

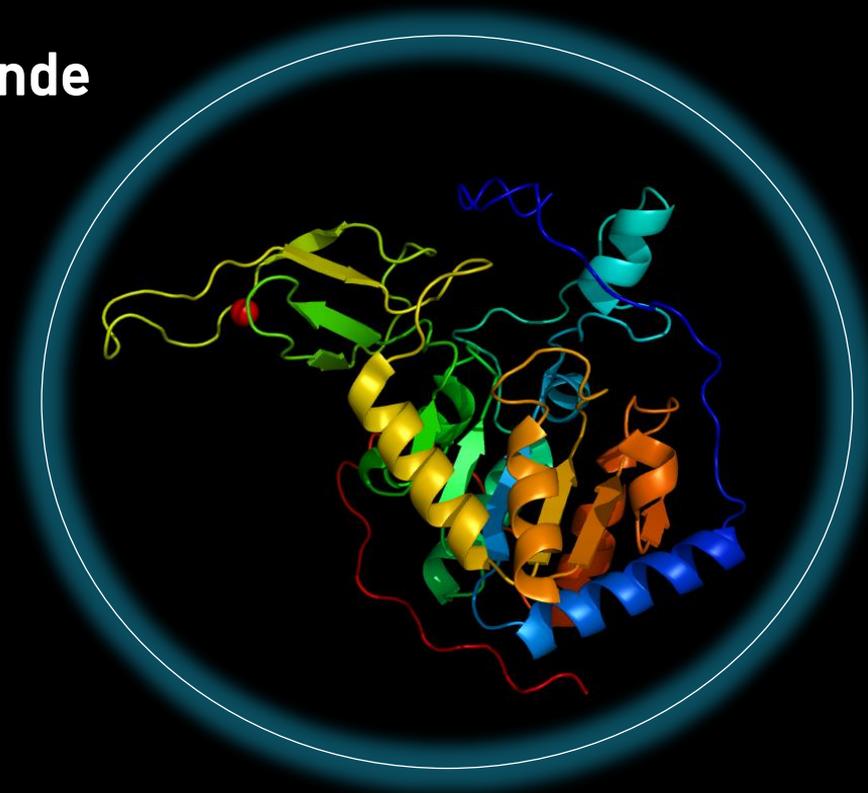
Modulación redox de Sirt6, enzima clave del metabolismo y la inflamación

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas - Subárea Bioquímica - PEDECIBA

Lic. Mara Carreño

Directora: Ana Denicola

Co-Director: Carlos Escande



Laboratorio de Físicoquímica Biológica
Facultad de Ciencias, UdelaR
Julio 2019

RESUMEN

Las sirtuinas pertenecen a la clase III de las HDAC, histona deacilasas, que dependen de NAD^+ en vez de Zn^{2+} como lo hacen otras clases de HDAC. Se ha reportado que la actividad de las sirtuinas es clave en la regulación del metabolismo, en inflamación y respuesta al estrés. La deficiencia en sirtuinas está asociada con envejecimiento temprano y patologías asociadas con estrés oxidativo como neurodegenerativas, cardiovasculares y diabetes tipo II. En humanos hay siete isoformas; la Sirt1 nuclear es la más estudiada; la Sirt6 también nuclear está menos caracterizada. Si bien *in vivo* se ha visto que Sirt6 desacetila en forma eficiente histona 3 (principalmente H3K9 y H3K56), *in vitro* presenta muy escasa actividad desacetilasa y prefiere sustratos de cadena acilada larga, pero es interesante la activación reportada de la actividad desacetilasa en presencia de ácidos grasos.

El objetivo de nuestro trabajo fue investigar la potencial modulación redox de hSirt6 caracterizando cambios estructurales y funcionales en determinadas condiciones redox.

Se expresó y purificó Sirt6 humana recombinante (hSirt6) en *E. coli*. Se pusieron a punto ensayos de actividad (método espectrofotométrico continuo, acoplado enzimático y método discontinuo cuantificando producto por HPLC-fluorescencia). Como sustratos se usaron péptidos sintéticos con la secuencia de H3 conteniendo lisina 9 acetilada o miristoilada.

La incubación de hSirt6 con H_2O_2 (100x, 30 min) produjo la oxidación de la mayoría de los tioles proteicos (hSirt6 contiene seis residuos de cisteína, uno C-terminal, otro N-terminal y cuatro en el core coordinando al Zn^{+2}), sin embargo, la actividad desacetilasa no se alteró significativamente. En cambio, el tratamiento con exceso de peroxinitrito redujo el contenido de tioles proteicos con una pérdida importante de actividad (se observa también nitración de tirosinas y liberación de Zn^{2+}). Los tratamientos con estos oxidantes también se acompañaron de cambios en estructura cuaternaria (disulfuros intra e intermoleculares, además de dímeros por ditirosinas). Se confirma el aumento de actividad desacetilasa *in vitro* en presencia de ácido oleico en exceso. Sorprendentemente, la incubación con el derivado electrofílico ácido nitro-oleico no inactivó la enzima (que posee una histidina catalítica, H133), por el contrario, la activación fue mayor que con el ácido graso. El mismo efecto se obtuvo con otros nitrolípidos como el NO_2 -CLA, ácido nitro-linoleico conjugado (el más abundante en plasma humano). Se constató la formación de aducto de Michael con cisteínas de la enzima, en particular C18 en el extremo N-terminal y C141, una de las cisteínas que coordina al zinc, pero no con la H133 catalítica. Así mismo, se observaron cambios conformacionales luego de la incubación con el nitrolípido, evidenciados en los espectros de dicroísmo circular en el UV cercano. Si bien la actividad desacetilasa *in vitro* se incrementa en presencia de nitro ácidos grasos, la actividad demiristoilasa no se ve afectada. Este efecto activador no se observa para la isoforma Sirt1, apuntando a los nitrolípidos como activadores selectivos de hSirt6.

| | |
|---|----------|
| 1. Introducción | 5 |
| 1.1. Isoformas de sirtuinas | 6 |
| 1.2. Estructura de sirtuinas | 7 |
| 1.2.1. Núcleo catalítico | 8 |
| 1.2.2. Regiones variables | 9 |
| 1.2.3. Características propias de Sirt6 | 10 |
| 1.3. Actividad desacetilasa, deacilasa y ADP-ribosiltransferasa | 11 |
| 1.4. Mecanismo de reacción | 12 |
| 1.5. Funciones de Sirt6 | 14 |
| 1.5.1. Estabilidad genómica y reparación de ADN | 15 |
| 1.5.2. Metabolismo | 16 |
| 1.5.3. Inflamación | 18 |
| 1.5.4. Cáncer | 19 |
| 1.6. Regulación | 20 |
| 1.6.1. Regulación por metabolitos endógenos | 20 |
| 1.6.2. Regulación exógena | 21 |
| 1.7. Modificaciones post-traduccionales de Sirt6 | 22 |
| 1.8. Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno | 23 |
| 1.9. Ácidos grasos y nitro ácidos grasos | 26 |
| 1.10 Hipótesis de trabajo | 29 |
| | |
| 2. Objetivos | |
| 2.1 Objetivo general | 30 |
| 2.2 Objetivos específicos | 30 |
| | |
| 3. Materiales y métodos | |
| 3.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes | 31 |
| 3.1.1. Producción de células competentes | 31 |
| 3.1.2. Transformación de células competentes | 32 |
| 3.1.3. Expresión y purificación de hSirt6 | 32 |
| 3.1.4. Expresión y purificación de Pnc1 | 33 |
| 3.1.5. Secuenciación de hSirt6 | 34 |
| 3.1.6. Mutagénesis de hSirt6 | 35 |
| 3.2. Ensayos enzimáticos | |
| 3.2.1. Actividad desacetilasa y deacilasa de hSirt6 | 36 |
| a - Ensayo acoplado | 36 |

| | |
|---|----|
| b – Ensayo por HPLC | 38 |
| 3.2.2. Actividad nicotinamidasasa de Pnc1 | 40 |
| 3.2.3. Tratamiento de hSirt6 con oxidantes | 40 |
| 3.2.4. Tratamiento de hSirt6 con ácidos grasos y nitro ácidos grasos | 40 |
| 3.3. Procedimientos generales | |
| 3.3.1. Reducción de tioles | 41 |
| 3.3.2. Cuantificación de tioles reducidos con ditiodipiridina (dtdPy) | 41 |
| 3.3.3. Alquilación de hSirt6 con NEM | 42 |
| 3.3.4. Cuantificación de Zn ²⁺ | 42 |
| 3.3.5. Análisis estructural por CD | 43 |
| 3.3.6. Geles de poliacrilamida para electroforesis | 44 |
| 3.3.7. Electroforesis diagonal | 44 |
| 3.3.8. Western blot anti-Sirt6 | 45 |
| 3.3.9. Western blot anti-NO ₂ Tyr | 46 |
| 3.3.10. Western blot anti-NO ₂ -OA-Bt | 46 |
| 3.3.11. Identificación de proteínas por MS | 46 |
| 3.3.12. ESI-MS/MS para identificación de aductos | 46 |
| 3.3.13. Modelado molecular computacional | 47 |
| 3.3.14. Análisis estadístico | 48 |
| 4. Resultados y discusión | |
| 4.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes | 49 |
| 4.1.1. hSirt6 | 49 |
| 4.1.2. Pnc1 | 53 |
| 4.2. Medidas de actividad | 54 |
| 4.3. Exposición a oxidantes | 55 |
| 4.3.1. Efectos estructurales | 57 |
| 4.3.2. Efectos sobre la actividad enzimática | 61 |
| 4.4. Efectos de ácidos grasos y nitro ácidos grasos sobre hSirt6 | 62 |
| 4.4.1. Aductos de Michael | 69 |
| 4.4.2. Modelado molecular computacional | 78 |
| 5. Conclusiones y perspectivas | 80 |
| 6. Referencias | 83 |
| 7. Anexo | 89 |
| 8. Agradecimientos | 90 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|--|
| ADP | Adenosina difosfato |
| ADPr | ADP-ribosa |
| CD | Dicroísmo circular |
| CLA | Ácido linoleico conjugado |
| CMC | Concentración micelar crítica |
| DEPC | Pirocarbonato de dietilo |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DO | Densidad óptica |
| dtdPy | 4-4'-Ditiodipiridina |
| DTT | Ditiotreitol |
| ESI-MS | <i>Electrospray ionization - mass spectrometry</i> |
| FNU | Fracción no unida |
| FPLC | <i>Fast protein liquid chromatography</i> |
| GDH | Glutamato deshidrogenasa |
| GST | Glutación S-transferasa |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrógeno |
| HDAC | Histona desacetilasa |
| HNE | 4-Hidroxinonenal |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| hSirt6 | Sirtuina 6 humana |
| IAM | Iodoacetamida |
| IMAC | Cromatografía por metales inmovilizados |
| IPTG | Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido |
| KO | Knock-out |
| LacI | Represor del operón Lac |
| MALDI-TOF-MS | <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization/Time of flight- mass spectrometry</i> |
| NAD | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| NAM | Nicotinamida |
| NEM | N-Etilmaleimida |
| OA | Ácido oleico |
| ONOO⁻ | Peroxinitrito |
| PAR | 4-(2-Pyridylazo)-resorcinol |
| p-CMB | p-Cloromercuriobenzoato |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| RBS | Sitio de unión a ribosoma |
| RNS | Especies reactivas del nitrógeno |
| ROS | Especies reactivas del oxígeno |
| rpsB | Proteína ribosomal 30S |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante |
| SN1, SN2 | Sustitución nucleofílica tipo 1 o 2 |
| TCEP | Tris-(2-carboxietil)fosfina |
| β-ME | β-Mercaptoetanol |

1. INTRODUCCIÓN

Los residuos de lisina en las histonas son sujeto de varias modificaciones, dentro de las que se encuentran la metilación, acetilación, ubiquitinación y sumoilación en el grupo ϵ -amino. En general, la acetilación de histonas va de la mano con la activación génica, mientras que la desacetilación se correlaciona con el silenciamiento génico. Al acetilarse una lisina, disminuye la carga positiva de la histona resultando en una menor afinidad por el ADN, dando como resultado una cromatina menos condensada. De esta forma se permite la entrada de toda la maquinaria de traducción. Las enzimas encargadas de la desacetilación de histonas son las HDAC (histonas desacetilasas). La forma en la que actúan las HDAC consiste en reducir los niveles de acetilación de las colas N-terminales de las histonas dentro de la cromatina, causando la represión o el silenciamiento de ciertos genes [1]. Estas HDAC se dividen en cuatro clases; clase I, II y IV (*Figura 1*) comparten cierta homología de secuencia y presentan un mecanismo catalítico dependiente de Zn^{2+} ; la clase III se diferencia de las anteriores por su secuencia, estructura y función. A su vez, su mecanismo catalítico depende de NAD^+ y no de Zn^{2+} (que posee un rol estructural) [1, 2].

Las HDAC de clase III denominadas como sirtuinas, involucran a una familia muy conservada de desacetilasas dependientes de NAD^+ que juegan un importante rol regulatorio tanto en procesos fisiológicos como patológicos del organismo, como ser: envejecimiento, cáncer, obesidad, resistencia a insulina, respuesta inflamatoria y metabolismo energético [3].

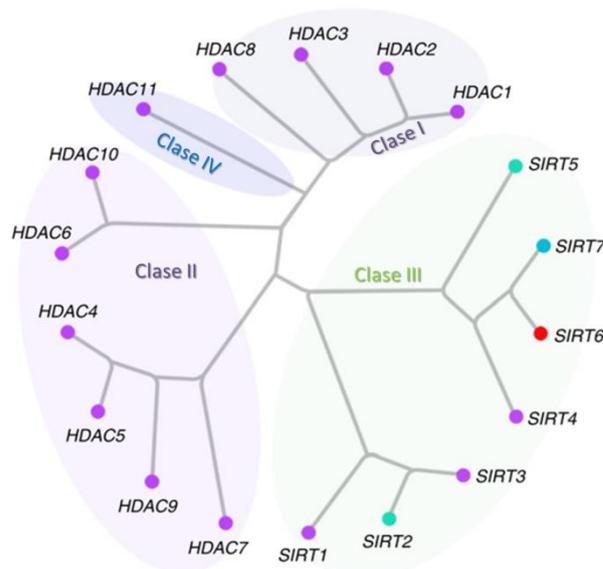


Figura 1 - Clasificación filogenética de las HDAC. Se dividen en cuatro clases. A su vez, dentro de la clase III, las sirtuinas se dividen en cuatro sub-clases por su similitud de secuencia. Clase I: Sirt1, Sirt2 y Sirt3, clase II: Sirt4, Clase III: Sirt5, Clase IV: Sirt6 y Sirt7 [4]. Tomada de [5].

El primer gen de sirtuina en ser descubierto fue SIR2 (*Silent mating type Information Regulatory 2*) de *Saccharomyces cerevisiae*, conocido por ser parte del mecanismo que regula el silenciamiento transcripcional en levadura, desacetilando histona 3 y 4 en una reacción que consume NAD^+ . El hallazgo de homólogos de SIR2 en levaduras y organismos que van desde bacterias a mamíferos y plantas, demuestra que SIR2 es miembro de una amplia familia, la que hoy se conoce como sirtuinas [3, 6]. El genoma humano codifica para siete proteínas SIR2-like que filogenéticamente pertenecen a la familia de desacetilasas de histonas HDAC.

1.1. Isoformas de sirtuinas

En mamíferos existen siete isoformas de Sirt (1 a 7) que si bien comparten aspectos de su estructura, difieren en su localización subcelular y regulación. En el núcleo se localizan las isoformas 1, 6 y 7. Hay evidencia que indica que Sirt1 puede translocar al citosol, y que Sirt7 se encuentra en el nucléolo [7, 8]. Estas isoformas nucleares se encargan de la reparación del daño al ADN. Dentro del citosol se encuentra Sirt2, interactuando con proteínas del citoesqueleto [9] y en la mitocondria se encuentran las isoformas 3, 4 y 5, encargadas de la regulación de la producción de energía [10]. Por lo cual, además de histonas, las sirtuinas son capaces de desacilar a otras proteínas, como factores de transcripción y enzimas [11]. Como se verá más adelante, otra de las diferencias entre las siete isoformas es el tipo de reacción que catalizan. Algunas de ellas son buenas actuando como deacilasas, otras particularmente como desacetilasas y algunas actúan también como ADP-ribosiltransferasas (*Figura 2*).

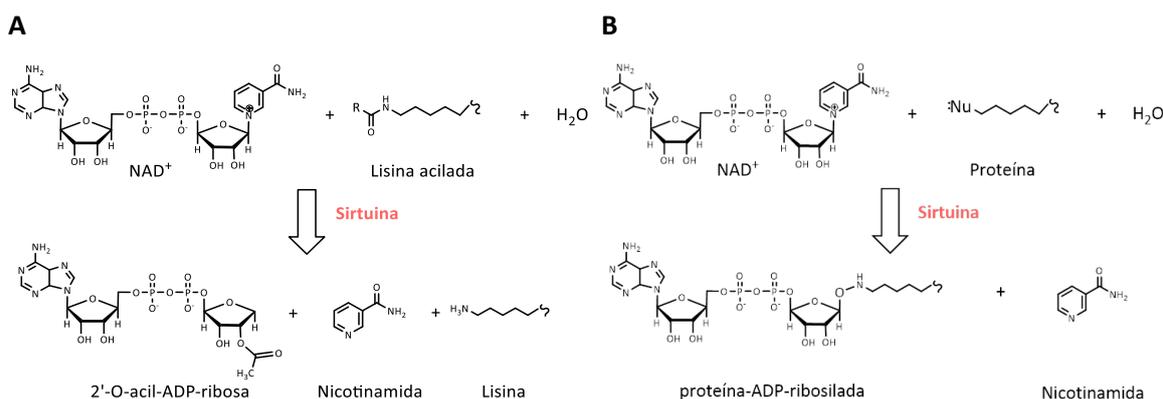


Figura 2 - Reacciones catalizadas por sirtuinas. (A) Actividad deacilasa. A partir de NAD^+ y un sustrato con lisina acilada, se obtiene 2'-O-acil-ADP-ribose, nicotinamida y el sustrato con la lisina. **(B)** Actividad ADP-ribosiltransferasa. A partir de los mismos sustratos se obtiene proteína-ADP-ribosilada. En ambos casos se libera nicotinamida, inhibidor no competitivo de la reacción.

Las siete isoformas poseen aspectos en común, como ser la estructura del sitio catalítico, el mecanismo de reacción, entre otros. Si bien en este trabajo centraremos nuestra atención en

Sirt6, a lo largo del mismo se describirán características generales que comparten todas las isoformas, haciendo hincapié en las particularidades de Sirt6.

1.2. Estructura de Sirtuinas

Todas las sirtuinas humanas comparten un núcleo catalítico de aproximadamente 260 aminoácidos y poseen regiones N-terminal y C-terminal muy variables en su longitud y secuencia como se representa en la *Figura 3* donde se indica el número de residuos aminoácidos de cada región.

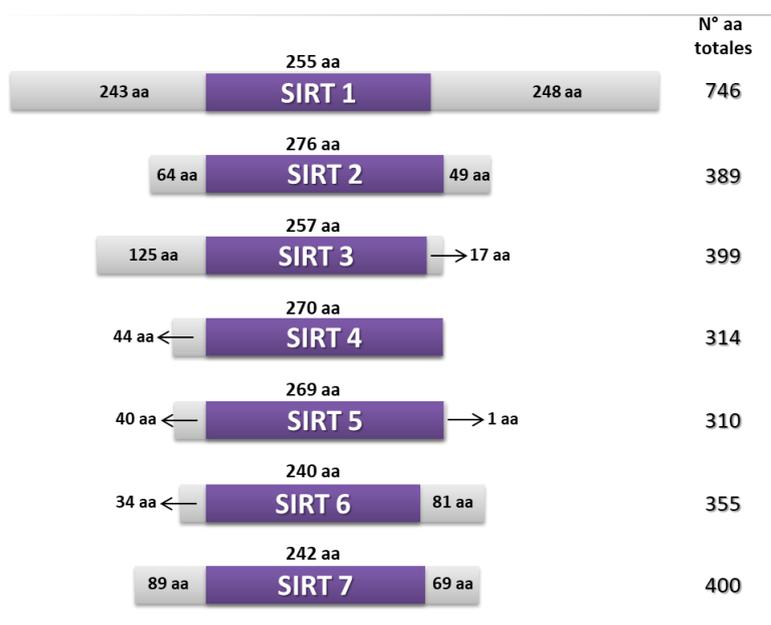


Figura 3 - Las siete isoformas existentes en mamíferos comparten un núcleo catalítico y varían en sus extremos Nt y Ct. Imagen adaptada de [12].

Las siete isoformas comparten 22% a 50% de identidad en la secuencia de aminoácidos, 27% a 88% de identidad en los dominios conservados. En la *Figura 4* se muestra el alineamiento de secuencia de las siete isoformas humanas de Sirt, donde se señalan residuos aminoácidos conservados como la histidina catalítica, así como otras secuencias y características que se detallarán más adelante. De todas las isoformas, Sirt1 es la más similar a SIR2 de *S. cerevisiae* siendo la que presenta más robustez en lo que refiere a actividad desacetilasa.

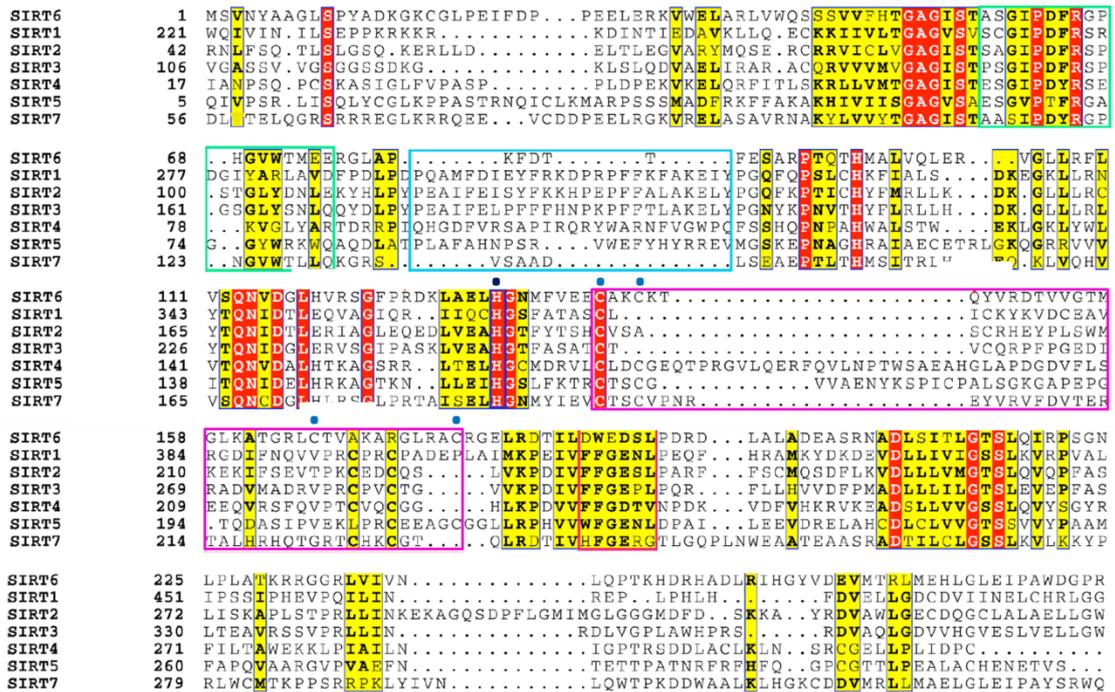


Figura 4 - Alineamiento de secuencia de las isoformas 1 a 7 de sirtuina. En rojo se señalan los aminoácidos conservados y en amarillo los residuos químicamente similares entre secuencias. El punto negro señala la histidina catalítica (H133 en hSirt6) y conservada entre secuencias. Dentro del recuadro rosado se señala la secuencia que contiene al Zn²⁺ (los puntos azules señalan las cisteínas involucradas en la coordinación de Zn²⁺ de Sirt6) y en el recuadro verde el *loop* de unión a cofactor (ver 1.2.3). Imagen adaptada de [13].

1.2.1. Núcleo catalítico

El núcleo catalítico está formado por dos dominios globulares, uno grande y uno pequeño. El dominio grande posee plegamiento de Rossmann característico de enzimas que unen NAD(H)/NADP(H). Este tipo de estructura consiste en seis hebras β organizadas en hoja β paralela, con cuatro α -hélices flanqueantes a la cara distal del sitio activo, y dos α -hélices en la cara opuesta, donde se encuentra el dominio de unión a zinc. Este último es el dominio pequeño del núcleo catalítico que está compuesto a su vez por dos módulos, el módulo helicoidal (formado por 4 α -hélices) y el módulo de unión a zinc que contiene un átomo de Zn²⁺ coordinado por cuatro cisteínas (Figura 5) [14, 15]. En la interface de los dos dominios, que no están unidos por interacción directa sino conectados por dos *loops* flexibles, se forma una hendidura perpendicular al eje de la molécula, que corresponde al sitio de unión a sustratos formado por un bolsillo de unión a NAD⁺ y un canal de lisina (Figura 5A). El bolsillo de unión a NAD⁺ a su vez está dividido en tres regiones. La región A, más expuesta, que une la fracción adenosina del ADP-ribosa (ADPr), la región B que es donde se acomoda la nicotinamida (NAM), mientras que esta misma porción ocupa la región C durante la catálisis. Esta región está caracterizada por la secuencia conservada TQNXD que participa en la transferencia del grupo acetilo del sustrato a la ribosa del NAD⁺ [13, 16].

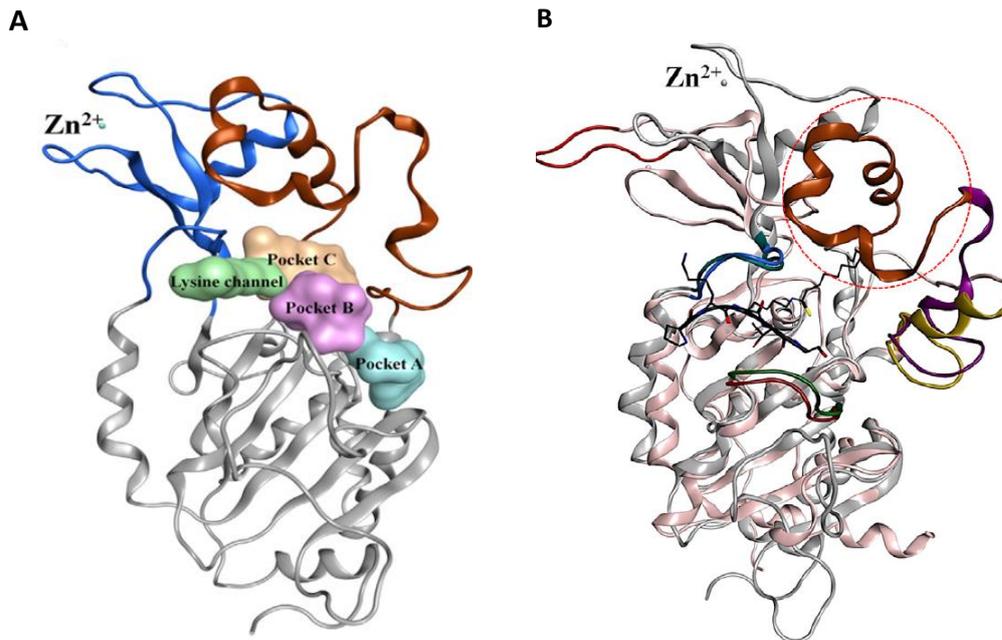


Figura 5 - Comparación estructural entre isoformas. (A) Estructura de Sirt2 (PDB 3ZGV) como representativo de todas las isoformas dónde se señala el canal de lisina y el bolsillo de unión a NAD⁺ con sus tres zonas. (B) Superposición de Sirt2 (gris) y Sirt6 (PDB 3PKI, rosado) dónde se observan las variaciones en los distintos *loops* principalmente la falta de módulo helicoidal (naranja) en Sirt6. Representado en bastones se encuentra el péptido miristoileado (H3K9Myr). Estructuras tomadas de [12].

1.2.2. Regiones variables

Se ha visto que las regiones variables adquieren diferente conformación y sufren modificaciones post-traduccionales [17]. Así son capaces de unirse a otras moléculas lo que posibilita que la sirtuina cumpla diferentes roles dentro de la célula. Un ejemplo de ello, es la fosforilación de una serina en la posición 368 de Sirt2 que regula su capacidad de interacción con tubulina u otros complejos [18]. Otro ejemplo que involucra cambios conformacionales es la presencia de una secuencia de 25 aminoácidos en el extremo C-terminal de Sirt1 capaz de modular su actividad al interactuar con el núcleo catalítico central de la enzima, así aumentando la afinidad de ésta por su sustrato [19].

Se sabe que las extensiones N-terminales de las isoformas 1 y 7 contienen las señales de localización y exportación nuclear mientras que las isoformas 3 y 4 contienen las señales de localización mitocondrial. En el caso de Sirt6, las señales de localización nuclear se encuentran en C-terminal cuya secuencia va entre los residuos 345 y 351 (PKRVKAK), mientras que la extensión N-terminal se requiere tanto para la asociación a la cromatina como para la actividad desacetilasa. Se ha demostrado que esta región es importante para la modulación de los niveles de acetilación de los sustratos de Sirt6, las lisinas 9, 18 y 56 de la histona 3 (H3K9, H3K18 y H3K56), apuntando a que esta extensión N-terminal participa en la química de la

desacetilación, posiblemente contribuyendo a la unión del sustrato o el NAD⁺, o promoviendo un plegado apropiado y estabilizando la proteína [20, 21].

1.2.3. Características estructurales propias de Sirt6

a) Aunque la mayoría de las sirtuinas contienen una secuencia Cys-X-X-Cys-X₁₅₋₂₀-Cys-X-X-Cys en el motivo de unión a Zn²⁺, Sirt6 tiene una inserción de 10 residuos entre la segunda tanda de cisteínas formando un *loop* muy flexible (*Figura 4*). En hSirt6 las cisteínas que se encuentran coordinando al Zn²⁺ son C₁₄₁, C₁₄₄, C₁₆₆ y C₁₇₇ [13, 16].

b) En todas las isoformas de Sirt existe un *loop* de unión a cofactor NAD⁺ que adopta diferentes conformaciones dependiendo del ligando unido; en particular en Sirt1, luego de la unión del péptido sustrato, adopta una conformación favorable para la unión de NAD⁺. En el caso de Sirt6 este *loop* de unión a cofactor está reemplazado por una hélice (H68 a E75) que contiene algunos residuos de unión a NAD⁺ (*Figura 4*). Debido a esto, el sitio de unión es menos flexible haciendo que su conformación sea menos variable al unir los sustratos.

c) Una diferencia crucial que se vio a partir de la cristalización de Sirt6 por Pan, P. W. *et al*, 2011 [13] es que Sirt6 se diferencia de las demás isoformas en que tiene una delección en su secuencia haciendo que le falte el módulo helicoidal (*Figura 5B*) pero que está sustituido por un pequeño *loop*. Esto hace que los dominios principales, tanto el que posee plegamiento de Rossmann como el de unión a Zn²⁺, estén en una conformación más desplegada que en el resto de las sirtuinas. Ésta es considerada la principal razón por la que Sirt6 presenta tan baja actividad desacetilasa *in vitro*, como se explicará más adelante [13, 22].

d) Otra característica que apoya la hipótesis anterior, es la falta de un puente salino (conservado en las otras isoformas de la enzima) que ayuda al posicionamiento del dominio de unión a Zn²⁺ con respecto al dominio de Rossmann. En su ausencia, se ve favorecida la formación de un enlace de hidrógeno que acerca los dominios pero por el lado opuesto y no directamente sobre el dominio de Rossmann, contribuyendo a una conformación más desplegada [13].

e) Otra de las diferencias de Sirt6 con respecto a las demás isoformas es en una pequeña secuencia que participa en la unión al péptido sustrato. Por lo general, esa secuencia conservada es FGEXL, mientras que en Sirt6 es WEDSL. El nitrógeno amida del Trp186 está ubicado de forma tal que no permite la formación de un enlace de hidrógeno (como sucede en otras isoformas) con un grupo carbonilo en el péptido sustrato. Esto resulta en una interacción sustrato-proteína menos estable y probablemente este aspecto también contribuya a la baja actividad desacetilasa *in vitro* [13].

f) Otra diferencia, que no es directamente estructural pero que está relacionada, es el mecanismo por el cual se da la unión de los sustratos. Esto será tratado más adelante.

1.3. Actividad deacilasa y ADP-ribosiltransferasa

Si bien las sirtuinas pertenecen al grupo de desacetilasas de histonas, hay que mencionar que no todas ellas presentan el mismo tipo de actividad enzimática. Las diversas isoformas poseen una o las dos de las siguientes funciones. Pueden actuar como deacilasas y/o ADP-ribosiltransferasas.

ADP-ribosiltransferasa

Se ha reportado actividad ADP-ribosiltransferasa únicamente para Sirt4 y Sirt6 [4, 23]. Un ejemplo de ello es la activación de PARP1 por ribosilación de la lisina 521 por parte de Sirt6 en condiciones de estrés oxidativo, resultando en la reparación de ADN [24].

Actividad deacilasa

La mayoría de las isoformas poseen un tipo particular de actividad deacilasa en la que el sustrato posee una lisina acetilada y por tanto hablamos de actividad desacetilasa. Se ha demostrado que las isoformas 1, 2 y 3 poseen fuerte actividad desacetilasa, a diferencia del resto de las isoformas que presentan muy baja actividad desacetilasa *in vitro*.

Sin embargo, se ha visto que éstas poseen actividad deacilasa, en la que varía la longitud de cadena acilada del sustrato (propionil, butiril, miristoil, etc). Es así que Sirt5 tiene preferencia por sustratos succinilados y malonilados [25] y Sirt6 por sustratos miristoileados o palmitoileados [26]. Si bien Sirt6 posee baja actividad desacetilasa *in vitro*, se ha visto que *in vivo* es a través de la desacetilación principalmente de las lisinas 9 y 56 de histona 3 que regula vías que dependen del Factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1 α) y el Factor nuclear kappa B (NF- κ B).[27-29] lo cual lleva a suponer que la interacción de Sirt6 con otras proteínas a nivel celular la lleva a una conformación productiva para tener buena actividad desacetilasa. Con respecto a la actividad deacilasa de Sirt6, se han reportado valores de k_{cat}/K_M de $4.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ vs. $1.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para sustratos acetilados y miristoilados, respectivamente [26], una diferencia de tres órdenes de magnitud.

En el caso de Sirt1, Sirt2 y Sirt3 no hay diferencias tan grandes entre la actividad desacetilasa y demiristoilasa, o sea, que Sirt6 es la única isoforma capaz de aumentar su actividad dependiendo de las características del sustrato (desacetila o deacila) [22]. Se ha determinado que la actividad deacilasa de Sirt6 tiene importancia en la regulación de un importante número de proteínas [30].

A partir de estructuras cristalizadas de Sirt6 en presencia del péptido sustrado miristoileado, H3K9Myr (PDB 3ZG6) se vio que el grupo miristoilo se acomoda en un bolsillo hidrofóbico formado por Ala 11, Pro 60, Phe 62, Trp 69, Pro 78, Phe 80, Phe 84, Val 113, Leu 130, Leu 184 y Ile 217 (según la estructura cristalina de la referencia [26]). Dicho bolsillo no se ve en otras isoformas de Sirt, dando indicio de por qué este efecto es tan particular de la isoforma 6. Si se comparan las estructuras de Sirt6 con y sin H3K9Myr (PDB 3ZG6 y 3K35 respectivamente) se ven diferencias en ciertas posiciones (*Figura 6B*), llevando a concluir que al posicionarse en el sitio activo un sustrato con grupo acilo de cadena larga, conduce a un cambio conformacional que acerca ambos dominios y provoca el aumento de actividad [22, 26].

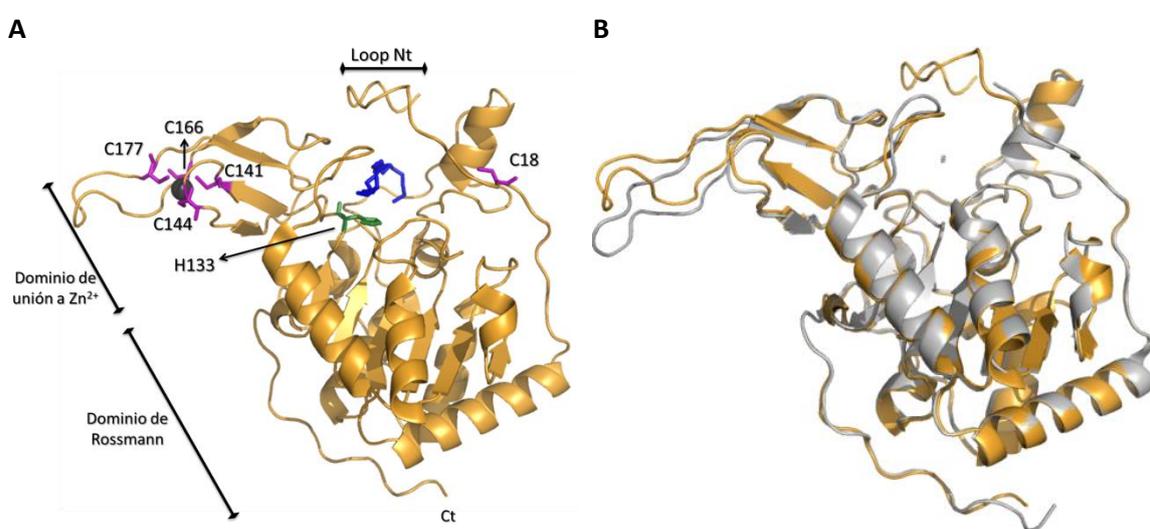


Figura 6 - Cambio conformacional de hSirt6 frente grupos acilo de cadena larga. (A) Sirt6 interactuando con H3K9Myr en el bolsillo hidrofóbico (grupo miristoilo en azul), PDB 3ZG6. Se señalan las cisteínas que coordinan al Zn^{2+} (C141, C144, C166, C177), la C18 (Nt) y en verde la H133. **(B)** Superposición de Sirt6 en presencia (amarillo) o ausencia (gris) de H3K9Myr. En ausencia de sustrato miristoilado se puede observar la conformación más desplegada de la enzima (PDB 3K35).

1.4. Mecanismo de reacción

Durante una reacción de desacetilación las sirtuinas consumen una molécula de NAD^+ liberando nicotinamida, 2'-O-acetil-ADP-ribosa y el sustrato con lisina (*Figura 7*). 1) En primer lugar se produce una reacción de ADP-ribosilación en la que el enlace amida de la lisina acetilada actúa como nucleófilo atacando la posición anomérica de la ribosa en el NAD^+ . La porción ADPr del NAD^+ es transferida a la lisina acetilada, generando un intermediario O-alkilamidato. En este paso el enlace nicotinamida-N-ribosa se rompe liberando nicotinamida. Aún no se sabe con exactitud el mecanismo por el cual se forma el alkilamidato, si corresponde a una SN_1 , SN_2 o una mezcla de ambos. Análisis tanto experimentales como computacionales se inclinan más hacia un mecanismo del tipo SN_2 [31, 32]. 2) Un residuo de

histidina conservado en el sitio activo de la sirtuina sirve como base general para desprotonar el 2'-OH de la ribosa y éste ataca al intermediario O-alkilamidato generando una especie cíclica. 3) La hidrólisis de la especie cíclica resulta en la lisina desacetilada y en 2'-O-acetil-ADP-ribosa [33].

Con respecto a la actividad ADP-ribosiltransferasa de Sirt6, ésta implica la transferencia de un grupo ADP-ribosa del NAD^+ a un aminoácido aceptor (arginina, asparagina, aspartato, glutamato) de otra proteína para formar enlaces N- y O- glucosídicos, dependiendo del grupo nucleofílico en la cadena lateral del aminoácido.

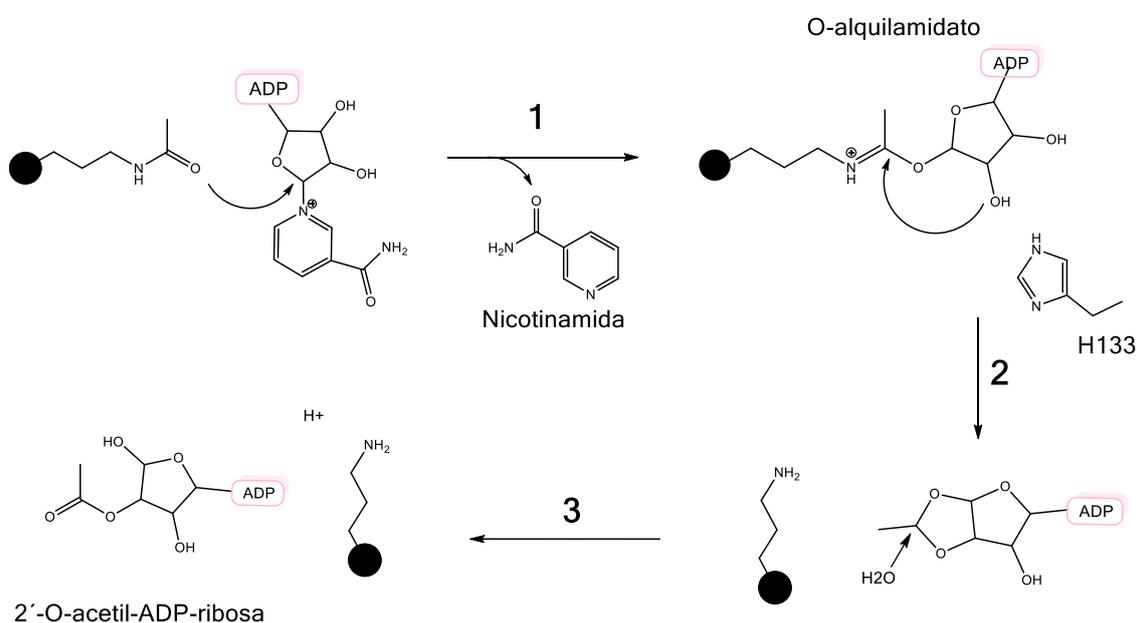


Figura 7 - Mecanismo catalítico de desacetilación por sirtuinas.

Estudios cinéticos indican que la catálisis sucede en forma ordenada y secuencial, donde el sustrato acetilado se une primero, y es seguido por el NAD^+ para formar un complejo ternario. En ausencia de sustrato acetilado las porciones nicotinamida y ribosa del NAD^+ pueden adoptar varias conformaciones en el sitio de unión, mientras que en presencia del grupo acetilo, NAD^+ adquiere una conformación tal que el anillo de la nicotinamida se hunde dentro de la región C del sitio activo (conformación con NAD^+ productivo). La nicotinamida interactúa con esta región a través de enlaces de Van der Waals y aquí el sustrato acetilado ya está orientado para reaccionar con NAD^+ [32-34].

A diferencia de las demás isoformas, Sirt6 no necesita de la unión del péptido acetilado previo para que se de la unión a NAD^+ . Se cree que dicho aspecto se debe a las características

estructurales antes mencionadas (sección 1.2.3) que la hacen única, entre ellas, la falta del módulo helicoidal haciendo que posea un canal más abierto para la unión a sustratos [13]. El primer producto en ser liberado es la nicotinamida al igual que las otras isoformas, mientras que el producto desacetilado o la 2'-O-acetil-ADP-ribosa se liberan indistintamente [34, 35].

La reacción de desacetilación es inhibida por producto, la nicotinamida. Si la nicotinamida producida se vuelve a unir a la región C (Figura 5A) antes de que se convierta el O-alquilamidato en el intermediario bicíclico, puede regenerarse NAD⁺ y la lisina acetilada en un intercambio de base [35-37]. Se habla de un residuo de fenilalanina conservado en la posición 157 en Sirt3 (Phe64 en Sirt6) esencial en el mecanismo de desacetilación o inhibición, ya que dependiendo de la conformación de esta cadena lateral, permite o no la salida de la molécula de nicotinamida luego de ser liberada al hidrolizarse el NAD⁺ [38] (Figura 8). Se ha visto que esta fenilalanina conservada participa del mecanismo inhibitorio de algunos inhibidores estudiados, atrapándolos en la región C del sitio de unión a NAD⁺, previniendo la liberación de nicotinamida.

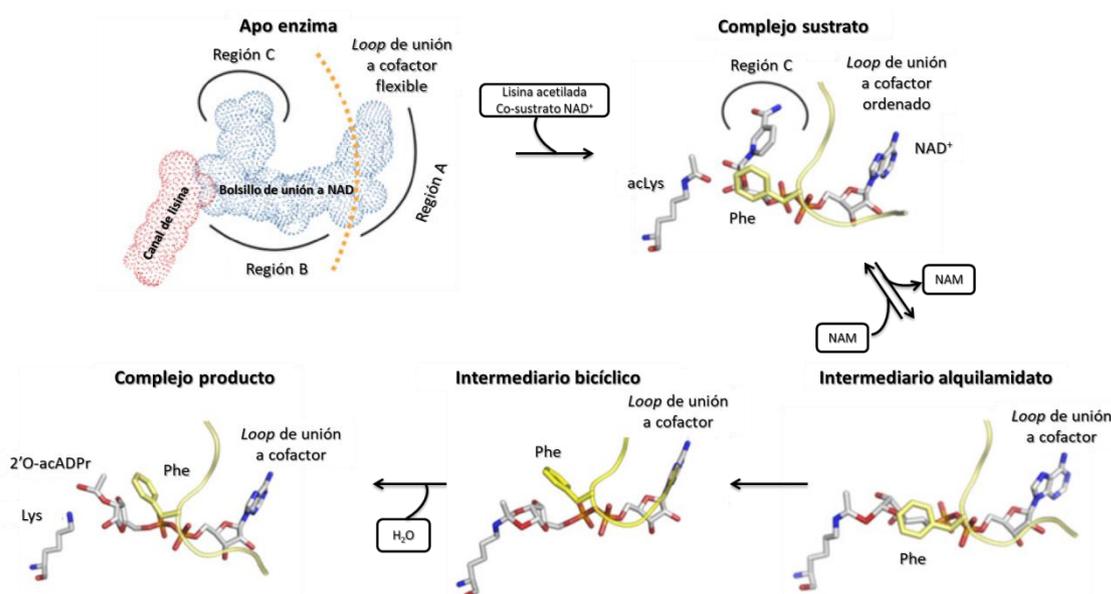


Figura 8 - Mecanismo de desacetilación por sirtuinas. Ilustrado en base a estructuras cristalográficas: apo-enzima (Sirt3 3GLS), complejo con sustratos (Sir2Tm 2H4F), intermediario alquilamidato (Sirt3 8GLT), intermediario bicíclico (Sirt5 4F56), complejo con productos (Hst2 1Q1A). Se muestra la Phe conservada de cuya conformación depende de la salida o no del producto nicotinamida. Imagen adaptada de [38].

1.5. Funciones de Sirt6

Sirt6 cumple variadas funciones biológicas que se han ido elucidando a través del estudio modelos *knock out* (KO) o de sobreexpresión de la enzima, tanto en células como en animales. Ratones deficientes en Sirt6 crecen con normalidad las primeras semanas de vida, pero luego comienzan a desarrollar procesos degenerativos y mueren al mes de haber nacido. En éstos se

ha observado hipoglicemia, bajos niveles de IGF-1 (*insulin-like growth factor*), pérdida de grasa subcutánea y linfopenia. La falta de Sirt6, causó defectos metabólicos severos y envejecimiento prematuro inducido por estructuras teloméricas anormales [39]. Por otro lado, la sobreexpresión de Sirt6 prolongó la vida de ratones macho y previno la inducción de obesidad por dieta rica en calorías [26]. Todas las funciones se resumen en la *Figura 9*.

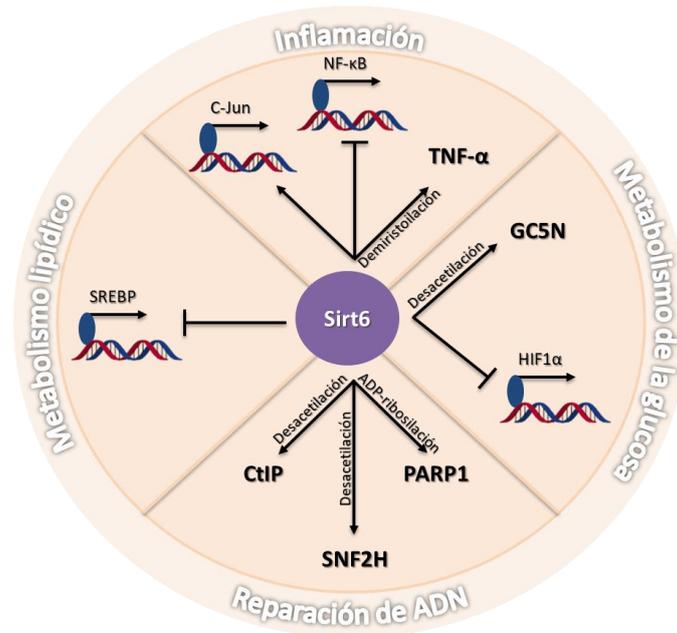


Figura 9 - Principales funciones de Sirt6. La enzima participa en la reparación de ADN involucrando procesos de desacetilación de CtIP (*C-terminal interacting protein*) y SNFH2 (remodelador cromatínico) y ADP-ribosilación de PARP1. También está involucrada en el metabolismo lipídico inhibiendo la expresión de SREBP y el metabolismo de la glucosa donde inhibe la expresión de HIF-1α y se encarga de desacetilar GC5N. Posee funciones como proteína pro-inflamatoria al regular la secreción de TNF- α mediante su demristoilación y como proteína anti-inflamatoria al regular negativamente el factor de transcripción de NF-κB e interactuar con C-Jun.

1.5.1. Estabilidad genómica y reparación de ADN

Mantenimiento de telómeros

Sirt6 se encarga de modular la acetilación de la cromatina de los telómeros mediante la desacetilación de H3K9 (principalmente durante la fase-S del ciclo celular) y H3K56. La ausencia de Sirt6 en células humanas resulta en una hiperacetilación de histonas con estructuras anormales, pérdida de secuencias teloméricas que llevan a la inestabilidad genómica, fusiones de cromosomas y senescencia prematura a causa de telómeros disfuncionales [40, 41].

Reparación de daño al ADN

Las lesiones en el ADN pueden estar dadas en una sola hebra o en ambas. Las lesiones que se dan en una sola de las hebras, según el tipo de lesión, son reparadas por mecanismos como reparación por escisión de nucleótidos (NER) o por escisión de base (BER). Por otro lado, las lesiones de doble hebra (DSB, *double-strand breaks*) pueden ser reparadas por recombinación homóloga (HR) o por unión de extremos no homólogos (NHEJ).

Se conocen ciertas interacciones de Sirt6 que poseen un rol en la reparación de DSB, regulando tanto HR como NHEJ. Se demostró que Sirt6 es capaz de desacetilar la proteína CtIP (C-terminal interacting protein), constitutivamente acetilada, a consecuencia de daño en el ADN, promoviendo así la reparación por recombinación homóloga [42]. Se ha visto también que Sirt6 interacciona con el complejo macromolecular DNA-PK (proteína quinasa ADN-dependiente), un regulador de reparación por NHEJ en células de mamífero [43]. Se ha demostrado que Sirt6 es uno de los factores que es más rápidamente localizado a sitios de DSB, reclutando a su vez a SNF2H (remodelador de cromatina) para abrir la cromatina condensada y permitiendo que Sirt6 desacetile H3K56. Así se desencadena el reclutamiento de factores de reparación [44, 45]. Como se mencionó anteriormente Sirt6 interacciona y ADP-ribosila PARP1 estimulando así su actividad de poly-ADP ribosilación. Se demostró que esta interacción se da únicamente en condiciones de estrés oxidativo permitiendo la reparación de lesiones de una sola hebra o doble hebra [24].

1.5.2. Metabolismo

En modelos de obesidad y diabetes, la actividad de Sirt6 se ha visto disminuída. Factores de riesgo para estas enfermedades como son la edad y la sobrenutrición llevan a un descenso en la actividad y función de Sirt6 resultando en un metabolismo anormal de lípidos y glucosa.

Metabolismo de glucosa

La glucosa es una fuente esencial de energía en todas las células y órganos de nuestro organismo. Un desbalance en la homeostasis de la glucosa es un factor de riesgo de diabetes, obesidad y otras enfermedades metabólicas.

Sirt6 es un regulador del metabolismo de la glucosa afectando tanto los procesos de glucólisis como de gluconeogénesis. Como ya se mencionó, modelos KO para Sirt6 resultan hipoglicémicos, esto podría estar dado por un aumento en la captación periférica de glucosa relacionado al incremento en la expresión de GLUT1 (transportador de glucosa-1) en membranas. Se ha visto que Sirt6 reprime la expresión de genes del metabolismo de la glucosa como el de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y GLUT1, entre otros, mediante la

interacción con HIF-1 α . Éste, el factor inducible por hipoxia, modula genes que activan la glucólisis y reprime simultáneamente la respiración mitocondrial de forma coordinada. El mecanismo propuesto es el siguiente: bajo condiciones normales, Sirt6 inhibe la expresión de genes glucolíticos actuando como desacetilasa de histona para reprimir HIF-1 α . Ahora, en condiciones de hipoxia o estrés nutritivo, Sirt6 se inactiva, permitiendo la activación de HIF-1 α y la acetilación de H3K9 en los promotores, de manera de aumentar la expresión de genes glucolíticos y disminuir la respiración mitocondrial [27]. En particular se vio que C18 de hSirt6 oxidada a ácido sulfénico es capaz de reaccionar de forma covalente con HIF-1 α mediante enlace disulfuro sugiriendo un control redox de la actividad transcripcional de HIF-1 α [46].

En estos modelos, la expresión de genes gluconeogénicos aumenta de forma de compensar la hipoglicemia. La gluconeogénesis también está regulada por Sirt6. La enzima es capaz de interactuar con la acetiltransferasa GCN5 aumentando su actividad y catalizando la activación por acetilación del regulador de la gluconeogénesis PGC-1 α (coactivador 1 α del receptor activado γ del proliferador de peroxisoma). De esta forma, Sirt6 suprime la producción de glucosa en el hígado. GCN5 es un ejemplo más de sustrato no histónico de Sirt6 [47]. Cuando la actividad de Sirt6 es baja, GCN5 está acetilado en la lisina 549 y su actividad por ende es baja. Esto resulta en bajos niveles de acetilación de PGC-1 α (con ayuda de Sirt1), por lo tanto alta actividad de PGC-1 α que se traduce en la expresión de genes gluconeogénicos [47].

Sirt6 es también capaz de regular la gluconeogénesis a través de FoxO1 (*Forkhead box protein O1*) que se une a regiones promotoras de genes gluconeogénicos. Sirt6 interacciona directamente con FoxO1 desacetilándolo y se transloca del núcleo al citosol no pudiendo interaccionar con las zonas promotoras [48].

Sirt6 participa también de la función pancreática. Se vio que tanto ratones KO para Sirt6 como células- β deficientes en la enzima son intolerantes a la glucosa y además poseen defectos en la secreción de insulina estimulada por glucosa. La pérdida de Sirt6 incrementa la acetilación de H3K9 y H3K56 y activa la ARN polimerasa II en la región promotora de la proteína de interacción con tiorredoxina (TXNIP). Ésta suprime la actividad antioxidante de tiorredoxina (esencial para eliminar especies reactivas del oxígeno). Se ha reportado que la expresión de TXNIP está negativamente asociada con la secreción de insulina estimulada por glucosa en células- β y que su sobreexpresión inhibe la secreción de insulina [49].

Metabolismo lipídico

El hígado es un órgano clave en el control del metabolismo lipídico en respuesta a señales hormonales y nutricionales. En condiciones de ayuno, el hígado convierte reservas de lípidos

en energía disponible mediante la oxidación de ácidos grasos. En caso contrario, se almacena energía en forma de lípidos mediante la lipogénesis.

Sirt6 juega un importante rol en el metabolismo lipídico hepático regulando la expresión de genes como SREBP (*sterol-regulatory element binding protein*), regulador clave en la biosíntesis de colesterol [50]. La ausencia de Sirt6 resulta en la acumulación de triacilglicéridos asociado a la enfermedad de hígado graso. Dicha acumulación está regulada por la absorción de ácidos grasos, β -oxidación y la síntesis y secreción de triacilglicéridos. En ausencia de Sirt6, se observa un aumento de la expresión de genes responsables de la absorción de ácidos grasos en el hígado, pero se reduce la expresión de aquellos que participan en la β -oxidación [51].

1.5.3 - Inflamación

Sirt6 produce tanto efectos proinflamatorios, deacilando TNF- α (Factor de necrosis tumoral) y promoviendo su secreción, como también efectos anti-inflamatorios a través de su actividad desacetilasa, actuando sobre NF- κ B y c-JUN.

Se conocen pocas proteínas modificadas en sus lisinas por grupos acilo de cadena larga (en cambio son muchas las lisinas proteicas acetiladas), una de estas proteínas es TNF- α , citoquina proinflamatoria producida por varios tipos celulares (macrófagos, linfocitos, células dendríticas y neuronas). TNF- α es una proteína transmembrana de tipo II con un dominio intracelular N-terminal y un dominio extracelular C-terminal. Una vez sintetizada en el retículo endoplasmático y alcanzado la membrana plasmática es hidrolizada por proteasas y la porción extracelular es liberada para unirse a sus receptores e inducir vías de señalización relacionadas a apoptosis y supervivencia celular [26, 52]. Se ha reportado que Sirt6 es capaz de regular la síntesis de TNF- α de forma post-transcripcional en células del sistema inmune, dependiendo de la concentración intracelular de NAD [53]. Por otro lado, Sirt6 es capaz de regular la secreción de TNF- α de forma post-traducciona [26, 52]. Una falta de regulación en la secreción de TNF- α está asociada con enfermedades inflamatorias como por ejemplo artritis reumatoidea. Esta regulación se realiza a través de varias modificaciones post-traduccionales de TNF- α , como glicosilación, acilación de cisteínas o acilación de lisinas. Esta última es regulada por Sirt6, ya que regula el nivel de acilación, particularmente miristoilación de las lisinas 19 y 20 de TNF- α [52, 54]. Se ha demostrado que la acilación de lisinas de TNF- α también regula su llegada a lisosomas para su degradación, o endosomas para su reciclaje [52].

Por otro lado, se han adjudicado a Sirt6 funciones como proteína anti-inflamatoria ya que actúa como regulador negativo del factor de transcripción NF- κ B. Se ha visto que la deficiencia de Sirt6 aumenta la respuesta inflamatoria en varios tejidos. La pérdida de la enzima aumenta

la expresión de NF-κB, sin embargo la sobreexpresión de la misma baja la actividad transcripcional de NF-κB. Este factor está compuesto por 2 subunidades, p50 y p65 o RelA. Se demostró que Sirt6 interacciona con la subunidad RelA, desacetilando H3K9 en promotores de genes blanco de NF-κB reprimiendo su expresión y por tanto no habiendo respuesta inflamatoria [28, 55].

Se conoce también la interacción de Sirt6 con c-JUN desacetilando H3K9 en el promotor de genes proinflamatorios, IL-6, TNF-α y MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1). Se vio que macrófagos deficientes en Sirt6 presentan hiperacetilación de H3K9 y por ende presentan elevada expresión de los genes proinflamatorios. Esto trae como consecuencia inflamación crónica y fibrosis en el hígado de los ratones KO para Sirt6 [56].

1.5.4 - Cáncer

Se ha acumulado evidencia que sugiere que Sirt6 se comporta también como supresor de genes tumorales [29, 57-59], de hecho, muchos genes que están canónicamente asociados con envejecimiento, también contribuyen al desarrollo de tumores. En varios tipos de cáncer se han encontrado disminuídos los niveles de Sirt6 [60], a su vez, la sobreexpresión de Sirt6 retrasa el desarrollo de cáncer en ratones inmunodeprimidos [57]. Más aún, pacientes con cáncer que presentan altos niveles de Sirt6, presentan menos recaídas [29].

Mutaciones puntuales en Sirt6 se han identificado en distintos tipos de cáncer, aisladas de tumores de pacientes (*Tabla 1*). Todas ellas presentan estabilidad estructural alterada y actividad desacetilasa deficiente, por lo que se asocia la función de Sirt6 como supresor tumoral con su actividad desacetilasa de H3 [61].

| Cancer | Tipo de mutación | Mutación |
|----------|-------------------|----------|
| NSCLC | Cambio de sentido | D25N |
| Riñón | Cambio de sentido | E36V |
| NSCLC | Cambio de sentido | D63Y |
| NSCLC | Cambio de sentido | A89S |
| NSCLC | Cambio de sentido | D116N |
| NSCLC | Sin sentido | E260* |
| Cervical | Cambio de sentido | T263P |
| Melanoma | Cambio de sentido | P274L |

Tabla 1 - Mutaciones puntuales en Sirt6 aisladas de pacientes con cáncer. Se detalla el tipo de cáncer, el tipo de mutación y el cambio de aminoácido. Es asterisco señala un codón stop. Tomado de [61].

NSCLC: *not small cells lung carcinoma*

1.6. Regulación de Sirt6

La regulación de Sirt6 se da a nivel de transcripción, de traducción, post-traducción, como en su reclusión en la cromatina y su actividad enzimática. Algunos aspectos ya fueron discutidos anteriormente. Como se verá a continuación, podemos hablar tanto de reguladores endógenos como exógenos.

1.6.1. Regulación por metabolitos endógenos

Las sirtuinas pueden actuar como sensores del estado metabólico ya que son sensibles a la relación intracelular de NAD^+/NAM y cambios en los niveles de NAD^+ pueden afectar directamente la actividad o la preferencia de sustrato de Sirt. De hecho, se ha demostrado que los niveles de NAD^+ decrecen durante el envejecimiento, obesidad y otras enfermedades metabólicas, resultando en menor actividad de Sirt [62]. A su vez, la actividad de las sirtuinas es controlada por el estado energético celular, reflejado en la relación NAD^+/NADH . El balance entre la forma oxidada (NAD^+) y la reducida (NADH) es crítica para un funcionamiento celular apropiado. Alteraciones en la relación NAD^+/NADH se encuentran en algunas patologías asociadas a desórdenes metabólicos como es el caso de la diabetes. Estos cambios en el metabolismo se transmiten a la cromatina a través de la desacetilación de histonas o factores de transcripción resultando en alteraciones en la expresión génica [62, 63].

In vitro, la actividad desacetilasa de Sirt6 es modulada por ácidos grasos de cadena larga. Principalmente los ácidos mirístico, oleico y linoleico han demostrado aumentar la actividad de la enzima hasta en un orden de magnitud. Según datos experimentales, se incrementa la afinidad por el sustrato acetilado en presencia de los ácidos grasos mencionados [22]. También se demostró que los mismos se unen en el mismo bolsillo hidrofóbico, presente en Sirt6, donde se une el sustrato H3K9Myr. Este aumento de actividad desacetilasa radica en el cambio conformacional que sufre la enzima, acercando el dominio de unión a Zn^{2+} y el dominio de Rossmann (Figura 6). El hecho de que estos ácidos grasos de cadena larga activen la desacetilación *in vitro*, sugiere un mecanismo por el cual *in vivo* la actividad desacetilasa de Sirt6 pueda ser aumentada en respuesta a altos niveles de ácidos grasos que provengan de la dieta o del ayuno, promoviendo así la glucólisis o lipólisis [22]. Recientemente se ha visto, mediante estudios de *docking* que los ácidos oleico y linoleico resultan en cambios en la orientación de Trp186 y Glu187 así como también en la posición de algunos *loops* cercanos al bolsillo hidrofóbico [64].

1.6.2. Regulación exógena

Atendiendo a todas las funciones biológicas asociadas a Sirt6, esta enzima puede ser considerada como un potencial blanco terapéutico de enfermedades tanto metabólicas como inflamatorias, incluso cáncer, por lo que el estudio de inhibidores y activadores de Sirt6 ha crecido en los últimos años. Si bien hay varias moléculas reportadas como activadores o inhibidores, la mayoría no son específicos para Sirt6 sino que son capaces de actuar sobre alguna o todas las demás isoformas. La búsqueda de reguladores exógenos específicos de Sirt6 es un área de intensa investigación científica en la actualidad.

Inhibidores:

Algunos de los inhibidores que se han descrito hasta el momento consisten en péptidos o pseudopéptidos [65], y algunas moléculas pequeñas como Ex-527, catequinas, derivados de quinazolina [38, 64, 65]. También los polifenoles quercitina y luteolina (metabolitos secundarios de plantas) aunque éstos han mostrado un comportamiento dual, ya que inhiben a Sirt6 a bajas concentraciones pero la activan a concentraciones altas [66, 67]. La gran mayoría de estas moléculas inhibitoras actúan compitiendo tanto por el sustrato peptídico como por el cofactor NAD⁺, interaccionando entonces con el sitio activo de Sirt [64].

Mediante análisis *in silico* así como ensayos experimentales, se ha profundizado en el mecanismo de inhibición de derivados de quinazolina y salicilato, inhibidores específicos para Sirt6. Se ha demostrado que los mismos son capaces de reproducir los efectos biológicos observados en respuesta a un silenciamiento o KO de la enzima, como ser aumento en la expresión GLUT-1, disminución en la secreción de TNF- α . Estas estructuras reproducen las interacciones de NAM con Sirt6 (recordando que NAM, producto de la reacción de desacetilación, es un inhibidor de Sirt), incluso el derivado de quinazolina llega a interaccionar con la histidina catalítica H133 [68].

Recientemente se ha reportado que la tricostatina A, inhibidor de HDAC clase I y II, pero no clase III (sirtuinas), se comporta como inhibidor específico de Sirt6, no afectando otras isoformas de sirtuinas [69]. Se vio que tricostatina A, inhibe eficientemente la desacetilación de K382 de p53 por parte de Sirt6. Se trata de un inhibidor competitivo y su mecanismo se basa en competir con el péptido sustrato e impedir la formación del intermediario alquilamidato (*Figura 7*). p53 es un supresor tumoral que juega un importante rol en varias vías de señalización, algunas de las cuales regulan el ciclo celular y la apoptosis inducida por estrés, indicando la importancia de Sirt6 en este tipo de procesos [69].

Activadores:

Se ha descubierto que las antocianidinas (responsables del color de ciertas plantas, frutas y vegetales) actúan como activadores de la actividad desacetilasa de Sirt6 [64]. Están reportadas como reductores de riesgo de varias enfermedades asociadas a la edad, principalmente contra el estrés oxidativo bajando niveles de especies reactivas tanto del oxígeno como del nitrógeno [64, 70]. Se demostró que la cianidina es capaz de estimular la expresión de genes asociados a Sirt6 como GLUT1 o FoxO3 involucrado en el crecimiento celular, proliferación, diferenciación, etc [64].

Recientemente se ha encontrado un activador alostérico específico para Sirt6, MDL-800 [5]. Es capaz de unirse a un sitio poco conservado en las sirtuinas, que en Sirt6 involucra la tríada Glu74–Phe82–Phe86, permitiendo interacciones altamente específicas y explica la activación selectiva. Analizando cómo se ve afectada la actividad desacetilasa o deacilasa se vio que los valores de k_{cat}/K_M no varían frente a un sustrato miristoilado, mientras que sí se ve un aumento de 25 veces para el sustrato acetilado a concentraciones de 100 μ M del compuesto. Los investigadores ven que cuando la enzima se encuentra unida al sustrato acetilado adopta más de una conformación por lo cual MDL-800 puede estabilizar alguna de esas conformaciones, mientras que la unión del sustrato miristoilado mantiene una conformación única y por tanto no hay cambios frente al activador [5].

1.7. Modificaciones post-traduccionales de Sirt6

Se han reportado varios tipos de modificaciones post-traduccionales que en parte también participan de la regulación de la enzima.

Está reportado que el residuo de tirosina 257 es susceptible a nitración por SIN-1 (dador de radicales superóxido y óxido nítrico, por lo tanto de peroxinitrito) provocando una pérdida de actividad desacetilasa [71]. Dicha Tyr se encuentra en el dominio de Rossmann fundamental para la unión de sustratos.

Se ha identificado también la modificación de serinas por fosforilación, particularmente del residuo S338 (conservado entre especies), situado en una zona rica en prolinas capaz de modular ciertas interacciones proteína-proteína de Sirt6 [72].

Recientemente se ha visto que Sirt6 puede ser modificada por un SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*). La SUMOilación es un mecanismo regulatorio de proteínas que participan en varias funciones biológicas incluyendo respuesta al estrés, estabilidad genómica, entre otras. En el

caso particular de Sirt6, modula específicamente su capacidad de desacetilación de H3K56 pero no de H3K9. Esta modificación, tiene que ver con los efectos sobre c-Myc pero no afecta genes blanco de NF- κ B [73].

A nivel post-traducciona l Sirt6 es regulada por CHIP (*Ct of Hsp70 interactive protein*), una proteína que forma parte del control de calidad proteico, y presenta actividad chaperona y ubiquitin-ligasa. Sirt6 es ubiquitinilada por CHIP en K170 previniendo su ubiquitinación canónica (por otras ubiquitin-ligasas) llevando a la estabilidad proteica y reduciendo la degradación por el proteasoma [74].

La exposición de Sirt6 a peróxido de hidrógeno se vio que lleva a la oxidación de C18 a ácido sulfénico con cambio conformacional que modifica su movilidad electroforética, y a su vez, en presencia de HIF-1 forma disulfuro intermolecular [46].

1.8. Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, que abarca especies radicalares oxidantes como el radical hidroxilo hasta no radicalares como el peróxido de hidrógeno) es central para la progresión de muchas enfermedades inflamatorias. Estas especies son generadas como productos secundarios del metabolismo celular o por enzimas presentes en fagocitos o células endoteliales, centrales en la generación de la respuesta inflamatoria y por ende de defensa al hospedero [75, 76]. Estas especies reactivas pueden actuar de dos formas diferentes dependiendo de su concentración. A concentraciones bajas, actúan como moléculas de señalización que pueden regular el crecimiento celular, diferenciación, adhesión celular, senescencia y apoptosis. Sin embargo, a altas concentraciones son responsables de daño celular, oxidación de proteínas y lípidos, además de causar daño al ADN.

En un contexto inflamatorio, células fagocíticas (neutrófilos, monocitos, eosinófilos) se encargan de eliminar patógenos a través de la generación de oxidantes antimicrobianos como superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y sus derivados durante el estallido respiratorio. El radical $O_2^{\bullet-}$ se genera por reducción por un electrón de O_2 a través de la catálisis por NADPH oxidasa (NOX) o flavoproteínas [77]. También son generados durante la transferencia de electrones en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, o como producto de reacciones enzimáticas como xantina oxidasa, citocromo P450 o por el desacople de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). A través de la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) se genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [78]. El H_2O_2 también es generado por reducción por dos electrones de O_2 en reacciones catalizadas por hemoproteínas. El H_2O_2

es un oxidante fuerte, $E''(\text{H}_2\text{O}_2, \text{H}_2\text{O}) = 1.32 \text{ V}$ a pH 7.0 [79] pero las barreras cinéticas hacen que sea reactivo sólo con tiol, selenol, hemo (que son la base de su rol en señalización redox), o con metales de transición (que dan lugar a la formación de radical hidroxilo vía mecanismo Fenton, altamente reactivo y oxidante) [80]. El radical hidroxilo, OH^\bullet es la especie oxidante más potente ($E_0 = 230 \text{ mV}$) reaccionando con las biomoléculas presentes en su sitio de producción. Por otro lado, durante un proceso inflamatorio, dentro de los fagocitos se libera la enzima mieloperoxidasa capaz de oxidar aniones (Cl^- , Br^- , I^-) en presencia de H_2O_2 y formar otras especies oxidantes, los correspondientes ácidos HOCl, HOBr, HOI [77].

El $\text{O}_2^{\bullet-}$ anión permea membranas a través de canales aniónicos, mientras que H_2O_2 es capaz de atravesar membranas por difusión pasiva y facilitada por aquaporinas (AQP3 y AQP8) [81].

Los niveles altos de H_2O_2 se controlan con sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. La catalasa es una hemoperoxidasa que descompone rápidamente H_2O_2 , presente principalmente en los peroxisomas. Además de metales, las reacciones más favorecidas de H_2O_2 son con tioles proteicos y no proteicos. Esto incluye tanto al glutatión como la glutatión peroxidasa y las peroxirredoxinas que además de actuar como defensa antioxidante, participan en la señalización redox [79]. Todo lo antes mencionado se resume en la *Figura 10*.

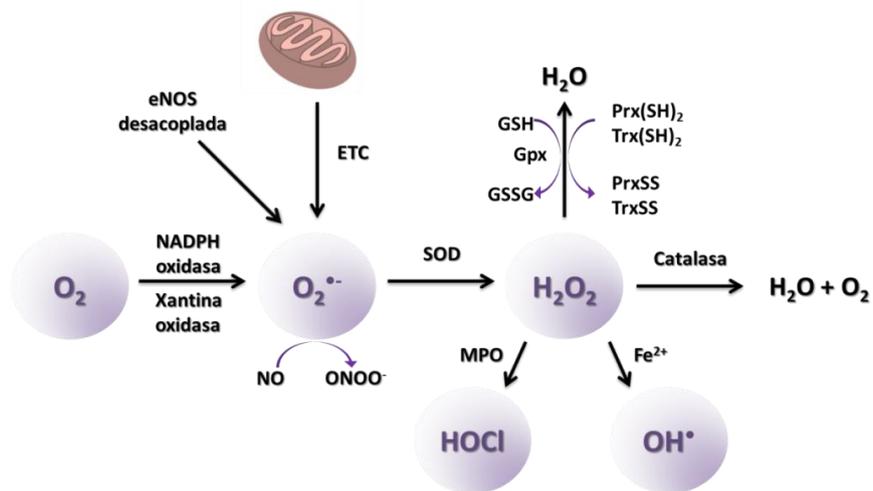


Figura 10 - Fuentes generadoras de ROS y las reacciones que llevan a cabo (ETC, cadena de transporte de electrones). Imagen tomada y adaptada de [75].

La reacción de terminación entre los radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ y NO^\bullet (óxido nítrico) da lugar a un no radical, el peroxinitrito (ONOO^-) fuertemente oxidante. Las RNS, especies reactivas del nitrógeno, incluyen el conjunto de especies reactivas derivadas del NO^\bullet (radicales como el NO^\bullet o NO_2^\bullet , o no radicales como el ONOOH). El peroxinitrito anión está en equilibrio con su correspondiente ácido conjugado, ácido peroxinitroso (ONOOH), pKa de 6.8. En condiciones

fisiológicas, pH 7.4 el 80% se encuentra como anión peroxinitrito [82]. El tiempo de vida del ONOOH es bajo (menor a 0.1 s) debido a su isomerización a nitrato (NO_3^-) pero además puede sufrir ruptura homolítica dando lugar a radicales NO_2^\bullet y OH^\bullet (Figura 11) [83]. Por otro lado, el ONOO^- es capaz de reaccionar directamente con dióxido de carbono (CO_2) para formar un aducto muy reactivo, nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-) que homoliza a radicales dióxido de nitrógeno y carbonato (NO_2^\bullet y $\text{CO}_3^{\bullet-}$) (Figura 11) [84].

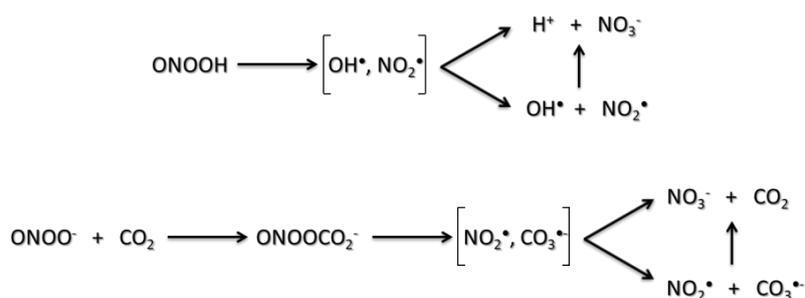


Figura 11 - Reacciones de ONOOH y ONOO⁻. Homólisis de ácido peroxinitroso ONOOH (superior) y reacción de peroxinitrito ONOO⁻ con CO₂ (inferior). Adaptado de [84].

El peroxinitrito es capaz de oxidar a sus blancos por dos mecanismos: reacción directa por uno o dos electrones, o por un mecanismo radicalar luego de su protonación a ONOOH o reacción con CO₂. Tanto ONOO⁻ como ONOOH llevan a cabo modificaciones oxidativas directamente a través de procesos de oxidación por uno o dos electrones. La oxidación es selectiva, pocos grupos son capaces de reaccionar directamente con peroxinitrito como tioles o centros hierro/azufre; también el CO₂ es un blanco preferencial. El segundo mecanismo involucra indirectamente al peroxinitrito mediando la oxidación por descomposición en radicales altamente reactivos [85]. Por descomposición homolítica de ONOOH se forma OH^\bullet y NO_2^\bullet y es mediante este segundo mecanismo que se da la formación de 3-nitrotirosina [86]. Esto involucra la reacción de tirosina con uno de estos radicales para formar radical tirosilo (Tyr^\bullet) que adiciona NO_2^\bullet para generar nitrotirosina. El radical carbonato incluso es mejor abstrayendo electrones del anillo aromático, por tanto favorece la formación del radical tirosilo. Este tipo de modificación post-traducciona tiene como consecuencia cambios en las propiedades del aminoácido llevando también a la alteración estructural de proteínas, pérdida o ganancia de actividad enzimática, además de interferir con mecanismos de señalización. La modificación proteica por 3-nitrotirosina es considerado un marcador de estrés nitroxidativo sistémico así como de células y tejidos [87].

1.9. Ácidos grasos y nitro ácidos grasos

Los ácidos grasos, libres o como parte de lípidos complejos, poseen varios roles en el metabolismo; almacenamiento y transporte de energía, son componentes esenciales en membranas y son parte de los reguladores génicos [88]. Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados son endógenos en mamíferos, en cambio los polinsaturados (PUFA) son sólo producidos por plantas y fitoplancton pero son esenciales para los organismos superiores y debemos adquirirlos en la dieta (aceites vegetales, de pescados, lácteos, carnes, granos). Una nomenclatura muy usada es denominar al grupo metilo final como omega ω y de ahí marcar la posición del doble enlace. El ácido estéarico (18:0) es el ácido graso saturado más abundante en animales, el ácido palmítico (16:0) el más común y el ácido mirístico (14:0) se encuentra ampliamente distribuido. De los ácidos grasos insaturados (siempre configuración *cis*), el más abundante en animales es el ácido oleico (18:1, ω -9) y ácido linoleico (18:2, ω -6) el lípido mayoritario en plantas.

En 2013, Feldman et al [22] reportan la activación de Sirt6 por ácidos grasos libres. Se observó que ácidos grasos, tanto saturados como el ácido mirístico o insaturados como el ácido oleico, a concentración 100 μ M, lograban aumentar la actividad desacetilasa *in vitro* en casi un orden de magnitud. El mecanismo de activación propuesto es el cambio conformacional que provoca la unión del ácido graso en el bolsillo hidrofóbico del sitio activo de Sirt6, que acerca los dos dominios de la enzima y mejoran la unión del péptido sustrato acetilado.

La dieta Mediterránea se caracteriza por el alto consumo de ácidos grasos insaturados, especialmente provenientes de aceite de oliva y pescado, ricos en ácido oleico (OA) y linoleico (LA), junto con vegetales ricos en nitrato y nitrito. Las condiciones ácidas y de baja concentración de oxígeno en el estómago proveen un ambiente adecuado para la nitración por nitrito de los ácidos grasos insaturados. La formación endógena de nitrolípidos se ha asociado con los efectos cardio protectores de dicha dieta [89-91].

El ácido linoleico conjugado (CLA), proveniente de lácteos, carnes y algunos vegetales, es el nitro ácido graso endógeno mayoritario, alrededor de 5 órdenes de magnitud por encima de la nitración del ácido linoleico. Se ha visto que NO_2 -CLA se forma en condiciones metabólicas basales en humanos y ratones, pero mediante el consumo de CLA en la dieta o su administración suplementaria se ven aumentados los niveles de formación del nitro ácido graso debido a su nitración endógena [92]. Los nitro ácidos grasos han sido detectados en plasma y orina de humanos sanos que han sido suplementados o no con CLA, y sus

concentraciones aumentan en organelos y tejidos en condiciones de estrés metabólico o inflamatorio [91, 93].

Nitración de ácidos grasos:

La nitración de ácidos grasos insaturados por el radical NO_2^\bullet genera especies electrofílicas y bioactivas [94]. Como se puede ver en la *Figura 12*, el radical NO_2^\bullet puede generarse a partir de nitrito consumido en la dieta o como se comentó anteriormente, mediante un proceso inflamatorio. En el primer caso, el NO_2^- (y NO_3^- que se reduce a NO_2^- por bacterias enterosalivales) en el pH bajo del estómago produce NO_2^\bullet a partir de ácido nitroso (HNO_2). A su vez, NO_2^\bullet puede provenir de la oxidación de NO_2^- por hemoperoxidasas o de la homólisis de ONOOH , incluso luego de reaccionar con CO_2 para formar ONOOCO_2 que también puede sufrir homólisis para formar NO_2^\bullet .

Si bien no se conoce en profundidad cómo se da la formación del nitro ácido graso se han propuesto algunos mecanismos [92, 94]. En la *Figura 12* se ejemplifica el caso particular de formación de NO_2 -CLA. La adición de NO_2^\bullet se da preferencialmente en las posiciones C9 y C12. Luego se pueden dar dos mecanismos; por un lado la oxidación del radical para recomponer el dieno conjugado, ahora con un grupo NO_2 adicionado (*Figura 12a*), o la adición de un segundo NO_2^\bullet al intermediario radical dando un producto inestable que se descompone rápidamente formando el producto nitrado y liberando HNO_2 (*Figura 12b*).

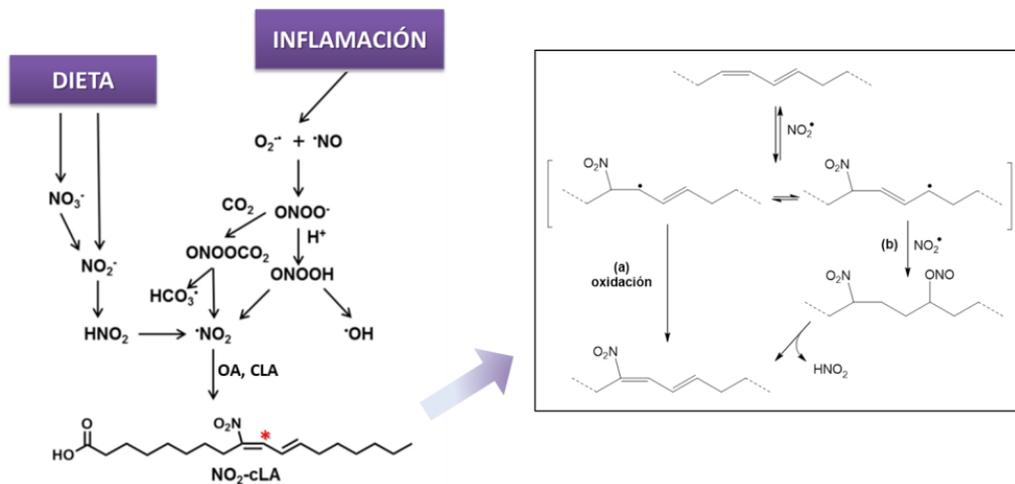


Figura 12 - Mecanismos de formación de nitro ácido grasos. A la izquierda, generación del radical NO_2^\bullet a partir de nitrito y nitrato proveniente de la dieta, o a través de $\text{ONOO}^\bullet/\text{ONOOH}$ en procesos inflamatorios. Se señala con asterisco el carbono electrofílico. Imagen adaptada de [95]. A la derecha, mecanismos propuestos de nitración de ácido linoleico conjugado, mediante oxidación de una especie intermediaria (a) o mediante la adición de una segunda molécula del radical NO_2^\bullet y la liberación de HNO_2 (b).

Los nitro ácidos grasos, nitroalquenos, exhiben propiedades anti-inflamatorias y citoprotectoras beneficiosas en modelos de enfermedades como aterosclerosis, síndrome

metabólico, diabetes, entre otras [92, 96]. El principal mecanismo de acción de los nitro ácidos grasos es a través de la modificación post-traducciona de factores de transcripción y enzimas mediante la formación de un aducto covalente y reversible en una reacción de adición de Michael [97] (*Figura 13*). La presencia de un grupo nitro, electrón atrayente, deja al carbono β del nitroalqueno electrón deficiente y así susceptible al ataque por nucleófilos (cisteínas, histidinas) como se observa en la *Figura 13* [96]. Esta modificación post-traducciona reversible por formación de aducto de Michael en proteínas involucradas en el metabolismo, señalización celular y homeostasis redox, ha sido descrita como un mecanismo sensor que regula respuestas celulares adaptativas [91]. Una de las consecuencias que posee la formación de este aducto es la modificación funcional de la proteína [98].

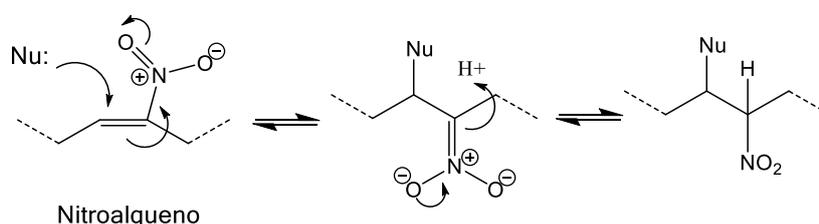


Figura 13 - Mecanismo de la reacción de adición de Michael. El nucleófilo (que podría ser una cisteína o histidina proteica) ataca al carbono electrofílico del nitroalqueno para formar el aducto.

Ejemplos en los que participan los nitroalquenos son numerosos, algunos de ellos incluyen blancos como la Cys285 de PPAR γ y actúan como su agonista provocando la transcripción génica o la Cys38 de la subunidad p65 de NF- κ B bloqueando la transcripción de ciertos genes, así como también algunas proteínas de shock térmico [99-101]. Otros blancos enzimáticos de la nitroalquilación son la xantina oxidasa y la ciclooxigenasa [102, 103]. Por lo general, estas reacciones son reversibles (excepto la reacción de la xantina oxidasa) y pueden ser moduladas por nucleófilos como cisteína, glutatión o sulfuro de hidrógeno [91].

En la *Tabla 2* se muestra la estructura de los isómeros de NO₂-OA y NO₂-CLA que serán utilizados a lo largo del trabajo.

Tabla 2 - Estructura de los isómeros de ácido nitro oleico (NO₂-OA) y ácido nitro linoleico conjugado (NO₂-CLA)

| | |
|-------------------------|--|
| 9-NO ₂ -OA | |
| 10-NO ₂ -OA | |
| 9-NO ₂ -CLA | |
| 12-NO ₂ -CLA | |

1.10 Hipótesis de trabajo

Sabemos que Sirt6 además de su función en la reparación de ADN, participa en mantener la homeostasis celular, en particular en la regulación del metabolismo y la inflamación, condiciones que involucran procesos oxidativos, por lo tanto es pertinente preguntar cómo cambios en el estado redox celular, pueden afectar estructural y funcionalmente a Sirt6.

Si bien hSirt6 no tiene residuo de cisteína crítico para su actividad, posee cuatro cisteínas coordinando a un átomo de Zn^{2+} que cumple un rol estructural, además de un residuo de histidina en el sitio activo, crítico para la catálisis ácido-base. Nos propusimos estudiar potenciales cambios en actividad y estructura de la hSirt6 recombinante al exponerla a oxidantes biológicos que son generados en el proceso de inflamación (en particular H_2O_2 y $ONOO^-$).

Por otro lado, sabemos que Sirt6 posee muy baja actividad desacetilasa *in vitro* y que ésta se ve aumentada en presencia de ácidos grasos de cadena larga. Este efecto es consecuencia de un cambio conformacional provocado por el acercamiento de los dominios de unión a Zn^{2+} y el dominio de Rossmann luego que el ácido graso se acomoda en el bolsillo hidrofóbico formado entre ambos. Nosotros pensamos que un ácido graso insaturado nitrado (nitrolípido) electrofílico se acomode bien en este bolsillo hidrofóbico y pueda reaccionar con residuos nucleofílicos como histidinas o cisteínas, inactivando la enzima o alterando su especificidad de sustrato. Teniendo en cuenta que en el sitio activo está presente la H133 catalítica, es posible la formación de un aducto de Michael entre ésta y el grupo electrofílico del nitrolípido haciendo que la enzima pierda actividad.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo General:

Investigar la potencial regulación redox de hSirt6 como enzima clave del metabolismo, la inflamación y respuesta al estrés, que ayude al desarrollo de promotores de su función anti-inflamatoria.

2.2 - Objetivos específicos:

- 1) Expresar y purificar la enzima Sirt6 humana recombinante.
- 2) Estudiar modificaciones oxidativas en la enzima recombinante hSirt6 por exposición a oxidantes biológicos (en particular peróxido de hidrógeno y peroxinitrito). Seguir cambios estructurales y actividad enzimática.
- 3) Estudiar el efecto de nitrolípidos electrófilos (anti-inflamatorios) en la actividad deacilasa o desacetilasa (activada por ácidos grasos libres) de hSirt6.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El plásmido pQE-80L que contiene la secuencia codificante para Sirt6 humana fue adquirido en Addgene, USA. Contamos por gentileza del Dr. Z. Lou, de la Mayo Clinic Research Foundation, MN, EEUU, bacterias BL21(DE3) ya transformadas con un vector de expresión con la secuencia codificante de Pnc1 con cola de histidinas. Los péptidos acetilados sustrato de Sirt6 fueron sintetizados por United Biosystems, USA. Los ácidos grasos utilizados durante el trabajo de maestría así como el NO₂OA-Bt fueron cedidos por el Dr. Darío Vitturi del Departamento de Farmacología y Química Biológica de la Universidad de Pittsburgh, USA. Los cebadores para realizar mutagénesis dirigida fueron adquiridos en Macrogen Inc, Korea. El peroxinitrito fue sintetizado mediante un reactor de flujo detenido a partir de nitrito de sodio y peróxido de hidrógeno según [104]. El anticuerpo policlonal anti-NO₂-Tyr fue producido por el Departamento de Bioquímica de Facultad de Medicina como se describió previamente [105]. Excepto que se especifique lo contrario, los reactivos utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, USA o AppliChem, Alemania.

3.1. Expresión y purificación de proteínas

Previo a la expresión proteica fue necesario la obtención de células competentes y su transformación, así como también el secuenciado del material a trabajar.

3.1.1. Producción de células competentes

Para este trabajo se produjeron células quimiocompetentes. Dependiendo del objetivo de la transformación se utilizaron células *E. coli* de la cepa DH5 α o BL21(DE3) para el almacenaje de ADN o para la expresión proteica, respectivamente. Para ello, se inocularon 3 mL de LB con una de las cepas de células y se incubaron *overnight* a 37°C. Posteriormente se procedió a un escalado a 50 mL de LB en una dilución 1/100 que se incubó a 37°C a 200 rpm hasta una DO_{600nm}=0.3. Se realizó una centrifugación a 5000 rpm, 10 minutos, 4°C y la fracción celular se lavó con 20 mL de CaCl₂ 0.1 M, etapa que se realizó en dos instancias consecutivas. La fracción celular se incubó en CaCl₂ 0.1 M durante 1 h a 4°C para luego centrifugar en las mismas condiciones que en la etapa anterior. Finalmente las células se resuspendieron en CaCl₂ 0.1 M con el agregado de 20% de glicerol y se guardaron alícuotas a -80°C hasta su uso. Una vez culminada la producción de estas células se analizó su eficiencia de transformación utilizando el plásmido control pUC18.

3.1.2. Transformación de células competentes

La transformación de células se realizó por el procedimiento de shock térmico. Para ello se descongelaron 50 μ L de células DH5 α o BL21(DE3) y se mantuvieron a 4°C por 10 minutos. Se agregaron 2 μ L de ADN y se realizaron tres incubaciones, la primera de 20 minutos a 4°C, luego de 1.5 minutos a 42°C y finalmente 2 minutos a 4°C. Se agregaron 500 μ L de LB y se realizó la última incubación a 37°C por 50 minutos bajo agitación a 200 rpm. Como última instancia se sembraron 50 μ L en una placa LB-Agar con el antibiótico correspondiente.

3.1.3 - Expresión y purificación de hSirt6

Para la expresión de la forma recombinante de hSirt6 se utilizaron bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3) transformadas con el plásmido pQE-80L conteniendo la secuencia codificante para hSirt6 a continuación de una cola de 6 histidinas (en Nt) para facilitar su purificación.

Se realizó un pre-cultivo de la cepa transformante a partir de un inóculo de una colonia aislada de placa en 10 mL de medio 2xYT (100 μ g de ampicilina/mL de medio) que se incubó a 37°C, 200 rpm *overnight*. El medio 2xYT se compone de triptona 16 g/L, extracto de levadura 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.4. Se realizó el cambio de escala a 1 L de medio 2xYT suplementado con 100 μ g de ampicilina/mL de medio y se incubó a 37°C, 200 rpm, hasta alcanzar una DO_{600nm} de aproximadamente 0.6 - 0.8. Se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante el agregado de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM y el cultivo se incubó por 16 horas a 25°C. A continuación de cosecharon las bacterias mediante centrifugación a 5000 rpm durante 25 minutos a 4°C. La fracción insoluble se resuspendió en amortiguador A (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 250 mM, imidazol 5 mM, 1mM β -ME, pH 7.2) en una relación 5 mL/g pellet. Se adicionó un cóctel de inhibidores de proteasas en una concentración de 1 tableta/100 mL, DNAsa 10 μ g/mL y lisozima 0.5 mg/mL y se incubó por 30 minutos a 4°C. Con el fin de facilitar la lisis celular, esta solución se congeló a -80 °C y se descongeló para luego realizar el sonicado en 3 tandas de 5 minutos, amplitud 70% y potencia 40 W. A continuación se centrifugó el lisado celular durante 45 minutos a 18.000 x g a 4 °C, se filtró el extracto líquido con filtros 0.45 μ m.

La purificación de la proteína recombinante se realizó por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) empleando una columna HisTrap (GE Healthcare) de 1 mL. La misma fue pre-equilibrada con 10 volúmenes de amortiguador A y se sembró el extracto soluble filtrado a la columna a un flujo de 0.5 mL/minuto utilizando una bomba peristáltica. A continuación, utilizando el mismo amortiguador se realizó un lavado con 10 volúmenes de

columna. La elución de hSirt6 fue realizada en un equipo ÄKTA FPLC con amortiguador B (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 250 mM, imidazol 250 mM, 1 mM β -ME, pH 7.2). Con el fin de eliminar el imidazol de nuestra muestra, se realizó un cambio de amortiguador mediante el uso de una columna Sephadex G-25 PD-10 a amortiguador C (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 50 mM, 1 mM β -ME, 5 % m/v glicerol, pH 7.2).

Como segunda instancia de purificación se realiza una cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna HiTrap SP HP (GE Healthcare) de 5 mL previamente equilibrada con 10 volúmenes de amortiguador D (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 50 mM, 1 mM β -ME, pH 7.2). La muestra a sembrar en la columna fue concentrada a 2.5 mL (volumen óptimo para obtener una buena resolución). Se realizó la siembra en el equipo FPLC a un flujo de 1 mL/min y posteriormente un lavado de 20 mL con 10 % amortiguador E (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 750 mM, 1 mM β -ME pH, 7.2) en amortiguador D, a un flujo de 0.5 mL/min. Para la llevar a cabo la elución se realiza un gradiente de 25 mL de 10% a 100% v/v de amortiguador E. Como última instancia, se realizó una diálisis para obtener la proteína en el amortiguador de almacenamiento, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 1 mM TCEP, 5 % m/v glicerol, pH 8. Se realizaron espectros de absorbancia para cuantificación de la proteína obtenida, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción de hSirt6 a 280 nm, $\epsilon = 33460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para determinar la pureza y descartar posibles contaminantes se realizó un SDS-PAGE 10% teniendo en cuenta su peso molecular (incluyendo cola de 6 His), 40517 Da. Las bandas proteicas separadas en SDS-PAGE fueron recortadas y analizadas por MALDI-TOF en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UBYP A), del *Institut Pasteur* de Montevideo.

3.1.4. Expresión y purificación de Pnc1

Se inocularon 5 mL de precultivo Luria-Bertani(LB) suplementado con kanamicina (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con BL21(DE3)ryPnc1Kan^R y se incubó a 37°C *overnight*. Se realizó el cambio de escala a 1 L de LB/kanamicina 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se incubó a 37°C hasta $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.6-0.8$ y se indujo la expresión proteica con IPTG 1mM final. Se realizó la cosecha luego de 4 h a 37°C , para lo cual se centrifugó por 20 minutos a 5000 rpm.

La fracción celular se resuspendió en amortiguador de lisis (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, tritón 1%, β -ME 3 mM, pH 8) con el agregado de leupeptina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DNAsa 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lisozima 0.5 mg/mL y MgCl_2 10 mM. Luego de 30 minutos en hielo se realizó la sonicación utilizando

macrotip en tres tandas de 5 minutos cada una, 70% amplitud, potencia 40W. Una vez realizada la ruptura celular, se centrifugó a 18000 x g, 4°C por 45 minutos y el sobrenadante se filtró con filtros 0.4 µm. Como único paso de purificación se realizó una IMAC, para lo cual se equilibró una columna de níquel de 1 mL con amortiguador de lisis. Se sembró la muestra a un flujo de 0.5 mL/min y se realizó un lavado con 10 volúmenes de columna con amortiguador de lavado (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 30 mM, β-ME 3mM pH 8). La elución se realizó con jeringa con 2.5 mL de amortiguador de elución (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, β-ME, pH 8). Para finalizar se cambió el amortiguador para quitar el imidazol, utilizando una columna Sephadex G-25 PD-10 equilibrada con amortiguador NaCl 150 mM, Na₂PO₄ 50 mM, β-ME 3 mM, pH 8. La elución se realizó en 3 mL y se agregó 25 % glicerol para almacenarla a -80 °C. Se midió concentración mediante absorbancia a 280 nm ($\epsilon = 42400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Para comprobar la calidad y pureza de Pnc1 se realizó un SDS-PAGE 12% y se midió actividad nicotinamidasa (ver 3.2.2).

3.1.5. Secuenciación de hSirt6

Para corroborar la secuencia nucleotídica de hSirt6 con la que contamos, se enviaron muestras a secuenciar al servicio de secuenciación de *Macrogen Inc*. Para ello se realizó una extracción de ADN mediante el uso de un kit comercial (*Invitrogen*). Para la secuenciación se seleccionaron 3 cebadores, dos *forward* (M13R y pQE_F) y uno *reverse* (pQE_R) complementarios a parte de la secuencia del plásmido donde está clonada nuestra proteína (pQE-80L, *Figura 14*). Dichos cebadores fueron seleccionados de una lista que ofrece el servicio y las secuencias son las siguientes:

M13R: 5' CGGATAACAATTCACACAG 3'

pQE_F: 5' CCCGAAAAGTGCCACCTG 3'

pQE_R: 5' GTTCTGAGGTCATTACTGG 3'

En la *Figura 14* se muestra el mapa del plásmido pQE-80L con los cebadores seleccionados. Como puede observarse, los cebadores directos contemplan también las secuencias que codifican para el sitio de unión a ribosoma (RBS), el inicio de la traducción con el codón ATG y la cola de 6 histidinas previa a la secuencia de interés. Este aspecto es importante ya que esta secuenciación, entre otras cosas, nos permitió determinar que el marco de lectura era el esperado. En el anexo (ver 7) se muestra el resultado de la secuenciación.

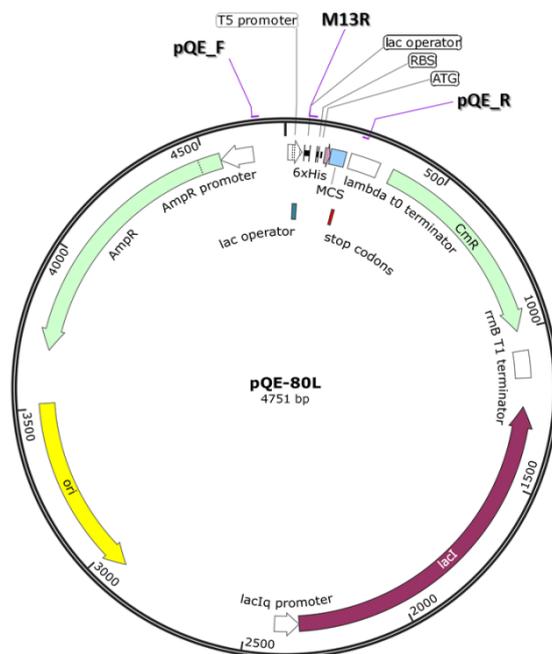


Figura 14 - Mapa del plásmido pQE-80L donde se señala la ubicación de los cebadores seleccionados para la secuenciación de hSirt6. Cebadores directos: pQE_F y M13R, cebador reverso: pQE_R

3.1.6. Mutagénesis de hSirt6

Con el fin de determinar dónde se forma el aducto de Michael con los nitro ácidos grasos, se decidió realizar dos mutantes de hSirt6. Se mutaron las cisteínas de los extremos N y C terminales por serina para obtener hSirt6 C18S y C320S.

Ambas cisteínas están codificadas por el codón *tgc* y se realizó la mutación para obtener el codón *tcc* codificante para serina. Los cebadores diseñados fueron evaluados utilizando la herramienta *online* OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>) con el fin de descartar la formación de estructuras secundarias como horquillas, homodímeros y heterodímeros. Los cebadores con los cuales se trabajó se resumen en la *Tabla 3*.

Tabla 3 - Cebadores utilizados para la mutagénesis de hSirt6 en C18 y C320 por serina.

| Cebador | Secuencia | Nº nucleótidos | Contenido GC (%) | Tm (C°) |
|----------------|----------------------------------|----------------|------------------|---------|
| SIRT6_C18S_F: | 5' GACAAGGGCAAGTCCGGCCTCCCG 3' | 24 | 70.8 | 67.9 |
| SIRT6_C18S_R: | 5' CGGGAGGCCGGACTIONTCCCTTGTC 3' | 24 | 70.8 | 67.9 |
| SIRT6_C320S_F: | 5'GCAGGAGCCCTCCGCCAGCACAA 3' | 24 | 70.8 | 69.8 |
| SIRT6_C320S_R: | 5' TTGTGCTGGGCGGAGGGCTCCTGC 3' | 24 | 70.8 | 69.8 |

Se utilizaron 10 ng de ADN molde, 125 ng de cada uno de los cebadores, 200 µM de cada dNTP y 1 U de polimerasa en un volumen final de reacción 50 µL. En la *Tabla 4* se muestran las

condiciones de la PCR realizada. Una vez terminados los ciclos de PCR se agregó la enzima DpnI y se incubó durante 1 h a 37°C. Posteriormente se transformaron 100 µL de células XL1 competentes con 10 µL del producto de PCR, se plaquearon en LB-ampicilina 100 µg/µL y luego de obtener colonias aisladas se realizó la extracción de ADN de hSirt6 C18A y C320S.

Tabla 4 - Condiciones de PCR para mutagénesis

| Repeticiones | Temperatura | Tiempo |
|--------------|-------------|---------|
| 1 | 95 °C | 30 s |
| | 95 °C | 30 s |
| 18 | 60 °C | 1 min |
| | 68 °C | 5.8 min |
| 1 | 68 °C | 10 min |

3.2. Ensayos enzimáticos

3.2.1. Actividad desacetilasa y deacilasa de hSirt6

Se han utilizado diversos métodos para determinar la actividad de sirtuinas que van desde seguir el consumo de NAD por cromatografía en capa fina [106] hasta la detección del producto desacetilado por HPLC [22, 26], pasando por el kit disponible comercialmente que hace uso de un ensayo discontinuo fluorescente (*Fluor de Lys*). En esta tesis, hemos utilizado dos ensayos para medir actividad: a) ensayo acoplado, b) ensayo por HPLC.

a) Ensayo acoplado

Para poder determinar la actividad de hSirt6 nos basamos en una metodología reportada por el grupo de trabajo de John M. Denu, en el cual utilizan un ensayo enzimático acoplado para la determinación de la actividad desacetilasa de otra de las isoformas de sirtuina, Sirt1 [107]. Este ensayo tiene la gran ventaja de poder medir de forma continua el avance de la reacción de desacetilación, que se acopla a otras dos reacciones enzimáticas bajo condiciones no limitantes. Como se muestra en la *Figura 15* la sirtuina es capaz de desacetilar el sustrato cuya lisina está acetilada, utilizando NAD⁺ como cofactor. Además de liberar el sustrato desacetilado, se libera nicotinamida que es consumida por una nicotinamidasa (Pnc1) para generar ácido nicotínico y amonio. El amonio liberado participa en la reacción de la glutamato deshidrogenasa (GDH) que consume α-cetoglutarato para liberar glutamato. Esta última reacción se da a expensas de NADPH, lo cual hace posible el seguimiento de la actividad de Sirt por absorbancia a 340 nm.

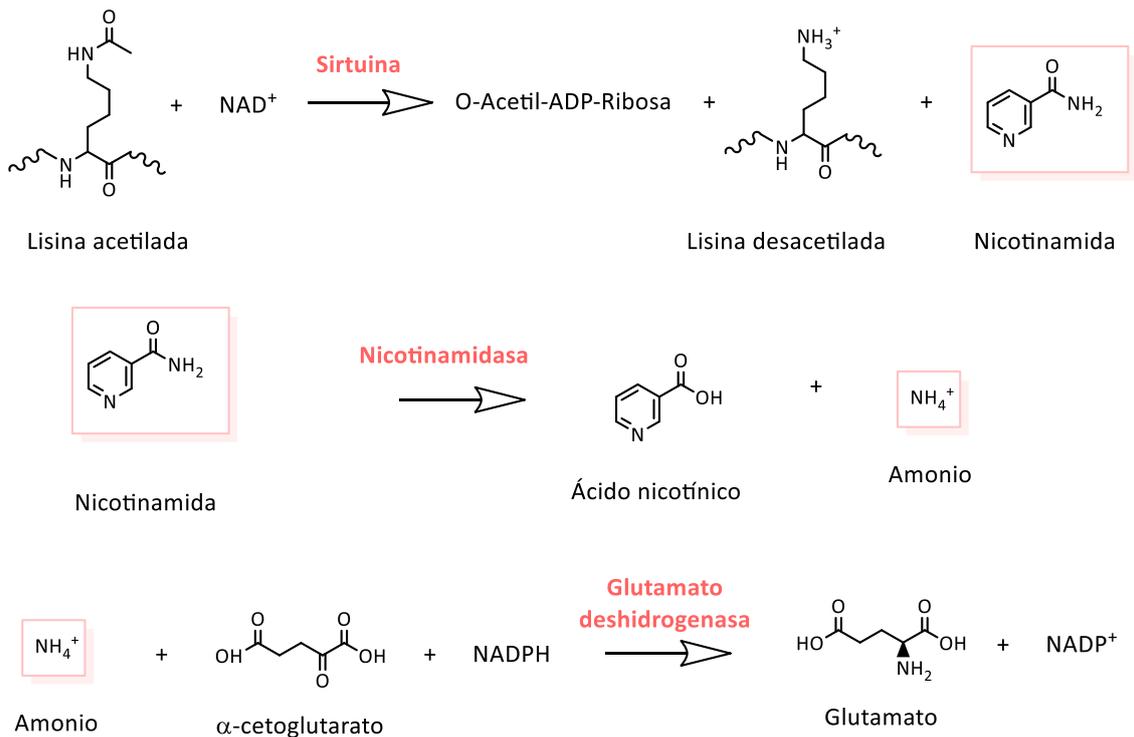


Figura 15 - Esquema de reacciones del ensayo enzimático acoplado.

Este ensayo fue utilizado tanto para medir actividad desacetilasa como deacilasa por lo que se trabajó con los péptidos sintéticos H3K9Ac o H3K9Myr adquiridos en *United BioSystems*. Las secuencias de los mismos se muestran en la *Tabla 5*:

Tabla 5 - Secuencia aminoacídica de los sustratos utilizados para las medidas de actividad desacetilasa y deacilasa.

| | Secuencia |
|----------------|----------------------|
| H3K9Ac | Ac-KQTARK(Ac)STGGWW |
| H3K9Myr | Ac-QTARK(Myrr)STGGWW |

Las condiciones del ensayo que se utilizaron son las siguientes: 600 μ M NAD, 3 mM α - cetoglutarato, 200 μ M NADPH, 2 U GDH, 3 μ M Pnc1, 50 μ M H3K9Ac o 30 μ M H3K9Myr, 0.5 μ M hSirt6 en amortiguador Na₂PO₄ 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4. Los *stocks* principales de los sustratos peptídicos fueron preparados en una concentración 2.5 mM en amortiguador (H3K9Ac) o DMSO (H3K9Myr). La temperatura utilizada para el ensayo fue 37°C o 25°C para actividad desacetilasa o demiristoilasa, respectivamente.

Existe un consumo basal de NADPH, debido a la contaminación con amonio de uno de los *stocks* comerciales, por lo cual la mezcla de reacción se incubó durante 20 minutos a la

temperatura del ensayo y se disparó la reacción mediante el agregado de enzima. Se registró la absorbancia a 340 nm en el tiempo y se determinaron constantes cinéticas. Para la determinación de K_M de péptido, se tuvo en cuenta que estamos trabajando con una reacción bisustrática, y por lo tanto se trabajó en condiciones de pseudo-primer orden utilizando NAD^+ en concentraciones exceso y variando la concentración de péptido. A partir de las pendientes iniciales determina la velocidad inicial ($V_{inicial}$) de la siguiente manera:

$$V_{inicial} = \frac{d [NADPH]}{dt} \quad (1)$$

Sabiendo que $A = \epsilon \cdot b \cdot C$,

$$V_{inicial} = \frac{d A_{340nm}}{dt} \times \frac{1}{\epsilon} \quad (2)$$

Donde ϵ corresponde al coeficiente de extinción de $NADPH = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, b al paso óptico y C a la concentración.

Una vez realizado esto, se ajusta el gráfico $V_{inicial}$ vs. [péptido] a la ecuación de Michaelis-Menten para determinar los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_M :

$$V_{inicial} = \frac{V_{m\acute{a}x} [p\acute{e}ptido]}{K_M + [p\acute{e}ptido]} \quad (3)$$

En algunos casos se expresan los resultados como "actividad relativa" con su respectiva desviación estándar (SD). Para ello se calculó la actividad relativa dividiendo $V_{inicial}$ para cada uno de los triplicados, por el valor promedio del control (enzima no tratada). Finalmente se determinó el promedio de dichos valores con su respectivo SD.

b) Ensayo por HPLC

El método se basa en la separación de producto desacetilado del sustrato acetilado. En este caso, se incorporaron residuos de triptófano en el péptido sustrato para poder seguir la reacción por absorbancia o fluorescencia (Tabla 5). Se utilizó un equipo 1260 Infinity (Agilent Technologies), y se trabajó con una columna C18 de fase reversa, utilizando como fase móvil 0.1% TFA en agua y acetonitrilo. El método a seguir consistió en una primer etapa de equilibrado de la columna con 20% acetonitrilo, un gradiente de 20% a 40% acetonitrilo en 9 minutos y posterior reequilibrado. Se realizó todo a un flujo de 1 mL/min. Debido a la presencia de triptófanos en sustrato y producto podemos obtener registros tanto de absorbancia a 280 nm y fluorescencia excitando a 280 nm y utilizando un λ_{em} 350 nm. En la Figura 16A se muestra el cromatograma de la elución de una mezcla de estándares de sustrato

y producto, mostrando la linealidad para un amplio rango de concentraciones (2.5 a 400 μM), *Figura 16B*. Finalmente se utilizaron únicamente los registros de fluorescencia ya que debido a la sensibilidad no fue posible cuantificar el producto por absorbancia.

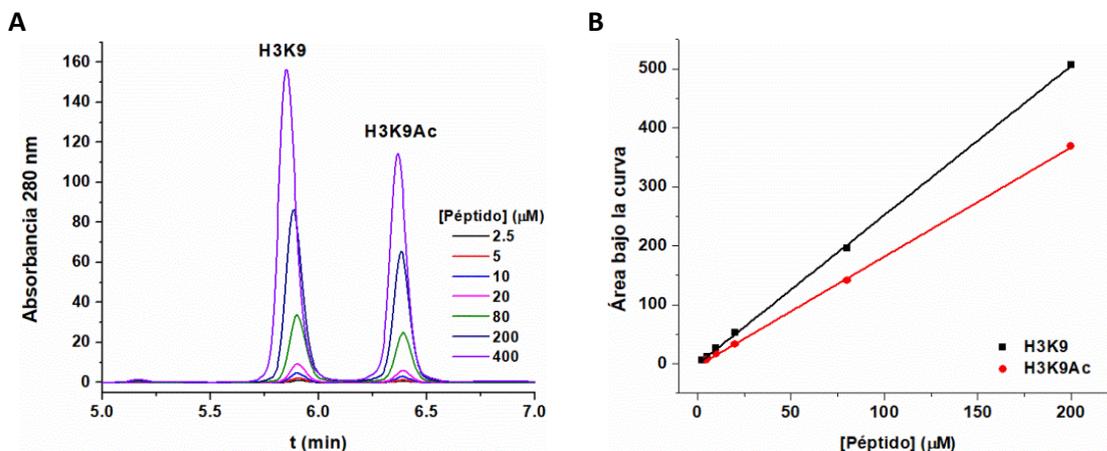


Figura 16 - Puesta a punto de ensayo mediante HPLC. (A) Comatograma de una mezcla de estándares de sustrato H3K9Ac y producto H3K9. (B) Se muestra la linealidad entre el área bajo las curvas de los picos del cromatograma y la concentración tanto de péptido sustrato (H3K9Ac) como de producto (H3K9).

Se realizó una curva de calibración que fue utilizada para todos los ensayos de actividad realizados en este trabajo (*Figura 17*).

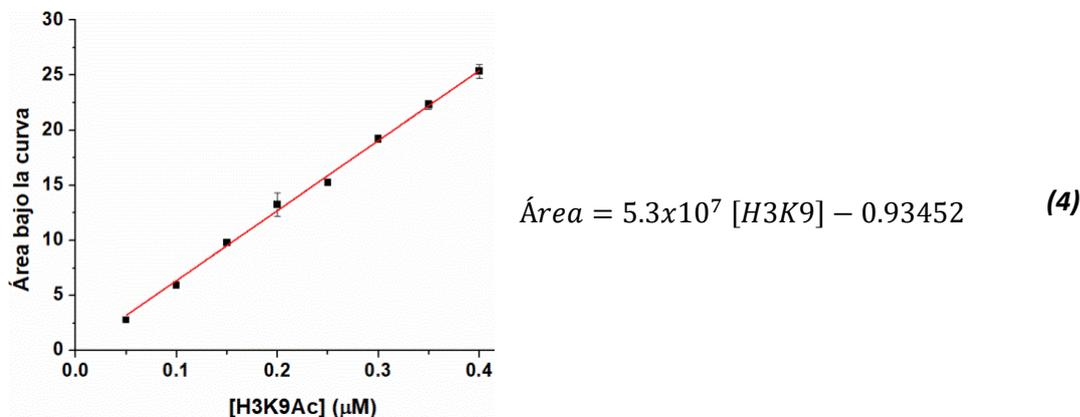


Figura 17 - Curva de calibración. Realizada mediante el uso de fluorescencia para los ensayos de medidas de actividad desacetilasa mediante HPLC.

Para las medidas de actividad se trabajó utilizando amortiguador NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4. Las concentraciones utilizadas fueron 0.5 mM NAD^+ , 50 μM H3K9Ac, 1 μM hSirt6 a 37 °C. Se toman alícuotas en el tiempo y se corta la reacción con el mismo volumen de HCl 0.5 M en MeOH.

3.2.2. Actividad nicotinamidasas de Pnc1

Uno de los métodos para comprobar la calidad de Pnc1 luego de purificada (ver 3.1.4) es mediante la medida de actividad nicotinamidasas. Para ello se tiene en cuenta la reacción que cataliza:



La forma que tenemos de medir actividad de la enzima es utilizando parte del ensayo acoplado descrito anteriormente. Como se mencionó, la enzima GDH es capaz de consumir amonio a expensas de NADPH (monitoreado a 340 nm) (Figura 15). Para llevar a cabo este par de reacciones se utilizaron las siguientes condiciones: 3 mM α -cetoglutarato, 0-600 μ M NAM, 200 μ M NADPH, 2 U GDH, 2 μ M Pnc1 en amortiguador Na_2PO_4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4.

Se registró la absorbancia a 340 nm en el tiempo y se comparan los valores cinéticos con valores reportados [108].

3.2.3. Tratamiento de hSirt6 con agentes oxidantes

Se analizó el efecto de dos agentes oxidantes sobre hSirt6, ONOO^- y H_2O_2 . Para ambos tratamientos la enzima fue reducida con DTT (ver 3.3.1) durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego de quitar el exceso de agente reductor se comenzaron los tratamientos. Las concentraciones tanto de proteína como de oxidantes se irán detallando en la sección de resultados a medida que se muestren los ensayos. Previo a cada experimento se preparan stocks frescos de ONOO^- y H_2O_2 y se cuantifican espectrofotométricamente:

- En el caso del H_2O_2 se realizaron diluciones en agua destilada y se midió absorbancia a 240 nm utilizando un valor de coeficiente de extinción de $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [109].
- El ONOO^- se descongeló y agregó dióxido de manganeso para eliminar trazas de H_2O_2 que puedan haber quedado de la síntesis [110]. Luego se diluyó en NaOH 100 mM y se midió la absorbancia a 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para determinar su concentración.

Luego de cada tratamiento los excesos de oxidantes fueron removidos por gel filtración.

3.2.4. Tratamiento de hSirt6 con ácidos grasos y nitro ácidos grasos

Los stocks principales de ácido oleico (OA), ácido nitro-oleico (NO_2 -OA) y ácido linoleico conjugado (NO_2 -CLA) se encuentran en metanol mientras que las diluciones a usar en todos los experimentos de este trabajo se realizaron en DMSO justo antes de cada experimento.

Previo a cada ensayo se cuantificó NO_2 -OA mediante espectrofotometría utilizando su máximo de absorción a 270 nm ($\epsilon = 8220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [97]. De igual forma, se cuantificó el NO_2 -CLA

utilizando su $\epsilon = 6490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a $\lambda = 330 \text{ nm}$ [96]. Ambas medidas fueron realizadas en amortiguador fosfato.

Para los distintos experimentos, una vez realizada la mezcla de hSirt6 con ácido graso se dejó reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente. En el caso de los ensayos de actividad, pasados estos 20 minutos se inicia la reacción de desacetilación o deacilación. Las concentraciones utilizadas serán detalladas en la sección resultados. Se realizó un control con la enzima sin ácido graso incubada igual tiempo a esa temperatura.

Se determinaron parámetros cinéticos para los ensayos de hSirt6 pre-incubada con los distintos ácidos grasos de la misma forma que se explicó anteriormente. Es importante mencionar que se realizaron los controles correspondientes descartando cualquier efecto que puedan tener los nitro ácidos grasos sobre las enzimas del ensayo acoplado.

3.3. Procedimientos generales

3.3.1. Reducción de tioles

Para algunos de los experimentos, es necesario que los tioles se encuentren en estado reducido. Para ello, se utilizó DTT como agente reductor.

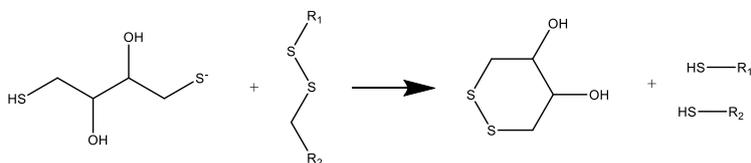


Figura 18 - Reacción de reducción de un enlace disulfuro con ditioneitol (DTT).

Se incubó hSirt6 con 5 mM DTT a temperatura ambiente por 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción de reducción. El exceso de agente reductor se quitó mediante gel filtración utilizando una columna PD SpinTrap G-25 (GE Healthcare) equilibrada con amortiguador Na_2PO_4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4.

3.3.2. Cuantificación de tioles reducidos con ditiodipiridina (dtdPy)

Para realizar las medidas de concentración de tioles reducidos se utilizó el reactivo 4,4'-ditiodipiridina (dtdPy), que al reaccionar con un tiol resulta en el producto 4-tiopiridona (Figura 19), cuantificable por absorbancia a 324 nm [111]. Éste, presenta un coeficiente de extinción de $21400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

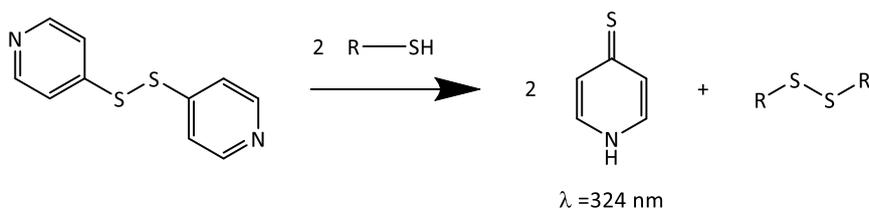


Figura 19 - Reacción general de un tiol con dtdPy

3.3.3. Alquilación de hSirt6 con N-etilmaleimida (NEM)

Se reduce la muestra como se mencionó en 3.3.1, una vez libre de agente reductor se incubaba con NEM 55 mM durante 45 minutos a 30 °C. En el caso de muestras a analizar por espectrometría de masa fueron corridas en SDS-PAGE y la banda correspondiente al PM se aisló y envió al servicio del *Institut Pasteur* de Montevideo.

3.3.4. Cuantificación de Zn²⁺

Como se mencionó anteriormente, hSirt6 contiene un átomo de Zn²⁺ coordinado por cuatro cisteínas. Luego de cada purificación es necesario cuantificar la cantidad de dicho metal como un control de calidad de nuestra proteína. Para realizar esto es necesario en primer lugar liberar el metal y luego capturarlo con algún método que nos permita realizar la cuantificación.

Para la liberación del metal se utilizó p-cloromercuriobenzoato (p-CMB), el mercurio quedará unido al tiol mientras se libera el átomo de Zn²⁺ y éste es capturado por el agente quelante 4-(2-Pyridylazo) resorcinol (PAR). Una característica de este agente quelante es que cuando está en su forma libre absorbe a 400 nm mientras que el complejo PAR:Zn absorbe a 500 nm con un coeficiente de extinción de 66000 M⁻¹cm⁻¹ [112, 113]. En la *Figura 20* se muestran las estructuras de las moléculas mencionadas.

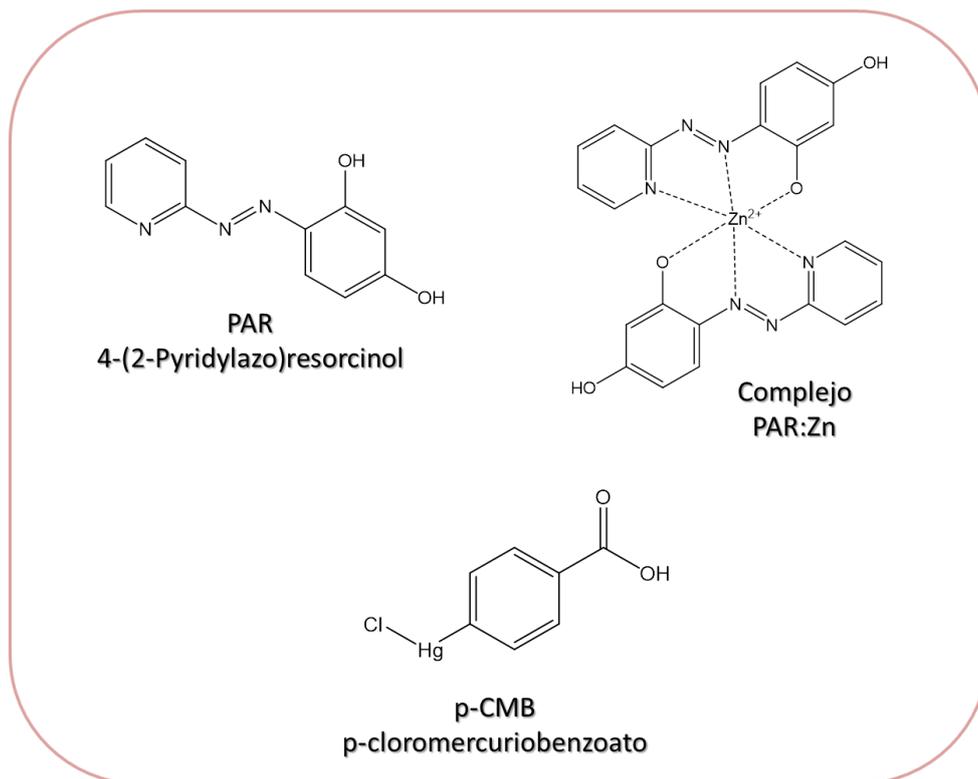


Figura 20 - Estructuras moleculares de los compuestos utilizados para la cuantificación de Zn^{2+} . PAR: (2-Pyridylazo) resorcinol cuyo máximo de absorbancia es 400 nm, PAR:Zn: complejo formado entre el agente quelante y el metal con un máximo de absorción a 500 nm, p-CMB: p-cloromercuriobenzoato.

Para la reacción de cuantificación se trabaja con una concentración de hSirt6 2 μ M, p-CMB 20 μ M y PAR 40 μ M. Luego de 30 minutos a temperatura ambiente se realiza una centrifugación de 5 minutos a 5000 x g y se registran espectros entre 300 y 600 nm. Una vez obtenido el valor de absorbancia a 500 nm y calculada la concentración de Zn^{2+} se calcula la relación:

$$\frac{N^{\circ} \text{ moles de } Zn^{2+}}{\text{mol de hSirt6}} \quad (5)$$

3.3.5. Análisis estructural por dicroísmo circular (CD)

El análisis de las muestras se llevó a cabo en un equipo de CD "Chirascan Q100 Spectropolarimeter (Applied Photophysics, UK)" en Institut Pasteur de Montevideo. Para evitar cualquier interferencia durante este análisis, todas las muestras fueron preparadas en un amortiguador $NaHPO_4$ 10 mM, pH 7.4, filtrado con filtros de 0.2 μ m. Se utilizaron cubas de 0.1 cm y 1 cm para el CD UV-lejano y UV-cercano respectivamente. Para ello, se verificaron las concentraciones óptimas de enzima para obtener un buen espectro, que no superara absorbancias de 0.9 a 190 nm y 280 nm, lo cual se corresponde con 3 μ M para el CD lejano

(195 a 250 nm) y 26 μM para el CD cercano (250 a 350 nm). Una vez preparadas las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 7000 x g.

Para la comparación de todos los espectros, se normalizó por la concentración de hSirt6 utilizada en cada espectro y a su vez se tuvo en cuenta la longitud de camino óptico de la cubeta utilizada [114].

(6)

$$\frac{\theta \text{ (mdeg)}}{(n - 1) \cdot [\text{enzima}] \cdot 10 \cdot l \text{ (cm)}}$$

donde θ corresponde a elipticidad, n al número de aminoácidos de la muestra y l al paso óptico

3.3.6. Geles de poliacrilamida para electroforesis

Para analizar la pureza de las proteína luego de las purificaciones se utiliza la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE). Debido al peso molecular de hSirt6 (39 kDa) se utilizaron geles separadores al 10% y concentradores (5%). Las muestras se preparan en amortiguador de carga: Tris 62,5 mM pH 6.8, 2% dodecil sulfato de sodio (SDS), 10% glicerol, 10% β -ME, 0,01% azul de bromofenol (con o sin β -ME dependiendo el ensayo). Las mismas son calentadas a 100 °C durante 5 minutos y una vez sembradas se realiza la corrida electroforética a 20 mA durante aproximadamente 1.5 h. El amortiguador de electrodo a usar consiste en 25 mM Tris, 0.2 M glicina, pH 8.3. Para el revelado de las bandas proteicas en los geles se realiza una tinción con solución coloidal Azul de Coomassie.

***Gel de poliacrilamida 10%

Para preparar 10 mL de gel separador al 10% se debieron agregar y mezclar: 4 mL de agua destilada, 3.3 mL de acrilamida/bis-acrilamida al 30%, 2.5 mL de amortiguador de separación (Tris-HCl 1.5 M pH=8.8), 0.1 mL de SDS 10%, 0.1 mL de APS 10% y 4 μL TEMED.

Para preparar 4 mL de gel concentrador al 5% se debieron agregar y mezclar: 2.7 mL de agua destilada, 0.67 mL de acrilamida/bis-acrilamida al 30%, 0.5 mL de amortiguador de concentración (Tris-HCl 0.5 M pH=6.8), 40 μL de SDS 10%, 40 μL de APS 10% y 4 μL TEMED.

3.3.7. Electroforesis diagonal

La electroforesis diagonal es una técnica que permite la detección de disulfuros intramoleculares e intermoleculares. La misma consiste en una electroforesis secuencial no reductora y una reductora. La mezcla proteica se siembra en un gel en condiciones no reductoras y luego el carril es cortado e incubado durante 15 minutos en primera instancia en una solución que contiene 1,4-ditiotreitol (DTT) y posteriormente en una que posee iodoacetamida (IAM). Dicha solución consiste en 6 M urea, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 2% SDS,

20% glicerol y 2% DTT o 2.5% IAM dependiendo el caso. A continuación el carril es sembrado en otro gel colocando las bandas de mayor peso molecular hacia la izquierda (*Figura 21*).

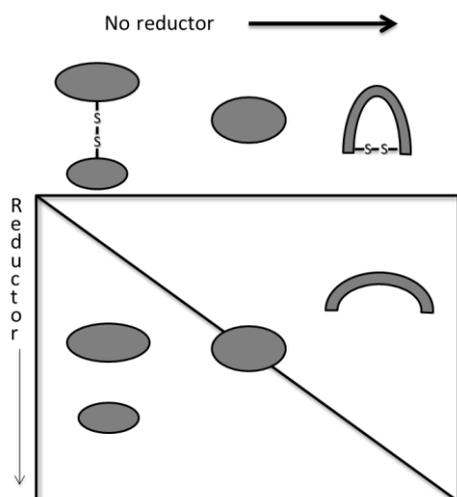


Figura 21 - Esquema del gel resultante en una electroforesis diagonal. Se muestra cómo sobre la diagonal se encuentran los *spots* de moléculas que no poseen disulfuros, por encima se ven los *spots* de proteínas con disulfuros intramoleculares y por debajo de ella *spots* con disulfuros intermoleculares.

Las proteínas que no contengan enlaces disulfuro se visualizan como *spots* a lo largo de una línea diagonal debido a que migrarán de igual forma en ambas condiciones (reductoras y no reductoras). Por debajo de la diagonal estarán las proteínas que contengan disulfuros intermoleculares ya que poseen menor peso molecular en condiciones reductoras. Por último las proteínas con disulfuros intramoleculares quedarán por encima de la diagonal ya que su peso molecular aparente es menor.

Para realizar este tipo de electroforesis y teniendo en cuenta que trabajamos con una proteína pura, además de hSirt6 se agregó glutatión S transferasa (GST) de 26 kDa con el fin de poder determinar la línea diagonal.

3.3.8. Western blot anti-Sirt6

Una vez realizado el SDS-PAGE, se realizó la transferencia utilizando una membrana de polivinildifluoruro (PVDF) toda la noche a 10 V a 4 °C, utilizando un amortiguador Tris 25 mM, glicina 0.2 mM, 20% etanol. Posteriormente se realizó el bloqueo de la membrana utilizando TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), tween 0.6 %, seroalbúmina bovina (BSA) 5%. Se incubó la membrana con anticuerpo primario de conejo anti-Sirt6 (Cell Signaling Technology®) utilizando una dilución 1/1000. Luego de tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween 0.1% se incubó la membrana con el anticuerpo secundario, para lo cual se utilizó el anticuerpo *Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 680)* (Abcam). Por último se realizaron otros tres lavados en las mismas condiciones anteriores. Tanto el bloqueo como la incubación con los anticuerpos se

realizaron a temperatura ambiente durante 1 h. El revelado se realizó utilizando un equipo G-Box.

3.3.9. Western blot anti-NO₂Tyr

El procedimiento es básicamente igual al caso anterior salvando algunas diferencias en los tiempos de incubación. La transferencia se realizó por 1.5 h a 100V y 4 °C, mientras que el bloqueo se realizó toda la noche a 4°C. El anticuerpo anti-NO₂Tyr se utilizó en una dilución 1/1000 en solución de bloqueo.

3.3.10. Western blot anti-NO₂-OA biotinilado.

Para determinar si se da la formación de un aducto de Michael entre NO₂-OA y nucleófilos como histidinas o cisteínas de hSirt6 se realizó un western blot anti ácido nitro oleico biotinilado (NO₂-OA-Bt). Para ello, se redujo hSirt6 con una resina de tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP). Una vez reducida la proteína, se la dejó reaccionar con distintas concentraciones de NO₂-OA-Bt durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron corridas en un SDS-PAGE y se llevó a cabo la transferencia a membrana de PVDF por 1 h a 100 V a 4 °C. Una vez realizada la transferencia, se procedió a una tinción con *Ponceau* para la obtención de una imagen con un equipo G-box con el fin de realizar una densitometría al final del experimento. A continuación se realizó el bloqueo de la membrana con PBS-caseína 1% (BIO-RAD) *overnight* a 4°C, se incubó con Streptavidina-HRP por 1 h a temperatura ambiente y se lavó en tres tandas de 5 minutos con TBS-Tween 0.1% y dos con TBS. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (ThermoFisher Scientific).

3.3.11. Identificación de las proteínas por espectrometría de masa

Las bandas proteicas mayoritarias, separadas por electroforesis SDS-PAGE, se recortan, se extraen proteínas del gel y se someten a digestión tróptica para luego mezclar los péptidos con la matriz de MALDI y ser analizados por espectrometría de masas MALDI/TOF-TOF en el servicio del *Institut Pasteur* de Montevideo. La identificación de las proteínas se realiza ingresando la huella peptídica en el motor de búsqueda Mascot.

3.3.12. ESI-MS/MS para identificación de aductos

Con el fin de determinar la formación de aductos de Michael entre los nitrolípidos y hSirt6 se realizó un análisis por ESI-MS/MS (servicio UBYPA del *Institut Pasteur* de Montevideo).

Para comenzar se redujo hSirt6 con 5 mM DTT y al quitar exceso de reductor mediante gel filtración se utilizó un amortiguador bicarbonato de amonio, pH 8. La concentración óptima para trabajar es 0.16 g/L, lo que equivale a 4 µM hSirt6. Se trabajó con tres muestras, por un

lado un control de enzima no tratada y por otro, dos tratamientos con NO₂OA en exceso de 0.5x y 5x con respecto a hSirt6. Dichos tratamientos fueron realizados a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se elimina el exceso de nitrolípido mediante gel filtración para evitar interferencias durante el análisis. Teniendo en cuenta la reversibilidad del aducto de Michael se realizó una tripsinización a tiempos cortos (2 h a 37 °C) e inmediatamente después se realizó el análisis.

3.3.13. Modelado molecular computacional(hSirt6 y nitro ácidos grasos)

En esta instancia se trabajó en colaboración con Dr. Matías Machado del Laboratorio de Simulaciones Biomoleculares de Institut Pasteur de Montevideo.

En los cálculos del modelado molecular computacional se utilizó como molde la estructura de hSirt6 en complejo con el péptido H3K9Myr y el fragmento ADP-ribosa del co-sustrato NAD⁺ (PDB 3ZG6 [26]). Los residuos 1 al 12 de hSirt6 que constituyen el bucle de unión a grupos acilo fueron removidos de la estructura debido a su alta flexibilidad, evidenciada en las estructuras apo de la enzima (PDB 3PKI [13]) y 5X16 [5]). Con el fin de bloquear bolsillos inespecíficos en la superficie de hSirt6 se mantuvo la presencia tanto del co-sustrato como de moléculas de agua co-cristalizadas (residuos 2006 2018 2019 2035 2036 2038 2040 2042 2053 2080 2099 2103 2104 2110 2111 2123 2124 2132). Dos escenarios fueron modelados considerando la presencia o ausencia del péptido H3K9. Para el primer caso, el péptido sustrato H3K9 fue modelado con un grupo acetilo reemplazando el miristilo de la estructura original. Las coordenadas del receptor fueron movidas empleando el software VMD 1.9.3 (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>) [115] previo a los cálculos de *docking*, de acuerdo a la siguiente matriz de transformación: (-0.782000720500946 0.30951544642448425 -0.5409945249557495 69.48826599121094) (0.5513688921928406 -0.06120478734374046 -0.8320134282112122 3.671846389770508) (-0.2906324565410614 -0.9489226341247559 -0.1227950006723404 -6.218472480773926) (0.0 0.0 0.0 1.0), donde cada vector es una fila. Los ligandos utilizados fueron OA, 9-NO₂OA y 10-NO₂OA. Los cálculos de *docking* se realizaron con AutoDock Vina [116]. Cada molécula fue preparada con AutoDockTools [117], combinando los Hidrógenos no polares y calculando las cargas Gasteiger. Los residuos de Histidina fueron modelados asumiendo su protonación en Nε. El receptor fue considerado rígido, mientras que los ligandos se modelaron completamente flexibles. La grilla de búsqueda fue centrada en las coordenadas x = 21.464 Å, y = 3.555 Å y z = 16.125 Å, y el tamaño total se definió como 50 Å, 70 Å y 44 Å para cada coordenada respectivamente. Se generaron 20 modos de unión por corrida utilizando un valor de exhaustividad de 20 y permitiendo rangos energéticos de 100

kcal/mol. Los cálculos fueron replicados 500 veces para un total de 10000 poses por ligando. Las poses con un *score* de hasta 1 kcal/mol mayor al de la mejor conformación fueron seleccionadas para el análisis de *cluster*. Este análisis se basó en la matriz de distancia RMSD (del inglés: *root mean square deviations*), usando un valor de corte de 4 Å para agrupar poses semejantes. El *cluster* más poblado de cada ligando fue empleado para el análisis.

3.3.14. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó a partir de corridas realizadas en su mayoría por triplicado (expresados con su respectiva desviación estándar, SD), mediante “*one way*” ANOVA utilizando el método Tukey para comparaciones múltiples. Las diferencias significativas se consideran para valores $p < 0.05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

4.1.1. Expresión y purificación de hSirt6

Para poder cumplir los objetivos planteados se realizó la expresión y puesta a punto de la purificación de la proteína recombinante hSirt6 (Figura 22). Una vez obtenido el lisado celular, el material soluble se sembró en una columna His-Trap (IMAC) previamente equilibrada en amortiguador con 5 mM imidazol. Luego de eluir la fracción no unida (FNU), la proteína eluye en el segundo pico (Figura 22A) al aumentar la concentración de imidazol a 250 mM. Éste fue colectado y se le realizó un cambio de amortiguador conteniendo 50 mM NaCl para ser sembrado en una columna de intercambio catiónico donde primero eluye la fracción no unida, luego se aumenta la concentración de NaCl a 100 mM y por último un gradiente de 25 mL hasta una concentración de NaCl de 750 mM. A lo largo del gradiente, se observa un patrón de elución con 3 picos (P1, P2 y P3, Figura 22B) que fueron colectados por separado para ser analizados individualmente mediante electroforesis (Figura 22C).

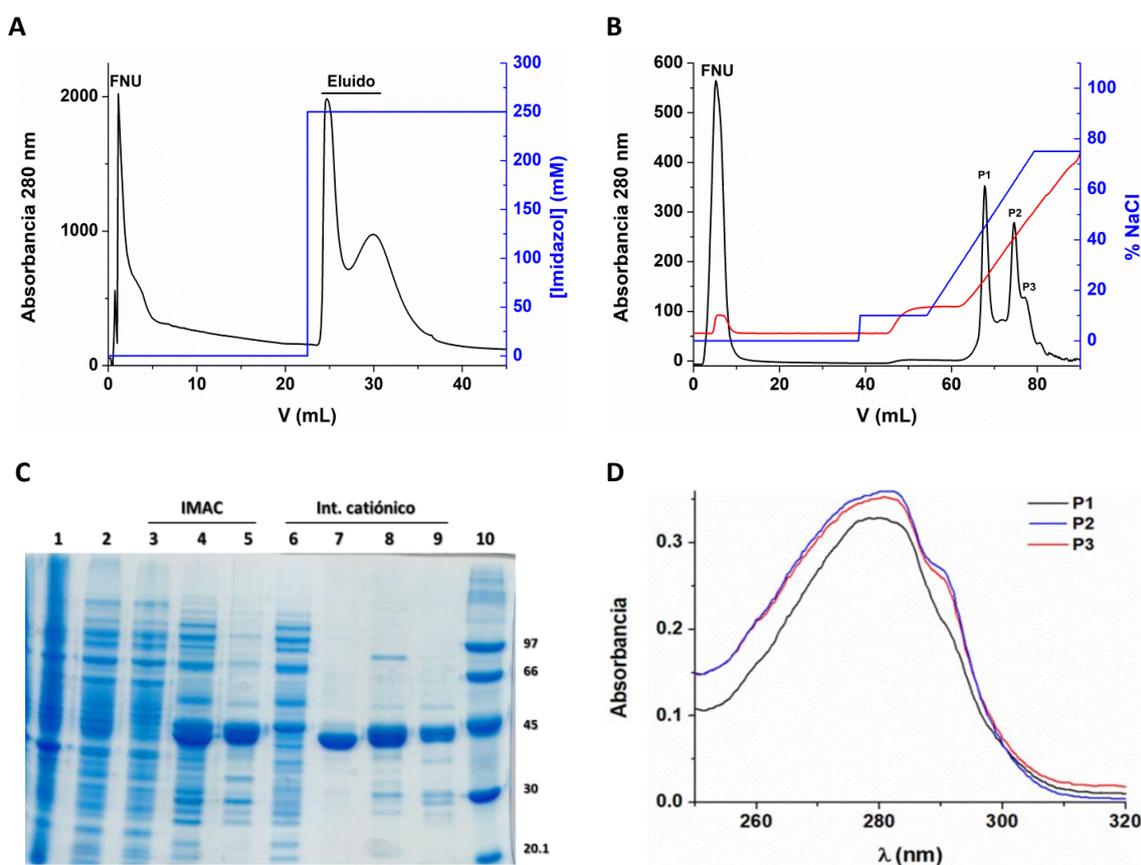


Figura 22 - Purificación de hSirt6. (A) Cromatograma de la IMAC, la muestra se sembró en amortiguador conteniendo 5 mM imidazol y en azul se indica su aumento a 250 mM imidazol. (B) Cromatograma del intercambio catiónico. Se siembra la muestra en amortiguador conteniendo 50 mM NaCl, y se realiza un lavado con 100 mM NaCl para luego aplicar un gradiente hasta 750 mM NaCl. Las líneas azul y roja representan el porcentaje de NaCl y la conductividad al momento de la elución. (C) SDS-PAGE 10% en condiciones reductoras. 1-Fracción insoluble; 2-Fracción soluble; 3- Fracción no unida a IMAC; 4 y 5- Eluidos IMAC; 6- FNU de intercambio catiónico; 7-P1; 8- P2; 9- P3; 10- Marcador de peso molecular (D) Espectros de absorbancia de P1, P2 y P3 todos a la misma concentración.

Si observamos las distintas etapas de la purificación en la electroforesis (*Figura 22C*) vemos que los picos de interés (P1, P2 y P3) que eluyen del intercambio catiónico presentan un componente proteico mayoritario del mismo peso molecular que hSirt6 (40.5 kDa según nuestra construcción), sin embargo la banda correspondiente a P1 parece migrar ligeramente por debajo de P2 y P3. A su vez, el espectro de absorbancia de P1 difiere en su forma al de P2 y P3, no presentando el hombro característico de triptófano. Con esta información especulamos si P1 se trata de una conformación diferente de hSirt6 (ya que si corresponde a una forma compacta migraría más en la electroforesis) o si realmente corresponde a nuestra proteína. Para determinar la identidad de P1, en primer lugar se compararon los espectros de dicroísmo circular de los tres picos y tanto los espectros de UV lejano como UV cercano revelaron una estructura secundaria y terciaria diferentes a hSirt6 respectivamente (*Figura 23*). Cabe mencionar que en la literatura no se ha reportado aún el espectro de CD para la isoforma 6 de sirtuina, por lo cual no contamos con un patrón contra el cual comparar nuestros resultados.

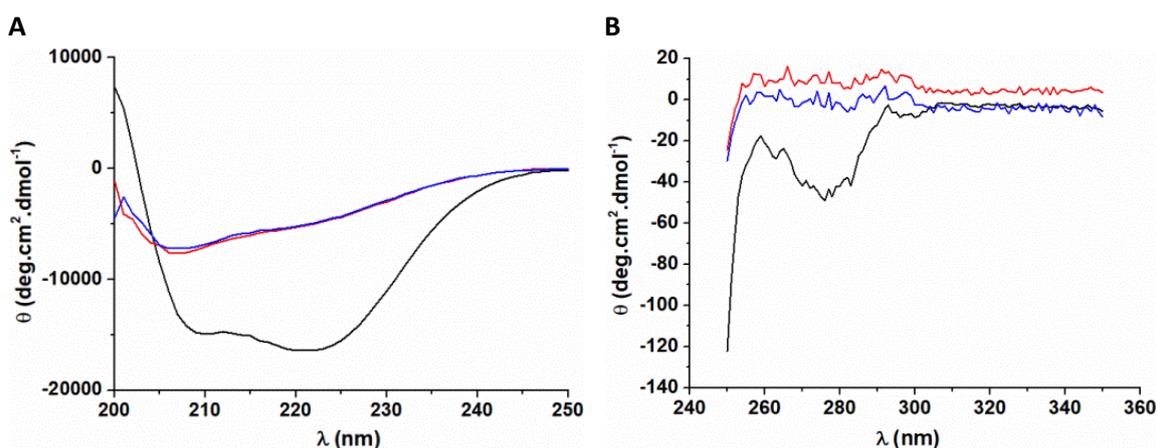


Figura 23 - Espectros de dicroísmo circular de las fracciones obtenidas en la purificación de hSirt6. (A) CD UV-lejano. (B) CD UV-cercano. Fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio catiónico: P1 (negro), P2 (rojo), P3 (azul). Los espectros aquí mostrados representan al promedio de 5 repeticiones.

Como muestra la *Figura 23A*, las proteínas contenidas en cada fracción no poseen estructura secundaria ni terciaria similar, sugiriendo que P1 contiene una proteína distinta de hSirt6. Finalmente se determinó mediante MALDI-TOF-MS que la misma, es una proteína contaminante de 38 kDa, que corresponde al represor del operón lac (LacI). Investigando en la literatura, se vio que esta proteína habitualmente co-purifica cuando se trabaja con células de *E. coli* [118]. Esto se debe a que en su estructura posee varias histidinas expuestas por lo cual puede quedar retenida en las columnas de níquel. Es por esta razón que al momento de realizar la IMAC se agregó una etapa de lavado con imidazol 10 mM donde efectivamente parte del contaminante eluye de la columna (señalado en el cromatograma de la *Figura 24A* como "L"), verificado por electroforesis (*Figura 24B*).

Si se observa el cromatograma del intercambio iónico (*Figura 24C*) aún sigue quedando retenido parte del contaminante (P1) pero se encuentra ahora en menor proporción con respecto a los picos correspondientes a hSirt6 (P2 y P3). Si se quisiera mejorar aún más la purificación, y obtener una mayor pureza de hSirt6, se deberían modificar las condiciones de la IMAC, realizando un lavado en el cual la concentración de imidazol fuese mayor con el fin de romper todas las interacciones entre el metal y Lacl. Se comprobó que aumentar la concentración de imidazol durante el lavado provoca también la elución de hSirt6 de la columna. Por lo cual se decidió realizar un único lavado con 10 mM imidazol en la IMAC y durante el intercambio catiónico seleccionar las fracciones correspondientes a hSirt6, descartando la presencia de Lacl por MS.

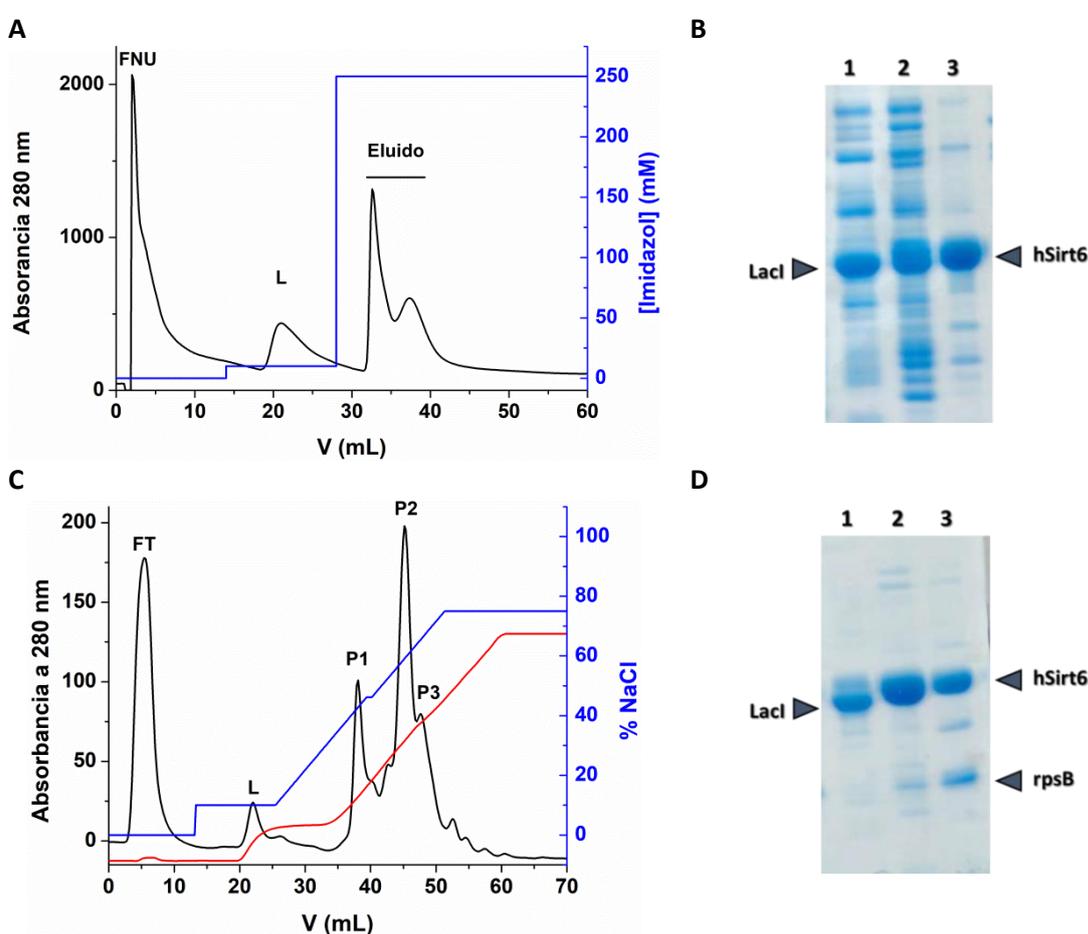


Figura 24- Purificación final de hSirt6. **(A)** Cromatograma de la IMAC donde se observa la elución de FNU, lavado con 10 mM imidazol (L) y los picos resultado de la elución con 250 mM imidazol. **(B)** SDS-PAGE 10% en condiciones reductoras. Carril 1- pico L, carriles 2 y 3 - eluido de la IMAC. **(C)** Cromatograma del intercambio iónico. La siembra se llevó a cabo con 50 mM NaCl, el lavado con 100 mM NaCl y por último la elución con un gradiente de 25 mL hasta 750 mM NaCl. Los tres picos obtenidos fueron sembrados en un SDS PAGE 10% (no reductor) **(D)**. Carril 1- P1, carril 2- P2 y carril 3- P3. Las líneas azul y roja representan la concentración de imidazol (IMAC) o NaCl (intercambio iónico) y la conductividad durante las corridas cromatográficas.

Si se observa el SDS-PAGE correspondiente al intercambio iónico (*Figura 24D*), vemos que por debajo de la banda de hSirt6 hay otras de menor peso molecular. Por experiencia previa en nuestro laboratorio, sabemos que en la purificación de la isoforma 1 de Sirt humana en un sistema similar, se obtienen fragmentos truncos o proteolizados de la misma. Para corroborar que las bandas de menor peso molecular que están por debajo de hSirt6 no correspondan a proteína trunca, se realizó un WB anti-Sirt6 (*Figura 25A*). Tanto P2 como P3 poseen una única banda, sugiriendo la ausencia de hSirt6 trunca o proteolizada. Mediante MALDI-TOF-MS se determinó que la banda que se encuentra alrededor de los 30 kDa, corresponde a rpsB “30S ribosomal protein”, también proveniente de *E. coli*, y cuya función se encuentra ligada a la maquinaria de traducción.

Otro aspecto a tener en cuenta, es que la enzima obtenida durante la purificación varía en su concentración de Zn^{2+} . Como se mencionó, éste posee un rol estructural aunque no participa de la catálisis, por lo cual luego de cada purificación se realiza una cuantificación del metal a fines de seleccionar la enzima cuya relación moles Zn^{2+} /mol proteína sea lo más cercana de 1 posible. Para ello se tomaron alícuotas de P2 y P3, se incubaron con p-CMB para liberar el Zn^{2+} y el quelante PAR para formar el complejo PAR:Zn que absorbe a 500 nm. Se realizaron espectros (*Figura 25B*) de ambas muestras (P1 y P2), además de una muestra control (sin enzima). Se puede ver que conforme la absorbancia a 500 nm va en aumento, a 400 nm la misma disminuye, indicando el consumo del PAR libre que pasa a formar parte del complejo. De esta forma se determinó que P2 contiene 0.99 moles Zn^{2+} /mol proteína mientras que P3 contiene 0.74 moles Zn^{2+} /mol proteína. Por esta razón y sumado al hecho que la fracción de P2 posee en proporción, menos contaminante *rpsB* se siguió adelante con la misma para los estudios posteriores.

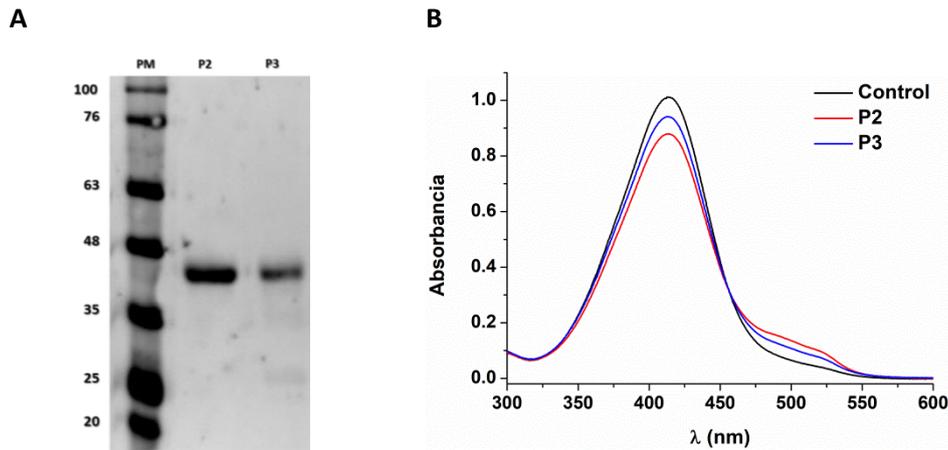


Figura 25 - Control de calidad de hSirt6 purificada. (A) Western blot α -Sirt6. Se incubó durante 1 h con anticuerpo primario α -Sirt6 de ratón y luego de tres lavados con TBS-T 0.1 % se reveló con anticuerpo secundario α -conejo, Alexa fluor 680 por 1 h (n=2). (B) Cuantificación de Zn^{2+} mediante el uso de p-CMB y PAR. En las mezclas de reacción se utilizó un stock de hSirt6 2 μ M, p-CMB 20 μ M y PAR 40 μ M. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 5 minutos a 6000 x g. Se realizaron espectros de absorbancia de 300 nm a 600 nm registrando los valores obtenidos a 500 nm. El coeficiente de absorptividad para el complejo PAR:Zn a 500 nm es de 66000 $M^{-1}cm^{-1}$. Se representa el promedio de un total de 3 espectros.

4.1.2. Expresión y purificación de Pnc1

Para las medidas de actividad por el ensayo acoplado fue necesario expresar y purificar la nicotinamidasas Pnc1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Contamos con una construcción que posee cola de histidinas por lo cual la purificación se realizó mediante un único paso cromatográfico que consistió en una IMAC. La cromatografía consistió en tres etapas, en primer lugar la siembra utilizando un amortiguador conteniendo 5 mM imidazol, luego el lavado aumentando la concentración a 30 mM y por último la elución con 500 mM imidazol. La elución de la proteína fue monitoreada midiendo absorbancia a 280 nm en las fracciones de 0.5 mL. Como se aprecia en el gel de la *Figura 26* se logró quitar la mayor parte del contenido proteico bacteriano en la fracción no unida (carril 6) y el lavado (carril 7), obteniendo Pnc1 con alto grado de pureza (carril 8). Previo a su almacenamiento, se determinó su actividad constatando que la misma es comparable con datos de la literatura [108].

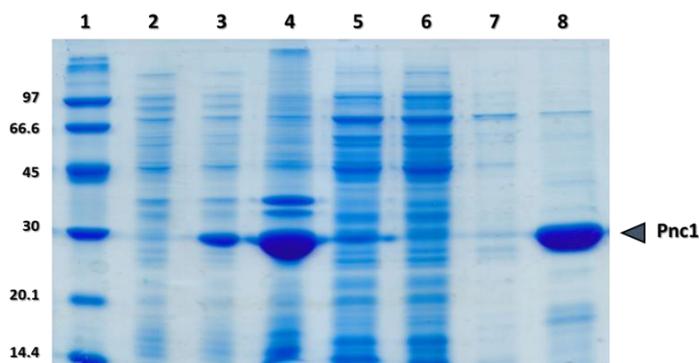


Figura 26 - Purificación de nicotinamidasas Pnc1. SDS-PAGE 10% no reductor revelado mediante tinción con Coomassie. Carril 1- Marcador de peso molecular, 2- pre-inducción, 3- post-inducción, 4- fracción soluble, 5- fracción insoluble, 6- FNU, 7- lavado, 8- eluido de la IMAC.

4.2. Medidas de actividad

Una vez obtenida hSirt6 recombinante se determinó la actividad tanto desacetilasa como deacilasa con el fin de obtener parámetros cinéticos. Tal como se mencionó, las medidas de actividad fueron realizadas por dos metodologías diferentes, mediante separación de productos por HPLC monitoreando reacciones a tiempo final o por el método continuo del ensayo acoplado.

En primer lugar se determinó actividad desacetilasa de hSirt6 siguiendo la formación producto (H3K9) por HPLC-fluorescencia. Se logró determinar el K_M para el péptido sustrato H3K9Ac (*Figura 27A*) variando su concentración de 25 a 400 μM y deteniendo la reacción a distintos tiempos (0, 10, 30 y 60 minutos) (ver 3.2.1 b). Una vez obtenidos los cromatogramas se determinaron las concentraciones de H3K9 formado utilizando la curva de calibración de 3.2.1b. A partir de las pendientes del gráfico [H3K9] vs. tiempo de reacción (inserto *Figura 27A*) se obtuvieron las velocidades iniciales para cada concentración utilizada. Graficando dichas velocidades en función de concentración de sustrato [H3K9Ac] se realizó un ajuste de Michaelis-Menten para determinar los valores de K_M y $V_{\text{máx}}$ que se muestran en la *Tabla 6*.

Por otro lado, mediante el uso del ensayo acoplado (punto 3.2.1 a) se logró determinar parámetros cinéticos para el péptido sustrato H3K9Myr en la reacción de deacilación (*Figura 27B*). Para ello se registró el consumo de NADPH a 340 nm en el tiempo para concentraciones de sustrato variables (0 a 20 μM H3K9Myr) y concentración saturante de NAD^+ (2 mM) (inserto *Figura 27B*). A partir de las velocidades iniciales obtenidas y en función de [H3K9Myr] se realizó el ajuste de Michaelis-Menten obteniendo los valores cinéticos de la *Tabla 6*.

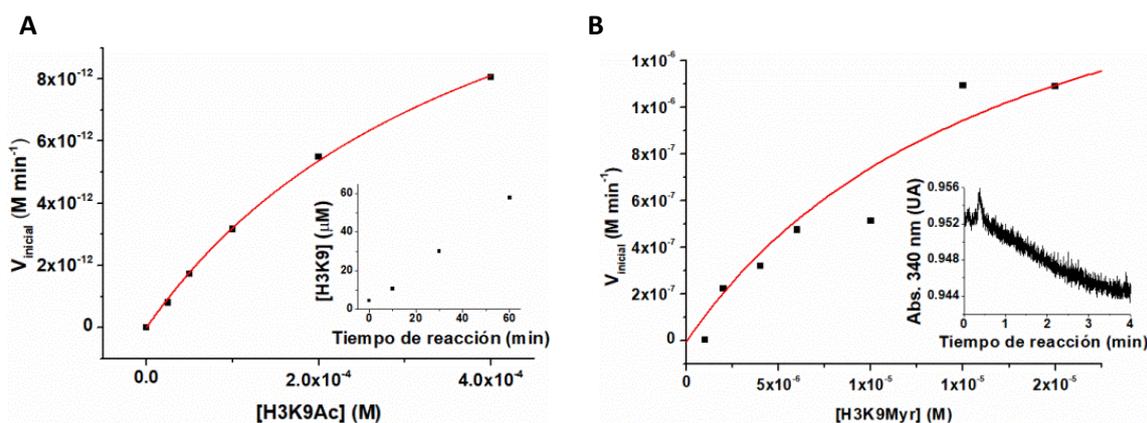


Figura 27 - Determinación de parámetros cinéticos para las reacciones catalizadas por hSirt6. (A) Reacción de desacetilación (H3K9Ac), determinadas por HPLC. En el inserto se observa el gráfico primario [H3K9] vs. tiempo de reacción (ejemplo para 200 μM de sustrato), a partir del cual se hallaron velocidades iniciales. Del gráfico V_{inicial} vs. [H3K9Ac] y el ajuste de Michaelis-Menten se determinó K_M y k_{cat} . Condiciones utilizadas: amortiguador NaHPO_4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5. [hSirt6] = 1 μM , $[\text{NAD}^+] = 2$ mM, [H3K9Ac] = 0-400 μM , $T=37^\circ\text{C}$. **(B)** Reacción de deacilación utilizando el sustrato miristoilado H3K9Myr mediante el ensayo acoplado. Se sigue absorbancia a 340 nm en el tiempo de reacción (inserto, ejemplo para 15 μM de sustrato). Se determinaron las velocidades iniciales de la reacción y se graficaron en función de la concentración de sustrato, [H3K9Myr]. A partir de los ajustes de Michaelis-Menten se determinaron los parámetros cinéticos de la reacción. $[\alpha\text{-cetoglutarato}] = 3$ mM, $[\text{NADPH}] = 200$ μM , $[\text{NAD}^+] = 2$ mM, $[\text{Pnc1}] = 3$ μM , $[\text{GDH}] = 2$ U, $T= 37^\circ\text{C}$. [hSirt6] = 0.5 μM [H3K9Myr] = 0 - 20 μM . Ambos experimentos fueron realizados por duplicado y se representan corridas representativas de dos experimentos independientes.

Los valores de velocidad de desacetilación obtenidos por el método de HPLC fueron sorprendentemente bajos (comparado con el valor de k_{cat}/K_M de [26] de $4.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} = 288 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$) (Tabla 6). A lo largo del trabajo se optó por medir actividad Sirt6 con el método acoplado.

Tabla 6 - Parámetros cinéticos obtenidos para las reacciones catalizadas por hSirt6 utilizando los péptidos sustrato H3K9Ac y H3K9Myr.

| | K_M (M) | k_{cat} (min^{-1}) | k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$) |
|---------|------------------------------|--|---|
| H3K9Ac | $(416 \pm 8) \times 10^{-6}$ | 0.10 ± 0.03 | 240 ± 10 |
| H3K9Myr | $(18 \pm 2) \times 10^{-6}$ | 0.52 ± 0.02 | $(28 \pm 4) \times 10^3$ |

4.3. Exposición a oxidantes

Los residuos de cisteína son altamente susceptibles a la oxidación. La hSirt6 cuenta con seis de estos residuos, cuatro de ellos (C141, C144, C166, C177) coordinan a un átomo de Zn^{2+} que cumple un rol estructural, una cisteína en el extremo N-terminal (C18) y otra en el C-terminal (C320). Si bien no hay residuos de cisteína que participen de la catálisis, la modificación de éstos por especies oxidantes podría llevar a cambios estructurales y funcionales así como

también podrían afectar la interacción con otras proteínas siendo así un mecanismo de regulación de la enzima.

En este trabajo concentramos nuestra atención en determinar posibles cambios estructurales y los que refieren a la actividad enzimática frente a exposición de la enzima a oxidantes biológicos como peróxido de hidrógeno y peroxinitrito. Para ello, se comenzó con una cuantificación de tioles utilizando dtdPy (*Tabla 7*) antes y después del tratamiento con ambos oxidantes. Primeramente se redujo la enzima con DTT 5 mM y una vez quitado el exceso de reductor se realizaron seis tratamientos. A partir de una concentración de 10 μ M de hSirt6 reducida, se trata con excesos de ONOO⁻ 5x y 10x bajo agitación; en segundo lugar se realizó el tratamiento con H₂O₂ 50x y 100x por 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Por último se realizaron dos controles, uno que corresponde a enzima recién reducida y otro donde la misma fue incubada a TA durante media hora donde esperamos contar con 6 cisteínas en estado reducido. Como se puede ver en la *Tabla 7*, en el control encontramos casi la totalidad de los tioles reducidos, mientras que en el control TA se cuantificaron únicamente 4. Es decir que nuestra enzima posee dos residuos de cisteína muy susceptibles a la oxidación, donde simplemente la exposición al aire (21% oxígeno) a TA lleva a una disminución en los tioles/mol proteína. Se comprobó que la incubación de hSirt6 a 4°C durante el mismo tiempo mantiene reducida en su totalidad a la enzima. Continuando con los tratamientos, se vio que al incubar con exceso de H₂O₂ (50x y 100x, 30 minutos a TA), se llegan a oxidar hasta cuatro de las seis cisteínas que tiene la enzima. Con respecto a los tratamientos con exceso de ONOO⁻ 5x y 10x se obtiene hasta 3 tioles reducidos por mol de hSirt6. No hay que olvidar que ONOO⁻ es capaz de modificar otros residuos como veremos más adelante. Sumado a esto, se comprobó que no hay liberación de Zn²⁺ en los tratamientos con H₂O₂ mientras que si sucede bajo el tratamiento con ONOO⁻. La exposición de la enzima a estos agentes oxidantes tiene consecuencias tanto estructurales y a nivel de la actividad como veremos a continuación.

Tabla 7 - Cuantificación de tioles reducidos en hSirt6 luego de tratamientos con oxidantes

| Tratamiento | hSirt6 | hSirt6 (25°C) | H ₂ O ₂ 50x | H ₂ O ₂ 100x | ONOO 5x | ONOO 10x |
|--------------------------------|-----------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------|-----------|
| N° tioles | 5.5 ± 0.4 | 4.3 ± 0.2 | 2.7 ± 0.3 | 1.5 ± 0.3 | 3.9 ± 0.1 | 3.4 ± 0.3 |
| Liberación de Zn ²⁺ | | | No | No | Si | Si |

*Número de tioles reducidos/ mol de proteína. . Se muestran valores promedio obtenidos de un total de 4 repeticiones con su respectivo SD.

4.3.1. Efectos estructurales

La oxidación de cisteínas puede dar lugar a la formación de disulfuros. Para ello se analizaron las muestras mediante un SDS-PAGE en condiciones reductoras (con el agregado de β -mercaptoetanol) y no reductoras (*Figura 28*). Como sospechamos, en ausencia de agente reductor, vemos la aparición de bandas que se corresponden con la formación de dímeros de acuerdo a su peso molecular (~80 kDa), que desaparecen cuando las muestras están tratadas con β -mercaptoetanol, o sea que son dímeros unidos por enlace disulfuro. En el caso de los tratamientos con ONOO⁻ se observa la persistencia de dímeros aún en condiciones reductoras, sugiriendo la formación de dímeros no reversibles por formación de ditirosinas. Un aspecto que concuerda con la anterior cuantificación de tioles, es la diferencia entre los controles (recién reducido y la incubación a TA). En el control TA también se da la aparición de la banda que indica formación de dímero, ausente cuando la proteína está reducida en su totalidad como es de esperar. Esto es consistente con la existencia de cisteínas muy susceptibles a la oxidación.

Otro aspecto que llamó nuestra atención fue la diferencia en el patrón de migración en la banda correspondiente a hSirt6. En presencia de agente reductor se observa una banda bien definida, sin embargo en su ausencia puede verse que esa banda migra más en el gel. La hipótesis es que además de la formación de disulfuros intermoleculares que dan como resultado la aparición de dímeros, también se esté dando la formación de disulfuros intramoleculares. Si esto es así, la estructura de hSirt6 podría compactarse haciendo que su peso molecular aparente sea menor y migre más en el gel. Incluso en el control que supone todos sus tioles reducidos vemos este patrón, no sería raro pensar que una pequeña proporción de la enzima presente disulfuros intramoleculares ya que si observamos nuevamente la *Tabla 7* no se logra alcanzar la cuantificación de seis tioles/mol sino que es un poco por debajo. En resumen, los resultados apuntan a que el tratamiento con oxidantes genera distintas poblaciones de enzima, en distinto estado de reducción y oligomerización.

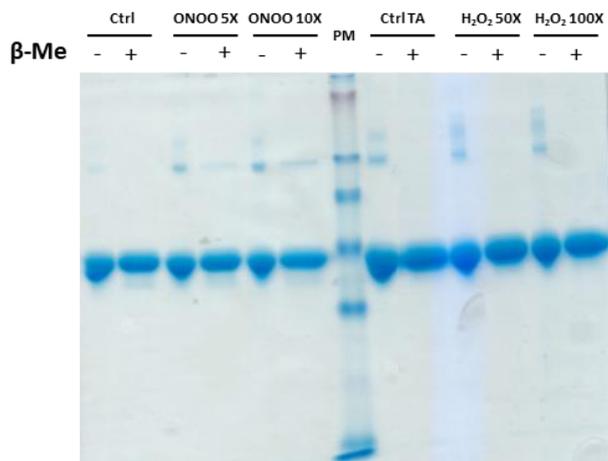


Figura 28 - Efecto de agentes oxidantes en la formación de enlaces disulfuro en hSirt6. SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras y no reductoras indicadas con (+) y (-) respectivamente, luego del tratamiento con ONOO⁻ y H₂O₂ en distintas concentraciones.

Para confirmar la formación de dímeros tanto intra como intermoleculares se realizó un gel diagonal. Para ello, en primera instancia se realiza una electroforesis en condiciones no reductoras (primera dimensión) y el carril con la muestra se siembra en una segunda electroforesis pero ahora en condiciones reductoras (segunda dimensión). Se obtiene como resultado una línea diagonal donde se encuentran las proteínas sin disulfuros, por encima de la diagonal las proteínas con disulfuros intramoleculares y por debajo de la misma las proteínas con disulfuros intermoleculares.

Antes de realizar el gel en la primera dimensión, se ajustaron las concentraciones de enzima a ser sembrada para poder tener una mejor resolución en las bandas correspondientes al monómero y a la estructura en la cual se forman los disulfuros intramoleculares. A su vez, con el fin de determinar la diagonal formada por estructuras sin disulfuros, se utilizó la proteína GST cuyo PM es de 26 kDa y si bien posee cisteínas en su secuencia, no es capaz de formar disulfuros de ningún tipo. El resultado obtenido se muestra en la *Figura 29*, donde en el gel de la primera dimensión se observa cómo efectivamente se logró separar las bandas correspondientes al monómero y la conformación más compacta, ya que hay dos bandas definidas. El carril de la mezcla hSirt6 y GST se cortó y se incubó con DTT y luego IAM y se sembró en la segunda dimensión. Como ya se mencionó (ver 3.3.7) las bandas de mayor peso molecular son las que se ubican a la izquierda, con menor movilidad electroforética en primera dimensión. De esta forma, en el segundo gel se define la diagonal con especies que no poseen disulfuros, en este caso el monómero de hSirt6 y GST (*Figura 29A*). Por debajo de la diagonal se ve un *spot* que confirma la presencia de dímero consecuencia del disulfuro intermolecular. Por último se pudo confirmar que existe la formación de disulfuros intramoleculares por la presencia del *spot* por encima de la diagonal. Si bien estamos convencidos que corresponde al disulfuro intramolecular, no está muy bien resuelto con respecto al monómero.

Es por eso que se comparó también mediante electroforesis una muestra oxidada en donde se ve la presencia de ambos tipos de disulfuro y una muestra reducida y tratada con NEM con el fin de bloquear los tioles para evitar la formación de disulfuros (Figura 29B). Se redujo hSirt6 con DTT y luego de quitar el exceso del mismo se realizaron dos tratamientos. Por un lado se incubó la enzima con H₂O₂ 100x, y por otro lado se la trató con NEM en exceso. Posteriormente ambas muestras fueron analizadas en un SDS-PAGE en condiciones no reductoras (Figura 29). Como se puede observar, cuando la enzima está oxidada se vuelven a resolver las tres bandas correspondientes al dímero, monómero y monómero con un disulfuro intramolecular. A diferencia de esto, cuando la enzima se trata con el agente NEM dicho bandeo desaparece, revelándose una única banda más intensa correspondiente a la estructura monomérica. Esto termina de confirmar que la estructura terciaria y cuaternaria de nuestra proteína se ve modificada al ser oxidada por exposición a estos peróxidos.

A

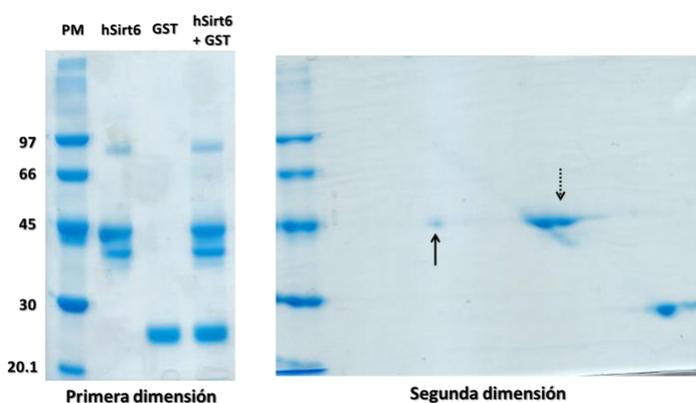
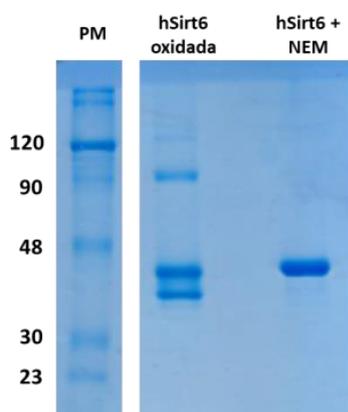


Figura 29 - Análisis de disulfuros inter e intra moleculares. (A) Electroforesis diagonal. En la primera dimensión (condiciones no reductoras) se muestra el patrón de migración de hSirt6 y GST y de la mezcla de ambos. En la segunda dimensión (condiciones reductoras) se observa la diagonal formada por el monómero de hSirt6 y GST. Por debajo de la misma aparece el spot del disulfuro intermolecular (flecha continua) y por encima el disulfuro intramolecular (flecha punteada). (B) SDS-PAGE 10% no reductor. Comparación de hSirt6 oxidada con H₂O₂ 100x durante 30 minutos a TA donde se pueden observar tres bandas correspondientes al dímero, monómero y monómero con un disulfuro intramolecular (de mayor a menor PM). Por otro lado, hSirt6 tratada con NEM donde se obtiene una única banda correspondiente al monómero en ausencia de disulfuros.

B



Se intentó determinar por MALDI-TOF-MS cuáles son las cisteínas que son oxidadas por ambos oxidantes pero no se obtuvieron resultados concluyentes. Una de las razones es que los péptidos obtenidos luego de la digestión con tripsina y que contienen a los residuos de cisteína

son muy pequeños y no son capaces de ser detectados por el equipo (no se ensayó corte con otra proteasa).

Con respecto a la oxidación de hSirt6 por ONOO^- , además de haberse oxidado cisteínas, se confirmó la nitración de tirosinas mediante un WB $\alpha\text{-NO}_2\text{Y}$ como muestra la *Figura 30* donde se comparan dos muestras tratadas con 5x y 10x ONOO^- con respecto a un control de enzima sin tratar. Se observa claramente la ausencia de banda en el control mientras que en las muestras se da un aumento la intensidad de la banda conforme aumenta la concentración de oxidante.

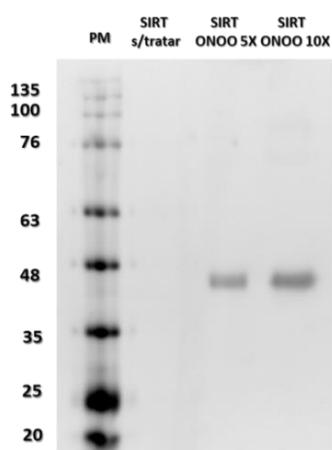


Figura 30 - Western blot $\alpha\text{-NO}_2\text{Y}$ post-tratamiento con ONOO^- . Se muestra de izquierda a derecha un control con enzima sin tratar, y los tratamientos con ONOO^- 5x y 10x donde se observa una banda correspondiente al PM de hSirt6 revelando la nitración de tirosinas. Para realizar el WB se utilizó como anticuerpo primario uno $\alpha\text{-NO}_2\text{Y}$ de ratón durante 1 h y luego de tres lavados con TBS-T 0.1% se reveló con anticuerpo secundario α -conejo, Alexa fluor 680 por 1 h.

Como se mencionó anteriormente, no hay mucha información previa de cómo afecta la oxidación a la estructura y/o actividad de la hSirt6. Un trabajo de 2015 reporta la inactivación de hSirt6 por peroxinitrito [71]. Otro trabajo menciona que hSirt1 no se ve afectada por exposición a H_2O_2 [119]. Sin embargo, no se encontró reporte alguno que mencione acerca de cambios en la estructura terciaria o cuaternaria de hSirt6 frente a exposición de estos agentes oxidantes.

Se analizó mediante CD UV-cercano cambios en la estructura terciaria de hSirt6 tratada con ambos oxidantes biológicos (*Figura 31*). El tratamiento con H_2O_2 no parece estar afectando la estructura de la enzima (*Figura 31A*). Si bien para concentraciones altas del oxidante los valores de elipticidad son menores, la forma del espectro no cambia, indicando que no hay variación en la estructura terciaria.

Cuando se analizan los espectros de CD UV-cercano de hSirt6 expuesta a ONOO^- vemos claras diferencias en lo que respecta a su estructura terciaria (*Figura 31B*). En este caso hay que tener en cuenta que tenemos formación de NO_2Tyr que absorbe en el UV cercano y podría estar

interfiriendo con la señal hacia el final de espectro. Tanto el tratamiento con exceso 5x como 10x de ONOO^- provoca alteración de la estructura terciaria, este aspecto va en concordancia con la liberación de Zn^{2+} vista anteriormente y por lo tanto hay una desestructuración de la enzima. A su vez, en este caso, se está dando la oxidación de otros residuos (por ejemplo la nitración de tirosinas confirmado por WB), pudiendo estar repercutiendo también en la estructura. Como se verá a continuación todos estos cambios repercuten de algún modo en la actividad enzimática de hSirt6.

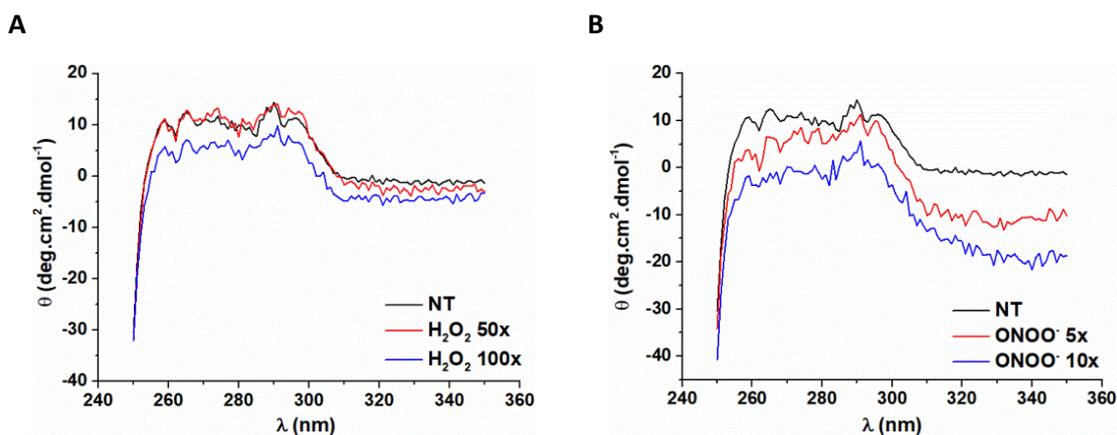


Figura 31 - Espectros de CD UV-cercano de hSirt6 expuesta a oxidantes. **(A)** Enzima expuesta a H_2O_2 50x y 100x **(B)** Exposición de hSirt6 a ONOO^- 5x y 10x. Estos espectros corresponden al promedio de 5 corridas y se muestra un experimento representativo de un total de 2.

4.3.2. Efectos sobre la actividad enzimática

Se estudió el efecto de ambos oxidantes biológicos sobre la actividad enzimática de hSirt6 mediante el ensayo acoplado, monitoreando el consumo de NADPH a 340 nm en el tiempo (*Figura 32*). Para determinar si hay variaciones en la actividad desacetilasa se compararon las velocidades iniciales de cada reacción a partir de las pendientes obtenidas en el gráfico $A_{340 \text{ nm}}$ vs. tiempo de reacción, utilizando concentraciones saturantes de NAD^+ y siempre la misma concentración de enzima y H3K9Ac. No se vieron cambios en la actividad desacetilasa luego del tratamiento con H_2O_2 (*Figura 32A*) a pesar de que sí hubo oxidación de cisteínas (*Tabla 7*). Sin embargo, el tratamiento con ONOO^- provocó disminución de la actividad en 22% y 35% luego de los tratamientos con 5x y 10x ONOO^- , respectivamente (*Figura 32B*). Además de los residuos aminoacídicos oxidados (cisteínas y tirosinas), hay liberación de Zn^{2+} que como se mencionó cumple un rol estructural y por ende cambia la conformación proteica lo cual puede incidir en la catálisis de hSirt6. Un aspecto que llama la atención es la forma en que se dan las cinéticas (*Figura 32A*). Como ya se mencionó, hay una diferencia entre los tratamientos y la variación de velocidades iniciales. Pero si se observa qué sucede a lo largo del tiempo de

reacción, se puede ver que al pasar el minuto de reacción la enzima se queda, aparentemente habiendo agotado todo el sustrato. Sin embargo, la cantidad de H3K9Ac consumido no corresponde a la concentración inicial del mismo. Esto estaría indicando una inactivación en *turnover*.

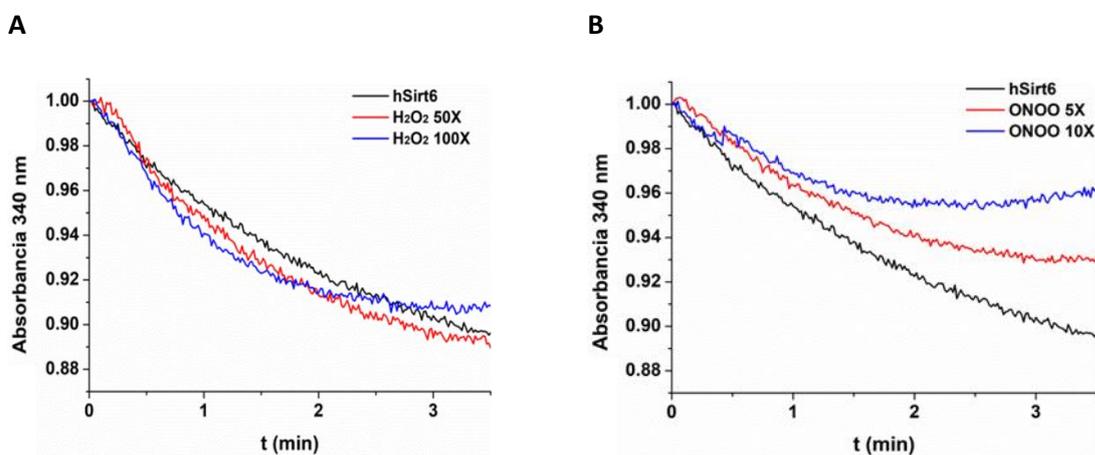


Figura 32 - Efecto de oxidantes en la actividad desacetilasa de hSirt6. Las medidas fueron realizadas por ensayo acoplado. **(A)** Tratamiento con H₂O₂. Prácticamente no hay diferencias en la actividad frente al tratamiento con el oxidante. **(B)** Tratamiento con ONOO⁻. La actividad disminuye en un 22% y 35% frente a ONOO⁻ 5x y 10x respectivamente. La mezcla de reacción de incubó durante 20 minutos a 37°C y se inició la reacción con el agregado de enzima. La mezcla de reacción: 3 mM α -cetoglutarato, 200 μ M NADPH, 600 μ M NAD⁺, 3 μ M Pnc1, 2 U GDH, 50 μ M H3K9Ac T=37°C. [hSirt6] = 6 μ M. Se muestran resultados representativos de un n=3.

4.4 - Efecto de ácidos grasos sobre hSirt6

Está reportado que la actividad desacetilasa *in vitro* de hSirt6 es baja comparada con las otras isoformas y se ha visto aumentada en presencia de ácidos grasos de cadena larga, particularmente ácido oleico y linoleico [22].

Lo primero que se realizó fue confirmar que la actividad desacetilasa de hSirt6 incrementa en presencia de OA. Para ello se pre-incubó la enzima con 25x, 50x y 100x exceso del ácido graso (teniendo en cuenta que su valor de CMC se encuentra entre en el rango 150-200 μ M [22]) y luego se midió actividad mediante el ensayo acoplado. La mezcla de reacción que contiene las enzimas y sustratos del ensayo fue incubado durante 20 minutos a 37°C hasta obtener una absorbancia a 340 nm estable y la reacción se inició con el agregado de hSirt6 (previamente incubada con ácido graso). Se registró la absorbancia a 340 nm para determinar el consumo de NADPH en el tiempo (Figura 33A). A partir de las pendientes del gráfico A_{340 nm} vs. tiempo de reacción, se determinaron las velocidades iniciales para cada caso y se compararon con respecto al control (enzima previamente incubada en DMSO, vehículo usado en la solución stock del ácido graso). Efectivamente se comprobó que la actividad de la enzima aumenta en

presencia de OA, siendo dicho aumento correspondiente a un factor de 3 al ser pre-incubada con 25x OA y poco más de 10 utilizando 100x, valores similares a lo reportado [22].

Un aspecto a tener en cuenta, es que debido a la baja actividad desacetilasa, la medida de actividad con el ensayo acoplado en ausencia de activador, está sujeta a fuerte error experimental. Es por ello que cada tratamiento necesariamente tiene que ser comparado con controles realizados en el mismo día y misma alícuota de enzima (recién descongelada).

Una vez constatado dicho aumento, se intentó demostrar la hipótesis que involucra la inactivación de la enzima frente a nitro ácidos grasos, ya que potencialmente serían capaces de formar un aducto de Michael con la H133 catalítica. Para demostrarlo se utilizó ácido nitro-oleico NO₂-OA (todos los experimentos fueron realizados con una mezcla de los isómeros 9-NO₂-OA y 12-NO₂-OA). Es importante aclarar que se intentó trabajar con concentraciones más altas que las utilizadas del nitro ácido graso pero la enzima no fue capaz de tolerar dichos tratamientos (se observó fuerte agregación de la proteína). Si bien no hay reportado un valor de CMC para estos nitro ácidos grasos, por experiencia previa en nuestro laboratorio se sabe que al menos hasta 100 μM NO₂-OA no se da la formación de micelas.

Para nuestra sorpresa, al estudiar el efecto que tiene el NO₂-OA sobre la actividad desacetilasa, no se vio inactivación de hSirt6 como se esperaba sino que por el contrario, se vio un aumento de actividad incluso mayor que con OA. Como se aprecia en la *Figura 33* no fue necesario llegar a concentraciones tan altas del derivado nitro para poder superar el efecto de OA ya que un exceso de 20x NO₂-OA tuvo como consecuencia un aumento en la actividad igual a 35 veces. Este hecho implica que el ácido graso nitrado no estaría reaccionando con el residuo de His133 pero que sí está teniendo un efecto sobre hSirt6 más pronunciado que su respectivo ácido graso, OA. Es aquí que surgen nuevas preguntas acerca de cómo el NO₂-OA está afectando la actividad catalítica de hSirt6. ¿Es posible que el NO₂-OA interactúe con residuos nucleofílicos provocando un cambio conformacional que favorezca la catálisis? ¿Este efecto depende de su interacción con el bolsillo hidrofóbico donde se une el sustrato acilado? ¿o solamente depende de su reacción con aminoácidos nucleofílicos?

Por otro lado, se vio que la incubación con el NO₂-OA no tiene efecto alguno sobre la actividad deacilasa al estudiarla utilizando el sustrato H3K9Myr. Es decir que esta enzima, cuando se encuentra con el grupo miristoilo ocupando el bolsillo hidrofóbico, ya se encuentra en su forma activa y no se ve afectada por el grupo nitro del ácido graso nitrado.

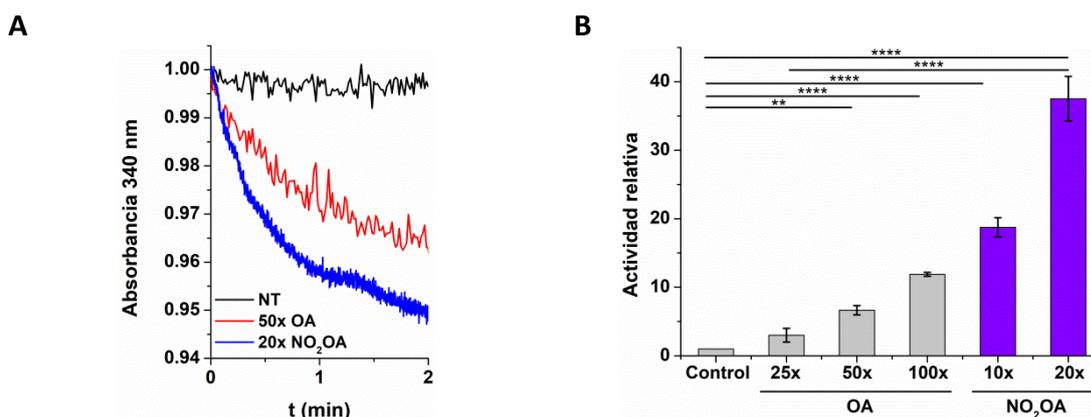


Figura 33 - Efecto de OA y NO₂-OA en la actividad desacetilasa de hSirt6. Se muestran corridas representativas del consumo NADPH para hSirt6 pre-incubada con OA y NO₂-OA (**A**). En (**B**) se muestra la variación de actividad para los distintos tratamientos normalizados contra el control (actividad relativa). Los tratamientos con OA y NO₂OA fueron corridas independientes, con valores de $V_{inicial}$ para el control de $5 \times 10^{-7} \pm 1 \times 10^{-7} \text{ M min}^{-1}$ (OA) y $1.1 \times 10^{-6} \pm 1 \times 10^{-7} \text{ M min}^{-1}$ (NO₂-OA). Para realizar las medidas para el ensayo acoplado se pre-incubó 1 μM de hSirt6 con OA y NO₂-OA por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó la enzima a la mezcla de reacción (en concentración final 0.5 μM) y se registró la absorbancia a 340 nm en el tiempo. Teniendo en cuenta las pendientes iniciales del gráfico obtenido se calcularon las velocidades iniciales de cada reacción utilizando la absorptividad molar del NADPH a 340 nm, $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Mezcla de reacción: 3 mM α -cetoglutarato, 200 μM NADPH, 600 μM NAD⁺, 3 μM Pnc1, 2 U GDH, 50 μM H3K9Ac, T=37°C, [hSirt6] = 0.5 μM . Se muestran corridas representativas de un total de 3 repeticiones. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

Un aspecto que llama la atención en estas cinéticas y que aún no se logró determinar, es el mecanismo molecular de activación por el nitro ácido graso. Si bien se registra un aumento significativo de la velocidad inicial respecto al control (que además es proporcional a la concentración de ácido graso utilizada), la velocidad disminuye mucho antes de consumir todo el péptido sustrato agregado, indicando inactivación en *turnover* (Figura 33A), efecto similar al que se vio al tratar a la enzima con oxidantes (Figura 32). Se sabe que hSirt6 es inhibida por producto (nicotinamida), pero es de esperar que en el ensayo acoplado utilizado, la nicotinamida generada esté siendo consumida por la nicotinamidasa Pnc1.

Teniendo en cuenta que está reportada la existencia de un cambio conformacional de la enzima a una forma más activa (más compacta) al estar unida a un grupo acilo de cadena larga, acercando el dominio de unión al Zn con el dominio de unión a sustratos, se buscó identificar potenciales cambios estructurales luego de la incubación con OA y NO₂-OA mediante espectroscopía de dicroísmo circular (CD).

Se corrieron los espectros de CD en el UV lejano (190 nm - 250 nm) y el UV cercano (250 nm - 350 nm) de la enzima sin tratar, enzima pre-incubada con OA y pre-incubada con NO₂-OA en exceso. Como muestra la Figura 34A, no se ven cambios mayores en la estructura secundaria para ninguno de los tratamientos. Sin embargo, cuando se analizan los espectros en el UV cercano se ven cambios en el entorno de los 260 nm (Figura 34B). Con respecto al control de

enzima sin tratar, su pre-incubación con OA resulta en un aumento del valor de elipticidad (θ) que se ve aún más incrementado en el caso del tratamiento con NO₂-OA y que podría estar reflejando los cambios en la actividad de la enzima que se vieron anteriormente. Esto deja en evidencia los cambios estructurales previamente reportados en los que frente a OA la enzima adquiere una conformación más compacta y según nuestras observaciones, el nitro ácido graso estaría teniendo un efecto extra que se ve reflejado tanto en los cambios estructurales como en el aumento de actividad desacetilasa.

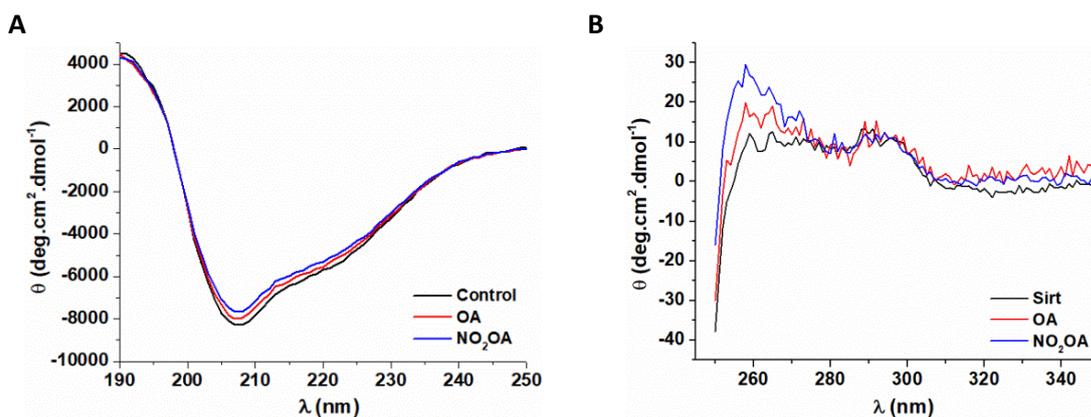


Figura 34 - Análisis estructural por dicroísmo circular. Muestras tratadas con OA y NO₂-OA fueron analizadas en el UV lejano (A) para elucidar cambios en la estructura secundaria y en el UV cercano (B) con el fin de ver posibles cambios en la estructura terciaria de la enzima. Control sin tratar (negro), tratamiento con OA (rojo) y NO₂-OA (azul). Para todas las muestras se utilizó un amortiguador NaPO₄ 10 mM pH 7.4. Los espectros fueron normalizados por la concentración de enzima utilizada en cada muestra (ver 3.3.5). Se muestran espectros promedio de un total de 5 repeticiones.

Se ensayó también la actividad desacetilasa luego de la incubación de la enzima con otras tres moléculas diferentes: una molécula anfipática de cadena larga que no es un ácido graso (SDS), un ácido graso que no es electrófilo (8,9-NO₂-OA) y una molécula electrofílica de tamaño pequeño (hidroxinonenal, HNE).

En el afán de entender más en profundidad qué sucede con la enzima en presencia de ácidos grasos de cadena larga, se intentó determinar qué pasaría si en lugar de contar con un ácido graso, se tiene otra molécula anfipática de estructura similar. Se utilizó SDS teniendo en cuenta que es una cadena carbonada (12 carbonos) hidrofóbica, con una cabeza polar (grupo sulfonato), en concentraciones no desnaturizantes (0.01%). Una vez comprobado el SDS al 0.01% no afecta a las otras enzimas del ensayo acoplado se pre-incubó hSirt6 con SDS y se registró el consumo de NADPH en el tiempo (Figura 35). Sorprendentemente, al igual que los casos anteriores la enzima también sufre un aumento en la actividad desacetilasa. En este caso la concentración de enzima utilizada fue distinta a ensayos anteriores por lo que se

compararon actividades específicas. Mientras que para el tratamiento con OA 25x se obtuvo una $A_{\text{específica}}=0.085$ U/mg, para el tratamiento con SDS 0.01% $A_{\text{específica}}=0.048$ U/mg. Cabe destacar la diferencia en la longitud de la cadena carbonada (SDS con 12C y OA con 18C) así como en la insaturación presente únicamente en el OA. En el trabajo previo de J. L. Feldman, et al 2013 [22] también observan diferencias en actividad desacetilasa de hSirt6 en presencia de ácido dodecanoico o de ácido oleico, dejando en evidencia la importancia de la longitud e insaturación de la cadena carbonada del activador.

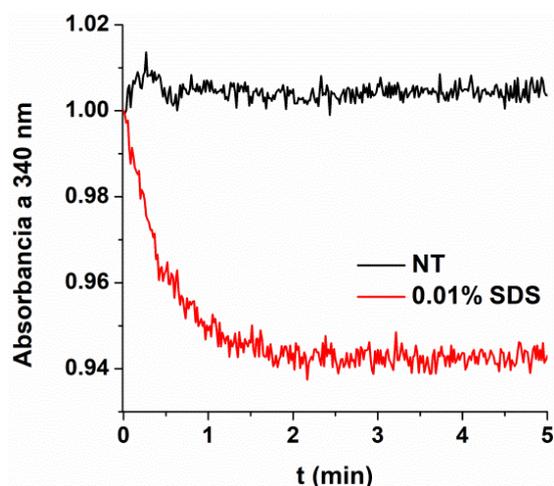


Figura 35 - Efecto de SDS en actividad desacetilasa de hSirt6. Se pre-incubó a la enzima con 0.01% SDS y se monitoreó el consumo de NADPH en el tiempo. Mezcla de reacción: : 3 mM α -cetoglutarato, 200 μ M NADPH, 600 μ M NAD^+ , 3 μ M Pnc1, 2 U GDH, 50 μ M H3K9Ac $T=37^\circ\text{C}$. [hSirt6] = 6 μ M

Por otro lado, se trabajó con un nitro ácido graso insaturado pero que no es electrofílico, el 8,9- NO_2 -OA con el cual esperábamos obtener un efecto similar al OA (*Figura 36*). Nuevamente nos enfrentamos al problema de concentraciones a utilizar y no logramos llegar a concentraciones más altas por problemas de precipitación de hSirt6. Para la concentración más alta utilizada que se corresponde con exceso 20x vemos que hay un aumento de actividad al doble, prácticamente el mismo efecto que se vio cuando se incubó a hSirt6 con OA a la misma concentración. Por tanto vemos que un nitro ácido graso que no contiene centros electrofílicos actúa de la misma forma que su respectivo ácido graso. Es decir que su efecto estaría dado por su interacción con bolsillo hidrofóbico de hSirt6 provocando así el acercamiento de los dos dominios proteicos.

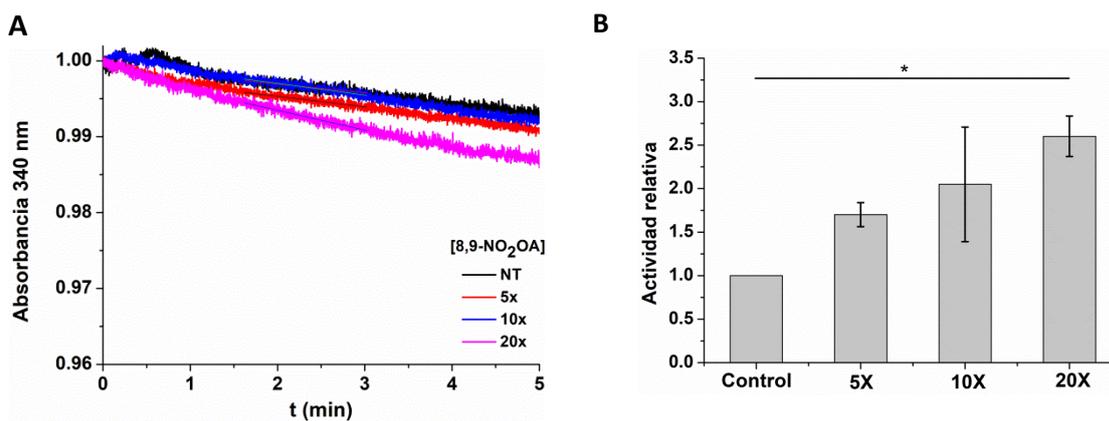


Figura 36 - Efecto de 8,9-NO₂-OA sobre la actividad desacetilasa de hSirt6. (A) Se pre-incubó hSirt6 1 μM con el nitro ácido graso no electrofílico en concentraciones exceso (5x, 10x y 20x). (B) Actividad relativa para los distintos tratamientos. Se normaliza con respecto al control sin tratar (NT). El valor de $V_{inicial}$ para el control en este ensayo es $1.8 \times 10^{-7} \pm 7 \times 10^{-8} \text{ M min}^{-1}$. Las condiciones utilizadas son las mismas que en los ensayos de la Figura 33. Se muestra un resultado representativo de un n=2. * $p < 0.05$.

Por último, se utilizó una molécula electrofílica pequeña, HNE, con el fin de que sea capaz de interactuar con H133 del sitio activo y potencialmente inactivar a hSirt6 (Figura 37). Para este caso, se tuvo en cuenta que la actividad desacetilasa de hSirt6 es muy baja y por ende es imposible detectar un efecto de inactivación mediante el uso del ensayo acoplado. Es por esta razón que se incubó la enzima con HNE 5x y a su vez con OA 50x. En el caso que la enzima se inactive luego de la incubación con HNE, no se debería ver el efecto activador del OA; en caso contrario se verá el consumo de NADPH característico de la reacción de desacetilación en presencia del ácido graso. Como reflejan las curvas de consumo de NADPH de la Figura 37, tanto de la reacción en presencia de OA como la reacción de la enzima incubada con HNE y OA no presentan variación. Por lo que se concluye que HNE no está inactivando a la enzima y por tanto no es capaz de reaccionar con His133 catalítica.

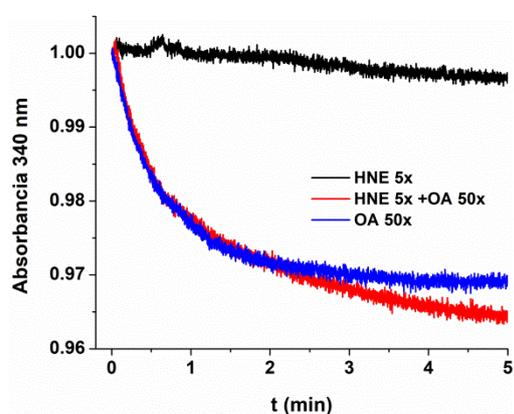


Figura 37- Efecto de HNE sobre la actividad desacetilasa de hSirt6. Se pre-incubó 1 μM de hSirt6 con HNE 5x, como no es posible detectar inhibición de la enzima se realizó el mismo ensayo en presencia de 50x OA y se comparó con el aumento de actividad característico de la enzima en presencia del ácido graso (líneas roja y azul respectivamente).

Una vez visto los efectos que tiene tanto el OA como su derivado nitrado, nos preguntamos si el ácido linoleico conjugado (CLA) y su respectivo nitro ácido graso (NO₂-CLA) tendrían el

mismo efecto sobre la actividad desacetilasa de hSirt6 *in vitro*. Para ello se realizaron los ensayos de actividad en las mismas condiciones en que se realizaron anteriormente (caso OA y NO₂-OA), ahora pre-incubando a la enzima con CLA y NO₂-CLA.

Los resultados de actividad desacetilasa obtenidos para hSirt6 en presencia de CLA y NO₂-CLA dejan en evidencia nuevamente que el derivado nitrado tiene un efecto extra por sobre el “efecto ácido graso” en la actividad desacetilasa.

Al igual que sucedía con OA y el derivado nitro no electrofílico (8,9-NO₂-OA) existe un pequeño aumento en la actividad desacetilasa que alcanza a ser el doble con respecto al control cuando se pre-incuba hSirt6 con exceso 20x CLA *Figura 38A*. Sin embargo, en presencia de NO₂-CLA (*Figura 38B*) nuevamente se refuta la hipótesis inicial, ya que éste no inactiva a la enzima descartando la formación de aducto de Michael con H133. Por el contrario, se determinó un aumento de actividad de aproximadamente un factor de 40 (utilizando un exceso 20x de NO₂-CLA con respecto a hSirt6). Una vez más afirmando que el grupo electrófilo nitro ácido graso está actuando de alguna forma sobre nuestra enzima, aspecto que se intentará determinar a lo largo del trabajo.

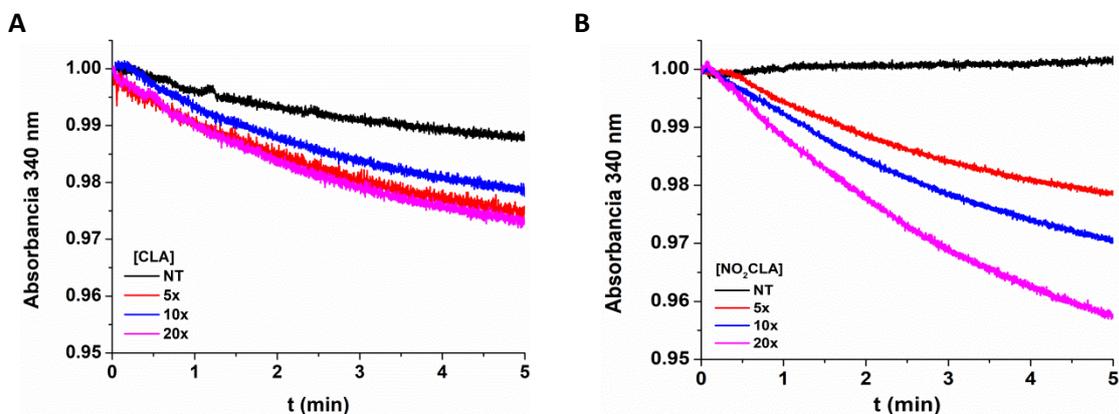


Figura 38 - Efecto de CLA y NO₂-CLA en la actividad desacetilasa de hSirt6. 1 μ M hSirt6 se pre-incubó con CLA (**A**) o NO₂-CLA (**B**) en concentraciones variables (0x, 5x, 10x, 20x) durante 20 minutos a temperatura ambiente y mediante el ensayo acoplado se midió actividad mediante el consumo de NADPH (340 nm). Las reacciones se iniciaron mediante el agregado de enzima a la mezcla de reacción. Mismas condiciones que *Figura 33*. (**C**) Actividad relativa normalizada con respecto a la enzima sin tratar (NT, valor = 1). Los tratamientos con CLA y NO₂-CLA fueron corridas independientes, con valores de $V_{inicial}$ control de $1.6 \times 10^{-7} \pm 1 \times 10^{-8}$ M min^{-1} (CLA), y $4.7 \times 10^{-8} \pm 1 \times 10^{-8}$ M min^{-1} (NO₂-CLA). Se muestra un experimento representativo de un n=3. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

4.4.1 - Aductos de Michael

Teniendo en cuenta que los ácidos grasos nitrados no inactivan a la enzima y por ende no estarían reaccionando con la histidina catalítica, se decidió profundizar en las características de la unión enzima-ácido graso nitrado.

Se ha reportado el cambio en el espectro de absorción UV del NO₂-CLA al estar unido a albúmina sérica humana (HSA) [96]. El máximo de absorbancia se encuentra en 330 nm cuando está en solución y 310 nm al estar unido a HSA. De esa forma y mediante una titulación variando la concentración del ácido graso se puede determinar el número de sitios de unión para este ligando.

Se buscó determinar en primer lugar si el espectro de NO₂-CLA se veía modificado al unirse a hSirt6 tal como el caso reportado para HSA, y en caso de que así sucediera, proceder a la titulación fijando la concentración de hSirt6 y variando la de NO₂-CLA. La *Figura 39A* muestra los espectros individuales de NO₂-CLA (10 μM) y de hSirt6 (15 μM) y de la mezcla de ambos. Se puede apreciar que el espectro de NO₂-CLA no varía al unirse a hSirt6 (aspecto que fue confirmado realizando un espectro diferencial) pero sí que hay una disminución en la absorbancia a 330 nm a lo largo del tiempo de incubación (*Figura 39B*) indicando un consumo de NO₂-CLA. Si bien este experimento no está realizado en condiciones de pseudo primer orden con el fin de poder determinar constantes cinéticas, sugiere que no se está dando una unión reversible del ácido graso nitrado sino que hay una reacción covalente entre el nitro ácido graso y grupos nucleófilos de la enzima como cisteínas o histidinas (descartando H133 del sitio activo ya que no hay inactivación). El análisis espectral indica entonces la posible formación de aductos de Michael.

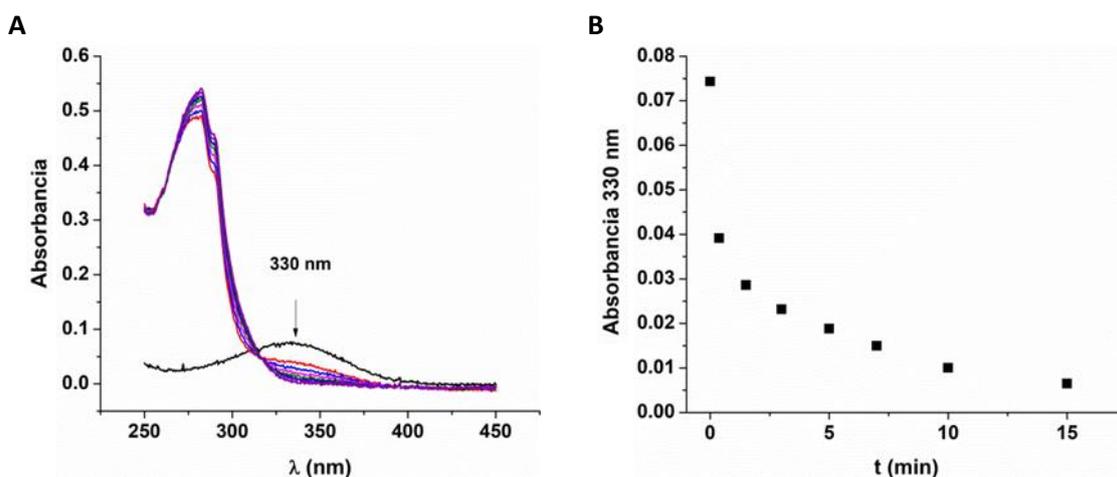


Figura 39 - Análisis de unión de NO₂-CLA a hSirt6. En (A) se puede observar el espectro de hSirt6 con su máximo a 280 nm y el espectro de NO₂-CLA libre con su máximo de absorbancia a 330 nm. Una vez realizada la mezcla de ambos hay una disminución de absorbancia a 330 nm indicando consumo de NO₂-CLA (indicado con una flecha). En (B) se representa la caída de absorbancia a 330 nm en función del tiempo, indicando consumo de NO₂-CLA.

Es a partir de este resultado que surge uno de los objetivos a realizar durante la pasantía en el Departamento de Farmacología y Química Biológica de la Universidad de Pittsburgh con el Dr. Darío Vitturi. Este laboratorio es de referencia mundial en el área de nitrolípidos, desde un punto de vista bioquímico, fisiológico así como farmacológico.

Durante dicha pasantía se intentó profundizar acerca de la formación del aducto de Michael. En primer lugar, se trabajó con NO₂-OA biotinilado (NO₂-OA-Bt), con el fin de revelar por western blot la enzima aductada. Se trabajó con enzima sin tratar (control), enzima tratada con 1 mM DECP para bloquear histidinas y otra tratada con 10 mM NEM para bloquear cisteínas (*Figura 40A*). Una vez realizados los tratamientos se puso a reaccionar hSirt6 con concentraciones crecientes de NO₂-OA-Bt (20 minutos a temperatura ambiente tal como los ensayos de actividad). Lo que vemos en el control es un aumento de la señal conforme aumenta la relación NO₂-OA-Bt con respecto a hSirt6. En el caso del tratamiento con NEM donde las cisteínas están bloqueadas vemos una disminución en la intensidad de la señal (respecto a la enzima control) indicando que efectivamente se está dando la reacción entre el ácido graso nitrado y residuos de cisteínas. Por otro lado, luego del tratamiento con DECP donde las histidinas están bloqueadas vemos nuevamente la aparición de señal, que al igual que el control incrementa conforme aumenta la concentración de NO₂-OA-Bt, descartando así la reacción con estos residuos. Esto se puede ver claramente en el gráfico de barras donde se muestra la densitometría que compara las señales del WB contra una tinción con el reactivo rojo Ponceau para proteínas, de manera de normalizar en base a la cantidad de proteína transferida en la membrana (*Figura 40B*).

En conclusión, se puede hablar de la formación de un aducto de Michael, no con H133 como sugería la hipótesis inicial, sino que se da con alguna de las seis cisteínas presentes en hSirt6.

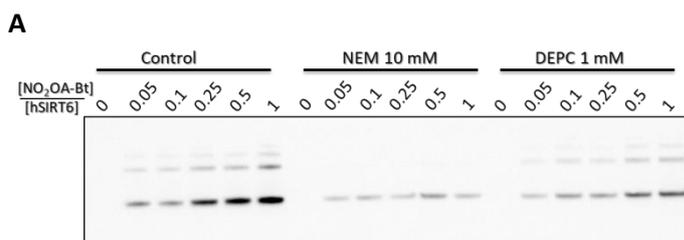
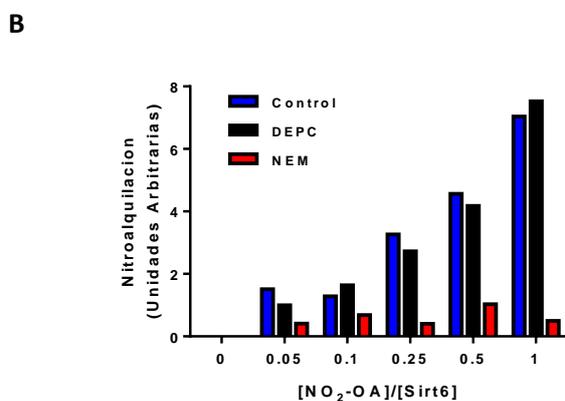


Figura 40 - Determinación de la formación de aductos de Michael entre hSirt6 y NO₂-OA. (A) Western blot anti NO₂-OA-Bt. Se realizaron tratamientos con NO₂-OA-Bt en diferentes relaciones con respecto a hSirt6 (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1) de una enzima control, enzima tratada con NEM 10 mM para bloquear cisteínas o con DEPC 1mM para bloquear histidinas. El revelado se realizó mediante streptavidina-HRP (1 h a TA) y quimioluminiscencia utilizando el kit ECL **(B)** Densitometría normalizada respecto al total de proteína, que refleja que el aducto de Michael se está formando con residuos de cisteína.



Como ya se mencionó, hSirt6 posee seis cisteínas, cuatro que coordinan un átomo de Zn²⁺ y una en cada uno de los extremos N y C terminal. Pensando en que el aducto de Michael se forma con alguna de las cisteínas más expuestas, es decir C18 o C320 y no con las que se encuentran coordinando al átomo de Zn²⁺, se decidió realizar dos mutantes de cisteína por serina en las posiciones 18 y 320 para obtener hSirt6 C18S y hSirt6 C320S. Una vez realizada la mutagénesis ambas secuencias fueron enviadas a secuenciar con el fin de confirmar que efectivamente tenemos las mutaciones de interés, y descartar posibles errores que hayan surgido (inserciones, deleciones, etc).

Teniendo el material genético ya secuenciado, se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3) y se realizó la expresión y purificación de ambas mutantes utilizando las mismas condiciones que para la salvaje wt. Una vez obtenidas ambas mutantes se corroboró si la introducción de estas mutaciones puntuales afectó la estructura secundaria o terciaria de hSirt6 mediante CD (*Figura 41*). En lo que respecta a la estructura secundaria no parece haber variaciones con respecto a la enzima wt. Al analizar la estructura terciaria, la mutación en la posición 18 tuvo repercusiones con respecto a wt, sin embargo el cambio en la posición 320 de cisteína por serina evidencia una variación en el espectro de CD alrededor de 260 nm indicando cierto efecto sobre la conformación de la enzima. Los valores de elipticidad se acercan a cero, lo que puede explicarse como una desestructuración de la enzima.

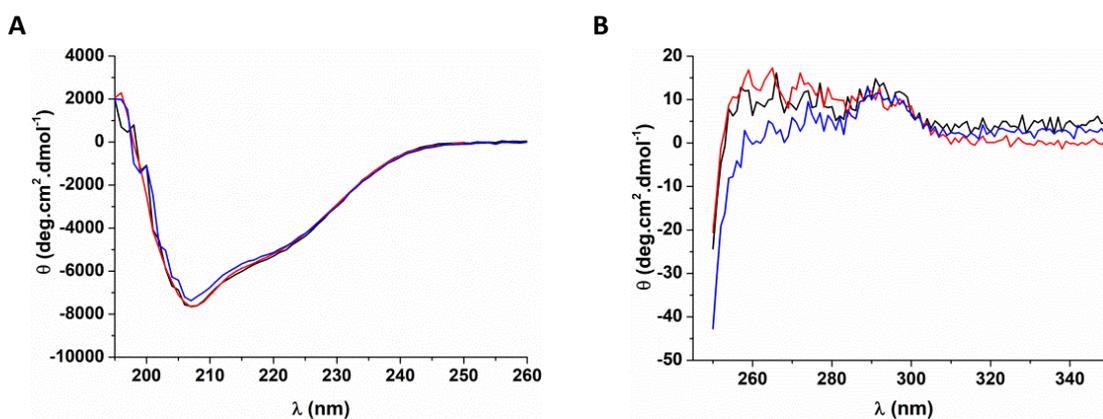


Figura 41 - Análisis estructural de hSirt6 C18S y hSirt6 C320S mediante CD. Se observan los espectros en el UV lejano (**A**) y cercano (**B**). wt (negro), C18S (rojo) y C320S (azul). Las muestras fueron preparadas en amortiguador NaPO_4 10 mM, pH 7.4. Se muestran espectros promedio de un total de 5 repeticiones.

Se realizó nuevamente un western blot anti $\text{NO}_2\text{-OA-Bt}$, ya sabiendo que el aducto se forma con cisteínas y no histidinas, así que hSirt6 wt, C18S y C320S fueron tratadas con el nitro ácido graso biotinilado para determinar con cuál de estas cisteínas se forma el aducto (*Figura 42*). Los resultados obtenidos utilizando ambas mutantes no fueron concluyentes ya que obtuvimos señal tanto para la mutante en la posición 18 como en 320. Estos resultados sugieren que alguna de las cisteínas que coordinan al átomo de Zn^{2+} también está reaccionando con el nitro ácido graso y por esta razón se obtiene señales para ambas mutantes modificadas por $\text{NO}_2\text{-OA-Bt}$.

Al analizar el SDS-PAGE no reductor (*Figura 42* superior), donde se sembraron las muestras tratadas con $\text{NO}_2\text{-OA-Bt}$ se aprecian las bandas correspondientes al dímero, al monómero y al disulfuro intra-molecular. Para el caso de wt, la relación monómero y disulfuro intra-molecular es igual mientras que esa relación cambia para el caso de ambas mutantes. Cabe notar que para hSirt6 C18S la especie de mayor movilidad electroforética es distinta, sugiriendo que el disulfuro intra-molecular estaría involucrando a C18. En el caso de C320 la banda de mayor movilidad también aparece como menos intensa que el monómero. En este caso y pensando que el disulfuro intra-molecular se está formando entre C18 y C320 es probable que se esté dando la oxidación de C18 a ácido sulfénico, tal como se reportó previamente [46]. Se habla de la oxidación por H_2O_2 de C18 a ácido sulfénico a través del cual es capaz de unirse a HIF-1 α (ver 1.7). En éste se menciona la aparición en gel de electroforesis de un doble bandeado; es decir, la banda correspondiente a hSirt6 monómero y a una banda por debajo de ésta. Los investigadores atribuyen la aparición de la banda inferior a la enzima oxidada, o sea que C18 está como ácido sulfénico. Esto lleva a suponer que existe un cambio conformacional asociado que provoca la compactación proteica y por ende mayor migración. Es por esta razón que, si bien estamos convencidos de la existencia del disulfuro intra-molecular (ya que contamos con

evidencia clara, *Figura 29A*) es probable que también estemos en presencia de C18 oxidada a ácido sulfénico ya que en el SDS-PAGE de la *Figura 42* la banda inferior desaparece en las muestras de hSirt6 C18S.

No es fácil pensar que el disulfuro intra-molecular se forme con alguna de las cisteínas que coordina al Zn^{2+} por la distancia a la cual se encuentra sumado a la importancia del Zn^{2+} en la estructura, por lo cual deja como única opción la cisteína en la posición 320. Si bien esta cisteína no ha podido ser vista en las estructuras cristalizadas disponibles, se sabe que se encuentra en la región C-terminal (variable entre isoformas) y no se puede determinar su ubicación tridimensional. Una forma de determinar las cisteínas que están involucradas en la formación del disulfuro intra-molecular sería mediante espectrometría de masa haciendo un marcaje con alquilantes. Esto implica que luego de la reducción de la proteína y su posterior oxidación (30 minutos a TA como se vio antes) se realice una alquilación con IAM. Posteriormente se reducirá nuevamente la enzima teniendo en cuenta que las cisteínas alquiladas con IAM no serán reducidas. Por último se realizará una alquilación con NEM. Como resultado en el MS las cisteínas que no se encuentran formando disulfuro se verán modificadas con IAM mientras que las que sí lo forman se verán modificadas con NEM. Teniendo en cuenta la formación de disulfuros tanto inter como intra-moleculares tendremos que comparar el resultado obtenido para hSirt6 wt y C18S donde la diferencia entre ambas será la modificación con IAM en las cisteínas implicadas en el disulfuro intra-molecular.

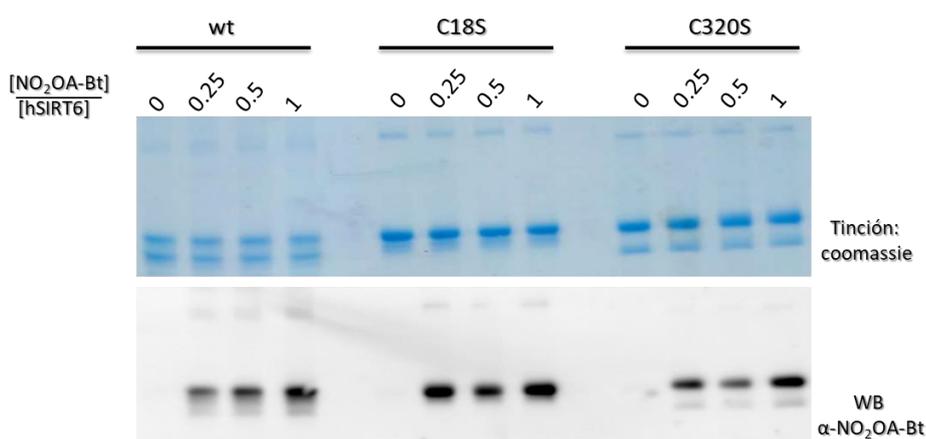


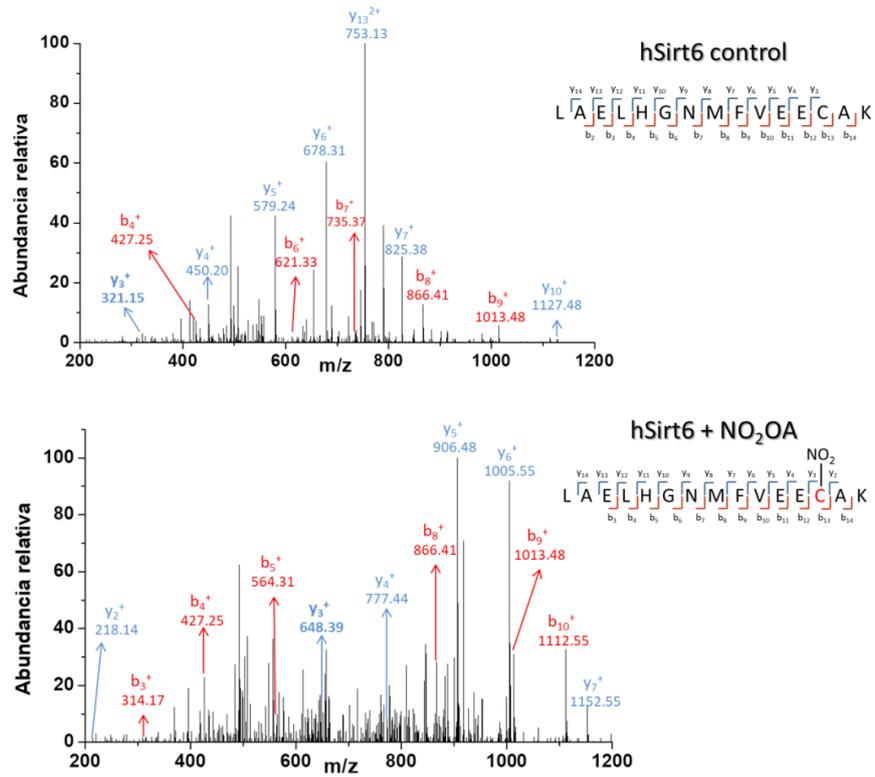
Figura 42 - Determinación de los residuos que forman aducto de Michael con nitro ácidos grasos. Se incubó hSirt6 wt, C18S y C320S con $NO_2-OA-Bt$ en diferentes relaciones con respecto a hSirt6 (0, 0.25, 0.5, 1). En la parte superior: SDS-PAGE no reductor. Parte inferior: WB $\alpha-NO_2-OA-Bt$. El revelado se realizó mediante fluorescencia con el uso de Streptavidina-Alexa Fluor 680.

Como no se logró obtener resultados concluyentes con las mutantes por WB sobre la formación de aducto de Michael, se dispuso el análisis por espectrometría de masa de la

enzima wt tratada con NO₂-OA. Teniendo en cuenta que la formación del aducto de Michael es reversible, especialmente en presencia de tiol y tiempos prolongados, la opción de realizar un análisis por MS fue la última en ser contemplada. Para poder determinar las modificaciones por esta metodología, se tuvieron en cuenta ciertas consideraciones y cuidados, entre ellos realizar el procedimiento en el menor tiempo posible para evitar la reversibilidad de las reacciones. Por esa razón, a las muestras tratadas con NO₂-OA se les realizó una digestión con tripsina corta y rápidamente fueron analizadas por ESI-MS. No se analizaron por MALDI-MS ya que el láser utilizado en éste provoca una ruptura del aducto formado y no se logra ver el corrimiento en la relación *m/z* esperado.

Teniendo en cuenta todo lo antes mencionado, se analizó como control hSirt6 wt sin tratar y dos muestras tratadas con NO₂-OA en dos concentraciones exceso (0.5x o 5x) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de quitar dicho exceso, tanto el control como la muestra tratada fueron digeridas con tripsina durante 2 h a 37°C. Estos análisis determinaron que en la muestra tratada con 0.5x NO₂-OA la cisteína modificada es la C141 (*Figura 43A*), una de las que coordina al Zn²⁺. En la muestra tratada con 5x NO₂-OA además de estar modificada C141, también se detectó a C18 formando aducto de Michael (*Figura 43B*).

A



B

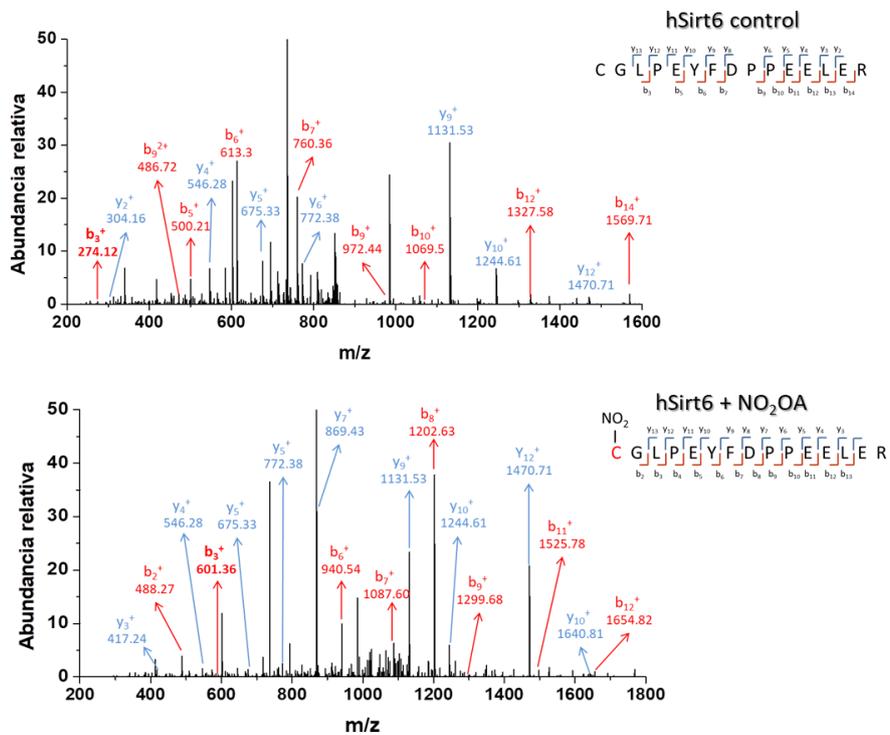


Figura 43 - Espectros obtenidos por ESI-MS/MS de hSirt6 control y tratada con NO₂OA. Se muestra la fragmentación peptídica obtenida para el tratamiento con 0.5x NO₂OA donde se determinó la modificación en C141 (A) y para el tratamiento con 5x donde se modifica además el residuo C18 (B).

De acuerdo al resultado anterior, se decidió seguir adelante trabajando con la mutante hSirt6 C18S para intentar elucidar si la formación del aducto de Michael en esa posición es el causante del aumento de actividad desacetilasa de hSirt6 *in vitro*.

Se investigó el comportamiento de la mutante hSirt6 C18S con CLA y NO₂-CLA. Como era de esperar, la presencia de CLA frente a la mutante C18S no arrojó resultados diferentes a lo que ya se había observado para la wt (*Figura 44A*). En este caso, la incubación con un exceso 20x de CLA respecto a hSirt6 resultó en un aumento de actividad de 1.5 veces (si bien está un poco por debajo de lo que se vio con la enzima wt frente a OA, esta variación está considerada dentro del error). Sin embargo, sí hubo una gran diferencia al comparar el efecto que tiene NO₂-CLA sobre la enzima wt y C18S. Como se demostró anteriormente (*Figura 38B*) utilizando un exceso de 20x del nitro ácido graso con respecto a la enzima, la actividad desacetilasa de hSirt6 wt aumenta aproximadamente en un factor de 40. Esto cambia rotundamente al realizar el mismo tratamiento con la mutante C18S (*Figura 44B*), donde si bien se vio un leve aumento de actividad, el mismo es de poco más del doble, por lo que se estaría comportando como un ácido graso convencional. Esto claramente está sugiriendo que la cisteína 18 de hSirt6 cumple un importante rol en la unión del grupo electrófilo del nitro ácido graso y provoque el aumento de la actividad desacetilasa. Nuestros resultados indican entonces que los nitro ácidos grasos además de estar teniendo un efecto por la formación de un aducto de Michael en C18, también se están comportando como un ácido graso convencional, es decir que pueden estar acomodándose en el bolsillo hidrofóbico provocando el mismo cambio conformacional visto para la enzima pre-incubada con OA y CLA.

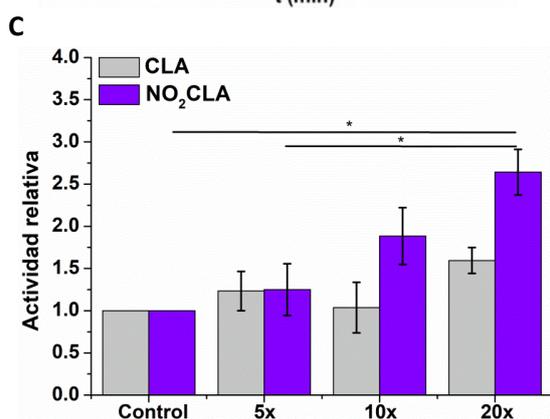
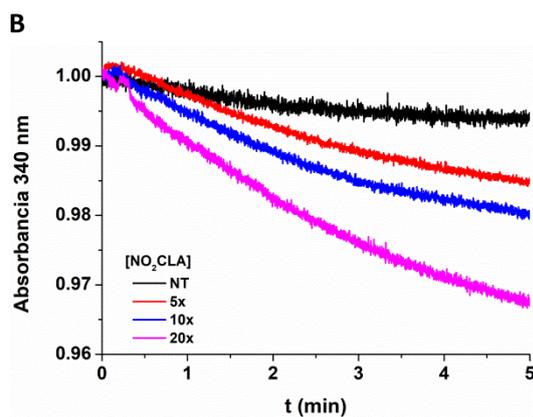
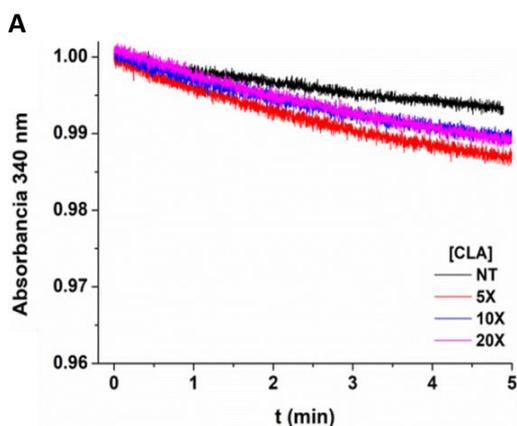


Figura 44 - Efecto de CLA y NO₂-CLA en la mutante hSirt6 C18S. 1 μ M hSirt6 C18S se pre-incubó con CLA (A) o NO₂-CLA (B) en concentraciones variables (0x, 5x, 10x, 20x) durante 20 minutos a temperatura ambiente y mediante el ensayo acoplado se midió actividad mediante el consumo de NADPH (340 nm). Las reacciones se iniciaron mediante el agregado de enzima a la mezcla de reacción. Mismas condiciones que Figura 33. (C) Actividad relativa normalizada con respecto a la enzima sin tratar (NT, valor = 1). Los tratamientos con CLA y NO₂-CLA fueron corridas independientes, con valores de $V_{inicial}$ control $1.9 \times 10^{-7} \pm 9 \times 10^{-8}$ M min^{-1} (CLA) y $7 \times 10^{-7} \pm 6 \times 10^{-7}$ M min^{-1} (NO₂-CLA). Se muestra un experimento representativo de un n=3. * $p < 0.05$.

El espectro CD (UV-cercano) de la mutante C18S se parece mucho al de la enzima wt, indicando se trata de una mutación neutra. Es más, se comporta como la enzima wt luego de la incubación con OA (Figura 45). En el espectro de la enzima tratada con OA parecen aumentar los valores de elipticidad alrededor de 260 nm, reflejando los mismos cambios conformacionales que en el caso de hSirt6 wt. Sin embargo, el tratamiento de la mutante C18S con NO₂-OA, no parece haber generado un cambio conformacional en el mismo sentido. Este resultado nos llamó la atención ya que esperábamos ver el mismo resultado que con OA y así deducir que aunque no se esté dando la formación del aducto de Michael, la cadena carbonada acomodándose en el bolsillo hidrofóbico provocaría el cambio a una conformación activa.

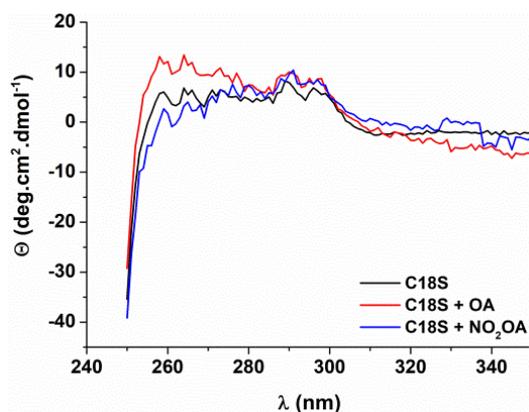


Figura 45 - Análisis CD (UV-cercano) de C18S. hSirt6 mutante fue tratada con OA y NO₂-OA. Los espectros fueron comparados contra una enzima control sin tratar. Para realizar el CD las muestras fueron preparadas en amortiguador NaPO₄ 10 mM, pH 7.4.

4.4.2. Modelado molecular computacional

Para profundizar sobre los cambios conformacionales que se están dando sobre hSirt6 en presencia de los nitro ácidos grasos se realizó un modelado molecular computacional. Para ello se trabajó sobre la estructura PDB 3ZG6 en presencia del sustrato H3K9Ac y la porción ADPr del co-sustrato NAD⁺.

En primer lugar, se ubicó a la molécula de NO₂-OA (los isómeros 9-NO₂-OA y 10-NO₂-OA) en el bolsillo hidrofóbico de la enzima para determinar las posibles interacciones del grupo electrofílico del nitro ácido graso con aminoácidos nucleofílicos de hSirt6 (Figura 46). Se determinó que las distancias entre el grupo electrófilo del ácido graso y la H133 catalítica son tales que sugieren una baja probabilidad de reacción y formación del aducto de Michael entre ellos (mayor a 20 Å). Este aspecto va en concordancia con los resultados experimentales en los cuales no se ve inactivación de la enzima en presencia de nitro ácidos grasos.

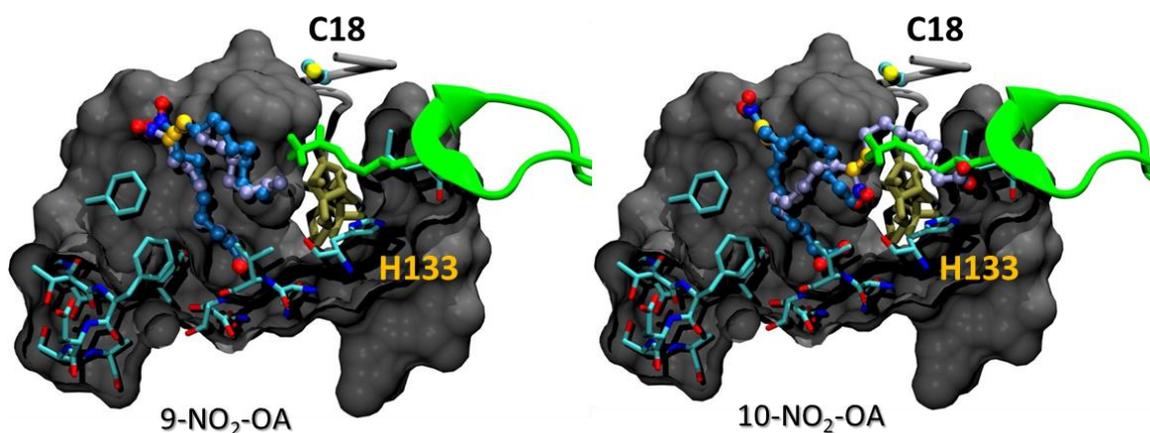


Figura 46 - Estructuras obtenidas de análisis por modelado molecular computacional entre hSirt6 y NO₂-OA. A la izquierda el isómero 9-NO₂-OA, a la derecha el 10-NO₂-OA en presencia de H3K9Ac (azul) y en su ausencia (violeta). En amarillo se representan los carbonos de la insaturación del NO₂-OA y en rojo los átomos de oxígeno del grupo nitro. Se refleja que no es posible la formación de un aducto de Michael entre el grupo electrofílico del ácido graso y la H133. ADPr (verde oliva), H3K9Ac (verde claro).

Otro aspecto observado es que si el nitro ácido graso se ubica dentro del bolsillo hidrofóbico, es prácticamente imposible que desde allí el grupo electrófilo reaccione con la C18. Es por esta razón que se analizó cómo se vería afectada la estructura proteica si el NO₂-OA se uniese a C18 por el lado externo más expuesto al solvente de la enzima. Al observar el resultado del análisis se vio que es muy probable que al formarse el aducto, la cadena carbonada del ácido graso provoque la estabilización del *loop* N-terminal de hSirt6 (*Figura 6A*), la secuencia previa a C18. Esto podría explicar el efecto visto experimentalmente sobre la actividad de la enzima luego de la incubación con nitro ácidos grasos. La hipótesis no descarta que éstos se puedan, además, acomodar en el bolsillo hidrofóbico, provocando a su vez el acercamiento de los dos dominios de hSirt6, y logrando un efecto similar al tratamiento con ácidos grasos (sin grupo electrófilo).

Vale la pena resaltar que se han reportado activadores de hSirt6, estructuralmente muy diferentes a los nitroalquenos, como MDL-800 [5] que se ha confirmado por cristalografía se une a un sitio alostérico en la superficie de Sirt6 e interactúa con la región Nt de la misma.

Está reportado que existen varias mutaciones puntuales (algunas más frecuentes que otras) en hSirt6 vistas en modelos de cáncer y que involucran tanto los extremos N y C terminales así como el *core* de la enzima [61]. Algunas de ellas son capaces de inactivar a la enzima, otras afectan una sola de las actividades de hSirt6 (deacilasa o desacetilasa) y en particular se conoce que la mutación A89S es capaz de quitarle a la enzima la capacidad de incrementar su actividad frente a ácidos grasos, sin embargo no pierde actividad desacetilasa ni deacilasa. Otras de las mutaciones si bien se dan fuera del sitio activo o del bolsillo hidrofóbico tienen grandes efectos en la estructura de la enzima. Una de ellas es por ejemplo E36V que se da en la alfa hélice (cerca al Nt) que provoca que dicha hélice se desestructure y toda la cadena hacia Nt se aleje del *core* de la proteína. Algo interesante de pensar es que los nitro ácidos grasos, mediante la formación de aducto de Michael con C18 sean capaces de estabilizar el extremo Nt recuperando la estructura de la proteína y recobrando la actividad de la misma en modelos de cáncer.

Por otro lado, se ha visto que el mecanismo de acción de algunos inhibidores de hSirt6 consiste en estabilizar ciertas conformaciones que dificultan la liberación del producto nicotinamida, la cual regenera la reacción reversa que se traduce como una pérdida de actividad. Tal vez, la modificación del *loop* Nt por el nitro ácido graso vista en el modelado molecular, pueda contribuir a la estabilización de conformaciones de la enzima que favorezcan la unión de sustrato y co-sustrato, provocando un aumento en la concentración efectiva de los mismos y por ende, podría también explicar el aumento en la actividad desacetilasa.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Para poder cumplir con los objetivos planteados en este trabajo, se expresó y purificó Sirt6 humana recombinante a partir de células *E.coli*. Se obtuvo una preparación de alta pureza de la enzima, logrando eliminar la proteína bacteriana contaminante (LacI) de similares características que co-purificaba con hSirt6 en los primeros pasos de la purificación.

Una vez obtenida la enzima se midió actividad desacetilasa y deacilasa mediante el uso de HPLC y el método de ensayo acoplado. Se constató que hSirt6 es una isoforma que presenta mayor afinidad *in vitro* por sustratos acilados de cadena larga ($K_M = 18 \mu\text{M}$ H3K9Myr) que por sustratos acetilados ($K_M = 416 \mu\text{M}$ H3K9Ac).

Se expuso a hSirt6 a oxidantes biológicos presentes en procesos de estrés oxidativo e inflamación, H_2O_2 y ONOO^- . En primer lugar se determinó que a pesar de la oxidación de cuatro cisteínas frente a la exposición a H_2O_2 , la actividad no se ve afectada significativamente, sin embargo cuando se la expone a ONOO^- se vio que la actividad cae en un 35% debido a que además de la modificación de cisteínas, también se modifican tirosinas (confirmado por western blot). Con respecto a modificaciones estructurales que posee la enzima bajo estos tratamientos, se vio que la misma es capaz de formar dímeros por disulfuro y por ditirosinas y que además también se forman disulfuros intramoleculares. Una de las cisteínas candidatas a formar este disulfuro es la cisteína 18 lo cual se determinará mediante MS. Es altamente probable que este residuo sea capaz de oxidarse a ácido sulfénico, modificación que ya se reportó altera la conformación de esta proteína.

Por otro lado se confirmó el efecto activador de ácidos grasos de cadena larga tal como está reportado. Se pre-incubó hSirt6 con OA y CLA, determinando un aumento de actividad desacetilasa en un factor de 2 para ambos ácidos grasos cuando se utilizó un exceso de 20x del ácido graso. Sorprendentemente, la pre-incubación de la enzima con los derivados nitrados, es decir, NO_2 -OA y NO_2 -CLA, contrario a la hipótesis planteada inicialmente, provocó un aumento de actividad desacetilasa mucho mayor (35-40 veces). Este efecto tan pronunciado no se observó para la mutante hSirt6 C18S. Todos estos resultados se resumen en la *Figura 46*.

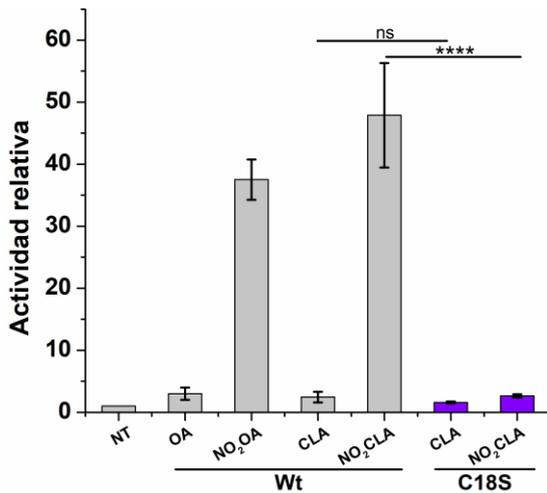


Figura 47 - Efecto de los ácidos grasos y sus derivados nitrados sobre actividad de hSirt6. OA y CLA provocan un aumento de actividad en un factor de 2, mientras los derivados nitrados provocaron un aumento de actividad desacetilasa de 35 - 40 veces. Este efecto deja de verse en la mutante hSirt6 C18S. En todos los casos se utilizó un exceso de 20x de (nitro) ácido graso. ns: no significativo; **** $p < 0.0001$.

Se vio que no existe formación de aducto de Michael con H133 confirmado por western blot utilizando un NO₂-OA biotinilado y mediante modelado molecular computacional. Sin embargo se confirmó mediante ESI-MS la existencia de aducto en C18 y C141. Al analizar la estructura por difracción circular se vio, que los ácidos grasos OA y CLA provocan cambios en el espectro de CD UV-cercano, alrededor de los 260 nm, que son aún mayores en presencia de los nitro ácidos grasos sugiriendo cambios conformacionales que pueden estar asociados al aumento de actividad desacetilasa. Estos efectos no se visualizan al analizar la mutante C18S frente a NO₂-OA y NO₂-CLA lo que indica que el aducto de Michael formado con dicha cisteína juega un importante rol en la activación de la enzima. Mediante modelado molecular computacional se determinó que la formación del aducto entre la C18 y los nitro ácidos grasos provoca una estabilización del *loop* Nt, llevando a la enzima a una conformación más activa. Es por todo lo antes mencionado que proponemos a los nitro ácidos grasos como potenciales activadores selectivos de hSirt6, atendiendo a las características estructurales particulares de esta isoforma.

Finalizado el trabajo de Maestría nos proponemos continuar investigando los cambios estructurales y funcionales de hSirt6 en entornos oxidativos y para ello nos planteamos algunas perspectivas. Como sabemos, el contexto en el cual se encuentra la enzima en ensayos *in vitro* varía con respecto a lo que sucede si se encuentra en un contexto celular. Es por ello que sería interesante estudiar qué sucede con la enzima en macrófagos y comparar el efecto que pueda tener la activación de los mismos ya que estaríamos simulando condiciones inflamatorias. Siguiendo en esta línea nos proponemos trabajar con histonas y/o nucleosomas como sustrato en ensayos *in vitro* ya que se ha demostrado que en este contexto Sirt6 posee buena actividad desacetilasa y habilita la posibilidad de confirmar los resultados obtenidos. Otra propuesta interesante es trabajar con mutantes de hSirt6, como la hSirt6 A89S (presente

en ciertos tipos de cáncer), mutante que frente a ácidos grasos únicamente pierde la capacidad de activación. Según nuestros resultados experimentales y el modelado molecular computacional, si se realiza dicha mutación no deberíamos ver aumento en la actividad desacetilasa de la enzima si se expone a ácidos grasos. Por el contrario, frente a nitro ácidos grasos electrófilos deberíamos ver el aumento de actividad que se demostró en el presente trabajo. Por otro lado, si se realizara la doble mutante, C18S-A89S se dejaría de ver el efecto del ácido graso electrófilo, reforzando todos los resultados obtenidos hasta el momento. Trabajar con la mutante hSirt6 A89S será interesante además por la relevancia que posee Sirt6 en contextos de cáncer. Por último, y también como forma de validar el efecto activador de los nitro ácidos grasos será interesante trabajar con una hSirt6 trunca en el extremo N-terminal. Proponemos generar una construcción de la proteína que va del residuo 8 al 355 con la cual no deberíamos ver la estabilización del Nt por los nitro ácidos grasos en tanto sí el “efecto ácido graso”.

6. REFERENCIAS

1. Zhao, K., et al., *Structure and autoregulation of the yeast Hst2 homolog of Sir2*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(10): p. 864-71.
2. Chen, L., et al., *Dual role of Zn²⁺ in maintaining structural integrity and suppressing deacetylase activity of SIRT1*. J Inorg Biochem, 2010. **104**(2): p. 180-5.
3. Michan, S. and D. Sinclair, *Sirtuins in mammals: insights into their biological function*. Biochem J, 2007. **404**(1): p. 1-13.
4. Liszt, G., et al., *Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21313-20.
5. Huang, Z., et al., *Identification of a cellularly active SIRT6 allosteric activator*. Nat Chem Biol, 2018. **14**(12): p. 1118-1126.
6. Cubizolles, F., et al., *A homotrimer-heterotrimer switch in Sir2 structure differentiates rDNA and telomeric silencing*. Mol Cell, 2006. **21**(6): p. 825-36.
7. Tanno, M., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6823-32.
8. Michishita, E., et al., *Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4623-35.
9. North, B.J., et al., *The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 437-44.
10. Knyphausen, P., et al., *Insights into Lysine Deacetylation of Natively Folded Substrate Proteins by Sirtuins*. J Biol Chem, 2016. **291**(28): p. 14677-94.
11. Rauh, D., et al., *An acetylome peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2327.
12. Sacconnay, L., P.A. Carrupt, and A. Nurisso, *Human sirtuins: Structures and flexibility*. J Struct Biol, 2016. **196**(3): p. 534-542.
13. Pan, P.W., et al., *Structure and biochemical functions of SIRT6*. J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 14575-87.
14. Zhao, X., et al., *The 2.5 Å crystal structure of the SIRT1 catalytic domain bound to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and an indole (EX527 analogue) reveals a novel mechanism of histone deacetylase inhibition*. J Med Chem, 2013. **56**(3): p. 963-9.
15. Finnin, M.S., J.R. Donigian, and N.P. Pavletich, *Structure of the histone deacetylase SIRT2*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(7): p. 621-5.
16. Min, J., et al., *Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex*. Cell, 2001. **105**(2): p. 269-79.
17. Costantini, S., et al., *Genealogy of an ancient protein family: the Sirtuins, a family of disordered members*. BMC Evol Biol, 2013. **13**: p. 60.
18. North, B.J. and E. Verdin, *Mitotic regulation of SIRT2 by cyclin-dependent kinase 1-dependent phosphorylation*. J Biol Chem, 2007. **282**(27): p. 19546-55.
19. Kang, H., et al., *Peptide switch is essential for Sirt1 deacetylase activity*. Mol Cell, 2011. **44**(2): p. 203-13.
20. Tennen, R.I., E. Berber, and K.F. Chua, *Functional dissection of SIRT6: identification of domains that regulate histone deacetylase activity and chromatin localization*. Mech Ageing Dev, 2010. **131**(3): p. 185-92.
21. Tasselli, L., et al., *SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(5): p. 434-40.
22. Feldman, J.L., J. Baeza, and J.M. Denu, *Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacetylation by mammalian sirtuins*. J Biol Chem, 2013. **288**(43): p. 31350-6.
23. Ahuja, N., et al., *Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase*. J Biol Chem, 2007. **282**(46): p. 33583-92.

24. Mao, Z., et al., *SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1*. Science, 2011. **332**(6036): p. 1443-6.
25. Du, J., et al., *Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase*. Science, 2011. **334**(6057): p. 806-9.
26. Jiang, H., et al., *SIRT6 regulates TNF-alpha secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine*. Nature, 2013. **496**(7443): p. 110-3.
27. Zhong, L., et al., *The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha*. Cell, 2010. **140**(2): p. 280-93.
28. Kawahara, T.L., et al., *SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span*. Cell, 2009. **136**(1): p. 62-74.
29. Sebastian, C., et al., *The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism*. Cell, 2012. **151**(6): p. 1185-99.
30. Zhang, X., et al., *Identifying the functional contribution of the defatty-acylase activity of SIRT6*. Nat Chem Biol, 2016. **12**(8): p. 614-20.
31. Sauve, A.A. and D.Y. Youn, *Sirtuins: NAD(+)-dependent deacetylase mechanism and regulation*. Curr Opin Chem Biol, 2012. **16**(5-6): p. 535-43.
32. Liang, Z., et al., *Investigation of the catalytic mechanism of Sir2 enzyme with QM/MM approach: SN1 vs SN2?* J Phys Chem B, 2010. **114**(36): p. 11927-33.
33. Hawse, W.F., et al., *Structural insights into intermediate steps in the Sir2 deacetylation reaction*. Structure, 2008. **16**(9): p. 1368-77.
34. Avalos, J.L., J.D. Boeke, and C. Wolberger, *Structural basis for the mechanism and regulation of Sir2 enzymes*. Mol Cell, 2004. **13**(5): p. 639-48.
35. Borra, M.T., et al., *Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD+-dependent histone/protein deacetylases*. Biochemistry, 2004. **43**(30): p. 9877-87.
36. Sauve, A.A. and V.L. Schramm, *Sir2 regulation by nicotinamide results from switching between base exchange and deacetylation chemistry*. Biochemistry, 2003. **42**(31): p. 9249-56.
37. Jackson, M.D., et al., *Mechanism of nicotinamide inhibition and transglycosidation by Sir2 histone/protein deacetylases*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 50985-98.
38. Gertz, M., et al., *Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD+-dependent deacetylation mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(30): p. E2772-81.
39. Mostoslavsky, R., et al., *Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6*. Cell, 2006. **124**(2): p. 315-29.
40. Michishita, E., et al., *SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin*. Nature, 2008. **452**(7186): p. 492-6.
41. Michishita, E., et al., *Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6*. Cell Cycle, 2009. **8**(16): p. 2664-6.
42. Kaidi, A., et al., *Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation*. Science, 2010. **329**(5997): p. 1348-53.
43. McCord, R.A., et al., *SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(1): p. 109-21.
44. Toiber, D., et al., *SIRT6 recruits SNF2H to DNA break sites, preventing genomic instability through chromatin remodeling*. Mol Cell, 2013. **51**(4): p. 454-68.
45. Gao, Y., et al., *SIRT6 facilitates directional telomere movement upon oxidative damage*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 5407.
46. Yang, J., et al., *Site-specific mapping and quantification of protein S-sulphenylation in cells*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4776.
47. Dominy, J.E., Jr., et al., *The deacetylase Sirt6 activates the acetyltransferase GCN5 and suppresses hepatic gluconeogenesis*. Mol Cell, 2012. **48**(6): p. 900-13.

48. Zhang, P., et al., *Tumor suppressor p53 cooperates with SIRT6 to regulate gluconeogenesis by promoting FoxO1 nuclear exclusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(29): p. 10684-9.
49. Qin, K., et al., *SIRT6-mediated transcriptional suppression of Txnip is critical for pancreatic beta cell function and survival in mice*. Diabetologia, 2018. **61**(4): p. 906-918.
50. Tao, R., et al., *Hepatic SREBP-2 and cholesterol biosynthesis are regulated by FoxO3 and Sirt6*. J Lipid Res, 2013. **54**(10): p. 2745-53.
51. Kim, H.S., et al., *Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis*. Cell Metab, 2010. **12**(3): p. 224-36.
52. Jiang, H., X. Zhang, and H. Lin, *Lysine fatty acylation promotes lysosomal targeting of TNF-alpha*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24371.
53. Van Gool, F., et al., *Intracellular NAD levels regulate tumor necrosis factor protein synthesis in a sirtuin-dependent manner*. Nat Med, 2009. **15**(2): p. 206-10.
54. Stevenson, F.T., et al., *Myristyl acylation of the tumor necrosis factor alpha precursor on specific lysine residues*. J Exp Med, 1992. **176**(4): p. 1053-62.
55. Lappas, M., *Anti-inflammatory properties of sirtuin 6 in human umbilical vein endothelial cells*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 597514.
56. Xiao, C., et al., *Progression of chronic liver inflammation and fibrosis driven by activation of c-JUN signaling in Sirt6 mutant mice*. J Biol Chem, 2012. **287**(50): p. 41903-13.
57. Lin, Z., et al., *USP10 antagonizes c-Myc transcriptional activation through SIRT6 stabilization to suppress tumor formation*. Cell Rep, 2013. **5**(6): p. 1639-49.
58. Marquardt, J.U., et al., *Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients*. Hepatology, 2013. **58**(3): p. 1054-64.
59. Kugel, S., et al., *SIRT6 Suppresses Pancreatic Cancer through Control of Lin28b*. Cell, 2016. **165**(6): p. 1401-1415.
60. Van Meter, M., V. Gorbunova, and A. Seluanov, *SIRT6: a promising target for cancer prevention and therapy*. Adv Exp Med Biol, 2014. **818**: p. 181-96.
61. Kugel, S., et al., *Identification of and Molecular Basis for SIRT6 Loss-of-Function Point Mutations in Cancer*. Cell Rep, 2015. **13**(3): p. 479-488.
62. Feldman, J.L., et al., *Kinetic and Structural Basis for Acyl-Group Selectivity and NAD(+)-Dependence in Sirtuin-Catalyzed Deacylation*. Biochemistry, 2015. **54**(19): p. 3037-3050.
63. Ying, W., *NAD+/NADH and NADP+/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(2): p. 179-206.
64. Rahnasto-Rilla, M., et al., *Natural polyphenols as sirtuin 6 modulators*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 4163.
65. Kokkonen, P., et al., *Peptides and Pseudopeptides as SIRT6 Deacetylation Inhibitors*. ACS Med Chem Lett, 2012. **3**(12): p. 969-74.
66. Yasuda, M., et al., *Synthesis and characterization of SIRT6 protein coated magnetic beads: identification of a novel inhibitor of SIRT6 deacetylase from medicinal plant extracts*. Anal Chem, 2011. **83**(19): p. 7400-7.
67. Rahnasto-Rilla, M., et al., *N-Acylethanolamines Bind to SIRT6*. Chembiochem, 2016. **17**(1): p. 77-81.
68. Parenti, M.D., et al., *Discovery of novel and selective SIRT6 inhibitors*. J Med Chem, 2014. **57**(11): p. 4796-804.
69. Wood, M., et al., *Trichostatin A inhibits deacetylation of histone H3 and p53 by SIRT6*. Arch Biochem Biophys, 2018. **638**: p. 8-17.

70. Smeriglio, A., et al., *Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins*. *Phytother Res*, 2016. **30**(8): p. 1265-86.
71. Hu, S., et al., *Posttranslational modification of Sirt6 activity by peroxynitrite*. *Free Radic Biol Med*, 2015. **79**: p. 176-85.
72. Miteva, Y.V. and I.M. Cristea, *A proteomic perspective of Sirtuin 6 (SIRT6) phosphorylation and interactions and their dependence on its catalytic activity*. *Mol Cell Proteomics*, 2014. **13**(1): p. 168-83.
73. Cai, J., et al., *A crucial role of SUMOylation in modulating Sirt6 deacetylation of H3 at lysine 56 and its tumor suppressive activity*. *Oncogene*, 2016. **35**(37): p. 4949-56.
74. Ronnebaum, S.M., et al., *The ubiquitin ligase CHIP prevents Sirt6 degradation through noncanonical ubiquitination*. *Mol Cell Biol*, 2013. **33**(22): p. 4461-72.
75. Mittal, M., et al., *Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(7): p. 1126-67.
76. Pendyala, S. and V. Natarajan, *Redox regulation of Nox proteins*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2010. **174**(3): p. 265-71.
77. Kalyanaraman, B., *Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms*. *Redox Biol*, 2013. **1**: p. 244-57.
78. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. **279**(6): p. L1005-28.
79. Winterbourn, C.C., *The biological chemistry of hydrogen peroxide*. *Methods Enzymol*, 2013. **528**: p. 3-25.
80. Beckman, J.S., *Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite*. *Chem Res Toxicol*, 1996. **9**(5): p. 836-44.
81. Winterbourn, C.C., *Biological Production, Detection, and Fate of Hydrogen Peroxide*. *Antioxid Redox Signal*, 2018. **29**(6): p. 541-551.
82. Pryor, W.A., X. Jin, and G.L. Squadrito, *One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(23): p. 11173-7.
83. Denicola, A., J.M. Souza, and R. Radi, *Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(7): p. 3566-71.
84. Radi, R., *Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(23): p. 5839-5848.
85. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(1): p. 315-424.
86. Trujillo, M., G. Ferrer-Sueta, and R. Radi, *Peroxynitrite detoxification and its biologic implications*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(9): p. 1607-20.
87. Radi, R., *Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects*. *Acc Chem Res*, 2013. **46**(2): p. 550-9.
88. Rustan, A.C. and C.A. Drevon, *Fatty acids: structures and properties*. e LS, 2001.
89. Charles, R.L., et al., *Protection from hypertension in mice by the Mediterranean diet is mediated by nitro fatty acid inhibition of soluble epoxide hydrolase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(22): p. 8167-72.
90. Fazzari, M., et al., *Olives and olive oil are sources of electrophilic fatty acid nitroalkenes*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e84884.
91. Delmastro-Greenwood, M., et al., *Nitrite and nitrate-dependent generation of anti-inflammatory fatty acid nitroalkenes*. *Free Radic Biol Med*, 2015. **89**: p. 333-41.
92. Bonacci, G., et al., *Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(53): p. 44071-82.
93. Salvatore, S.R., et al., *Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine*. *J Lipid Res*, 2013. **54**(7): p. 1998-2009.
94. Buchan, G.J., et al., *Nitro-fatty acid formation and metabolism*. *Nitric Oxide*, 2018. **79**: p. 38-44.

95. Freeman, B.A., V.B. O'Donnell, and F.J. Schopfer, *The discovery of nitro-fatty acids as products of metabolic and inflammatory reactions and mediators of adaptive cell signaling*. Nitric Oxide, 2018. **77**: p. 106-111.
96. Turell, L., et al., *The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid*. J Biol Chem, 2017. **292**(4): p. 1145-1159.
97. Baker, L.M., et al., *Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction*. J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 31085-93.
98. Delmastro-Greenwood, M., B.A. Freeman, and S.G. Wendell, *Redox-dependent anti-inflammatory signaling actions of unsaturated fatty acids*. Annu Rev Physiol, 2014. **76**: p. 79-105.
99. Ferreira, A.M., et al., *Nitro-fatty acids as novel electrophilic ligands for peroxisome proliferator-activated receptors*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(9): p. 1654-63.
100. Cui, T., et al., *Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators*. J Biol Chem, 2006. **281**(47): p. 35686-98.
101. Kansanen, E., et al., *Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid*. J Biol Chem, 2009. **284**(48): p. 33233-41.
102. Kelley, E.E., et al., *Nitro-oleic acid, a novel and irreversible inhibitor of xanthine oxidoreductase*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36176-84.
103. Trostchansky, A., et al., *Nitroarachidonic acid, a novel peroxidase inhibitor of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 12891-900.
104. Romero, N., et al., *Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44049-57.
105. Brito, C., et al., *Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3356-66.
106. Tanny, J.C. and D. Moazed, *Coupling of histone deacetylation to NAD breakdown by the yeast silencing protein Sir2: Evidence for acetyl transfer from substrate to an NAD breakdown product*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(2): p. 415-20.
107. Smith, B.C., W.C. Hallows, and J.M. Denu, *A continuous microplate assay for sirtuins and nicotinamide-producing enzymes*. Anal Biochem, 2009. **394**(1): p. 101-9.
108. Yan, C. and D.L. Sloan, *Purification and characterization of nicotinamide deamidase from yeast*. J Biol Chem, 1987. **262**(19): p. 9082-7.
109. Nelson, D.P. and L.A. Kiesow, *Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV)*. Anal Biochem, 1972. **49**(2): p. 474-8.
110. Manta, B., et al., *The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2*. Arch Biochem Biophys, 2009. **484**(2): p. 146-54.
111. Riener, C.K., G. Kada, and H.J. Gruber, *Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine*. Anal Bioanal Chem, 2002. **373**(4-5): p. 266-76.
112. Chakrabarty, S.P. and H. Balaram, *Reversible binding of zinc in Plasmodium falciparum Sir2: structure and activity of the apoenzyme*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(9): p. 1743-50.
113. Sabel, C.E., J.L. Shepherd, and S. Siemann, *A direct spectrophotometric method for the simultaneous determination of zinc and cobalt in metalloproteins using 4-(2-pyridylazo)resorcinol*. Anal Biochem, 2009. **391**(1): p. 74-6.
114. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1751**(2): p. 119-39.

115. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*. J Mol Graph, 1996. **14**(1): p. 33-8, 27-8.
116. Trott, O. and A.J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. J Comput Chem, 2010. **31**(2): p. 455-61.
117. Morris, G.M., et al., *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. J Comput Chem, 2009. **30**(16): p. 2785-91.
118. Owens, R.M., et al., *Copurification of the Lac repressor with polyhistidine-tagged proteins in immobilized metal affinity chromatography*. Protein Expr Purif, 2001. **21**(2): p. 352-60.
119. Kalous, K.S., et al., *Mechanism of Sirt1 NAD⁺-dependent Protein Deacetylase Inhibition by Cysteine S-Nitrosation*. J Biol Chem, 2016. **291**(49): p. 25398-25410.

7. ANEXO

Secuencia de hSirt6 obtenida luego de la secuenciación

(En rojo se señalan las secuencias que fueron seleccionadas como cebadores para mutagénesis)

atgagaggatcgcatcaccatcaccatcacggatccatgtcggggaattacgcggcgggg
M R G S H H H H H G S M S V N Y A A G
ctgtcgcggtacgcggaacaaggcaagtgcggcctcccgagatccttcgaccccccgag
L S P Y A D K G K C G L P E I F D P P E
gagctggagcggaaggtgtgggaactggcgaggctggctctggcagctctccaatgtggg
E L E R K V W E L A R L V W Q S S N V V
ttccacacgggtgcccggcatcagcactgcctctggcatccccgacttcaggggtccccac
F H T G A G I S T A S G I P D F R G P H
ggagtctggaccatggaggagcaggtctggcccccaagttcgacaccacctttgagagc
G V W T M E E R G L A P K F D T T F E S
gcgcgcccacgcagaccacatggcgctgggtgcagctggagcgcgtgggcctcctccgc
A R P T Q T H M A L V Q L E R V G L L R
ttcctggtcagccagaactgggacgggctccatgtgcgctcaggcttccccagggacaaa
F L V S Q N V D G L H V R S G F P R D K
ctggcagagctccacgggaacatgtttgtggaagaatgtgccaagtgtgaagacgcagtac
L A E L H G N M F V E E C A K C K T Q Y
gtccgagacacagttgtgggcaccatgggcctgaaggccacgggcccggctctgcaccgtg
V R D T V V G T M G L K A T G R L C T V
gctaaggcaagggggctgcgagcctgcaggggagagctgagggacaccatcctagactgg
A K A R G L R A C R G E L R D T I L D W
gaggactccctgcccgaccgggacctggcactcgccgatgaggccagcaggaacgccgac
E D S L P D R D L A L A D E A S R N A D
ctgtccatcacgctgggtacatcgctgcagatccggcccagcgggaacctgccgctggct
L S I T L G T S L Q I R P S G N L P L A
accaagcgcgggggagggccgctggctcatcgtcaacctgcagcccaccaagcagaccgc
T K R R G G R L V I V N L Q P T K H D R
catgctgacctccgcatccatggctacgttgacgaggtcatgaccggctcatgaagcac
H A D L R I H G Y V D E V M T R L M K H
ctggggctggagatccccgcctgggacggcccccgctgtgctggagagggcgctgccacce
L G L E I P A W D G P R V L E R A L P P
ctgccccgcccgccacccccaaagtggagcccaaggaggaatctcccaccggatcaac
L P R P P T P K L E P K E E S P T R I N
ggctctatccccgcccggccccaaagcaggagccctgcgcccagcacaaaggctcagagccc
G S I P A G P K Q E P C A Q H N G S E P
gccagccccaaacgggagcggcccaccagccctgccccccacagacccccaaaagggtgaaa
A S P K R E R P T S P A P H R P P K R V K

8. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis tutores. A Ana por todo el tiempo y la dedicación brindados durante estos años. A diario siempre dispuesta a discutir resultados y planear nuevos experimentos. A Carlos por el trabajo dedicado en la co-orientación de esta tesis.

También a Darío Vitturi por recibirme y permitir realizar mi pasantía en su laboratorio, a Mariana Bonilla por las largas charlas sobre Biología Molecular y su apoyo con las mutagénesis y a Gerardo Ferrer por la ayuda brindada con los experimentos de CD. También a Matías Machado por su aporte con los análisis computacionales.

A todos los integrantes de FQB-Enz que hacen que el trabajo en el laboratorio sea un disfrute a diario. Siempre con buena onda y dispuestos a dar una mano cuando se necesita.

A mis amigas, con quienes durante la carrera compartimos horas de estudio, mates y risas. Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia que siempre está alentando a seguir adelante.