



Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Tesina de grado Licenciatura en Bioquímica

CARACTERIZACION TOPOGRAFICA Y TEMPORAL DE LA EXPRESION DE LA PROTEINA DBC1 EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL RATON

ROCIO VARELA

Tutor: Dr Aldo Calliari

Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de
Veterinaria - Udelar

Montevideo, Uruguay

Febrero 2016

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Aldo, por su dedicación constante.

A mamá, porque sin ella esta carrera no hubiese sido posible. Luchando siempre el día a día conmigo, en las buenas y en las malas. Por siempre tener la palabra justa y alegrarse de mis logros como si fuesen de ella. En definitiva por tu apoyo incondicional y confianza, hoy y siempre.

A Fede, mi novio, quien también fue participe de esta carrera desde el día 1. A quien enloquecí en cada parcial y cada examen transmitiéndole mis nervios y mis locuras. Gracias por siempre estar ahí intentando tranquilizarme y entender mis tiempos de estudio.

Gracias a las Glendas por convertirse un personas muy importantes para mí, y por haber compartido cada minuto de esta carrera. Siempre con las palabras justas de aliento y aguante en los buenos y malos momentos.

A GPT, mis amigas de la vida, por su apoyo incondicional.

A todos, gracias por hacer esto posible.

RESUMEN

Deleted in Breast Cancer (DBC1) es una proteína nuclear de función poco estudiada. Los animales *knockout* para este gen resultan fenotípicamente normales, excepto por su mayor resistencia a las alteraciones metabólicas producidas por las dietas hipercalóricas, mayor incidencia al cáncer y su mayor longevidad. DBC1 se encuentra generalmente asociada a factores reguladores de la actividad transcripcional¹ (factores de transcripción y otras proteínas reguladoras de la expresión génica). Una de ellas es SIRT1, una desacetilasa dependiente de NAD⁺ que ha concitado gran interés pues es capaz de regular la actividad de varios factores de transcripción. De esta forma, SIRT1 promueve el silenciamiento génico, la resistencia al estrés oxidativo, modera la respuesta inflamatoria y reprime la apoptosis. Asimismo, promueve y regula el metabolismo calórico. DBC1 se une a SIRT1 y regula negativamente su actividad desacetilasa, formando un complejo dinámico que es a su vez regulado por el estado metabólico del organismo. A la fecha, se considera a DBC1 como el principal regulador negativo de SIRT1.

Si bien no existe evidencia directa que vincule a DBC1 con la fisiología del Sistema Nervioso Central, su potencial importancia puede sospecharse a partir de lo que se conoce sobre SIRT1.

En este trabajo nos propusimos caracterizar la expresión de DBC1 en el Sistema Nervioso Central, concentrándonos en regiones claves como el hipocampo, la corteza y el cerebelo. Nuestros estudios demuestran que la expresión de DBC1 es mayor en el hipocampo, y que tiende a aumentar con la edad del ratón.

PALABRAS CLAVES

DBC1, SIRT1, corteza, cerebelo, hipocampo, envejecimiento

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxiribonucleotido.

ADP: Di fosfato de adenosina

AMP: Mono fosfato de adenosina Adenosinmonofosfato

AMPK: Kinasa dependiente de AMP ciclico adenosinmonofosfatociclico

BRCA1: cáncer de mama 1 (breast cáncer 1)

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

ErbRev: Reverse ERBalpha (gen que codifica para un gen nuclear) nuclear

FOXO: factor de transcripción *forkhead*, subgrupo O

HDAC3: Histona desacetilasa 3

HDL: Lipoproteina de alta densidad.

hSIRT1: Sirtuina de tipo 1 humana.

IL-6: Interleuquina 6

kDa: Kilo Dalton

LXR: receptores X del hígado

MPM: Marcador de peso molecular

NAD: Di nucleótido de Nicotinamida adenina

NET-N: NaCl, EDTA , Tris - Nonidet NP40

NFkB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

pADPr: poly ADP ribosa

PBS: Buffer fosfato salino

PGC-1 α : Receptor Peroxisoma- γ coactivador activado por el proliferador

PKA: Proteína quinasa A

PPAR γ : El receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma

PVDF: Di fluoruro de polivinilideno

SDS: Dodecilsulfato sódico

Suv39H1: histona-lisina N-metiltransferasa

TBS-T: Buffer Tris salino-tween

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

UCP2: Proteína desacoplante 2

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 1.1 Metabolismo energético y salud | 1 |
| 1.2 Sirtuinas..... | 3 |
| 1.2.1 SIRT1 | 4 |
| 1.2.1.1 Estructura de SIRT1 | 5 |
| 1.2.1.2 Funciones de SIRT1 | 7 |
| 1.2.1.3 Reguladores de SIRT1 | 9 |
| 1.3 DBC1 | 10 |
| 1.3.1 Estructura de DBC1 | 11 |
| 1.3.2 Interacciones de DBC1 | 14 |
| 1.3.3 Funciones de DBC1..... | 22 |
| 1.3.4 Importancia de DBC1 en la fisiología del sistema nervioso | 23 |
| 2. OBJETIVOS | 27 |
| 2.1 Objetivo general..... | 27 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 27 |
| 3. MATERIALES Y METODOS | 28 |
| 3.1 Materiales | 28 |
| 3.2 Métodos | 29 |
| 3.2.1 Extracción y disección de las distintas regiones del cerebro | 29 |
| 3.2.2 Extracción de proteínas de hipocampo, corteza y cerebelo | 30 |
| 3.2.3 Cuantificación de concentración de proteínas presente en las muestras (método de Bradford)..... | 30 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.4 | Curvas de calibración | 31 |
| 3.2.5 | <i>Western Blot</i> e identificación de proteínas DBC1 y α -Tubulina | 32 |
| 3.2.6 | Análisis de datos - <i>Western Blot</i> | 34 |
| 3.2.7 | Crioprotección de cerebros..... | 35 |
| 3.2.8 | Cortes histológicos de tejidos | 36 |
| 3.2.9 | Inmunohistoquímica..... | 36 |
| 3.2.10 | Análisis de datos – Inmunohistoquímica..... | 39 |
| 4. | RESULTADOS | 41 |
| 4.1 | Expresión de la proteína DBC1 en el cerebro de ratón, en diferentes etapas del desarrollo post natal..... | 42 |
| 4.2 | Variación de la expresión de DBC1 en el tiempo | 54 |
| 5. | DISCUSION | 57 |
| 6. | CONCLUSION..... | 62 |
| 7. | PERSPECTIVAS | 63 |
| 8. | REFERENCIAS | 64 |

1. INTRODUCCION

1.1 Metabolismo energético y Salud

Las alteraciones del metabolismo energético, principalmente fruto del desbalance de la ingesta calórica típica de las dietas occidentales, constituyen actualmente un serio problema de salud pública mundial. En casos extremos la alteración metabólica producida por excesos en la ingesta de lípidos y carbohidratos de fácil digestión, asociada a otros hábitos y pautas culturales, se constituye en el llamado “Síndrome Metabólico”. Se le denomina así a una combinación de factores de riesgo, como lo son la obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia, hipertensión, HDL bajo, y estados pro-trombótico y pro-inflamatorios^{1,2}.

Otro ejemplo de la relevancia del metabolismo energético sobre la salud y la fisiología del individuo, lo constituyen los efectos producidos por la “restricción calórica”. Se entiende por Restricción Calórica (RC) a la ingesta caracterizada por una disminución variable del aporte calórico (usualmente entre el 10 y el 30 %), pero sin que esto implique carencia nutricional ni desbalance dietético³. O sea, una dieta restringida en calorías, puede ser al mismo tiempo, saludable. En 1935 se publicó el primer estudio en el cual sometiendo a ratas a una RC su esperanza de vida se veía aumentada⁴.

Esto alentó estudios posteriores y así fue que se observó que no solo aumentaba la esperanza de vida sino que también retrasaba el envejecimiento de organismos, desde la levadura hasta los mamíferos⁵. Un estudio realizado con monos Rhesus demostró que al disminuir la cantidad de calorías aumenta la esperanza de vida. Aumenta la longevidad y no solamente esto, sino que retarda la aparición de síndromes y patologías como la diabetes tipo 2, cáncer, atrofia cerebral y enfermedades cardiovasculares^{5,6}. Considerando la cercanía evolutiva existente entre monos y humanos, lo anterior sugiere que los efectos beneficiosos de dietas disminuidas en calorías también podrían ocurrir en seres humanos⁶. Por lo tanto, entender cuáles son los mecanismos moleculares que vinculan la restricción calórica con todos esos parámetros positivos para la salud es de gran interés.

Se han encontrado varias evidencias de que una familia de desacetilasas dependientes de NAD (sirtuinas) juegan un rol importante en el control del metabolismo energético. Entre varias otras evidencias, se ha observado que la restricción calórica en ratones promueve un aumento de la actividad enzimática de la sirtuina SIRT1 en tejidos claves como cerebro e hígado⁷.

1.2 Sirtuinas

Las sirtuinas forman parte de una familia de enzimas muy conservadas en la evolución, presentes en varios dominios, desde levaduras hasta eucariotas superiores⁸. Esta familia presenta su nombre por tener una homología con Sir2 (*Silence information regulator 2*) de *Saccharomyces cerevisiae*⁹.

En mamíferos, se encuentra constituida por 7 miembros. Su localización en la célula varía según el subtipo; SIRT1, SIRT6 y SIRT7 se encuentran en el núcleo, aunque SIRT1 se ha visto que en ciertas condiciones puede también estar localizado en el citosol¹⁰. SIRT6 se localiza en regiones ricas en heterocromatina, mientras que SIRT7 se localiza en el nucléolo¹¹. SIRT3, SIRT4 y SIRT5 son mitocondriales mientras que SIRT2 es citosólica.

Desde el punto de vista estructural todas ellas presentan un núcleo catalítico altamente conservado (dominio sirtuina), mientras que las regiones N y C-terminal son variables¹².

Si bien pertenecen a la misma familia, no todas las sirtuinas poseen la misma actividad enzimática. SIRT1, cataliza la hidrólisis de un enlace amida transfiriendo un grupo acetilo presente en el sustrato (proteína acetilada), a la ribosa del NAD⁺ a expensas de la hidrólisis de un enlace glucosídico. La nicotidamida (NAM), la O-acetil-ADP-ribosa y la lisina desacetilada son los productos de esta reacción^{13,14}. Esta reacción se detalla en la figura 1

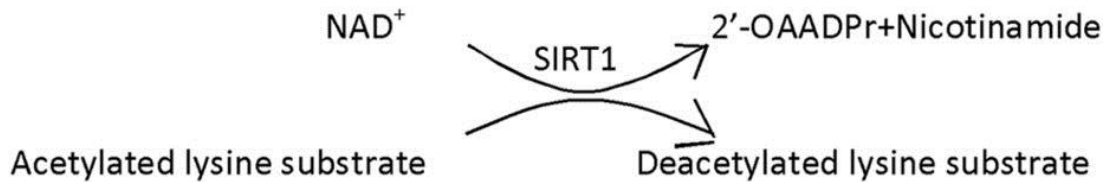


Figura 1. Actividad catalítica de SIRT1. Tomado de Yunan Sun. et. al, 2016

A través de la desacetilación de histonas, ésta sirtuina, es capaz de regular la actividad de varios factores de transcripción, por ejemplo la activación PGC-1 α (metabolismo calórico)¹⁵, el silenciamiento de proteínas Ku 70 y p53 (pro apoptoticos)^{16,17}, factores de transcripción forkhead y NFkB (pro oncogénicos, pro inflamatorios)^{18,19}, MyoD (proteína de diferenciación celular)²⁰.

1.2.1 SIRT1

SIRT1 humana (hSIRT1) es la isoforma mas estudiada y como hemos mencionado previamente se encuentra muy involucrada con varios procesos metabólicos. Se compone de 747 aminoácidos que forman el dominio catalítico, y las regiones de los extremos N y C-terminal²¹.

1.2.1.1 Estructura de SIRT1

El dominio catalítico es la región que se encuentra más conservada en todas las sirtuinas y está conformada por dos dominios globulares: uno pequeño que a su vez presenta dos módulos y un dominio grande²². Este último presenta el plegamiento de Rossman, un plegamiento clásico de unión de di nucleótidos de pirimidina que posee una hoja beta formada por seis cadenas beta paralelas y varias hélices alfa²³. El dominio pequeño contiene un sitio de unión al Zinc, a pesar de que este no participa en el mecanismo catalítico de las sirtuinas, su presencia es esencial para que la enzima funcione correctamente (figura 2)^{24,25}. Ambos dominios se encuentran unidos por varios “*loops*” que se pliegan formando un surco profundo al que ingresan por un lado los aminoácidos y por el otro la molécula de NAD⁺²⁶. Tanto la región N-terminal como C-terminal sufren modificaciones que modulan su actividad enzimática. Se observó para la sirtuina de levadura Hst2 que estas regiones interaccionan intermolecularmente para formar trímeros²⁷. La estructura cristalográfica de SIRT1 aún no se ha definido, pero existen modelados aproximados, tal como muestra la figura 2.

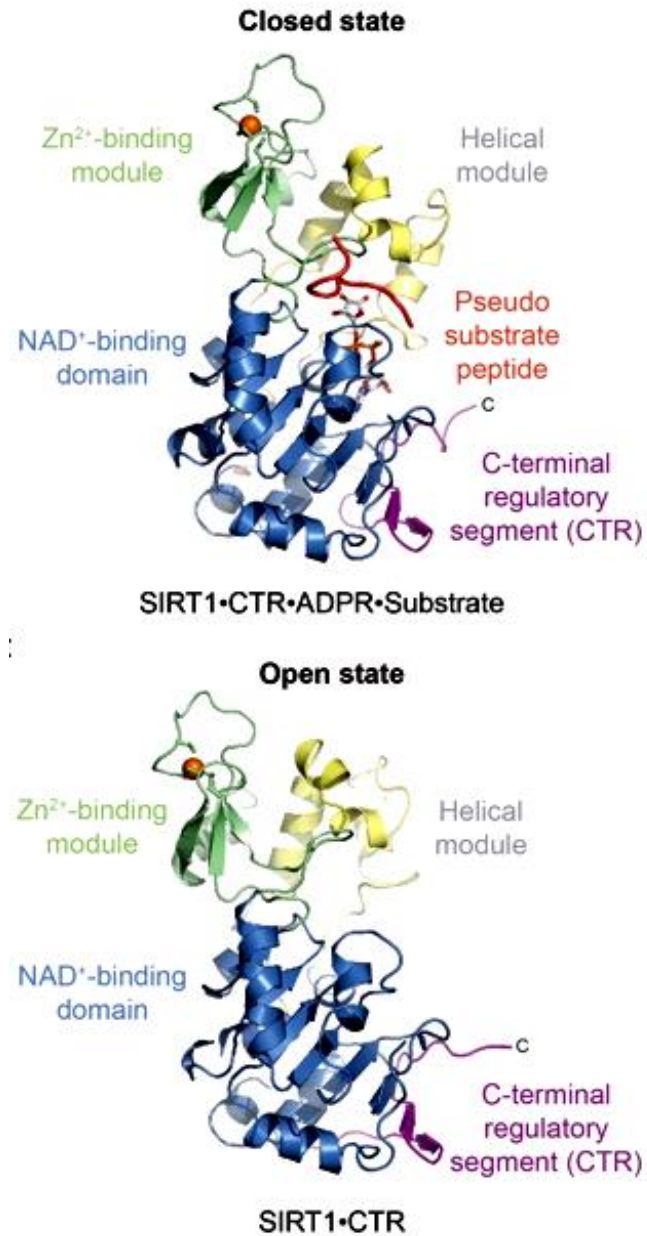


Figura 2. Estructura propuesta para hSIRT. Esta estructura fue obtenida considerando el complejo con su segmento regulador en C-terminal (CTR). Se observa la representación en cinta. (A) Estructura de SIRT1-CTR-ADPR-Sustrato en su estado abierto. (B) Estado cerrado, SIRT1-CTR. Modificado de Davenport, A. et. al, 2014

1.2.1.2 Funciones de SIRT1

SIRT1 posee un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo energético, tanto a nivel celular como a nivel sistémico. Se ha observado que SIRT1 modula el metabolismo hepático de los lípidos, la glicolisis, la gluconeogénesis, la secreción de la insulina y la acumulación de grasa en el tejido adiposo^{15,28,29,30,31,32,33,34,35}. Todas estas funciones se detallan en la figura 3.

El primer efecto metabólico descrito para SIRT1 fue en el tejido adiposo blanco en el cual se observó su capacidad para promover la movilización de grasa en condiciones de ayuno³⁶.

En el páncreas se observó una gran expresión de SIRT1 en las células β ³⁷. Experimentos realizados en ratones transgénicos, que sobreexpresan SIRT1 en las células β del páncreas, demuestran que estos animales presentan mayor tolerancia a la glucosa y que aumentan la secreción de insulina en respuesta a un aumento de glucosa, mediante la supresión de la transcripción de UCP2^{38,35}. Por otro lado, en las líneas celulares β del páncreas, en las cuales disminuye la expresión de SIRT1 mediante siARN

(pequeños ARN de interferencia), se observa una disminución de la secreción de insulina en respuesta a un aumento de la glucosa³⁷. Asimismo, durante el estrés oxidativo, promueve la supervivencia de las células beta mediante la interacción con FOXO³⁹.

Por otro lado en el hígado, se han descubierto diversas funciones controladas por SIRT1. El primer reporte mostró que en periodos de ayuno prolongado SIRT1 desacetila al factor de transcripción PGC1 α e induce la expresión de genes codificantes para enzimas gluconeogénicas, mientras que reduce la expresión del gen de la enzima glicolítica glucocinasa (GK)¹⁵.

Se ha visto también que SIRT1 media algunos de los efectos de la RC. Por ejemplo, SIRT1 retrasa algunas características del envejecimiento y protege contra la esteatosis en el hígado, diabetes tipo 2 y el cáncer^{40,41,42,43,44}.

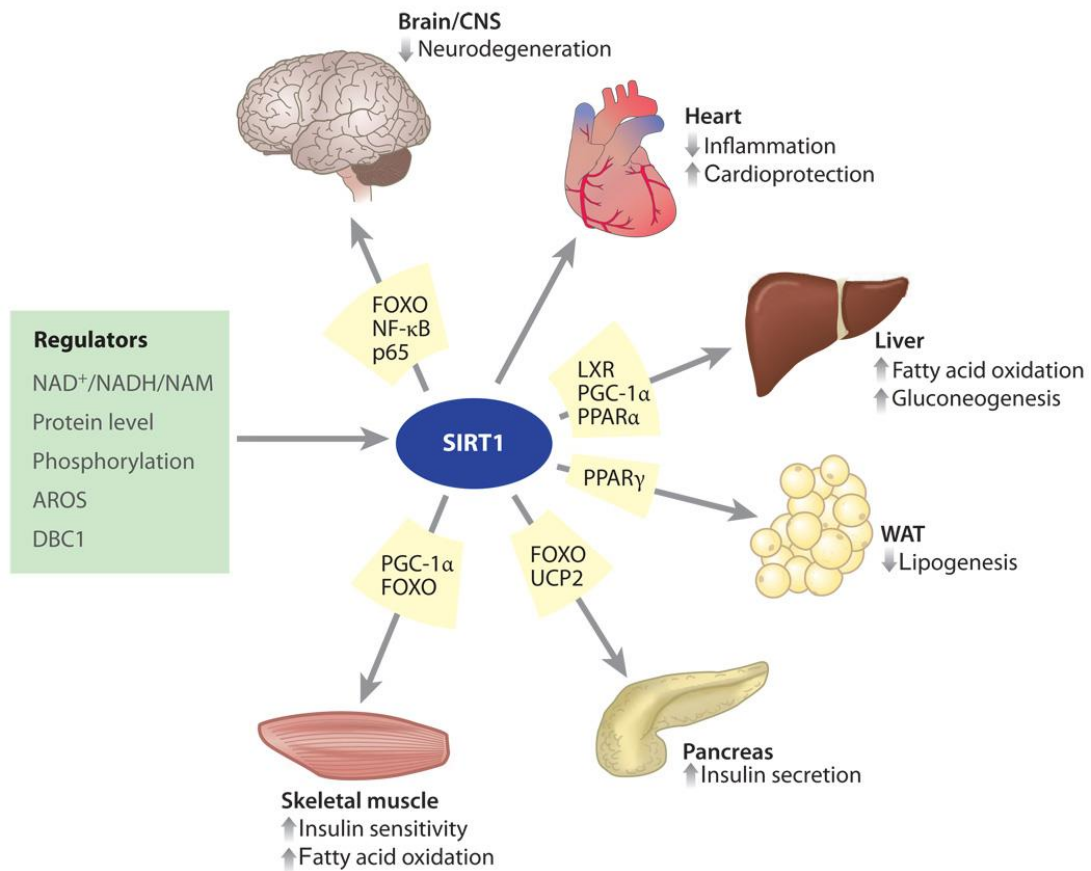


Figura 3. Actividad de SIRT1 sobre los distintos tejidos y órganos. Aquí se observan los distintos tipos de reguladores y los efectos que posee la disminución o aumento de la actividad de SIRT1 a nivel metabolismo y fisiológico. Tomado de Haigis, M. C. et. al, 2010

1.2.1.3 Reguladores de SIRT1

Tal vez debido a lo complejo y variado de los efectos que tiene sobre el metabolismo celular, la función de SIRT1 es regulada a varios niveles,

transcripcional, postranscripcional, postraduccion y mediante interacciones con proteínas regulatorias.

Respecto a la regulación postraduccion, se han identificado al menos dos reguladores: AROS (*Active regulator of SIRT1*) como regulador positivo, quien se une a la región N-terminal de SIRT1⁴⁵. Un regulador negativo bien caracterizado es DBC-1 (*Deleted in Breast Cancer 1*) el cual se une al núcleo catalítico de la sirtuina por un motivo cierre de leucinas^{46,47}. Se trata de la regulación negativa más importante que se ha descrito hasta ahora y constituye un hallazgo importante debido a su potencial impacto sobre varias rutas metabólicas dependientes de SIRT1. Experimentos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos nucleares aisladas de hígado revelaron que más del 50% de SIRT1 se encuentra unido a DBC1 en condiciones basales²⁸.

1.3. DBC1

Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1), o también llamada CCAR2, es una proteína nuclear ubicua⁴⁸. El gen codificante para esta proteína se encuentra en una región del cromosoma 8p21 en humanos, el cual fue descubierto por ser eliminado en el cáncer de mama de manera homocigota⁴⁹. La nomenclatura utilizada para designar a esta proteína puede confundirse con otra proteína, que también recibe la misma abreviatura, esta es llamada

Deleted in Bladder Cancer-1 (DBC1).

DBC1 ha recibido muchas abreviaturas como KIAA1967, P30DBC1, entre otros, pero ninguno refleja las características y funciones de esta, por lo tanto, en este trabajo utilizaremos la abreviatura DBC1 para referirnos a esta proteína.

Es posible que DBC1 se encuentre implicada en la regulación del metabolismo celular en el cáncer, pero hasta la fecha aún no está del todo claro^{50,51,52}. Incluso, algunos estudios recientes observaron la sobreexpresión de DBC1 en los tejidos tumorales de cáncer de mama, esófago, páncreas, gástrico, entre otros^{48,53,54,55,56}.

A pesar de ser una proteína nuclear, se ha demostrado que también puede encontrarse en el citosol. Esto fue visto, por ejemplo, en la apoptosis celular mediada por TNF- α ⁵⁰.

1.3.1 Estructura de DBC1

La proteína CCAR1 (regulador del ciclo y la apoptosis celular 1) es un parólogo de DBC1, ubicado en el cromosoma humano 10q22.1⁵⁷. Ambas proteínas poseen preferentemente localización nuclear y estudios comparativos de la estructura de estas ha conducido al descubrimiento de

varios dominios importantes de DBC1⁴⁹. Tanto DBC1 como CCAR1 comparten el dominio NL, el dominio Nudix, el dominio de unión a ARN, el dominio importante para la interacción con proteínas y el dominio N-terminal (LZ).

Desde el punto de vista estructural DBC1 entonces está compuesto por varios dominios, tal como muestra la figura 4. El extremo N-terminal se encuentra compuesto por un motivo de cierre de leucina (LZ), y es responsable de la interacción con receptores nucleares y enzimas⁵⁸. LZ es crítico para la unión con HDAC3, y para la interacción con SIRT1^{58,59}. Se observó que este se encuentra implicado en la unión a los dominios catalíticos de SUV39H1 quien curiosamente también interactúa con SIRT1⁶⁰. La región *S1-like* (ARN-binding) también forma parte de este dominio y es consistente con el papel de DBC1 en el procesamiento del ARN^{49,61}. Aunque se sabe que este dominio posee una función en el *spliceosoma*, aún no se ha estudiado. En particular, los primeros 240 aminoácidos de DBC1 son responsables de la unión con SUV39H1^{53,28,58,62,59}. El dominio C-terminal se cree que es importante para la interacción con otras proteínas, tal es el ejemplo de Rev-erba, un regulador del ciclo circadiano. A pesar de que la interacción DBC1-Rev-erba sea dependiente del dominio C-terminal se necesita de la región N-terminal para su función y estabilización adecuada⁶³. DBC1 también contiene un dominio Nudix hidrolasa. Estos dominios tienen

una función ambigua, algunas de estas, se encargan de la degradación de varios nucleótidos como ADP-ribosa o Ap4A (tetrafosfato diadenosina). Sin embargo este dominio en DBC1 es probable que sea catalíticamente inactivo⁴⁹. Se observó que un dominio Nudix similar, no funcional, desempeña un papel en la regulación en los canales de calcio por ADP-ribosa. Pero hasta el momento no se ha estudiado si este dominio en DBC1 cumple un papel similar⁴⁷. Los diferentes dominios le permiten a DBC1 interactuar con múltiples componentes al mismo tiempo.

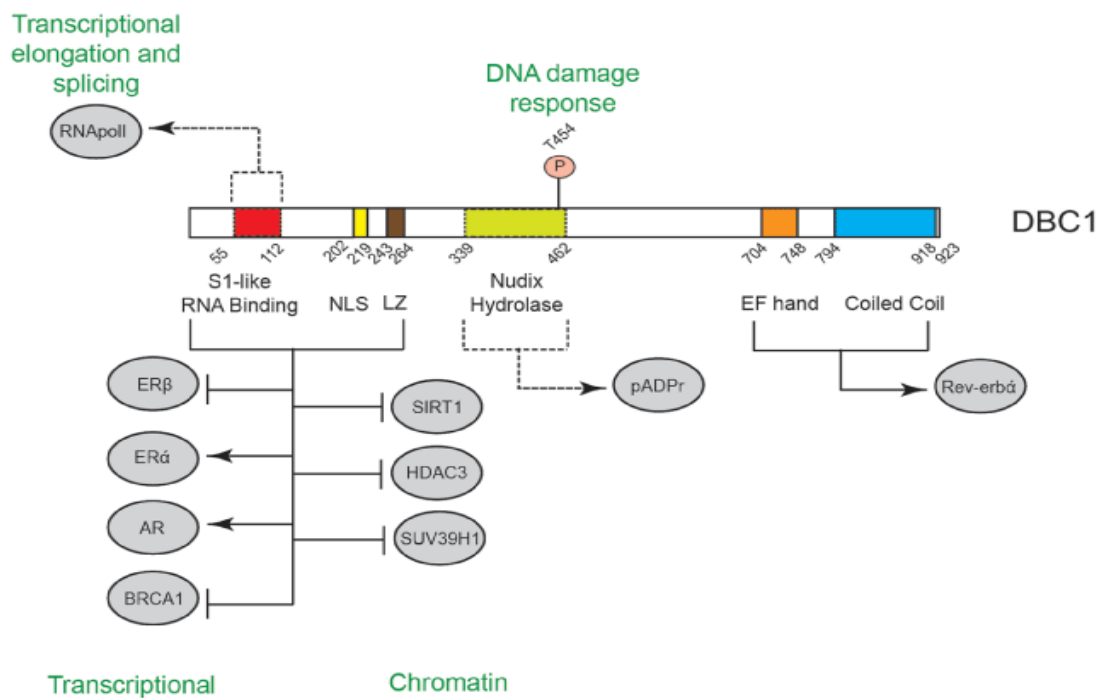


Figura 4. Estructura de DBC1. Las regiones se indican como: Cremallera de leucina (LZ, marrón), señal de localización celular (NLS, amarillo), EF mano (naranja), dominio c-terminal (celeste). La región S1 marcada en rojo corresponde con el dominio de unión a ARN y el dominio Nudix hidrolasa se ve representada en verde. Tomada de Joshi, P. et. al, 2013

1.3.2 Interacciones de DBC1

Se ha identificado también que DBC1 posee muchas interacciones proteína-proteína, gracias a lo cual podría regular varios procesos celulares diferentes. Se la conoce como una proteína de unión a receptores nucleares ya que interactúa con ER (receptor de estrógenos), AR (receptor de andrógenos)^{64,65}, con el receptor Rev-erb, SIRT1, HDAC3 y con Suv39H1⁵⁹. Estas interacciones son posibles ya que en su estructura DBC1 posee múltiples dominios, y al unirse a estos receptores logran modular o estabilizar la transcripción de estos. El efecto de DBC1 es diferente dependiendo con que receptor interactúe.

DBC1 es un regulador de varias moléculas y vías que han sido involucrados en la patogénesis del cáncer, la apoptosis, la función de receptor nuclear, el metabolismo celular, el ciclo circadiano y la epigenética^{28,66,58,46,67,68,65,69}.

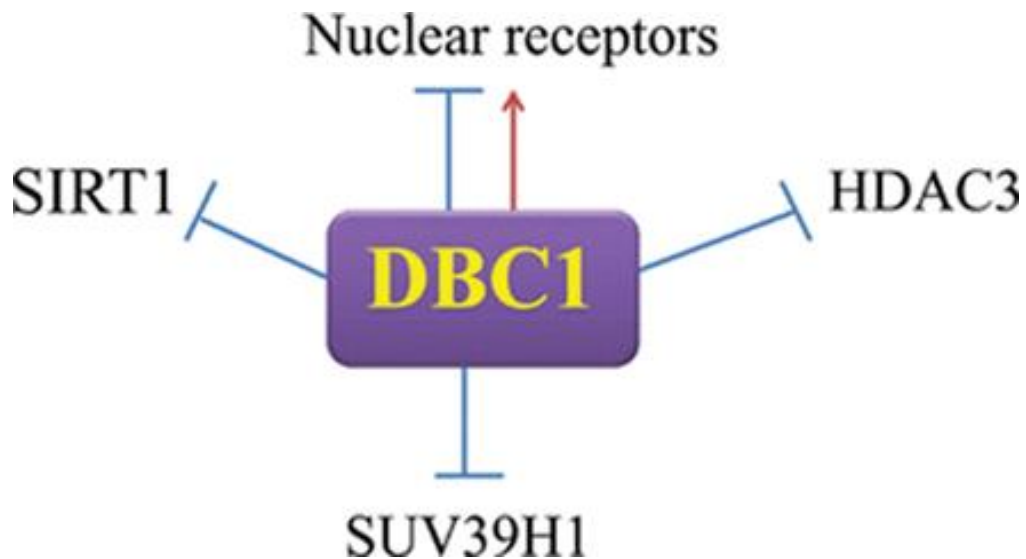


Figura 5. Reguladores epigenéticos de DBC1 e interacción con receptores nucleares. DBC1 se une y regula la función de varias proteínas nucleares y modificadores epigenéticos como HDAC3, SIRT1 y la metiltransferasa SUV39H1. Tomada de Amy M. et. al, 2007

La interacción de DBC1 con todas las moléculas previamente mencionadas parece ser de manera directa en la mayoría de los casos; es decir que no requiere de adaptadores. Se sabe que esto es así, ya que se ha estudiado su interacción tanto *in vivo* como mediante la expresión y el uso *in vitro* de proteínas recombinantes. Por ejemplo, DBC1 puede unirse de manera directa al sitio catalítico de las enzimas, como SIRT1, provocando así una inhibición de su actividad^{28,58,62,59}. La región encargada de la mayoría de las interacciones de DBC1 es la N-terminal.

Como hemos mencionado, DBC1 es un regulador de los receptores nucleares como ER, Er β , AR, RAR (receptor del ácido retinoico) y de Rev-erba^{69,65,64,70,71,63}. Al unirse a estos receptores, DBC1 regula su actividad y/o estabilidad. El efecto de DBC1 es distinto dependiendo con que receptor interacciona, pero en general se ha visto que suele funcionar como un co-activador⁷¹. Se ha observado además, que DBC1 también interacciona con CCAR1, el cual es un importante co-activador para varios receptores nucleares. En conjunto, ambas proteínas potencian la transcripción mediada por el ER, TR (receptor de la hormona tiroidea) y GR (receptor de glucocorticoides)⁷¹.

La unión de DBC1 a AR es dependiente de ligando, e involucra a la región N-terminal⁶⁵. Por otro lado, la unión a ER no depende solamente de ligando, ya que se ha encontrado que la interacción se genera tanto en presencia como en ausencia de ligando⁷¹. ER-DBC1 también involucra la región N-terminal. Por otro lado, la unión de AR a DBC1 no afecta de manera significativa a la estabilidad de AR, pero la unión a ER genera controversias^{65,70,71}.

La unión de DBC1 a RAR se requiere para su actividad transcripcional⁶⁹.

DBC1 también interactúa con Rev-erba, un receptor que coordina la regulación del ciclo circadiano del metabolismo celular y de los “genes reloj”^{72,73,74,75,76}. A diferencia de los demás, su interacción involucra al

dominio C-terminal, pero depende de la N-terminal para su estabilización, tal como describimos anteriormente⁶³. Se ha observado que la pérdida de este receptor conlleva a la desregulación del ciclo circadiano^{77,78,79}.

Al ser DBC1 un inhibidor endógeno de SIRT1, HDAC3 y de la metiltransferasa SUV39H1, parece claro que esta proteína tendría un rol fisiológico fundamental en la función metabólica y como modulador epigenético. Un ejemplo de esto, es la modulación indirecta de la actividad de p53 a través de la regulación negativa de SIRT1; la unión de DBC1 al sitio catalítico de SIRT1, bloquea su actividad y promueve vías de apoptosis a través de la consecuente hiperacetilación de p53^{58,46}.

SIRT1-DBC1 forman un complejo dinámico, tanto *in vivo* como *in vitro*, que se encuentra regulado por el estado energético del organismo y por varias vías de señalización^{28,80,81,82,83,84,85}. Se ha visto también que esta interacción puede ser regulada por la respuesta al daño del ADN^{83,84}. El sitio catalítico de SIRT1 interacciona con el dominio LZ de DBC1^{28,58}. En particular se ha visto que una región de 25 aminoácidos que se encuentra en el extremo C-terminal de SIRT1, denominado ESA (esencial para la actividad de SIRT1) es la que interacciona con la región LZ de DBC1. Se ha demostrado que el mecanismo por el cual DBC1 inhibe a SIRT1 viene dado por el

desplazamiento de una interacción intramolecular necesaria para la actividad de SIRT1⁴⁷.

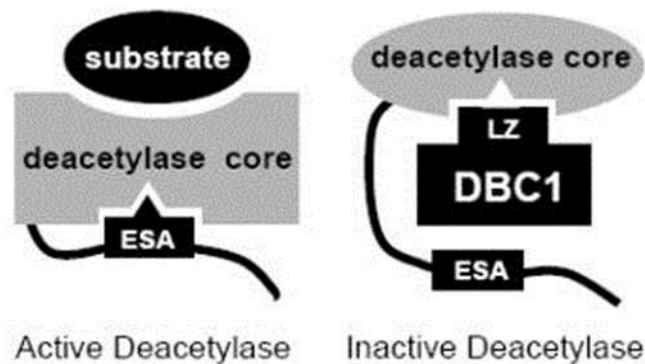


Figura 6. Mecanismo propuesto de la inhibición de SIRT1 por DBC1 involucrando la región ESA (*Essential for SIRT1 activity*). Modificado de Kang, H. *et. al*, 2015.

Experimentos demostraron que frente a un balance energético negativo, la actividad de SIRT1 se ve aumentada, provocado por una disminución de su interacción con DBC1. Consistentemente, se observó una reducción de la actividad de SIRT1 en dietas altas en calorías, correlacionado con un aumento en la interacción proteína-proteína²⁸. Por ejemplo, en la restricción calórica se ha visto que la disociación del complejo en respuesta a un aumento de la actividad de PKA y la concentración de AMPc, promueve la actividad de SIRT1; la cascada de eventos se observa en la figura 7^{80,83}.

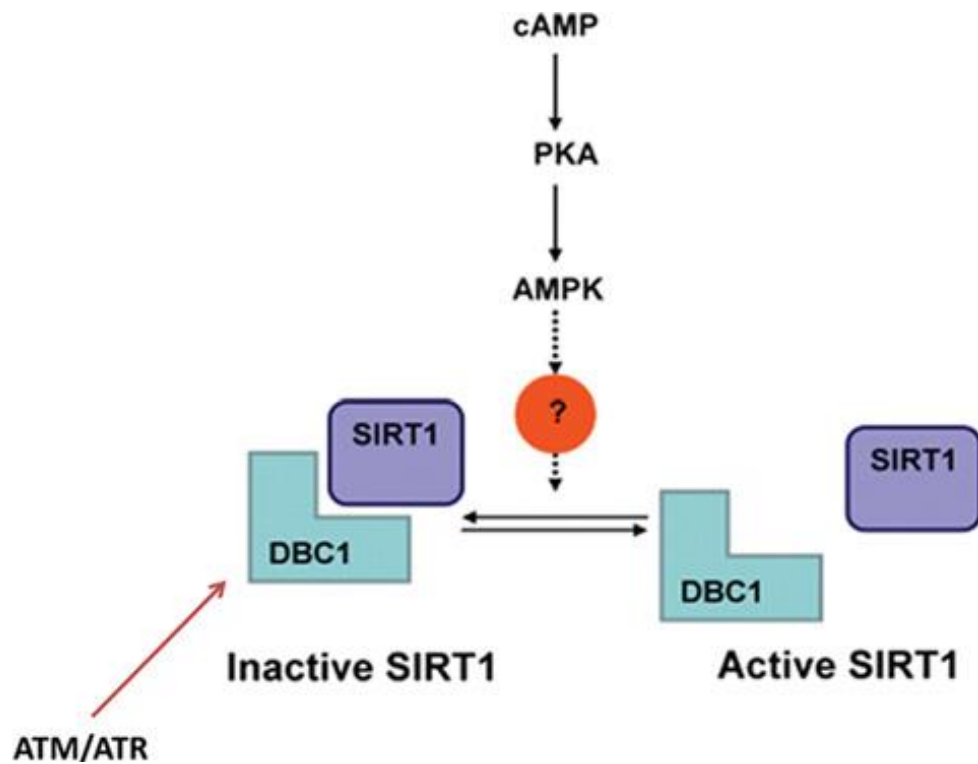


Figura 7. Regulación de DBC1-SIRT1 mediado por AMPc-PKA. Tomado de Nin, V. et al, 2012

En el mecanismo propuesto en la figura 7, observamos que hasta la fecha se han descrito dos formas de disociar el complejo SIRT1-DBC1. Por un lado, la mencionada previamente y por otro que DBC1 es fosforilada en la treonina 454 por las quinasas ATM/ATR. Esta fosforilación desfavorece la interacción con SIRT1, provocando su inhibición. De esta forma, la interacción SIRT1-DBC1 impide que se desencadene la apoptosis^{58,84}. Estudios en ratones *Knockout* para *Dbc1*, apoyan esta hipótesis. La supresión de DBC1

conduce a la activación de SIRT1 y con ello la disminución de algunos los efectos producidos por las dietas con alto contenido en grasas como esteatosis hepática y la inflamación²⁹.

Se han observados los efectos de DBC1 en la lipogénesis y la β -oxidación. La AMPK fosforila e inactiva a ACC (Acetil-coA carboxilasa), provocando una disminución consecuente en el Malonil-coA. Al disminuir, aumenta los niveles de la β -oxidación hepática y disminución de la lipogénesis^{28,80}.

Estos ratones, KO para DBC1, también experimentan ser intolerantes a la glucosa a medida que envejecen, pero aun el mecanismo por el cual sucede esto no se conoce⁶⁶.

Aunque se ha puesto mucho hincapié en la regulación de SIRT1 por DBC1, como ya se ha mencionado, ésta también regula a otras histonas como SUV39H1 y HDAC3.

SUV39H1 es una metiltransferasa de histonas con un rol importante en la formación de la heterocromatina, regulación de la expresión génica y en la inducción de la senescencia en células premalignas. Como mencionamos previamente, esta molécula también forma un complejo con SIRT1. Por esta razón, DBC1 podría actuar como un regulador importante en la formación de la heterocromatina y estabilidad genómica al interrumpir la interacción SUV39H1-SIRT1. DBC1 se une al dominio catalítico de SUV39H1 por su extremo N-terminal inhibiendo la metilación de histonas⁵⁹.

HDAC3 es una desacetilasa ubicua que comparte algunos sustratos con SIRT1. Entre estos encontramos p53, MEF2D (factor potenciador específico de miocito 2D) y NF-κB (factor nuclear κB). A diferencia de otras histonas de la familia que suelen ser de localización nuclear, como lo son HDAC1 y HDAC2, esta histona puede encontrarse tanto en el núcleo como en el citoplasma. Al igual que SIRT1 se encuentra implicada en procesos como la apoptosis, ciclo circadiano, el control de la glicemia, metabolismo de lípidos, entre otros^{73,76,86,87,88}. DBC1 se une a la desacetilasa de histonas HDAC3 en el dominio N-terminal, principalmente al LZ, inhibiendo su función^{28,66,58,62}. En ausencia de DBC1, la actividad de HDAC3 se ve incrementada⁶².

Estos datos tomados en conjunto indican que DBC1 regula múltiples componentes de la maquinaria epigenética. Dilucidar cuál es rol preciso que tiene DBC1 en epigenética, regulación del metabolismo, envejecimiento y Cáncer podría ser una herramienta importante para la biología celular.

1.3.3 Funciones de DBC1

Las funciones más conocidas son las estudiadas debido a su interacción con la sirtuina SIRT1, como hemos mencionado previamente, una disociación del complejo SIRT1-DBC1, o incluso en animales KO para *Dbc1* presentan aspectos aparentemente beneficiosos para el metabolismo energético.

Su función mejor caracterizada es en el hígado, donde se observó que DBC1 posee un papel crítico en la patogenia de la esteatosis y la inflamación hepática. Como hemos mencionado, la actividad de SIRT1 se veía aumentada en condiciones de balance energético negativo (disminución de la interacción SIRT1-DBC1) y disminuida en animales alimentados con la dieta alta en calorías. Se ha demostrado que ratones KO *Dbc1* se encuentran protegidos contra el desarrollo de la esteatosis inducida por estas dietas, y con ello una disminución de la inflamación²⁸.

Los ratones KO para DBC1 poseen una disminución de las citoquinas involucrada en la inflamación, tal es el ejemplo de IL-6 y TNF-alfa. Una disminución de TNF-alfa provoca una baja de la activación de NF-kappa B. Por lo siguiente, la inhibición de la actividad de SIRT1 por DBC1 juega un rol importante en la respuesta inflamatoria desencadenada durante el desarrollo de la enfermedad del hígado graso⁸⁹.

Por otro lado, se ha visto que DBC1 participa en la regulación de la supervivencia y muerte celular en respuesta a diversos estímulos. En particular se ha estudiado que DBC1 promueve la apoptosis en aquellas células que han sufrido daño en el ADN a través de la inhibición de la enzima SIRT1 desacetilasa. La apoptosis es un proceso fisiológico fundamental para el desarrollo, la homeostasis y para la defensa contra patógenos^{90,91,92} por lo que la actividad de DBC1 es esencial en el mantenimiento de la actividad genómica y de la integridad celular en células que se encuentran en estrés genotóxico inducido por radiaciones UV^{67,46}.

El dominio N-terminal de la proteína DBC1, como hemos descrito, es una región involucrada en el procesamiento del ARN por corte y empalme⁴⁹. Al interactuar DBC1, con la proteína ZNF326, forman el complejo DBC1-ZNF326, también llamado DBIRD. Este afecta el *splicing* y *splicing* alternativo⁶¹. Es posible que este dominio entonces juegue un rol importante en el *spliceosoma*, aunque cuál es su función puntual aún no se ha estudiado.

1.3.4 Importancia de DBC1 en la fisiología del Sistema Nervioso

Si bien no existe evidencia directa que vincule a DBC1 con la fisiología del Sistema Nervioso Central, su potencial importancia puede sospecharse a

partir de lo que se conoce sobre SIRT1. Existe abundante literatura demostrando una relación directa o indirecta entre la actividad SIRT1 y ciertos procesos, tanto fisiológicos, pero sobretodo patológicos en Sistema Nervioso Central⁹³.

Dentro del espectro fisiológico, se ha observado que SIRT1 modula la ansiedad y la respuesta exploratoria en ratones, a través de la regulación de la expresión de la Mono Amino Oxidasa-A, un factor importante de la regulación de serotonina circulante y de función neurotransmisora. Así, se ha vinculado a SIRT1 con la regulación de aspectos comportamentales tales como la búsqueda y la ingesta de alimentos⁹⁴.

Estudios en ratones han demostrado que SIRT1 se encuentra involucrada en el aprendizaje y la memoria; se ha observado que la ausencia de SIRT1 deteriora las capacidades cognitivas, el aprendizaje espacial y la memoria inmediata. Se encontró que los déficit cognitivos en ratones KO para SIRT1 se asociaban con defectos en las plasticidad sináptica^{95,96}.

Más relacionado con la neuropatología, se ha reportado que la activación farmacológica o la sobre expresión de SIRT1 modifica el curso de patologías específicas en diversos modelos de Alzheimer, Enfermedad Lateral

Amiotrófica, Huntington, Parkinson y Esclerosis Múltiple^{97,93}. En efecto, cuando SIRT1 desacetila e inhibe NFκB a nivel de microgila o a la quinasa RhO en neuronas, protege contra la toxicidad producida por el péptido β-amiloide, responsable del desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer. La capacidad que tiene SIRT1 para inducir la biogénesis mitocondrial a través de PGC1alfa o modulando la actividad de p53 han sido asociadas al efecto positivo observado en varios modelos in vitro o animales de la Enfermedad de Parkinson, Enfermedad Lateral Amiotrófica o Alzheimer^{98,99,100}.

Por último, se ha sugerido que SIRT1 retrasa la degeneración Walleriana in Vitro en cultivos primarios de neuronas sensoriales de ratón¹⁰¹. Consistente con esto, y con la línea que hemos planteado, también se ha observado una participación de DBC1 durante la degeneración Walleriana en axones del Sistema Nervioso Periférico del ratón¹⁰².

En función de lo anterior, planteamos la hipótesis según la cual la proteína DBC1 probablemente tenga un papel relevante en la fisiología del Sistema Nervioso, el cual se justifica explorar. En ese contexto y como primera etapa, se ha planteado en el marco de la realización de esta pasantía una caracterización de la expresión de la proteína DBC1 en el Sistema Nervioso Central (particularmente cerebelo, hipocampo y corteza frontal). Como parte

de esa caracterización, nos propusimos estudiar si existen variaciones en su expresión entre regiones y a través de diversas etapas del desarrollo posnatal.

2. OBJETIVO

2.1 *Objetivo general*

Conocer la importancia biológica de la proteína DBC1 en el Sistema Nervioso.

2.2 *Objetivos específicos*

- a) Estudiar la expresión de la proteína DBC1 en el cerebro de ratón, en diferentes etapas del desarrollo post natal.
- b) Estudiar la distribución de DBC1 en diferentes regiones del encéfalo del ratón.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 *Materiales*

Buffers y soluciones

- **PBS 1x:** 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.46mM KH₂PO₄ pH=7,4
Buffer citrato: 0,01M, pH=6
- **Buffer de bloqueo para inmunohistoquímica:** PBS 1x, 50mM Lisina monohidroclorada, 0,05% suero fetal bovino.
- **Buffer de lavado:** PBS 1x, 0,05% tritón
- **Buffer de homogeneización:** NET-N (10 mM NaCl, 1mM EDTA, 20mM Tris, 0,5% Nonidet)
- **Reactivo de Bradford para cuantificación de proteínas:** Azul brillante de *Coomassie* G250 (0.05% w/v), Ethanol 25 % (v/v), Ácido fosfórico 42.5 % (v/v).
- **Buffer de muestra (Laemmli) 1x:** 0,0625 TRIS pH=6.8, 2% p/v SDS, 0,002% p/v azul bromofenol, 5% v/v β-2 mercaptoetanol, 10% glicerol.
- **Buffer de transferencia (*Western Blot*):** 25mM tris, 192mM glicina, 10% v/v etanol, H₂O suficiente para un litro.
- **Buffer de corrida para electroforesis 1x:** 25mM TRIS pH=8. 250mM glicina, 0,1% SDS
- **Buffer TBS-T:** 1,5M NaCl, 200mM tris, 0,5% tween 20, pH7,4
- **Marcadores de peso molecular para proteínas:** 116 kDa, 60 kDa .
- **Animales utilizados:** Ratones (cepa C57/BL6), de una semana, 8 semanas y 1 año de edad.

Anticuerpos (*Western Blot*):

- Anticuerpo anti DBC1: anti-conejo IgG 432 (contra la region N-terminal) 1mg/ml, *Bethyl*. Número de catálogo: A300-432A
- Anticuerpo secundario anti IgG de conejo: IgG-HRP, *Sigma*. Número de catálogo: AP156P
- Anticuerpo anti α -tubulina: monoclonal anti ratón IgG, 0,5mg/ml (*Invitrogen*). Número de catálogo: 32-2500
- Anticuerpo secundario anti IgG de ratón, hecho en cabra 0,5 mg/ml, conjugado a peroxidasa (*Invitrogen*). Número de catálogo: A10551

Anticuerpos (inmunohistoquímica):

- Anticuerpo anti DBC1:anti-conejo IgG 432 (contra la región N-terminal) 1mg/ml, *Bethyl*. Número de catálogo: A300-432A
- Anticuerpo secundario anti IgG de ratón Alexa fluor 488 2mg/ml, *Life Technology*. Número de catálogo: A11001

Otras sondas:

- DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol, *Invitrogen*).

3.2 Métodos

3.2.1 Extracción y disección de las distintas regiones del cerebro:

A ratones de 1 semana, 8 semanas y 1 año se les extrajo el cerebro.

Cada cerebro fue dividido en dos mitades, mediante un corte sagital. A partir de una de las mitades, se extrajeron muestras de hipocampo, corteza y cerebelo para posterior análisis de proteínas por SDS-PAGE y *Western Blot*, mientras que la otra mitad se procesó para inmunohistoquímica. La región para inmunohistoquímica fue fijada en paraformaldehído 4% en PBS, pH=7,4 *overnight* y luego fue crioprotegida en sacarosa y conservada a 4 °C hasta su inclusión.

3.2.2 Extracción de proteínas de hipocampo, corteza y cerebelo:

En un comienzo se resuspende la muestra (tejido) en 0,5 ml de buffer de homogeneización. La muestra es homogenizada a 4°C utilizando un homogeneizador vidrio- vidrio. Luego se procede a realizar una centrifugación a 10.000 rpm durante 4 minutos a 4°C con el objetivo de obtener una fracción de proteínas solubles. Del sobrenadante obtenido, se conserva una fracción destinada a determinar la concentración de proteínas totales presentes, mientras que el resto del sobrenadante es tratado con buffer de muestra para electroforesis y congeladas hasta su uso.

3.2.3 Cuantificación de concentración de proteínas presente en las muestras (método de Bradford):

El método de Bradford se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue, a las proteínas para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente

de extinción mayor que el del colorante libre. Este método es sensible simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación.

En un tubo eppendorff se coloca 1µl de muestra (Sobrenadante extraído previamente) con 1ml de reactivo de Bradford. El blanco para la cuantificación se realiza colocando 1 µl del buffer en que se resuspendió la muestra (NET-N). Se procede a la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda. Luego se determina la concentración de la proteína utilizando la curva de calibración obtenida con parámetros (ordenada en el origen y coeficiente de regresión), conocidos.

3.2.4 Curva de calibración

En distintos tubos se colocan distintas concentraciones de albumina bovina en solución acuosa en cantidad tal que queden a una concentración final de 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mg/ml. Luego a cada grupo se le agrega 1ml de reactivo Bradford y se mezcla. Se procede a medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 595nm de longitud de onda. Una vez obtenidos los valores, se grafica Absorbancia vs mg de proteína. La función es ajustada a una recta, y en base a los parámetros de la función, se estiman las concentraciones de la muestra.

3.2.5 *Western Blot* e identificación de las proteínas DBC1 y alfa-Tubulina

Esta técnica permite la detección de proteínas específicas presentes en una muestra. La especificidad de este método se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único (anti α -tubulina) o varios epitopes de una región específica (anti DBC1). Con esta técnica es posible estimar la presencia de la proteína y cuantificarla.

Las muestras congeladas son calentadas durante 5 minutos a 95°C y luego se cargan en un gel de SDS- poliacrilamida al 10%. Los volúmenes de muestra aplicados en el gel son calculados con el fin de sembrar cantidades equivalentes de proteína total, para cada muestra. Como estos experimentos están primariamente dirigidos a estudiar las posibles variaciones de la expresión de DBC1 a lo largo del desarrollo, sembramos en cada gel y por triplicado, muestras extraídas de la misma región del cerebro de animales de diferentes edades. La electroforesis se lleva a cabo durante 30 minutos a 60mA, con el buffer de corrida. Luego se procede a la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF durante 1 hora a 350mA. Para asegurarnos que las proteínas se transfirieron correctamente, realizamos una tinción de la membrana con Rojo Ponceau durante 5 minutos o podemos simplemente visualizar el marcador de peso pre teñido en la membrana.

A continuación realizamos el bloqueo de las membranas utilizando el buffer de bloqueo (5% p/v leche en polvo descremada en TBS-T) durante 30 minutos. Luego se remueve el bloqueante y lava la membrana con TBS-T a fin de retirar el exceso de leche en solución. Posteriormente incubamos el anticuerpo primario anti- DBC-1 (concentración 1/1000 en albumina bovina al 2%) "overnight", a 4°.

Al día siguiente retiramos el anticuerpo y realizamos 3 lavados consecutivos de 5 minutos con TBS-T. Luego incubamos con el anticuerpo secundario durante 1 hora. La concentración utilizada fue de 1/20000 en TBS-T. Al terminar, realizamos 3 lavados en las mismas condiciones a fin de retirar el exceso de anticuerpo secundario. El revelado de las membranas, se realizó por quimiolumiscencia y registro sobre placas radiográficas. Para ello se requiere la incubación de la membrana con un sustrato de la enzima peroxidasa, unida al anticuerpo secundario (kit Novex ECL, Invitrogen). La reacción, que está basada en la reacción del luminol con intermediarios de la degradación del peróxido de hidrógeno, genera la emisión de luz, la cual es recogida como una señal de velado en la placa radiográfica.

La detección de la α -tubulina tuvo como objetivo, usar esta proteína como control de carga y al mismo tiempo, poder expresar la cantidad de DBC1 presente en la muestra como una relación DBC1: α -tubulina. Para ello, en primer lugar se procede a quitar de la membrana los anticuerpos primario y

secundario previamente utilizados a fin de evitar que interfieran con la subsiguiente detección de tubulina. Esto se logra incubando la membrana en solución saturada (7 Molar) de Guanidina sódica durante 15 minutos en agitación. Posteriormente, la membrana se lava con agua y queda pronta para la nueva detección. A partir de este momento, se procede de una manera análoga a la descrita (incluyendo la etapa de bloqueo). Se utilizó una dilución de anticuerpo primario 1/1000 en albumina bovina al 2% y una dilución del anticuerpo secundario; 1/4000 en TBS-T.

3.2.6 Análisis de datos – *Western Blot*

Las imágenes obtenidas en las placas radiográficas fueron digitalizadas para luego poder ser cuantificadas por densitometría, utilizando el programa ImageJ (ImageJ, 1.48k, NIH). Así, se calculó la cantidad de cada proteína (DBC1 y α tubulina) presente en cada muestra y los resultados se expresaron como DBC1/ α -tubulina. Es importante tener presente que el valor de DBC1 expresado como una relación, se vuelve independiente de la cantidad de muestra aplicada en cada *lane* del gel, lo cual elimina los inevitables errores de carga o cuantificación de las concentraciones de proteínas presentes en la muestra. Esta aproximación asume necesariamente que para que la cantidad de tubulina es constante entre las diferentes condiciones comparadas (edades). Las variaciones en la cantidad de DBC1 (expresada como DBC1/ α -tubulina)

en cada condición, se analizaron mediante test-t y ANOVA de una vía. Consideramos como significativo un valor de $p \leq 0,05$, con un “n” de 3 por condición. Ambos test nos dieron valores muy similares, por lo que decidimos expresar solamente el test-t para la cuantificación.

3.2.7 Crioprotección de cerebros

La muestra extraída para inmunohistoquímica debe sufrir el proceso de crioprotección para luego poder ser utilizada cortes en criostato. La crioprotección es un proceso realizado para preservar la integridad de los tejidos cuando estos se congelan. Esta manipulación entonces tiene como objetivo, eliminar la mayoría del agua presente en el tejido (la cual es desplazada por la sacarosa), y así evitar la formación de cristales durante su posterior procesamiento.

Las muestras se colocan en sacarosa 15% en PBS utilizando la agitación hasta observar la decantación de las mismas. Esto nos da la pauta de que la sacarosa presente en el medio de crioprotección penetró en el tejido, desplazando al agua y cambiando su densidad. Luego se retira la sacarosa al 15% y se sustituye por sacarosa al 30% en PBS, la cual se incuba el tiempo suficiente hasta lograr el mismo efecto. Luego se procede a incluir la muestra en un medio hidrofílico para criosecciones a base de polivinil alcohol, polietilen-glicol e ingredientes no reactivos; (*TissueTek*). Para eso,

inicialmente se transfiere el tejido a una mezcla sacarosa-medio de inclusión en concentraciones ascendentes de este último (relación sacarosa:medio 3:1 y 2:2) durante 15 minutos y (1:3 y 0:4) durante 30 minutos. A continuación se retira el cerebro de la muestra y se lo coloca en un molde con *Tissue-Tek* y posteriormente se congela a -20°C.

3.2.8 Cortes histológicos de los tejidos

A partir del material congelado se realizan cortes sagitales del tejido (de medial a lateral) utilizando un criostato a -25°C. Las secciones obtenidas tienen un grosor de 20µm. Luego de realizado los cortes se adhieren a portaobjetos previamente tratados con polilisina (sol 1% p/v).

3.2.9 Inmunohistoquímica:

Esta técnica nos permite localizar a DBC1 en los cerebros mediante el empleo de anticuerpos de gran especificidad y afinidad. Para detectar las regiones donde ocurre la reacción antígeno-anticuerpo se utilizan métodos como la fluorescencia. La inmunofluorescencia indirecta utiliza dos tipos de anticuerpos, el primario que reconoce a la proteína DBC1, mientras que el secundario (que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo), reconoce al primario uniéndose a él.

Los cortes realizados en el criostato se calientan a 90°C por 30 minutos en buffer citrato (desenmascaramiento antigénico). Pasado ese tiempo se retira

el buffer y se realiza un lavado por inmersión en buffer de lavado. Se dejan secar los preparados y se procede a delimitar el área del tejido con el “lápiz grasoso” con el fin de realizar la inmunoreacción en una gota de medio.

Posteriormente, incubamos el preparado con buffer de bloqueo durante 30 minutos para bloquear los sitios inespecíficos de unión presentes en el tejido y asegurarnos que efectivamente el anticuerpo se una a la proteína de interés y no a lugares que hayan quedado libres. Luego, se incubaba con el anticuerpo primario (anti DBC1 dilución 1/50 en buffer de bloqueo) *overnight* a 4°C. Los controles son incubados solo con buffer de bloqueo.

Al día siguiente, se retira el anticuerpo y se realizan 3 lavados de 5 minutos con buffer de lavado. A continuación incubamos todos los cortes con el anticuerpo secundario (dilución 1/5000 en buffer de bloqueo), y simultáneamente con 4',6-diamino-2-fenilindol, (DAPI) en concentración 1/1000, durante 1 hora. El DAPI es un marcador fluorescente capaz de intercalarse en el ADN, por lo que se utiliza para poder visualizar la posición de los núcleos neuronales (regiones de interés) en las distintas regiones del encéfalo de nuestros cortes. Pasado ese tiempo, retiramos el anticuerpo secundario y realizamos 3 lavados de 5 minutos en las mismas condiciones que con el anticuerpo primario. Se dejan secar las muestras y se le coloca un medio de inclusión específico para fluorescencia (Pro Long Gold antifade, Invitrogen).

Para terminar, las muestras fueron visualizadas por microscopia confocal utilizando el microscopio confocal del Instituto Clemente Estable. Este microscopio es una herramienta fundamental para el estudio y localización intracelular de señales marcadas con fluorescencia.

El microscopio laser confocal (Olympus, BX61, con un módulo confocal FV300), contiene varios filtros dicroicos. De acuerdo a los fluoroforos utilizados, utilizamos el U-MWIBA2 Excitación: 460-495nm Emisión: 510-550nm. (Alexa flúor 488). Se utilizaron 2 láseres de excitación, Kr 488nm y Diodo 405nm.

El microscopio es controlado por el *software Olympus Fluoview*, que permite además la obtención y procesamiento de las imágenes. Las imágenes fueron obtenidas en dos canales independientes (uno para alexa 488 y otro para DAPI), con un objetivo de 60x (de inmersión), con una apertura numérica de 1:35 y prestando especial cuidado en mantener constantes los parámetros de la adquisición de la imagen (intensidad del láser, ganancia y siempre la misma magnificación) entre las diferentes condiciones experimentales. El PMT (fotomultiplicador) fue de 600v para el verde (alexa 488), y 620v para el azul (DAPI). Las imágenes fueron obtenidas utilizando dos o tres campos por condición, considerando que cada uno posee más de 20 núcleos. La cantidad de animales utilizados fue diferente. Para los animales de 1 semana

y 8 semanas, el número de hipocampos y corteza utilizados fue de 4 (n=4), mientras que para el cerebelo el n=3. Para los animales de 1 año, en cambio, el n utilizado fue de 3 en todas las regiones.

3.2.10 Análisis de datos - Inmunohistoquímica

Las imágenes obtenidas a partir del software *Fluoview*, fueron analizadas con el programa *Imagej*. Para ello se utilizó la herramienta especial que posee este programa para evaluar imágenes. En las imágenes obtenidas en el canal del DAPI, se seleccionaron entre 20 y 50 núcleos al azar por campo, intentando elegir siempre núcleos del mismo tamaño. Cada núcleo representa una Región de Interés (ROI), pudiéndose exportar estas ROIs a la imagen correspondiente a la obtenida en el canal donde se ve la reacción anti DBC1. Recordemos que DBC1 es una proteína de localización preferentemente nuclear.

De esta forma, se puede cuantificar la reacción anti DBC1 dentro de esas ROIs que corresponden a regiones nucleares. El parámetro medido para la cuantificación de los datos fue Densidad/Intensidad, el cual se corresponde con la cantidad absoluta de señal (proteína) presente en el núcleo. De esta manera se obtuvieron una variedad de datos para las distintas regiones y edades consideradas.

Del análisis primario de los datos, surge que la distribución de intensidades de los núcleos, independiente de la condición experimental, se aleja considerablemente de la distribución normal (χ^2 , $p < 0,05$). Por lo antedicho, el análisis comparativo de las intensidades de la inmunoreactividad en núcleos de diferentes condiciones experimentales, se realizó utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y se tomaron como significativos aquellos valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Para poder llevar a cabo los objetivos planteados en este proyecto, utilizamos 2 técnicas diferentes, tal como se describió en materiales y métodos: *Western Blot* e inmunohistoquímica. Del análisis global de los datos generados en ambos casos comenzaremos a conocer cómo es el comportamiento de DBC1 en el encéfalo.

La expresión de DBC1 en las distintas etapas de desarrollo del ratón se llevó a cabo mediante el ensayo de *Western Blot*. Para ello medimos DBC1 como relación DBC1/ α -TUB, asumiendo que la expresión de tubulina en una misma región del cerebro, no varía con el tiempo. Al comparar entre regiones del cerebro, ya es mucho más difícil asumir lo anterior, por lo cual optamos por medir directamente la cantidad de DBC1 presente en el tejido, usando inmunofluorescencia. Si bien se trata de una estrategia efectiva y frecuentemente utilizada para comparar niveles de expresión de proteínas en tejidos, en nuestro caso presenta el gran inconveniente de que solo podemos medir con certeza la proteína presente en los núcleos, mientras que la que pueda estar presente en el citoplasma resulta ignorada. Por lo tanto el *Western Blot* y la inmunofluorescencia nos dan informaciones diferentes y complementarias sobre la misma proteína, lo cual nos obliga a realizar un análisis integrado de todos los resultados.

4.1 Expresión de la proteína en el cerebro de ratón, en diferentes etapas del desarrollo post natal.

Se realizó el ensayo de *Western Blot* considerando las 6 condiciones (región – edad), según el procedimiento descrito en materiales y métodos.

Se observó que en las 3 regiones analizadas: cerebelo, corteza e hipocampo, el anticuerpo contra DBC1 reconoce, además de la banda de peso molecular esperado de aproximadamente 150 kDa (figura 8, flecha), algunas otras varias bandas de menor peso molecular. Esto es particularmente notorio en cerebros de 1 año, tal como muestra la figura 7.

En el cerebelo se observa claramente que a medida que aumenta la edad del animal, aumenta el número de bandas reconocidas por el anticuerpo observándose unas pocas y tenues en muestras de animales de 1 semana de vida y unos cuantas en los de 1 año. Al mismo tiempo, resulta notorio que a medida que aumenta la cantidad de bandas inmunoreactivas, disminuye la abundancia relativa de la banda de 150 kDa. En hipocampo se observa un patrón similar aunque la presencia de varias bandas es observada en todas las edades del ratón, llegando a distinguirse hasta 6 fragmentos inmunoreactivos en hipocampos de 1 año. En corteza la correlación entre el número de bandas observado y la edad no es tan clara.

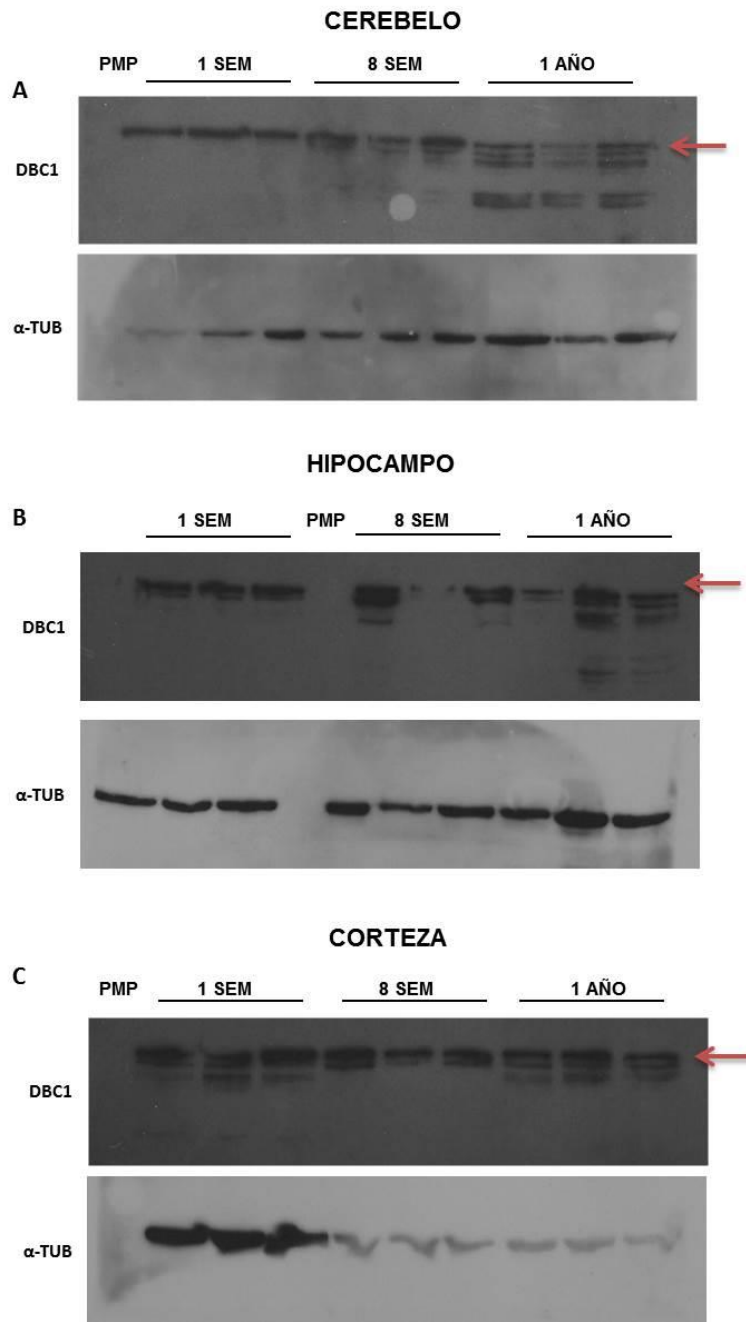


FIGURA 8. *Western Blot* para cerebelo, hipocampo y corteza, por triplicado. Nótese la banda de 150 kDa, (flecha), correspondiente al tamaño esperado para DBC1, así como la aparición de bandas menores. En caso de cerebelo e hipocampo, la banda de 150 kDa parece disminuir con la edad.

Al observar este patrón de inmunoreactividad y considerando que las bandas de menor tamaño podrían ser también una reacción específica del anticuerpo, decidimos cuantificar DBC1 para el fragmento de DBC1 de 150 kDa por un lado (figura 9A, C y E) y por otro la inmunoreactividad total anti DBC1 (“DBC1 total”, figura 9B,D y F), siempre en relación a la tubulina.

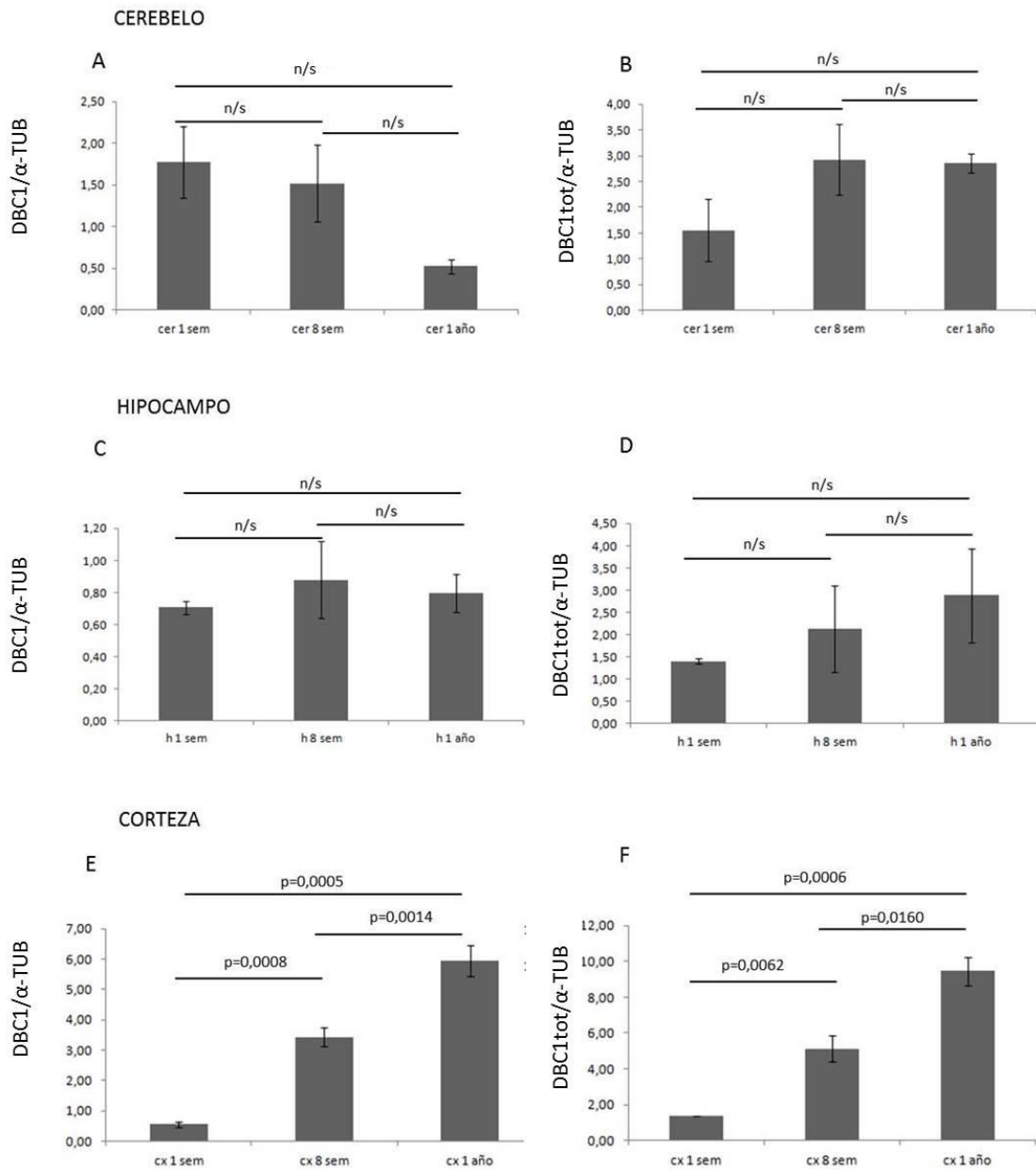


FIGURA 9. Cuantificación *Western Blot*. A,C y E corresponden a la relación DBC1 (150 kDa)/αTUB. B, D y F a la relación DBC1 total/αTUB. Se utilizó el Test-t (n = 3) y se consideran diferencias significativos para $p \leq 0,05$. n/s, no significativas.

De lo datos anteriores, surgen algunas diferencias significativas en los niveles de expresión de DBC1 y otros que sugieren una tendencia. Esto es particularmente claro en el cerebelo, donde la presencia de la banda de 150 kDa disminuye con la edad, pero la inmunoreactividad total anti DBC1, parece aumentar, debido a la aparición de varias bandas menores. En ambos casos las diferencias no llegan a ser significativas, probablemente debido a que el n es muy pequeño (n = 3, para cada grupo).

La otra diferencia significativa detectada es la correspondiente a la corteza cerebral. Sin embargo, en este caso la interpretación se ve dificultada por el aumento importante de la inmunoreacción de la tubulina en estos tejidos de una semana de edad. Debido a que los resultados son expresados como la relación DBC1/tubulina, este efecto condiciona la interpretación.

La expresión de DBC1 también puede ser analizada utilizando la inmunohistoquímica. El procedimiento de inmunohistoquímica fue llevado a cabo tal como se detalló en materiales y métodos. Los tejidos crioprotegidos son cortados usando un criostato. Los núcleos fueron también marcados con DAPI, un agente intercalante del ADN y de esta manera es posible identificar los núcleos en las distintas regiones del encéfalo. En este estudio, nos centramos en las regiones cerebelo, hipocampo, corteza ya que son 3 regiones prototípicas y claramente identificables. Además, al ser las mismas

que estudiamos por *Western Blot*, nos permitirá establecer una correlación entre los resultados obtenidos por ambas metodologías.

El hipocampo es un área relacionada con la corteza cerebral que se ubica al interior del lóbulo temporal. Esta región participa la consolidación de la memoria y el aprendizaje. Dentro del hipocampo consideramos los núcleos de las neuronas de la región del giro dentado (flecha, figura 10A). El cerebelo, se encuentra en la parte posterior del encéfalo, constituido por una masa de tejido nervioso y que se encarga de la a coordinación muscular y movimientos involuntarios. Para su análisis nos centramos en la capa granular del cerebelo (flecha, figura 10B). Tenemos entonces una región vinculada a funciones cognitivas (hipocampo) y otra claramente diferente, relacionada a la función motora. La corteza frontal, fue elegida por ser un área de fácil acceso. Estas neuronas están asociadas a las funciones ejecutivas y de la regulación de la conducta. De esta zona, nos centramos en las regiones más externas, aproximadamente las capas 2 y 3 de la corteza (flecha, figura 10C).

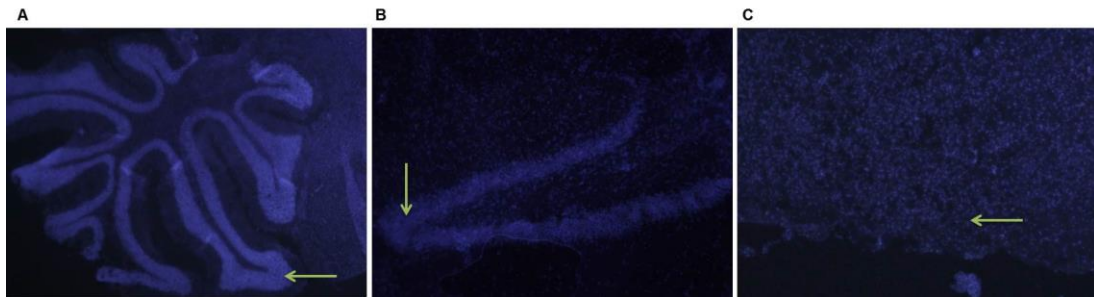


FIGURA 10. Vistas panorámicas de las regiones seleccionadas para estudio. (A). Cerebelo de un animal de 1 semana, amplificación 40x, la flecha indica la capa granular. (B). Hipocampo de un animal de 1 semana, amplificación 40x la flecha indica el giro dentado. (C). Corteza de un animal de 1 año, amplificación 100x, la flecha indica la región seleccionada.

En las siguientes figuras (Figura 11) se observan cortes representativos de los hipocampos de animales de 1 semana, 8 semanas y 1 año y un control.. Aquí observamos una clara diferencia entre aquellos núcleos que presentan reacción con el anticuerpo anti-DBC1 y el control que presenta una reacción homogénea sin localización preferente y de baja intensidad..

Para los tejidos tratados con anti-DBC1 observamos una gran reacción en los núcleos, lo cual concuerda con la ubicación de DBC1 habitual.

Un aspecto interesante que surge del análisis visual de los histogramas de cada condición y su respectivo control (figura 12) es que cada par “anticuerpo – control” presenta una región de la distribución de frecuencias donde claramente se superponen (y que corresponden a los núcleos con valores de menor intensidad o negativos a DBC1) y otra región que es propia

de los preparados marcados con el anticuerpo, que corresponde a los valores de mayor intensidad (marcación positiva). Esto quiere decir que no todos los núcleos son positivos a DBC1, inclusive entre las neuronas del giro dentado del hipocampo o la granular del cerebelo, las cuales son poblaciones celulares homogéneas. Esto se aprecia claramente en la figura 12, donde se ve que los núcleos que aparecen en el canal verde (DBC1) son muchos menos que los núcleos totales presentes en el mismo campo y visibles con DAPI en el canal azul.

En algunos cortes, en especial los correspondientes a los cerebros de animales de 8 semanas de edad, se aprecian reacciones puntuales muy brillantes y distribuidas aleatoriamente en el tejido. Probablemente se traten de precipitados de anticuerpo primario. Los núcleos ubicados en esta zona del preparado no fueron utilizados para las cuantificaciones de reacción anti-DBC1.

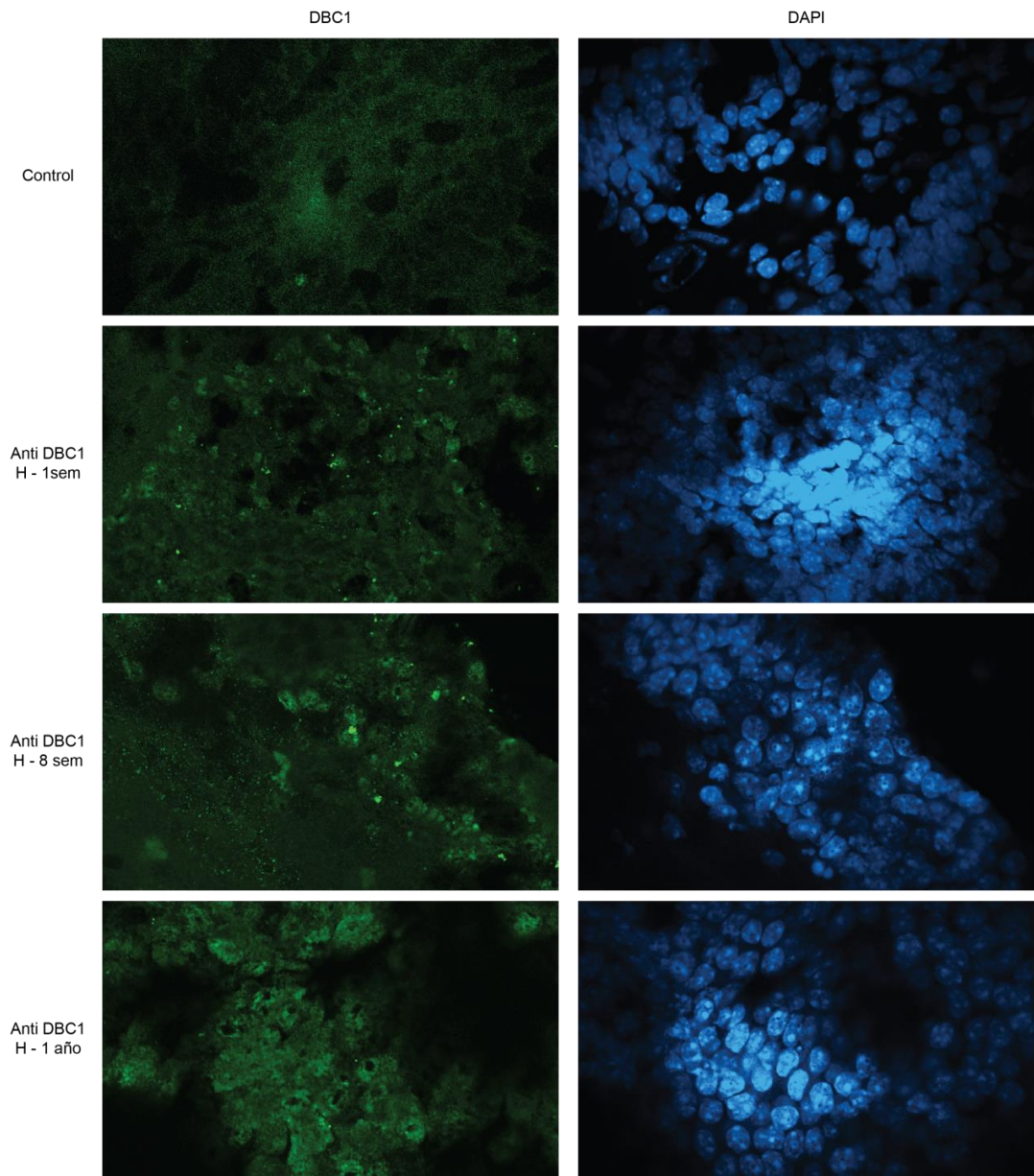
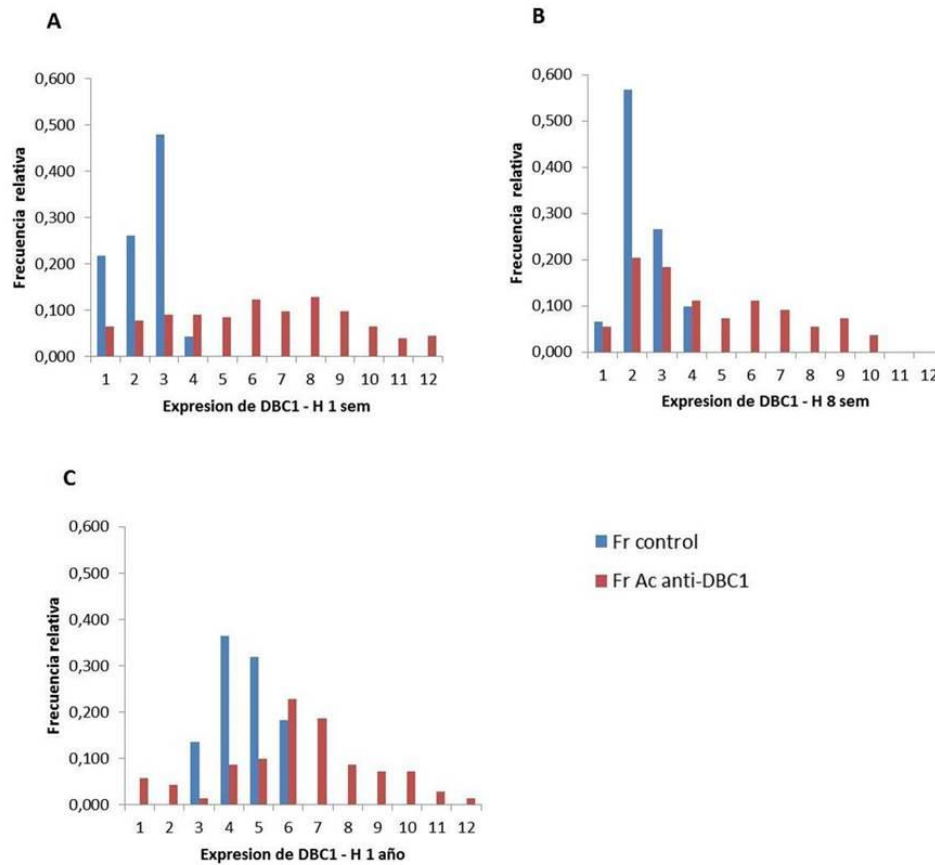


FIGURA 11. Inmunohistoquímica para la región hipocampo (giro dentado). El control corresponde a un hipocampo de 1 semana.

El primer paso del análisis de datos consistió en comparar cada uno de los grupos de datos de intensidad de cada región con la señal registrada en sus correspondientes controles sin anticuerpo. Con esto pretendemos confirmar que la señal generada por el anticuerpo anti DBC1 es significativamente más alta que la del ruido de fondo (*background*). Esto es particularmente importante para regiones como la capa granular del cerebelo, donde las señales del anticuerpo en los núcleos fueron muy bajas. Para evaluar esto, comparamos las distribuciones de intensidades en los núcleos en los cortes tratados con anticuerpo anti-DBC1, con sus respectivos controles (tabla 1). Al comprobar que existe diferencia significativa (χ^2) entre ambas distribuciones, abordamos la segunda etapa del análisis que consistió en la comparación de las señales anti DBC1 en las diferentes condiciones experimentales. A modo de ejemplo, en la figura 12 se muestran los histogramas de frecuencias correspondientes a las intensidades medidas en los núcleos de hipocampo (giro dentado) y sus controles. Elegimos esta región como representativa para el resto del análisis ya que es la región que posee mayor expresión de DBC1 (figura 14).



| | condición | Mediana | | Valor Chi² | G.J. | P-valor |
|-----|-----------|-----------|-----------|------------|------|---------|
| | | control | Anti-DBC1 | | | |
| H | 1 sem. | 0,901 (3) | 2,409 (6) | 342,4 | 11 | 0,0 |
| | 8 sem. | 1,201 (2) | 1,836 (4) | 113 | 11 | 0,0 |
| | 1 año | 1,67 (4) | 2,85 (6) | 298,7 | 11 | 0,0 |
| CER | 1 sem. | 0,543 | 1,969 | 176,8 | 12 | 0,0 |
| | 8 sem. | 0,678 | 1,179 | 810,4 | 11 | 0,0 |
| | 1 año | 0,412 | 1,543 | 189,1 | 12 | 0,0 |
| CX | 1 sem. | 1,114 | 1,772 | 1120,1 | 17 | 0,0 |
| | 8 sem. | 0,774 | 1,358 | 342,1 | 11 | 0,0 |
| | 1 año | 1,202 | 1,961 | 276 | 12 | 0,0 |

FIGURA 12. A, B y C. Histogramas de frecuencias. Se observa la comparación entre control y marcado con DBC1. **D.** Comparación de distribuciones de intensidad anti-DBC1 en controles y marcados. Se observan los valores correspondientes a las medianas de los controles y los que poseen Anticuerpo anti-DBC1. Los valores que se observan entre paréntesis corresponden al número de clase desplegado en el eje de las x en la figura 12 a b y c. Por otro lado, se observan los valores de chi2 y el valor p de probabilidad asociados los cuales son todos altamente significativos.

Un resumen de los resultados y de las comparaciones entre edades y por región, se expresan en la figura 13.

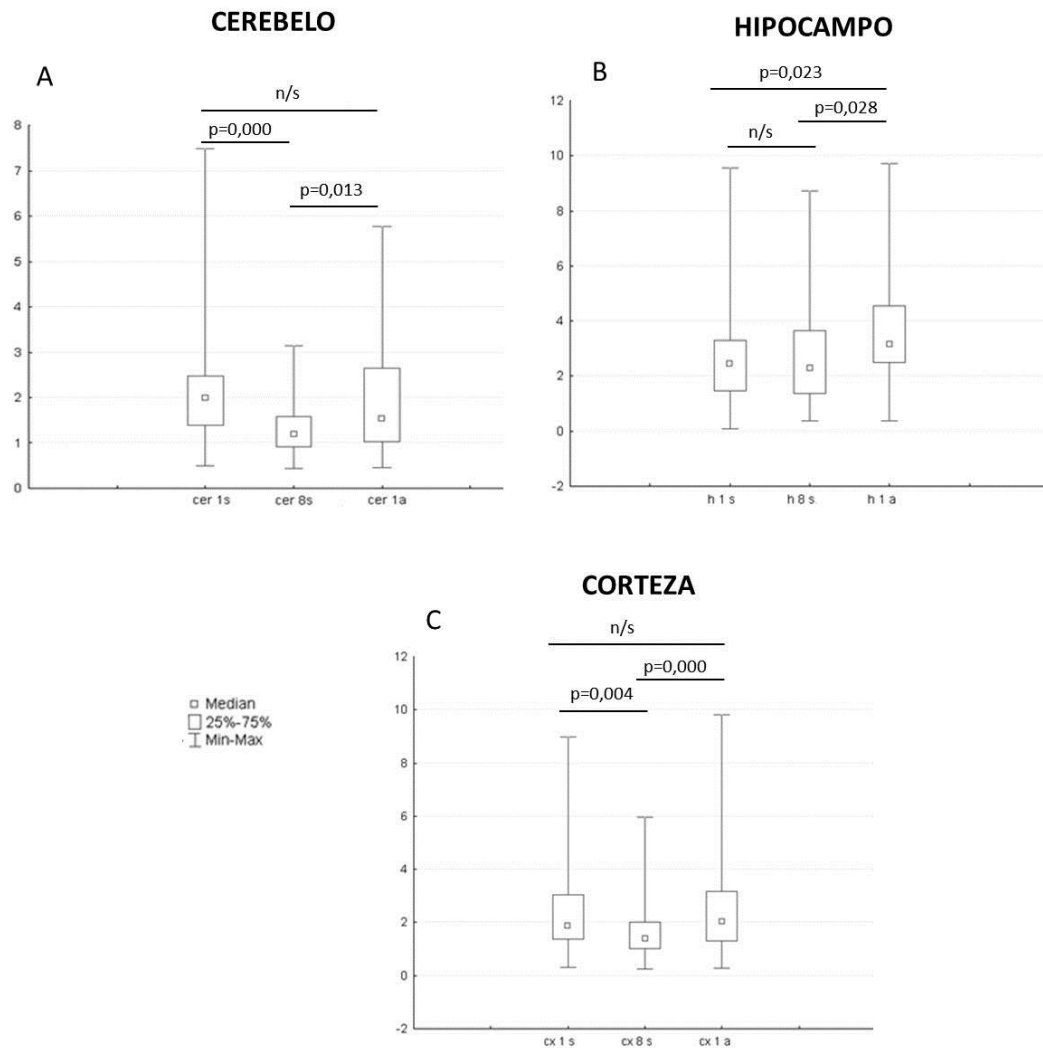


Figura 13. Box Plot de las comparaciones de intensidades de los núcleos entre edades y por región.. Se aplico Test no paramétrico de Kruskal–Wallis considerándose significativos valores $p \leq 0,05$. n/s, no significativas.

A partir de las gráficas anteriores podemos afirmar que la expresión de DBC1 en el cerebelo no es uniforme. En todos los casos se observa un descenso a las 8 semanas, que en algunos casos llega a ser significativo.

En el hipocampo observamos que entre los animales de 1 semana y 8 semanas no hay una diferencia significativa en la expresión de DBC1, pero si entre 8 semanas y 1 año. Entre los animales de 1 semana y 1 año también se observan diferencias significativas observándose un aumento en la expresión de DBC1 a medida que aumenta la edad del mismo.

Por otro lado, al considerar la corteza observamos un comportamiento similar al observado en el cerebelo. La expresión de DBC1 no varía entre los animales de 1 semana y 1 año.

4.2 Variación de la expresión de DBC1 en el tiempo

La expresión de DBC1 también ser analizada comparando las distintas regiones a un tiempo fijo.

Como primera aproximación, evaluamos la inmunoreactividad presente en los núcleos neuronales de las diferentes regiones seleccionadas en inmunohistoquímica, sin discriminar por edad. Observamos una diferencia

importante de la señal de DBC1 entre regiones, siendo máxima en el giro dentado del hipocampo (figura 14).

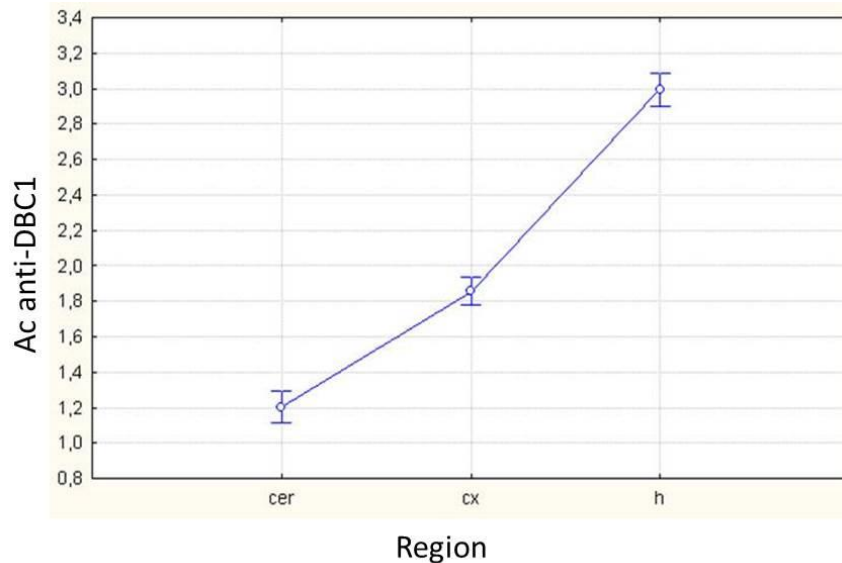


FIGURA 14. Diferencias en la expresión de DBC1 en núcleos neuronales de las distintas regiones del cerebro (cer, cerebelo; cx, corteza; h, hipocampo). Se observó un $p < 0,00001$ para un ANOVA de una vía y diferencias entre todas las condiciones (test Scheffe).

En la siguiente imagen observamos la expresión de DBC1 de manera más detallada. A la semana de edad, no se detectan diferencias entre regiones, a excepción de una expresión ligeramente mayor (y no significativa) en el hipocampo.

En cambio, a medida que aumenta la edad del ratón esa tendencia observada se va consolidando, siendo siempre mayor en el hipocampo y menor en el cerebelo (figura 15). Lo cual es consistente con la figura 14.

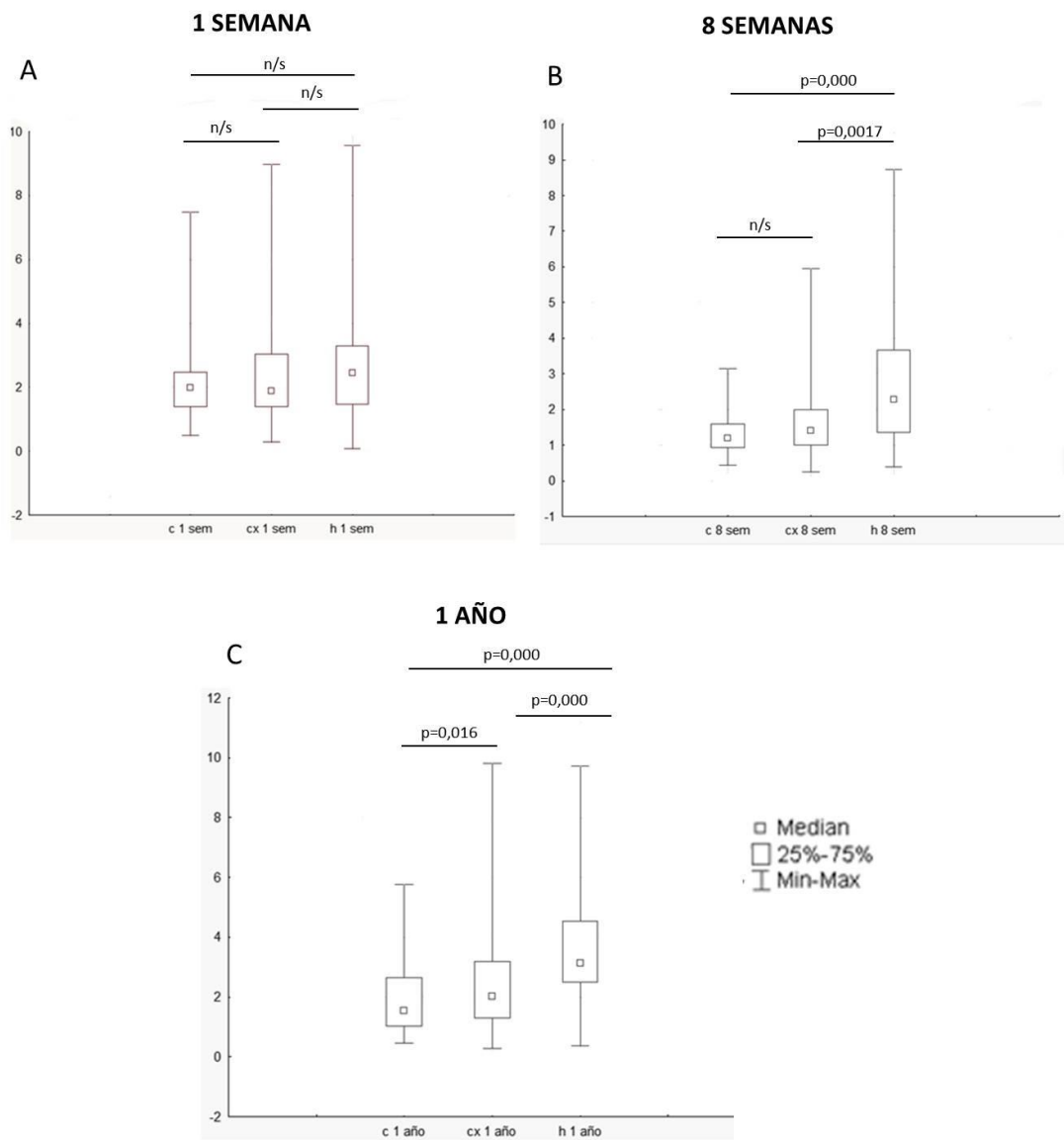


Figura 15. Representación gráfica de la expresión de DBC1 en las distintas edades. Se aplicó Test no paramétrico de Kruskal–Wallis considerándose significativos valores $p \leq 0,05$. n/s, no significativas.

5. DISCUSION

DBC1 es una proteína nuclear de función poco estudiada. Actualmente las funciones más conocidas corresponden con el metabolismo energético, por lo que en esta tesina nos hemos propuesto analizar la importancia biológica de DBC1 en el Sistema Nervioso Central. Si bien sabemos que no existe evidencia que vincule a DBC1 con la fisiología del Sistema Nervioso, su potencial importancia se sospecha a partir de lo que se conoce sobre SIRT1. Hemos estudiado la distribución de DBC1 en las diferentes regiones del encéfalo, y su expresión en el cerebro considerando diferentes etapas del desarrollo post natal.

Un aspecto que nos llamó la atención al analizar la expresión de DBC1 por la técnica de *Western Blot* fue el patrón de inmunoreconocimiento caracterizado por la presencia de 1 a 6 diferentes bandas dependiendo de la condición experimental. En la figura 8A además de la banda de 150 kDa, observamos varias bandas de menor tamaño en las 3 regiones analizadas. Si bien no estimamos el tamaño exacto de estas bandas, sabemos que el fragmento de mayor peso molecular es superior a 116 kDa (marcador estándar), por lo que estimamos que corresponde al peso molecular descrito para la proteína (150 kDa). En el cerebelo y en el hipocampo observamos que a medida que aumenta la edad del ratón, las bandas de menor peso molecular se hacen

más notorias, apareciendo las primeras bandas en los animales de 8 semanas. En la corteza, en cambio, observamos que este patrón de inmunoreactividad es similar en todas las edades.

Este patrón puede corresponder a un clivaje por degradación inespecífica, a un fenómeno de proteólisis regulada, o a variantes de *splicing* del gen de DBC1. También puede ser que el anticuerpo este reconociendo otro epítopo similar.

En principio estas bandas no corresponderían con una degradación inespecífica, ya que las muestras fueron todas procesadas al mismo tiempo, y este patrón parece específico de la edad del ratón. Por otro lado, las variantes de *splicing* aún no han sido descritas por lo que en principio tampoco lo consideraríamos. No podríamos descartar una inmunoreactividad inespecífica o cruzada del anticuerpo, es decir que el anticuerpo esté reconociendo una secuencia similar a los aminoácidos que se encuentran en la región N-terminal de DBC1. Sin embargo, llama la atención que esas bandas menores a 150 kDa aparezcan en forma dependiente de la edad y en parte de de la región analizada. Finalmente, la posibilidad del clivaje por proteólisis regulada ha sido descrita previamente, por Sundararajan, et. al. 2005. Se ha reportado un clivaje de DBC1 durante la apoptosis inducida por TNF- α en un modelo con células HeLa⁵⁰. El producto principal que reportan corresponde con una banda de 120 kDa, que podía coincidir con la ubicada

inmediatamente por debajo de la banda de 150 kDa. El patrón de inmunoreactividad publicado por esos autores se observa en la figura 16

Muchas de estas dudas, con respecto a la especificidad de la reacción, se podrían despejar utilizando como control un KO para DBC1.

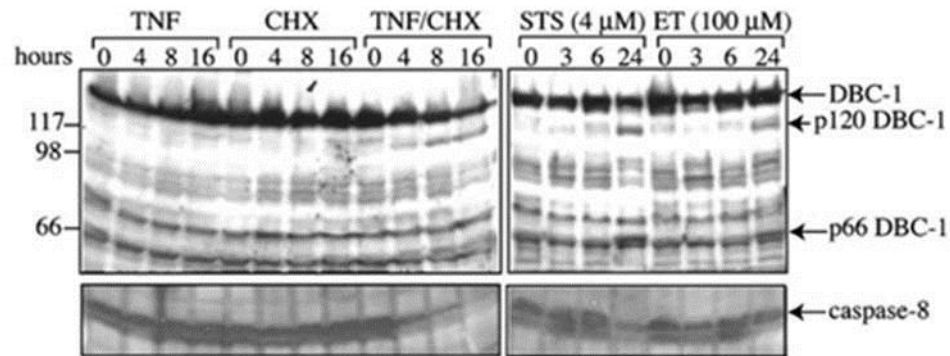


Figura 16. Comportamiento de DBC1 en respuesta a TNF-alfa in vivo durante la apoptosis. SDS-PAGE 7,5% en el panel superior, y 12% en el inferior⁵⁰. Tomado de Sundararajan, et. al. 2005.

Considerando el patrón de inmunoreactividad presente en los western de las tres regiones analizadas, consideramos pertinente cuantificar su abundancia teniendo en cuenta la inmureactividad únicamente de la banda de 150 kDa, por un lado o la totalidad de las bandas, por otro. Un análisis global de los datos y considerando específicamente la relación DBC1tot/ α -tubulina, estos

sugieren una tendencia al aumento de la expresión a medida que aumenta la edad del ratón.

Los resultados de la inmunohistoquímica no arrojan datos concluyentes respecto a la variación de la proteína en el tiempo. En la figura 13 se observa que solo a nivel del hipocampo existe un aumento significativo de la expresión en el tiempo. Sin embargo, cuando la comparación es realizada entre diferentes regiones a un tiempo fijo (figura 15), observamos que existe una tendencia a una mayor expresión en el hipocampo en detrimento de las otras dos regiones, y siendo los niveles de expresión en el cerebelo inferiores a los demás. Cuando los datos son agrupados solamente por región (figura 14) este efecto se ve aún más claro.

En la inmunohistoquímica los resultados solamente consideran la presencia de DBC1 en el núcleo. Se ha descrito que la proteína también puede encontrarse en el citosol⁵⁰. Si bien en teoría, podría haberse cuantificado la inmunoreactividad anti DBC1 a nivel del citosol, la calidad, e intensidad de la señal proveniente de las regiones perinucleares, así como la ausencia de los límites de las células, nos impiden obtener datos confiables de su expresión en el citoplasma.

Por lo anterior, concluimos que los resultados de *Western Blot* y de inmunofluorescencia no son estrictamente comparables entre sí. De todas

formas y a pesar de lo antedicho, tomando todos los datos en su conjunto, podemos concluir que la expresión de DBC1 en el hipocampo es mayor siempre respecto a las otras regiones, y que se ve aumentada con la edad.

Estos resultados resultan interesantes en relación a lo que se sabe de SIRT1 sobre la fisiología del Sistema Nervioso Central. Hemos visto que SIRT1 modula la ansiedad y la respuesta exploratoria de en ratones⁵⁴, y que se encuentra involucrada en el aprendizaje espacial y la memoria inmediata^{57, 56}. Nosotros observamos que de las 3 regiones analizadas, la única que posee un patrón claro es el hipocampo, lo cual plantea la duda sobre si esta expresión tiene relación con la actividad de SIRT1. De ser así, deberían constatarse diferencias en la expresión de DBC1 en animales que viven en condiciones de pobre estímulo (auditivo, visual, interacción con pares), con otros de ambiente enriquecido, Análogamente podría haber diferencias entre animales que aprenden y no aprenden determinados ensayos.

6. CONCLUSION

- Mediante la técnica de Western Blot, se obtuvo la presencia de diferentes fragmentos de DBC1, que podrían corresponder a un posible clivaje de la proteína.
- Hemos observado que la expresión de DBC1 es mayor en el hipocampo y siempre menor en el cerebelo.
- En las distintas etapas del desarrollo, la expresión de DBC1 varía según la región, pero siempre observamos una tendencia a aumentar con la edad del ratón.

7. PERSPECTIVAS

Considerando los niveles de expresión de DBC1 puntualmente altos en el hipocampo respecto a las otras regiones analizadas, así como su tendencia a aumentar en el tiempo, surge la necesidad de confirmar este dato comparando por ejemplo, edades más extremas. Para esto, deberíamos realizar un estudio similar utilizando por ejemplo, hipocampos de animales de una semana de vida (o incluso embriones) con hipocampos de animales viejos (2 años). Además interesaría correlacionar estos resultados con la información que nos brindan otras técnicas tales como el ensayo de qPCR. Si estos datos dieran consistentes con los obtenidos en esta tesis, se podría seguir explorando qué es lo que sucede en los animales KO *Dbc1* y si ese aumento con la edad genera un cambio funcional. De la misma manera podríamos estudiar si la mayor expresión de DBC1 en el hipocampo tiene alguna correlación con lo cognitivo.

El posible clivaje de DBC1 podría continuarse investigando. En este caso, debería confirmarse la naturaleza de las bandas de menor peso molecular. Debería descartarse definitivamente la posibilidad de un artefacto para luego abordar su identificación en forma directa, por ejemplo mediante su secuenciación usando espectrometría de masas.

8. REFERENCIAS

1. Matyus, P. Welcome to new insights into ' Metabolic Syndrome '. 1719–1720 (2010).
2. Services, H. Do Different Dimensions of the Metabolic Syndrome Change Together Over Time. **24**, (2001).
3. Heilbronn, L. K. & Ravussin, E. Calorie restriction and aging : review of the literature and implications for studies in humans. (2003).
4. Maynakd, L. A. The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate bpdy size. (1935).
5. Masoro, E. J. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 913–922 (2005).
6. Colman, R. J. *et al.* Caloric restriction delays disease onset and mortality ir Rhesus monkeys. **325**, 201–204 (2010).
7. Cohen, H. Y. *et al.* Calorie Restriction Promotes Mammalian Cell Survival by Inducing the SIRT1 Deacetylase. **390**, (2010).
8. Blander, G. & Guarente, L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 417–435 (2004).
9. Aparicio, O. M., Billington, B. L. & Gottschling, D. E. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* **66**, 1279–1287 (2015).
10. Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K. & Horio, Y. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.* **282**, 6823–6832 (2007).
11. Enjalbert, B. *et al.* Evolutionatily Conserved and Nonconcerned Cellular Localizations

and functions of human SIRT proteins. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1018–1032 (2006).

12. Frye, R. A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 793–8 (2000).
13. Jackson, M. D. & Denu, J. M. Structural identification of 2'- and 3'-O-acetyl-ADP-ribose as novel metabolites derived from the Sir2 family of beta-NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases. *J. Biol. Chem.* **277**, 18535–18544 (2002).
14. Tanner, K. G., Landry, J., Sternglanz, R. & Denu, J. M. Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14178–14182 (2000).
15. Rodgers, J. T. *et al.* Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1[alpha] and SIRT1. *Nature* **434**, 113–118 (2005).
16. Jeong, J. *et al.* SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp Mol Med* **39**, 8–13
17. Vaziri, H. *et al.* hSIR2SIRT1 Functions as an NAD-Dependent p53 Deacetylase. *Cell* **107**, 149–159 (2015).
18. Brunet, A. *et al.* Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Sci.* **303**, 2011–2015 (2004).
19. Yeung, F. *et al.* Modulation of NF-κB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* **23**, 2369–2380 (2004).
20. Fulco, M. *et al.* Sir2 Regulates Skeletal Muscle Differentiation as a Potential Sensor of the Redox State. *Mol. Cell* **12**, 51–62 (2015).
21. Dai, H. *et al.* Crystallographic structure of a small molecule SIRT1 activator-enzyme complex. *Nat. Commun.* **6**, 7645 (2015).
22. Min, J., Landry, J., Sternglanz, R. & Xu, R.-M. Crystal Structure of a SIR2 Homolog–NAD Complex. *Cell* **105**, 269–279 (2015).

23. Rossmann, M. & Argos, P. The taxonomy of binding sites in proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **21**, 161–182 (1978).
24. Autiero, I., Costantini, S. & Colonna, G. Human Sirt-1: Molecular Modeling and Structure-Function Relationships of an Unordered Protein. *PLoS One* **4**, (2009).
25. Finnin, M. S., Donigian, J. R. & Pavletich, N. P. Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 621–625 (2001).
26. Sanders, B. D., Jackson, B. & Marmorstein, R. Structural Basis for Sirtuin Function: What We Know and What We Don't. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1604–1616 (2010).
27. Zhao, K., Chai, X., Clements, A. & Marmorstein, R. Structure and autoregulation of the yeast Hst2 homolog of Sir2. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 864–871 (2003).
28. Escande, C. *et al.* Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 545–558 (2010).
29. Frescas, D., Valenti, L. & Accili, D. Nuclear Trapping of the Forkhead Transcription Factor FoxO1 via Sirt-dependent Deacetylation Promotes Expression of Glucogenic Genes. *J. Biol. Chem.* **280**, 20589–20595 (2005).
30. Hallows, W. C., Yu, W. & Denu, J. M. Regulation of Glycolytic Enzyme Phosphoglycerate Mutase-1 by Sirt1 Protein-mediated Deacetylation. *J. Biol. Chem.* **287**, 3850–3858 (2012).
31. Liu, Y. *et al.* A Fasting Inducible Switch Modulates Gluconeogenesis Via Activator-Coactivator Exchange. *Nature* **456**, 269–273 (2008).
32. Rodgers, J. T. & Puigserver, P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12861–12866 (2007).
33. Purushotham, A. *et al.* Hepatocyte-specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid

- Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metab.* **9**, 327–338 (2009).
34. Li, Y. *et al.* Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *FASEB J.* **25**, 1664–1679 (2011).
 35. Moynihan, K. A. *et al.* Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic β cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab.* **2**, 105–117 (2015).
 36. Picard, F. *et al.* Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature* **429**, 771 (2004).
 37. Bordone, L. *et al.* Sirt1 Regulates Insulin Secretion by Repressing UCP2 in Pancreatic β Cells. *PLoS Biol.* **4**, e31 (2006).
 38. Lee, J.-H. *et al.* Overexpression of SIRT1 Protects Pancreatic β -Cells Against Cytokine Toxicity by Suppressing the Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway. *Diabetes* **58**, 344–351 (2009).
 39. Kitamura, Y. I. *et al.* FoxO1 protects against pancreatic β cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab.* **2**, 153–163 (2015).
 40. Guarente L, P. F. Calorie restriction-the SIR2 connection. *Cell Cycle* **120**, 473–82 (2005).
 41. Longo, V. D. & Kennedy, B. K. Sirtuins in Aging and Age-Related Disease. *Cell* **126**, 257–268 (2006).
 42. Li X, Z. S. SIRT1 deacetylates and positively regulates and nuclear receptor LXR. *Mol. Cell* **28**, 91–106 (2007).
 43. Nerurkar, P. V & Nerurkar, V. R. Can Sir(2) regulate cancer? *Cellscience* **4**, 50–56 (2008).
 44. BAUR, J. A. *et al.* Dietary Restriction: Standing Up for Sirtuins. *Science* **329**, 1012–

1014 (2010).

45. Kim, E.-J., Kho, J.-H., Kang, M.-R. & Um, S.-J. Active Regulator of SIRT1 Cooperates with SIRT1 and Facilitates Suppression of p53 Activity. *Mol. Cell* **28**, 277–290 (2015).
46. Zhao, W. *et al.* Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* **451**, 587–590 (2008).
47. Kang, H. *et al.* Peptide Switch Is Essential for Sirt1 Deacetylase Activity. *Mol. Cell* **44**, 203–213 (2015).
48. Hamaguchi, M. *et al.* DBC2, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13647–13652 (2002).
49. Anantharaman, V. & Aravind, L. Analysis of DBC1 and its homologs suggests a potential mechanism for regulation of sirtuin domain deacetylases by NAD metabolites. *Cell Cycle* **7**, 1467–1472 (2008).
50. Sundararajan, R., Chen, G., Mukherjee, C. & White, E. Caspase-dependent processing activates the proapoptotic activity of deleted in breast cancer-1 during tumor necrosis factor- α -mediated death signaling. *Oncogene* **24**, 4908–4920 (2005).
51. Joshi, P., Quach, O. L., Giguere, S. S. B. & Cristea, I. M. A Functional Proteomics Perspective of DBC1 as a Regulator of Transcription. *J. Proteomics Bioinform.* **Suppl 2**, (2013).
52. Qin, B. *et al.* DBC1 functions as a tumor suppressor by regulating p53 stability. *Cell Rep.* **10**, 1324–1334 (2015).
53. Kim, J.-E., Chen, J. & Lou, Z. p30 DBC is a potential regulator of tumorigenesis. *Cell Cycle* **8**, 2932–2935 (2009).
54. Di Marcotullio, L., Canettieri, G., Infante, P., Greco, A. & Gulino, A. Protected from the inside: Endogenous histone deacetylase inhibitors and the road to cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1815**, 241–252 (2011).

55. Kang, Y. *et al.* Expression of SIRT1 and DBC1 in Gastric Adenocarcinoma. *Korean J. Pathol.* **46**, 523–531 (2012).
56. Kim SH, K. J. The overexpression of DBC1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis. **27**, 49–58 (2012).
57. Muthu, M., Cheriyan, V. T. & Rishi, A. K. CARP-1 / CCAR1: A biphasic regulator of cancer cell growth and apoptosis. *Oncotarget* **6**, 6499–6510 (2015).
58. Kim, J.-E., Chen, J. & Lou, Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* **451**, 583–6 (2008).
59. Li, Z. *et al.* Inhibition of SUV39H1 Methyltransferase Activity by DBC1. *J. Biol. Chem.* **284**, 10361–10366 (2009).
60. Vaquero, A. *et al.* SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* **450**, 440–444 (2007).
61. Close, P. *et al.* DBIRD complex integrates alternative mRNA splicing with RNA polymerase II transcript elongation. *Nature* **484**, 386–389 (2012).
62. Chini, C. C. S., Escande, C., Nin, V. & Chini, E. N. HDAC3 Is Negatively Regulated by the Nuclear Protein DBC1. *J. Biol. Chem.* **285**, 40830–40837 (2010).
63. Chini, C. C. S., Escande, C., Nin, V. & Chini, E. N. DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) modulates the stability and function of the nuclear receptor Rev-erb α . *Biochem. J.* **451**, 453–461 (2013).
64. Koyama, S. *et al.* Repression of estrogen receptor β function by putative tumor suppressor DBC1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**, 357–362 (2010).
65. Fu, J. *et al.* Deleted in Breast Cancer 1, a Novel Androgen Receptor (AR) Coactivator That Promotes AR DNA-binding Activity. *J. Biol. Chem.* **284**, 6832–6840 (2009).
66. Qiang, L. *et al.* Brown Remodeling of White Adipose Tissue by SirT1-Dependent Deacetylation of Pparg. *Cell* **150**, 620–632 (2012).

67. Kim, W. Deleted in breast cancer 1 (DBC1) deficiency results in apoptosis of breast cancer cells through impaired responses to UV-induced DNA damage. **333**, 180–86 (2013).
68. Park, S. H., Riley, P. & Frisch, S. M. Regulation of anoikis by Deleted in Breast Cancer-1 (DBC1) through NF- κ B. *Apoptosis* **18**, 949–962 (2013).
69. Garapaty, S. *et al.* Identification and Characterization of a Novel Nuclear Protein Complex Involved in Nuclear Hormone Receptor-mediated Gene Regulation. *J. Biol. Chem.* **284**, 7542–7552 (2009).
70. Amy M. Trauernicht, S. jin K. Modulation of Estrogen Receptor α Protein Level and Survival Function by DBC-1. *Mol. Endocrinol.* **21**, (2007).
71. Ji Yu, E. *et al.* Reciprocal roles of DBC1 and SIRT1 in regulating estrogen receptor α activity and co-activator synergy. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6932–6943 (2011).
72. Yin, L., Wu, N. & Lazar, M. A. Nuclear receptor Rev-erba: a heme receptor that coordinates circadian rhythm and metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* **8**, e001 (2010).
73. Alenghat, T. *et al.* Nuclear receptor corepressor and histone deacetylase 3 govern circadian metabolic physiology. *Nature* **456**, 997–1000 (2008).
74. Yin L, W. N. Rev-erba, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science* (80-.). **318**, 1786–9 (2007).
75. Crumbley, C. & Burris, T. P. Direct Regulation of CLOCK Expression by REV-ERB. *PLoS One* **6**, e17290 (2011).
76. Yin, L. & Lazar, M. A. The Orphan Nuclear Receptor Rev-erba Recruits the N-CoR/Histone Deacetylase 3 Corepressor to Regulate the Circadian *Bmal1* Gene. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1452–1459 (2005).
77. Feng, D. & Lazar, M. A. Clocks, Metabolism, and the Epigenome. *Mol. Cell* **47**, 158–167 (2012).

78. Bugge, A. *et al.* Rev-erba and Rev-erbβ coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev.* **26**, 657–667 (2012).
79. Cho, H. *et al.* Regulation of Circadian Behavior and Metabolism by Rev-erba and Rev-erbβ. *Nature* **485**, 123–127 (2012).
80. Nin, V. *et al.* Role of Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1) protein in SIRT1 deacetylase activation induced by protein kinase A and AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **287**, 23489–23501 (2012).
81. Suter, M. A. *et al.* A maternal high-fat diet modulates fetal SIRT1 histone and protein deacetylase activity in nonhuman primates. *FASEB J.* **26**, 5106–5114 (2012).
82. Raynes, R. *et al.* The SIRT1 Modulators AROS and DBC1 Regulate HSF1 Activity and the Heat Shock Response. *PLoS One* **8**, e54364 (2013).
83. Yuan, J., Luo, K., Liu, T. & Lou, Z. Regulation of SIRT1 activity by genotoxic stress. *Genes Dev.* **26**, 791–796 (2012).
84. Zannini, L., Buscemi, G., Kim, J., Fontanella, E. & Delia, D. DBC 1 phosphorylation by ATM / ATR inhibits SIRT 1 deacetylase in response to DNA damage. 294–303 (2012).
85. Menssen, A. *et al.* The c-MYC oncoprotein, the NAMPT enzyme, the SIRT1-inhibitor DBC1, and the SIRT1 deacetylase form a positive feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E187–E196 (2012).
86. Feng, D. *et al.* A Circadian Rhythm Orchestrated By Histone Deacetylase 3 Controls Hepatic Lipid Metabolism. *Science* **331**, 1315–1319 (2011).
87. Guenther, M. G., Barak, O. & Lazar, M. A. The SMRT and N-CoR Corepressors Are Activating Cofactors for Histone Deacetylase 3. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6091–6101 (2001).
88. Ishizuka, T. & Lazar, M. A. The N-CoR/Histone Deacetylase 3 Complex Is Required for Repression by Thyroid Hormone Receptor. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5122–5131 (2003).

89. Pfluger, P. T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M. & Tschöp, M. H. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 9793–9798 (2008).
90. Adams, J. M. Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* **17**, 2481–2495 (2003).
91. Cuconati, A. & White, E. Viral homologs of Bcl-1: role of apoptosis in the regulation of virus infection. *Genes Dev.* **16**, 2465–2478 (2002).
92. Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. Cell Death: Critical Control Points. *Cell* **116**, 205–219 (2004).
93. Zhang, F. *et al.* Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **95**, 373–395 (2011).
94. Libert, S. *et al.* SIRT1 Activates MAO-A in the Brain to Mediate Anxiety and Exploratory Drive. *Cell* **147**, 1459–1472 (2011).
95. Gao, J. *et al.* A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* **466**, 1105–1109 (2010).
96. Michán, S. *et al.* SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **30**, 9695–9707 (2010).
97. Jiang, M. *et al.* Neuroprotective role of SIRT1 in mammalian models of Huntington’s disease through activation of multiple SIRT1 targets. *Nat. Med.* **18**, 153–158 (2012).
98. Parker, J. A. *et al.* Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nat Genet* **37**, 349–350 (2005).
99. Qin, W. Neuronal SIRT1 Activation as a Novel Mechanism Underlying the Prevention of Alzheimer Disease Amyloid Neuropathology by Calorie Restriction. *J. Biol. Chem.* **281**, 21745–21754 (2006).
100. Kim, D. *et al.* SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for

Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.* **26**, 3169–3179 (2007).

101. Araki , Sasaki Y, M. J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science (80-.).* **13;305(568)**, 1010–3 (2004).
102. Calliari, A., Bobba, N., Escande, C. & Chini, E. N. Resveratrol delays Wallerian degeneration in a NAD(+) and DBC1 dependent manner. *Exp. Neurol.* **251**, 91–100 (2014).