysine and arginine modifications. *Biochim biophys acta* 1, 45–57.
- Denu, J.M, Tong, L. 2010. Function and metabolism of sirtuin metabolite O-acetyl-ADP-ribose. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins& Proteomics*. 1804, 1617–1625.
- Deubzer, H.E., Milde, T., Oehme, I., Witt, O. 2009. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Letters* 277, 8–21
- Doi, M., Mochizuki, S., Nakayama, M., Sugahara, K., Yamaoka I., Yoshizawa F. 2005. Isoleucine, a blood glucose-lowering amino acid, increases glucose uptake in rat skeletal muscle in the absense of increases in AMP-activated protein kinase activity. *Journal of Nutrition* 9, 2103–2108.

- Eller, L.K., Reimer, R.A. 2010. Dairy protein attenuates weight gain in obese rats better than whey or casein alone. *Obesity*. 4, 704–711.
- Ford, E., Grummt, I., Guarente, L., Liszt, G., Magin, C., Voit, R. 2005. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes & Development* 20, 1075–1080.
- Gorbunova, V., Ke, Z., Mao, Z., Seluanov, A., Tian, X., Van Meter, M. 2012. Sirtuin 6 (SIRT6) rescues the decline of homologous recombination repair during replicative senescence. *PNAS* 29, 11800–11805.
- Gorbunova, V., Mao, Z., Seluanov, A., Van Meter, M. 2011. Repairing split ends: SIRT6, mono - ADP ribosylation and DNA repair. *AGING*. 9, 829–835.
- Grant, P.A. 2001. A tale of histone modifications. *Genome Biology reviews*0003-reviews0003.6.
- Gregory, S., Kelly, G. 2010. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol;part 2. *Alternative Medicine Review* 15, 313–328.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E. 2011. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: W. B. Saunders company.
- Ha, E., Zemel, M.B. 2003. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 14, 251–258.
- Haigis, M.C., Laurent, G., Lomb, D.J. 2010. Sirtuins regulate key aspects of lipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1804, 1652–1657.
- Haigis, M.C. & Sinclair, D.A. 2010. Mammalian sirtuins: Biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*. 5, 253-295.
- Hakala, M., Koivula, M-K., Risteli, J. 2012. Onko nivelreuma infektiosairaus? *Duodecim* 2012;128:237–9.
- He, W., Ho, L., ewman, J.C, Verdin, E., Wang, M.Z. 2012. Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 9, 467- 476.

- Hirschev, M.D., Ho, L., Huang, J., Shimazu, T., Verdin E. 2010. Mitochondrial sirtuins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins& Proteomics*. 1804, 1645–1651.
- Ho, C-H., Lai, C-S., Pan, M-H., Tsai, M-L., Wu, J-C. 2012. Molecular mechanism for anti-aging by natural dietary compounds. *Molecular nutrition & Food Research*. 56, 88–115.
- Hoffman, J.R. & Falvo, M.J. 2004. Protein - which is best? *Journal of Sports Science and Medicine* 3, 118–130.
- Hutson, S.M., LaNoue, K.F., Sweatt A.J. 2005. Branched-chain amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes. *Journal of Nutrition* 6, 1557S-1564S.
- Jia, G., Liu, X., Singhal, S., Su, L. 2012. Emerging roles of SIRT6 on telomere maintenance, DNA repair, metabolism and mammalian aging. *Molecular and cellular biochemistry*, 364, 345–350.
- Kazgan, N., Li, X. 2011. Mammalian sirtuins and energy metabolism. *International journal of biological sciences*. 7, 575–587.
- Kelly, G. 2010. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol:part 1. *Alternative Medicine Review* 3, 245–263.
- Kivirinta, P. 2008. Design and synthesis of silent information regulator human type 2 (SIRT2) inhibitors. *Kuopio University Publications A. pharmaceutical sciences* 114, ISBN 978-951-27-0852-9.
- Koya., D., Kume, S., Liang F. SIRT1 and insulin resistance. 2009. *Nature Reviews*, 5, 367–373.
- Kumagai, S., Nakano, H., Radak, Z., Suwa, M. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor GAMMA coactivator-1 α protein expressions in rat skeletal muscle. 2008. *Metabolism*, 57, 986–998.
- Laakso, M. 2007. Sirtuinit - energiatasapainon ja glukoosimetabolian uudet molekyylit. *Duodecim* 123, 2291–2292.
- Lebiendzinska, M., Mariusz, R., Iliveira, P.J., Pereira C.V. 2011. Regulation and protection of mitochondrial physiology by sirtuins. *Mitochondrion*, 12, 66–76.

- Letzel, S., Mahlknecht, U., Voelter-Mahlknecht, S. Fluorescence in situ hybridization and chromosomal organization of the human sirtuin 7 gene. 2005. *International journal of oncology*, 28, 899–908.
- Lu, Z., Sack M., Scott, I, Webster B.R. 2012. The role of sirtuins in modulating redox stressors. *Free radical biology and medicine*. 2, 281–290.
- Marshall, K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review* 9, 2,136-156.
- Martinez-Pastor, B., Mostoslavsky R. 2012. Sirtuins, metabolism and cancer. *Frontier in pharmacology*, 3, 1-7.
- Matthews, D.E. 2005. Observations of branched-chain amino acid administration in humans. *The Journal of nutrition*. 135, 15803S-1584S.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. 2008 *Lehninger principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers.
- Relton, C.L., Smith, G.D. 2010. Epigenetic Epidemiology of Common Complex Disease: Prospects for Prediction, Prevention, and Treatment. *PLOS* 10, 1-8.
- Taipale, M. 2006. Epigenetiikka, geenin säätely ja syöpä. *Duodecim* 122, 2611–2618.