

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Bioquímica

PEDECIBA Biología

**Regulación redox de la actividad e interacción
proteína-proteína de sirtuinas nucleares**

Lic. Leonardo Santos

Laboratorio de Fisicoquímica Biológica

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Directora: Dra. Ana Denicola
Co-director: Dr Carlos Escande

Tribunal: Dra. Mónica Marín
Dra. Celia Quijano
Dr. Carlos Batthyány

Contenido

Resumen.....	4
1. Introducción.....	6
1.1. Sirtuinas	6
1.2. Los isotipos de sirtuinas en humanos	9
1.3. Estructura.....	11
1.4. Mecanismo catalítico.....	14
1.5. Funciones de SIRT1.....	16
1.6. SIRT1 regulador de la inflamación	18
1.7. Estrés oxidativo.....	20
1.8. Modificaciones redox en SIRT1	21
1.9. Regulación de SIRT1 por otras proteínas durante el estrés oxidativo	23
2. Hipótesis y objetivos	24
2.1. Hipótesis de trabajo.....	24
2.1. Objetivos específicos	24
3. Materiales y métodos	25
3.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	25
3.1.1. Expresión de rhSIRT1	25
3.1.2. Preparación de extracto libre de células.....	25
3.1.3. Purificación por cromatografía de afinidad	26
3.1.4. Purificación por cromatografía de intercambio aniónico	26
3.1.5. Purificación por gel filtración.....	26
3.1.6. Expresión de ryPnc1.....	26
3.1.7. Purificación de Pnc1	27
3.1.8. Clonado del vector de expresión de hDBC1	27
3.1.9. Expresión y purificación de DBC1	28
3.2. Control de calidad y rendimiento de la producción de las enzimas recombinante	28
3.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	28
3.2.2. Identificación de las proteínas por espectrometría de masa.....	29
3.2.3. Cuantificación de proteínas	29

3.3.	Medidas de Actividad	29
3.3.1.	Método fluorescente	29
3.3.2.	Método acoplado	30
3.4.	Tratamiento con oxidantes biológicos	31
3.4.1.	Medidas de peróxidos.....	31
3.4.2.	Exposición de la proteína a los oxidantes.....	31
3.5.	Western blots para detección de especies oxidadas.....	32
3.5.1.	Western anti-nitrotirosina.....	32
3.6.	Cuantificación de tioles	32
3.6.1.	Cuantificación de tioles con ditiodipiridina	32
3.6.2.	Cuantificación de tioles titulando con PCMB	33
3.7.	Cuantificación de Zn ²⁺	33
3.8.	Espectros de dicroísmo circular	33
3.9.	Espectros de emisión de fluorescencia.....	33
3.10.	Interacción SIRT1/DBC1	34
3.10.1.	Transfección de células HEK293 y HeLa y tratamientos.....	34
3.10.2.	Inmunoprecipitaciones.....	34
4.	Resultados y discusión.....	35
4.1.	Purificación de proteínas recombinantes	35
4.1.1.	rhSIRT1	35
4.1.2.	ryPNC1	41
4.1.3.	rhDBC1.....	42
4.2.	Efecto de oxidantes sobre rhSIRT	45
4.2.1.	Medidas de actividad desacetilasa	45
4.2.2.	Oxidación de tioles y otras modificaciones oxidativas	47
4.2.3.	Espectros de dicroísmo circular y fluorescencia	52
4.2.4.	Oxidación de tioles y liberación del Zn ²⁺	56
4.3.	Interacción DBC1/SIRT1	60
5.	Conclusiones y perspectivas.....	63
6.	Referencias	67
7.	Agradecimientos	76

Abreviaturas

AceCS	acetyl-CoA synthetase.
AKT	protein kinase B
APE1	apurinic/aprimidinic endonuclease 1
CPS1	carbamoyl-phosphate synthase 1
FOXO1	Forkhead box protein O1
GDH	glutamate dehydrogenase
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1 alpha
HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2
hSIRT1	human sirtuin 1
IDH2	isocitrate dehydrogenase 2
KO	knock out
LCAD	long-chain acyl-CoA dehydrogenase
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PAF53	RNA polymerase associated factor
PARP-1	poly(ADP-ribose) polymerase 1
PDC	pyruvate dehydrogenase complex
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
PGC1 α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha
PPAR α	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RC	restricción calórica
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
siARN	small interference ARN
SOD2	superoxide dismutase
SREBP-1c	sterol regulatory element binding protein c
TFAM	transcription factor A, mitochondrial
TNF α	tumor necrotic factor alpha
UCP-2	uncoupling protein 2

Resumen

Las sirtuinas conforman una familia de enzimas evolutivamente conservadas, presentes en un amplio rango de organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Estas enzimas cumplen funciones como la regulación de vías metabólicas altamente conservadas y procesos inflamatorios, procesos claves en la promoción de la salud. Las sirtuinas catalizan la desacetilación de proteínas acetiladas en residuos de lisina utilizando como segundo sustrato dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), dando como productos a la proteína desacetilada, nicotinamida y ADP-Ribosa acetilada.

En mamíferos se expresan siete isotipos de sirtuinas (SIRT1-SIRT7) con diferentes localizaciones a nivel celular y distintos sustratos proteicos.

La isoforma más estudiada es la SIRT1, y aunque el alcance y detalle de las funciones de SIRT1 aún no están completamente esclarecidos, existe evidencia abrumadora que sugiere que esta enzima censa la disponibilidad de nutrientes y transmite esta información a las proteínas que regulan la utilización del combustible celular y el mantenimiento de la homeostasis energética. Se han reportado resultados sorprendentes en modelos animales de ratones transgénicos obesos, o animales a los cuales se les induce trastornos metabólicos con dietas ricas en grasas, en donde una inducción de la expresión o un aumento de la actividad de SIRT1, corrige en parte los desbalances metabólicos asociados con la obesidad.

Sumado a esto se ha acumulado evidencia que asocia la actividad de sirtuinas con el desarrollo de patologías de corte pro-trombótico y pro-inflamatorio como síndrome metabólico. Está demostrado que el estrés oxidativo contribuye a una variedad de enfermedades inflamatorias crónicas donde una amplia gama de proteínas sufre modificaciones oxidativas reversible e irreversibles. Algunas de estas modificaciones pueden modular la actividad biológica de dichas proteínas o producir la pérdida de función de las mismas.

En este trabajo se realizó un estudio *in vitro*, del efecto de oxidantes biológicos sobre hSIRT1. Para ello, se obtuvo la enzima recombinante con un buen grado de pureza para estudiar el efecto de los oxidantes biológicos sobre su actividad enzimática y su estructura. Se constató la oxidación de algunos de sus residuos amionacidicos (cisteínas y tirosinas) acompañada de una

disminución en la actividad enzimática. Se analizaron espectros de dicroísmo circular de la proteína reducida y tratada con los distintos tratamientos para determinar cambios estructurales.

Por otra parte se obtuvieron herramientas para profundizar los estudios de la enzima aislada y en su interacción con DBC1 (proteína inhibidora de SIRT1). Estas herramientas fueron la puesta punto de un método de medida de actividad enzimática más fiable al que ya disponíamos. Y la generación de un vector de expresión de hDBC1 para producir la proteína en *E coli*. Aunque no se logró purificar del todo a esta última se logró avanzar en esa dirección.

Por último se realizaron experimentos preliminares para el estudio del efecto del estrés oxidativo en la interacción SIRT1-DBC1 en un modelo celular.

1. Introducción

Existen múltiples mecanismos moleculares encargados de la manutención del delicado balance en la homeostasis de los seres vivos. Se han identificado varias proteínas y complejos multiproteicos responsables de regular las vías metabólicas, encargadas de la obtención y administración de energía dentro de la célula. Hoy en día es bien conocido que el sedentarismo y las dietas ricas en grasas y azúcares refinados alteran el balance homeostático interfiriendo con el correcto funcionamiento de las vías que lo regulan. La obesidad, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico son causa y consecuencia de desórdenes en las vías de regulación del metabolismo. La comprensión de los mecanismos moleculares que regulan aspectos claves del metabolismo energético se ha convertido en un elemento de gran relevancia en la lucha contra estas patologías. En este sentido, se ha acumulado evidencia que apunta a las sirtuinas, enzimas desacetilasas dependientes de NAD, como proteínas claves en la orquestación de las distintas vías metabólicas involucradas en el metabolismo energético celular. Además se le atribuye a las sirtuinas la regulación de varios otros procesos fisiológicos de relevancia para el mantenimiento de la homeostasis de los organismos vivos a nivel celular y sistémico. Esta introducción hará foco principalmente en los procesos y vías donde participan las sirtuinas (y especialmente la SIRT1) que afectan el metabolismo energético y los procesos redox en distintos organismos.

1.1. Sirtuinas

En un principio se clasificaron las sirtuinas dentro de la familia de las desacetilasas de histonas de clase III (HDAC III). A diferencia del resto de las desacetilasas de histonas éstas tienen un mecanismo distinto de hidrólisis para la remoción de los grupos acetilos de las lisinas modificadas en su ϵ -amino, a expensas de NAD.

Las sirtuinas son una familia de enzimas con un alto grado de homología estructural en su núcleo catalítico con la enzima de *S. cerevisiae*, Sir2 (Silence Information Regulator 2) [1]. Esta enzima fue la fundadora de la familia y fue primero identificada como una enzima clave en el silenciamiento génico de

regiones del genoma de la levadura que controlan aspectos de su ciclo de reproducción sexual. La Sir2 desacetila histonas formando regiones más compactas en los cromosomas y consecuentemente generando el silenciamiento de secciones del genoma. Las sirtuinas remueven los grupos acetilo de los residuos de lisina acetilada, restaurando la carga positiva en el ϵ -amino de la lisina. La reacción produce el sustrato desacetilado, O-Ac-ADP-ribosa y nicotinamida, que es un inhibidor no competitivo de las sirtuinas. El grupo amino desacetilado queda cargado positivamente a pH fisiológico aumentando la afinidad de las histonas por los grupos fosfato cargados negativamente del ADN, haciendo que éste se enrolle más fuertemente. El mayor grado de compactación de la cromatina no permite acceder a la maquinaria de transcripción, por lo tanto, los genes codificados en estas regiones quedan silenciados.

Desde el descubrimiento de la Sir2, uno o más miembros de esta familia altamente conservada de enzimas, se han encontrado en prácticamente todas las especies, desde arqueas a mamíferos [2]. En bacterias se ha reportado solo una isoforma de sirtuina [3]. Organismos complejos cuentan con varios subtipos de sirtuinas. La mayoría de los vertebrados tienen siete isoformas (SIRT1-7) [4].

Además de histonas, las sirtuinas pueden desacetilar a otras proteínas, como factores de transcripción y enzimas. Y cada subtipo de sirtuinas cataliza la modificación de conjuntos de sustratos que a menudo se superponen [5]. Los sustratos difieren de acuerdo a la sub-localización celular de estas enzimas. La sirtuinas mitocondriales tienen varios blancos en las diferentes etapas de la producción de energía, las sirtuinas nucleares contribuyen a la reparación de daños en el ADN, y en el citosol, las sirtuinas actúan por ejemplo sobre proteínas del citoesqueleto [6].

A medida que se profundizó en el estudio de esta clase de enzimas, se caracterizaron nuevas actividades. En organismos superiores existen distintas isoformas de sirtuinas con distinta localización subcelular, y se vio que algunas sirtuinas no solo desacetilan lisinas sino que también catalizan otras reacciones que modifican postraduccionalmente proteínas. En la Figura 1 se muestra de manera muy esquemática algunas de las reacciones catalizadas por estas

enzimas. Algunas tienen actividad ribosiltransferasa mientras que otras pueden catalizar la remoción de grupos manoilo, succinilo, o lipoamilo.

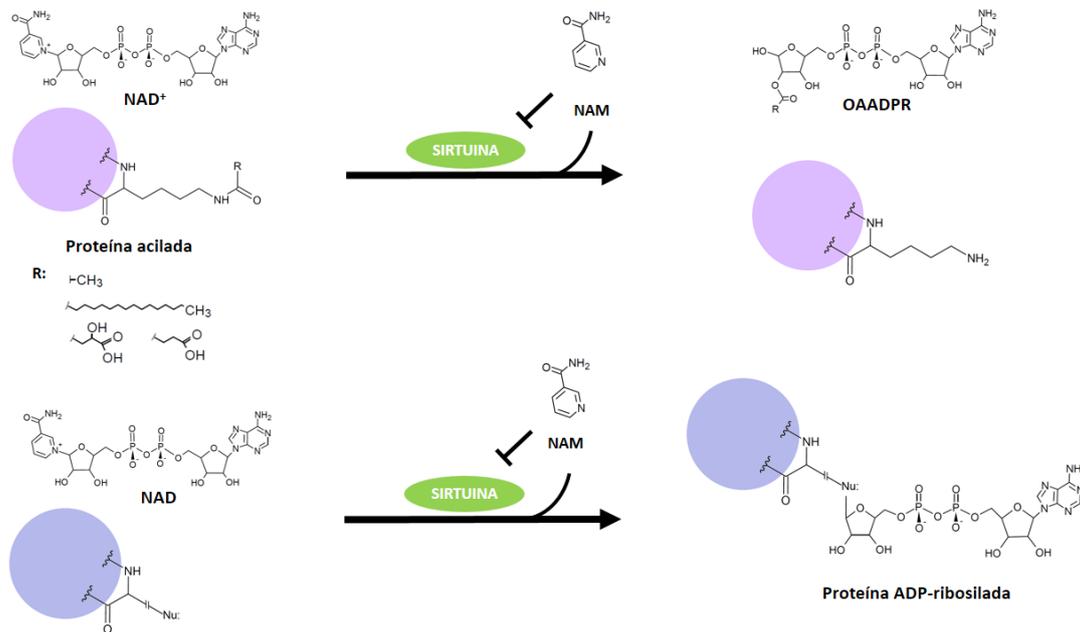


Figura 1 Esquema de algunas de las reacciones catalizadas por sirtuinas. En la parte superior se muestra de manera esquemática la reacción de deacilación y en la inferior un esquema de la ADP Ribosilación

Tempranamente se propuso que Sir2 desempeñaba una función clave en prolongar la sobrevivida de las células y luego se demostró que los homólogos de esta enzima en otros organismos también tienen un efecto positivo en la sobrevivida de los mismos [7], [8].

El interés científico en estudiar a las sirtuinas aumentó cuando se descubrió que Sir2 estaba involucrada en la prolongación de la vida media de levaduras mediada por restricción calórica (RC) [9]. Los modelos de RC se consiguen administrando dietas donde la ingesta de calorías se reduce de un 25 a 60% sin variaciones en el suministro de micronutrientes como son las vitaminas y los elementos traza. Durante mucho tiempo se ha sabido que la RC extiende la esperanza de vida de varios organismos tales como levadura, gusanos, peces, ratones y ratas [10]–[12]. Este mismo efecto en el aumento de la sobrevivida de diversos organismos también es observado aumentando la expresión de sirtuinas [13]–[17]. Sin embargo, a más de 10 años de los primeros reportes que vinculan la actividad de las sirtuinas con un aumento en la sobrevivida, aún no

existe un consenso sobre cuál es el papel que juegan las sirtuinas en este fenómeno. Sólo unos pocos modelos donde sobreexpresan sirtuinas en mamíferos han mostrado un aumento de la supervivencia [18]–[21]. El efecto de la RC sobre la concentración de NAD y la actividad sirtuina es distinto según el tejido estudiado [22]. En el músculo esquelético y tejido adiposo, tanto la concentración de NAD como la actividad de SIRT1 aumentan, lo opuesto ocurre en el hígado. A baja disponibilidad de calorías (RC) el almacenamiento de energía en el hígado disminuye y el organismo acude a las reservas de energía en el tejido adiposo y mantiene activo al músculo SIRT1 desacetila PGC1- α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) induciendo en las mitocondrias la oxidación de lípidos [23], y en el tejido adiposo SIRT1 reprime PPAR γ activando la movilización de lípidos [24]. Guarente y colaboradores observan que en el hígado, al bajar la actividad de SIRT1 no se estimulan las vías dependientes de la misma que implican el almacenamiento de energía [22]. Los resultados y las conclusiones de este trabajo fueron controversiales y están en discordancia con los resultados obtenidos por otros grupos, aspecto que será discutido más adelante.

1.2. Los isotipos de sirtuinas en humanos

Como se mencionó anteriormente, existen siete isoformas de sirtuinas en humanos. En la Tabla 1 se presenta, de manera resumida, características de las distintas isoformas. Los diferentes isotipos tienen distintas ubicaciones subcelulares [25]. Las SIRT1, 6 y 7 fueron identificadas como proteínas nucleares, aunque se sabe que SIRT1 puede translocarse al citosol celular dependiendo del tejido [25], [26]. Dentro del núcleo, SIRT6 se localiza predominantemente en las regiones ricas en heterocromatina mientras que SIRT7 se encuentra en el nucléolo [25]. SIRT2 se encuentra principalmente en el citosol, siendo uno de sus sustratos la α -tubulina [6], en tanto SIRT3-5 son sirtuinas mitocondriales [19, 23]. Algunos isotipos catalizan otro tipo de reacciones además de la desacetilación. SIRT1 es una desacetilasa NAD-dependiente, en tanto SIRT4 presenta actividad ADP-ribosiltransferasa [27], [28]. Se ha reportado que SIRT2, SIRT3 y SIRT6 cuentan tanto con actividad desacetilasa como ADP-ribosiltransferasa [6],[29],[30]. Además de desacetilación, SIRT5 al menos puede catalizar la desuccinilación y demalonilación in vitro e in vivo [31].

Tabla 1. Característica generales de las distintas isoformas de sirtuinas humanas [32]

Isoformas Humanas	Localización	Longitud	Posición del núcleo catalítico	Actividad catalítica	Sustratos	Funciones
SIRT1	Núcleo Citoplasma	747 aa	 254 489	Desacetilasa	p53, H3K9, H1K26, H4K16, PGC-1 α , SREBP-1c, PAR γ , NF- κ B, AKT, FOXO, HIF-1 α , TFAM, AceCS1, APE1, PARP-1	Lipogénesis (-) Gluconeogénesis (+/-) Lipólisis (+) Inflamación (-)
SIRT2	Citoplasma	352 aa	 40 294	Desacetilasa Desmiristoilasa	PEPCK, α -tubulina, H4K16, FOXO3a	Gluconeogénesis (+) Salida de la mitosis
SIRT3	Mitocondria	399 aa	 238 373	Desacetilasa	LCAD, HMGCS2, SOD2, IDH2, PDC, AceCS2	Acumulación de lípidos (-) Oxidación de ácidos grasos (+) Estrés oxidativo (-)
SIRT4	Mitocondria	314 aa	 47 308	ADP-ribosiltransferasa Lipoamidasa	GDH, PDC	Secreción de insulina (-)
SIRT5	Mitocondria	310 aa	 51 301	Desuccinilasa Desmalonilasa Desglutarilasa	CPS1	Ciclo de la urea (+)
SIRT6	Núcleo Retículo endoplasmático	355 aa	 45 257	Despalmitoilasa ADP ribosiltransferasa Desacetilasa Desmiristoilasa	H3K9, H3K56, TNF α , PARP1	Incorporación de glucosa (-) Inflamación (+) Reparación del ADN (+)
SIRT7	Núcleo	400 aa	 254 489	ADP ribosiltransferasa Desacetilasa	PAF53, H3K18	Transcripción de la ARN polimerasa I (+)

1.3. Estructura

Las sirtuinas tienen un dominio catalítico altamente conservado de cerca de 275 aminoácidos flanqueados por extremos amino y carboxilo variables que no participan directamente en la catálisis pero regulan su actividad [33]–[35].

A pesar de ser SIRT1 la isoforma más estudiada aún no se ha logrado obtener un modelo cristalográfico de la proteína completa. A la fecha hay reportadas varias estructuras pero sólo del núcleo catalítico de la enzima, co-cristalizada con sustratos y/o inhibidores. Una de las estructuras parciales más recientes es la co-cristalografiada con un fragmento de su extremo C-terminal [36]. Existe un modelo completo de la enzima generado por computadora en base a homología con otras proteínas de la familia y utilizando programas de predicción de estructura según secuencia [37]. La información estructural que se tiene sobre las sirtuinas proviene de las estructuras cristalográficas ya publicadas de: Sir2Af1 y Sir2Af2 de *Archea*, Hst2 de levadura, CobB bacterial, Sir2Tm de *Thermophilus* y SIRT2 humana [38]–[41].

El dominio catalítico de estas enzimas está conformado por dos dominios bilobulares, el grande y el pequeño. El dominio grande contiene a la región con conformación de Rossmann, característica de proteínas con sitio de unión a NAD o NADP oxidados y reducidos [42]. Este dominio consiste en una hoja beta central formada por seis cadenas beta paralelas y varias alfa hélices (el número depende de la sirtuina), que se empaquetan enfrentadas a la hoja beta. Este motivo se caracteriza por tener un bolsillo para el NAD con residuos cargados que acomodan a la ribosa y la secuencia Gly-X-Gly, importante en la unión del pirofosfato del NAD [39].

El dominio pequeño se conforma por dos subdominios estructurales. Uno de estos módulos tiene un plegamiento helicoidal formado por tres alfa hélices. En las sirtuinas de clase I (grupo en el que se encuentra SIRT1 de mamíferos) estas tres alfa hélices forman un bolsillo hidrofóbico que se propone estaría mediando el reconocimiento de residuos específicos en las proteínas sustrato. Información estructural proveniente de Sir2-Af1 unida a NAD⁺, Sir2-Af2 unida a p53, y SIRT2 humana sugieren que el módulo helicoidal sufre un cambio conformacional al unirse NAD permitiendo la interacción del mismo con la lisina acetilada del sustrato [38]. El segundo módulo contiene un sitio de unión al zinc

(Zn²⁺), conformado por dos cadenas beta antiparalelas que contienen dos motivos Cys-X-X-Cys separados por entre 15 y 20 aminoácidos encargados de coordinar al metal [38]. El zinc no participa en el mecanismo catalítico de las sirtuinas pero su presencia es necesaria para que la enzima funcione correctamente. En trabajos donde se reemplazan las cuatro Cys que coordinan al zinc por alaninas o donde se utiliza o-fenantrolina como quelante de zinc, la actividad enzimática disminuye notoriamente [38]. De esos resultados se desprende que el zinc estaría cumpliendo un rol en la mantención de la estructura de estas enzimas.

No se cuenta todavía con una estructura cristalográfica de SIRT1, pero se sabe que el núcleo catalítico guarda una gran homología de secuencia con la Sir2 [3]. En la Figura 2 se presenta la estructura cristalográfica de un heterodimero del núcleo catalítico de SIRT1 y un fragmento de la región carboxi-terminal [36]. En el trabajo de Auterio *et. al.* se propone un modelo de SIRT1 construido mediante herramientas bioinformáticas [37]. En dicho trabajo se predice, utilizando un programa para el modelado de regiones desordenadas DISOPRED, que tanto el dominio C- como el N-terminal se encuentran muy desestructurados, siendo el C-terminal el que cuenta con una mayor cantidad de segmentos estructurados [37]. Estas regiones contienen dos secuencias de localización nuclear en el extremo N y dos secuencias de exportación nuclear, una N-terminal y otra C-terminal [26].

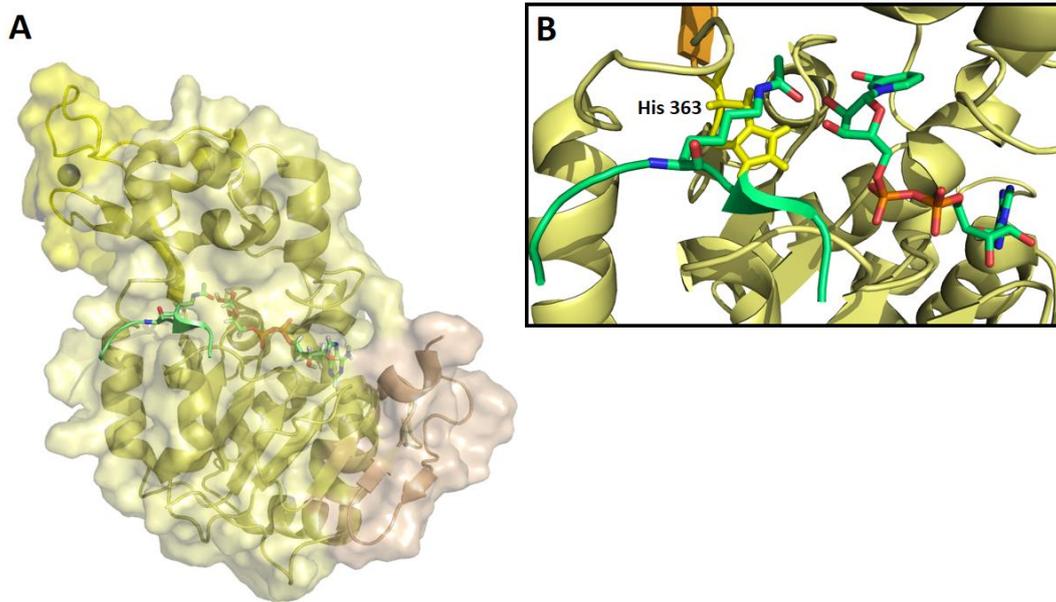


Figura 2. Estructura cristalográfica del núcleo catalítico de hSIRT1 A) Se muestra el heterodímero formado entre el núcleo catalítico (amarillo) y un fragmento regulador de la región carboxilo terminal (trigo). En otro tono de amarillo se denota el dominio lobular de unión al zinc. En verde se observa al NAD y al péptido acetilado. B) Se hace zoom del centro catalítico de la enzima con sus dos sustratos unidos y la histidina catalítica 363. La imagen es adaptada del PDB 4KXQ

Tanto la región carboxilo como amino terminal sufren modificaciones que modulan la actividad enzimática. Una región específica dentro del extremo N-terminal de la SIRT1 se une al núcleo catalítico y es indispensable para que la enzima sea activa [34]. Cuando se trabaja con la proteína recombinante con dicha región eliminada, se observa que la enzima pierde actividad desacetilasa y disminuye la afinidad por los sustratos acetilados tanto *in vivo* como *in vitro* [34].

En la sirtuina de levadura Hst2 se ha demostrado que las regiones N- y C-terminal interactúan intermolecularmente para dar lugar a la formación de trímeros de Hst2, lo cual fue constatado tanto en la proteína cristalizada como en solución [40]. La oligomerización de la enzima podría cumplir un rol en la regulación de la unión al sustrato acetilado y/o en la catálisis de la reacción de desacetilación [40].

1.4. Mecanismo catalítico

El mecanismo catalítico de las sirtuinas aún no ha sido completamente elucidado, sin embargo, hay varios estudios reportados que han arrojado luz sobre este aspecto [43]–[49].

Dado que es la desacetilación la reacción más característica de la sirtuinas, la mayoría de los trabajos se centran en el mecanismo catalítico de este tipo de reacción. En la Figura 3 se muestra esquemáticamente el mecanismo de desacetilación de las sirtuinas. Se sabe que la desacetilación NAD dependiente ocurre en dos pasos [48], [50].

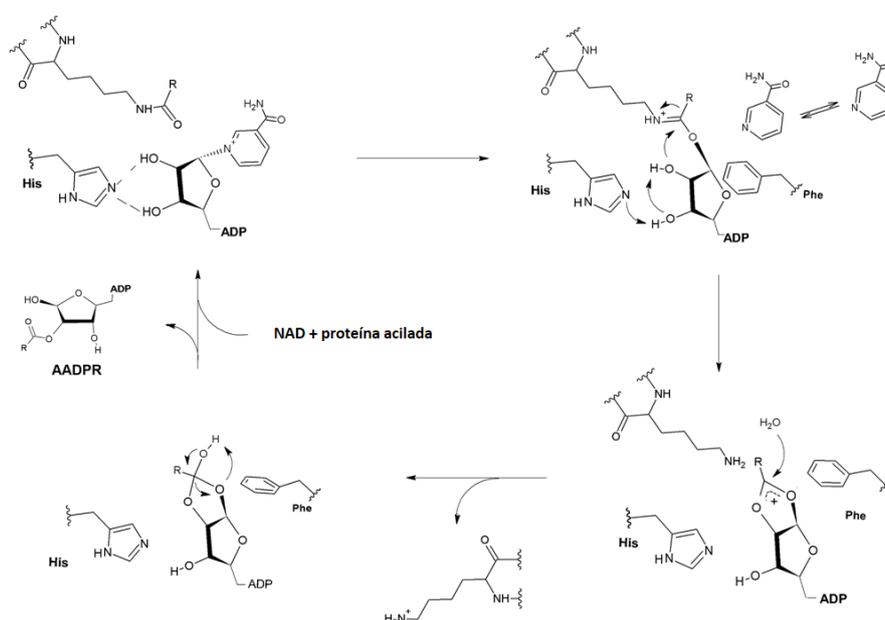


Figura 3 Esquema de mecanismo de reacción donde se muestra el ciclo catalítico propuesto para la desacetilación de proteínas mediada por sirtuinas.

En la primera etapa de la reacción se produce el ataque nucleofílico del oxígeno del carbonilo del grupo acetilo al carbono 1' de la ribosa. Esto libera la nicotinamida y forma al intermediario peptidil imidato. La nicotinamida puede volver a reaccionar con el peptidil imidato en una reacción de intercambio de base, regenerando nuevamente al NAD. Esta reversibilidad en la formación del intermediario de reacción determina la inhibición por producto en las sirtuinas [47], [51].

La formación del intermediario de reacción fue elucidado haciendo experimentos con inhibidores péptido miméticos de sustratos acetilados. Estos inhibidores detienen el mecanismo catalítico de la enzima en la formación del peptidil imidato lo que luego se puede analizar mediante cristalografía de rayos X [52]. No se sabe por completo si esta reacción se trata de una sustitución nucleofílica SN1 o SN2. En un mecanismo de tipo SN1, el enlace glucosídico se hidrolizaría antes del ataque nucleofílico del oxígeno del carbonilo, mientras que las dos reacciones se producirían simultáneamente en mecanismos del tipo SN2. Estudios de mecánica cuántica/ mecánica molecular (QM / MM) proponen una reacción del tipo SN2, lo que más adelante fue apoyado por resultados cinéticos donde además hacen experimentos QM /MM [53]–[55]. Sin embargo, todavía no hay consenso si el mecanismo es de hecho SN1, SN2 o SN2 asíncrono (implica características de ambos) [56].

La segunda etapa de la reacción incluye el paso determinante de la velocidad, con contribución de la histidina catalítica [38], [57]. Según lo descrito por Sauve, en la segunda etapa del ciclo catalítico la histidina catalítica actúa como base para desprotonar uno de los hidroxilos de la ribosa, lo que conduce a la formación de un intermediario bicíclico y la liberación del sustrato desacetilado [48]. Entonces, el agua descompone el compuesto intermedio bicíclico para formar el O-Ac-ADPR. Este orden de reacción fue cuestionado por un estudio de MM/QM que indicaba la descomposición del intermedio bicíclico ocurriría antes de la salida del sustrato desacetilado [50]. Por otra parte, se han recabado datos experimentales de que los dos productos de la segunda etapa se liberan al mismo tiempo [58]. En lo que concuerdan los distintos mecanismos propuestos, es que es la histidina catalítica la que participa en la reacción limitante [48], [50], [56].

Los mecanismos de otros tipos de reacciones catalizadas por sirtuinas no están aún tan estudiados. Se ha propuesto que las reacciones siguen mecanismos similares a los de la desacetilación, ya que producen el correspondiente O-succinil y el O-malonil-ADPR. Actividad de ADP ribosilación se ha observado en SIRT4 y SIRT6 [28], [59], [60]. En un trabajo donde se estudia la actividad de ADP-ribosilación de la Sir2T de la bacteria *Thermotoga marítima* se describe un mecanismo de catálisis [61]. Según este trabajo, la

transferencia de la ADP-ribosa se produce en argininas o lisinas a dos residuos de distancia de una lisina acetilada en dirección C-terminal. La reacción comienza inicialmente en la misma forma que el proceso de desacetilación, formando el intermediario ADPR peptidil imidato. Las argininas o lisinas nucleofílicas pueden atacar al intermediario aceptando la ADP ribosa mientras la lisina que estaba acetilada en un principio se mantiene de esa forma [61].

1.5. Funciones de SIRT1

La SIRT1 participa de manera central en vías que mantienen la homeostasis del metabolismo energético tanto a nivel celular como sistémico. Entre algunos de los procesos que modula la proteína se encuentran el metabolismo hepático de lípidos, la glicolisis, la gluconeogénesis, la secreción de insulina y la acumulación de grasa en tejido adiposo. Se ha establecido que SIRT1 actúa a distintos niveles según el tejido.

Algunos miembros de la familia de factores de transcripción FOXO (Forkhead-O-box), reguladores clave del metabolismo de lípidos, resistencia al estrés y apoptosis, son sustrato de SIRT1. SIRT1 aumenta la gluconeogénesis vía la desacetilación del factor de transcripción FOXO1 [62].

En el hígado SIRT1 activa la obtención de energía por oxidación de ácidos grasos deacetilando PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) [63].

El papel de la regulación de SIRT1 en la gluconeogénesis en el hígado es un aspecto que ha generado controversia al respecto. Por un lado hay evidencia experimental que apoya que SIRT1 aumenta la gluconeogénesis en el hígado vía la desacetilación de PGC1 α lo que induce la expresión de genes de enzimas gluconeogénicas como PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) y reprime la expresión de glucoquinasa que participa en la glicolisis, en respuesta al ayuno [64]. También se observó que al suprimir la expresión de SIRT1 en el hígado se provoca hipoglicemia así como una disminución en la expresión de PEPCK y G6Pasa (glucose 6-phosphatase) y un aumento en la expresión de GK (glucokinase) [65]. Por otra parte también se reportó la disminución de la

producción de glucosa hepática en un modelo de diabetes del tipo 2 en ratas, a las cuales se les disminuía la expresión de SIRT1 en hígado, utilizando oligos antisentido [66]. Otro de los trabajos que demuestra que SIRT1 activa la gluconeogénesis, es mediante la desacetilación de STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), levantando su efecto represor de la producción de glucosa [67]. STAT3 desacetilado deja de inhibir la expresión de PGC1- α factor que promueve la expresión de genes gluconeogénicos.

En contradicción con lo recién mencionando, hay trabajos que demuestran un accionar de SIRT1 que disminuye la gluconeogénesis hepática. En modelos animales donde se somete a ratones a periodos de ayuno, se observa que SIRT1 inhibe la fase temprana de la gluconeogénesis vía CRTC2 (CREB regulated transcription coactivator 2) [68]. El mismo trabajo observa un aumento en la producción de glucosa hepática en animales knock-out específicos para SIRT1 en el hígado [68]. En otro trabajo independiente también se observa disminución de la gluconeogénesis vía la desacetilación de CRTC2 por SIRT1, en este caso animales tratados con metformina, un medicamento para el tratamiento de la diabetes [69]. También se ha reportado cómo SIRT1 regula positivamente la transcripción de genes que desencadenan la fosforilación de AKT y FOXO1 lo que resulta en una disminución en la expresión de genes pro- gluconeogénicos [70].

Es claro que la regulación de la gluconeogénesis hepática es un mecanismo muy complejo y que hasta el momento no se ha elucidado completamente cuál es el rol de SIRT1 en el mismo.

Por otra parte SIRT1 modula la actividad de la fosfoglicerato mutasa 1 (PGAM1), una de las enzimas que participa en una de las vías metabólicas más conservadas como es la glicolisis. La sirtuina desacetila a la enzima PGAM1 disminuyendo su actividad y por lo tanto disminuyendo la tasa de glucólisis [71].

Por otro lado, en trabajos donde la expresión de SIRT1 es silenciada utilizando shRNA (short hairpin RNA), se observa una disminución en la expresión de los genes participantes en la β -oxidación de ácidos grasos en hígado de ratones sometidos a ayuno [65]. La disminución de la β -oxidación también fue constatada en ratones KO para la enzima en hígado [74]. Si se

somete a estos animales a una dieta rica en grasas (HFD), los mismos desarrollan esteatosis hepática, dislipidemia e inflamación del hígado[63]. En cambio, en ratones KO para DBC-1 (una de las proteínas inhibidoras de la SIRT1), se observa una menor susceptibilidad de estos animales a desarrollar esteatosis hepática inducida por HFD [72]. También se ha visto, que la sobreexpresión hepática de SIRT1, atenúa la esteatosis hepática y restituye la homeostasis de la glucosa [73].

SIRT1 regula el metabolismo del colesterol mediante la desacetilación de SREBPs, reguladores críticos en el metabolismo lipídico que promueven la expresión de genes colesteronigénicos y lipogénicos y de genes implicados en el almacenamiento de lípidos [74]. La desacetilación de SREBP1c mediada por SIRT1, la hace más sensible a la ubiquitinación haciendo que se degrade más rápido, disminuyendo la cantidad de proteína dentro de la célula. Esto trae como consecuencia una disminución en la expresión de genes involucrados en la lipogénesis. A nivel del tejido adiposo blanco participa en el almacenaje de ácidos grasos y en el metabolismo de la glucosa reprimiendo la actividad de PPAR γ [24].

SIRT1 también participa en la secreción de insulina por las células β del páncreas. Ha sido reportado que en ratones transgénicos a los cuales se les aumenta la dosis genética para SIRT1 en células β pancreáticas, se mejora la tolerancia a la glucosa y se potencia la secreción de insulina en respuesta a la glucosa [75]. En tanto en líneas celulares β de páncreas donde se disminuye la expresión de SIRT1 mediante siARN (small interference ARN), se observa que disminuye el efecto de la glucosa en la estimulación de secreción de insulina [76]. En ambos trabajos se concluye que SIRT1 promueve la secreción de insulina reprimiendo la transcripción de UCP2 (uncoupling protein 2).

1.6. SIRT1 regulador de la inflamación

Hoy se sabe que SIRT1 cumple también un papel importante en vías de represión de procesos inflamatorios [77]–[80]. En ratones, la sobreexpresión de SIRT1 conduce a la supresión de la respuesta inflamatoria, mientras que ratones SIRT1 knock-out inducen la inflamación sistémica tras la exposición a dieta rica

en grasas [81], [82]. Por otra parte, el silenciamiento de SIRT1 en hepatocitos genera un aumento de la inflamación en animales sometidos a una dieta rica en grasas [63]. Se cree que el efecto beneficioso de SIRT1 sobre los trastornos metabólicos, se debe en parte a su capacidad para suprimir la actividad de NF- κ B, regulador clave de la respuesta inflamatoria celular [83]. Está reportado que SIRT1 desacetila RelA / p65 (subunidad de NF- κ B) en su lisina 310, lo que conduce a una disminución en la actividad transcripcional NF- κ B, disminuyendo la expresión de citocinas proinflamatorias y genes anti-apoptóticos. Por otra parte, la sobreexpresión moderada de SIRT1 en ratones conduce a la reducción de la actividad de NF- κ B, mientras que en la línea celular RAW264.7 y en macrófagos intraperitoneales KO para SIRT1, aumenta la secreción de TNF α estimulada por LPS [79]. Por otra parte, se ha demostrado que el humo del cigarrillo disminuye los niveles de proteína SIRT1 celulares, causando el aumento de NF- κ B acetilado, que induce una respuesta proinflamatoria en macrófagos humanos [77]. En un trabajo donde utilizan ratones KO SIRT1 específico de macrófagos, se demostró in vivo que SIRT1 desacetila la subunidad RelA/p65 de NF- κ B atenuando la transcripción de genes bajo el control de dicho factor de transcripción, predisponiendo a los ratones a generar resistencia a la insulina y síndrome metabólico [80].

Por otro lado, se ha determinado que la actividad y la expresión de SIRT1 están bajo control de la inflamación sistémica. Por ejemplo, se ha demostrado que IFN γ , una citoquina pro-inflamatoria, reprime la transcripción de SIRT1 alterando de esta manera el metabolismo y el gasto energético [84]. Por otra parte, también se ha visto en condrocitos que TNF α induce la hidrólisis de SIRT1 mediada por catepsina B [85]. Ratones alimentados con una dieta rica en grasas (HFD) induce la degradación de SIRT1 en el tejido adiposo por caspasa-1 [86]. Por lo tanto, se puede concluir que SIRT1 participa activamente en procesos inflamatorios y es regulada por éstos a distintos niveles. Parece claro que SIRT1 es uno de los eslabones que conectan procesos inflamatorios con desórdenes metabólicos.

1.7. Estrés oxidativo

Como parte de los procesos fisiológicos asociados al metabolismo aeróbico ocurren, tanto dentro como fuera de las células, procesos por los cuales se generan compuestos oxidantes que pueden dañar distintos componentes celulares. Estos compuestos, en condiciones normales, pueden ser neutralizados por sistemas enzimáticos y moléculas antioxidantes. En principio se definió al estrés oxidativo como un desbalance entre oxidantes y antioxidantes [87]. Al aumentarse la comprensión respecto a la biología redox, se demostró que los compuestos oxidantes también tienen un rol de intermediarios en vías de señalización redox [88], [89]. Por ello el concepto de estrés oxidativo fue ampliado y redefinido como “un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes en favor de los oxidantes, que da lugar a una disrupción de la señalización redox y/o el control del daño molecular” [90].

Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y RNS por su abreviatura en inglés) se generan endógenamente en condiciones fisiológicas (como ser por la fuga de electrones en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, como producto de reacciones enzimáticas o autoxidaciones) y más aún durante procesos inflamatorios u otras condiciones de estrés oxidativo. El peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito (H_2O_2 , ONOO^-) son ejemplos de especies reactivas que pueden generar daño a distintos componentes celulares [91], [92]. El H_2O_2 es generado in vivo por la dismutación del radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$, generado principalmente por reducción parcial del O_2 en la respiración celular por la fuga de electrones en la mitocondria. Además, como producto de reacciones enzimáticas como ser la NADPH oxidasa (Nox) y la xantina oxidasa [93]. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede dismutar espontáneamente a H_2O_2 o catalizado por la superóxido dismutasa (SOD). Otras fuentes enzimáticas productoras de H_2O_2 son la xantina oxidasa, glucosa oxidasa, D-aminoácidos oxidasas, urato oxidasa, entre otras [94]. El H_2O_2 puede reaccionar con Fe^{2+} en una reacción tipo Fenton formándose el radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$ el cual es extremadamente reactivo y oxidante. El H_2O_2 puede reaccionar directamente con tioles proteicos y de bajo peso molecular para dar ácido sulfénico que condensa con otro tiol para formar disulfuro o reacciona con otro H_2O_2 para dar ácido sulfínico.

Por otra parte el ONOO^- es generado por la reacción entre dos radicales, el O_2^- y el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). El $\cdot\text{NO}$ cumple la función de mensajero intercelular en vertebrados modulando la presión arterial, la trombosis y la actividad neuronal. La enzima encargada de la síntesis de $\cdot\text{NO}$ es la óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial, inducible y neuronal [92]. El ONOO^- puede reaccionar directamente con sulfhidrilos proteicos, o puede mediar reacciones indirectas al descomponerse en especies radicalares más reactivas como por ejemplo radical $\cdot\text{OH}$ y dióxido de nitrógeno $\cdot\text{NO}_2$. También puede reaccionar con CO_2 para dar radical carbonato CO_3^- y $\cdot\text{NO}_2$ [92]. En suma, el peroxinitrito puede llevar a la oxidación de proteínas por distintas vías, modificando fundamentalmente residuos de cisteína (a ácido sulfénico, sulfínico, disulfuro), metionina (metionina sulfóxido) y tirosinas (3-nitro tirosina). La formación de nitrotirosinas proteicas es de particular importancia pues se trata de una modificación NO_2 -dependiente, que no puede llevarla a cabo las ROS [95].

1.8. Modificaciones redox en SIRT1

Aunque existen algunos trabajos donde se explora el efecto de moléculas oxidantes sobre la estructura y actividad de las sirtuinas, la bibliografía sobre el tema hoy es escasa. Zee et al, incubando hSIRT1 recombinante con nitrosoglutación (GSNO) observaron mediante espectrometría de masa, la glutationilación de la Cys 67 [96]. Según el mismo trabajo, la glutationilación de esta cisteína no afecta la actividad desacetilasa pero sí afecta la activación de la enzima mediada por resveratrol [93]. Además de encontrar a la Cys 67 glutationilada identificaron indirectamente mediante alquilación diferencial, cinco cisteínas (incluyendo a la Cys 67) como residuos susceptibles a ser glutationilados por el GSNO. Tres de estas cisteínas (C67, C268 Y C623) se encuentran expuestas al solvente según el modelo estructural de hSIRT1 generado por computadora [37]. En cambio, en otro trabajo del mismo año, donde también tratan *in vitro* a SIRT1 recombinante con GSNO, observan transnitrosilación de la sirtuina con consecuente pérdida de su actividad [98]. En dicho trabajo identifican la nitrosilación de Cys 387 y Cys 390, dos de las cisteínas que coordinan al Zn^{2+} en la SIRT1 murina. Observaron también que la modificación de estas cisteínas lleva a la pérdida de actividad enzimática de la

sirtuina. La transnitrosilación de SIRT1 también se determinó en experimentos *in vivo* donde se trataron células HEK293 con GSNO o células HEK293-nNOS con un inductor de la NOS. En este trabajo concluyen que el dador de NO para la transnitrosilación de SIRT1 *in vivo* es GAPDH nitrosilada. Es la GAPDH que transloca al núcleo y transnitrosila a la SIRT1 afectando su actividad, por ejemplo, disminuyendo la expresión de PGC1 α [98].

En experimentos donde expresan de manera transitoria a mSIRT1 en células HepG2 y las tratan con H₂O₂ o con CysNO, se observó disminución en la actividad de la sirtuina desacetilando p53 [99]. Haciendo experimentos con sobreexpresión de mutantes de distintas cisteínas, identifican tres mutantes C61S, C318S y/o C613S que presentan una mayor actividad desacetilasa que cuando sobreexpresan en la mismas condiciones a la proteína wt. Además, los mutantes son insensibles a la inactivación en los tratamientos con oxidantes [99]. Los autores de este trabajo sugieren que las cisteínas de SIRT1 que identificaron con los mutantes, son las responsables del efecto inhibitorio con oxidantes biológicos; son oxidadas formando aductos con glutatión que pueden ser revertidos por Grx-1 [99]. Ninguna de las tres cisteínas referidas en este trabajo participa en la coordinación del zinc.

Por otra parte se ha identificado a la enzima APE/Ref-1 como encargada de mantener reducida a SIRT1 *in vivo* [100]. La sobreexpresión de APE/Ref-1 en cultivos celulares repercute en un aumento en la actividad de SIRT1 así como también en la cantidad de cisteínas reducidas de la enzima. Según sus experimentos con mutantes, las cisteínas que son reducidas por APE/Ref-1 son C371 y C374, dos de las que coordinan al zinc en hSIRT1. Sin embargo, en el trabajo de Kornberg no se identifica a estas dos cisteínas como susceptibles a la nitrosilación [98].

Finalmente, se ha reportado que el tratamiento de células epiteliales humanas con N-etil maleimida (NEM) produce una disminución en los niveles intracelulares de SIRT1 y también la alquilación de cisteínas de la SIRT1, aunque no se identificaron cuáles son alquiladas [101].

Para concluir, hay que mencionar que se han reportado modificaciones redox en otras isoformas de sirtuinas. Se ha encontrado que SIRT3 aumenta su carbonilación en modelos *in vivo* [102]. También se ha reportado la sulfenilación

de cisteínas en SIRT6 (C18 que no participa de la coordinación con zinc) [103] y la nitración de la tirosina 257 [104].

1.9. Regulación de SIRT1 por otras proteínas durante el estrés oxidativo

Además de modificaciones oxidativas de sus residuos que afectan su actividad enzimática, SIRT1 también es regulada por estrés oxidativo a través de su unión a proteínas reguladoras. Los principales proteínas reguladoras descritas hasta el momento son DBC1 (deleted in breast cancer 1) [105] proteína inhibitoria y AROS (active regulator of SIRT1) [106] proteína activadora, y ambas están involucradas en la respuesta de SIRT1 ante el estrés oxidativo [106], [107].

En trabajos en células donde se silencia la expresión de AROS se observa una disminución en la respuesta de SIRT1 ante el estrés oxidativo [106].

Con respecto a los cambios en la interacción SIRT1/DBC1, se sabe que en situaciones de estrés oxidativo se promueve la fosforilación de DBC1 (Thr454) por un mecanismo ATM / ATR (quinasas de serina y treonina) dependiente. Esto aumenta su afinidad por SIRT1 y conduce a la inhibición de su actividad desacetilasa [107]. Curiosamente, en experimentos con ratones, tanto la obesidad como el envejecimiento [72], [108] conducen a una mayor proporción de SIRT1 unida a DBC1 [105], lo que lleva a una disminución en la actividad de SIRT1.

Por último, cabe mencionar que se ha demostrado recientemente que durante el estrés oxidativo SIRT1 es secuestrada en el citoplasma en caveolas, observándose una asociación directa entre SIRT1 y caveolina-1 [109].

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis de trabajo

Se ha acumulado evidencia que asocia la actividad de sirtuinas con el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles, como la obesidad, diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares, todas patologías con un fuerte componente de estrés oxidativo e inflamación en sus etiologías. De hecho, se ha demostrado que el estrés oxidativo contribuye a una variedad de enfermedades inflamatorias crónicas donde una amplia gama de proteínas sufre modificaciones oxidativas reversibles e irreversibles como ser la formación de enlaces disulfuro, la S-nitrosación y S-glutacionilación, la carbonilación de distintos aminoácidos o la nitración de tirosinas. Algunas de estas modificaciones pueden modular la actividad biológica de dichas proteínas o producir la pérdida de función de las mismas.

SIRT1 cuenta con 19 residuos de cisteína, 4 de ellos coordinan tetraédricamente a un átomo de Zn^{2+} que cumple un rol estructural, algunos se encuentran expuestos al solvente, más disponibles a participar en reacciones de óxido-reducción. Si bien no hay residuos de cisteína que participen de la catálisis la modificación de estos residuos por especies oxidantes podría llevar a cambios estructurales y/o de interacción con otras proteínas que represente un mecanismo más de regulación de la SIRT1.

Asimismo la interacción SIRT1-DBC1 es un conocido mecanismo de regulación de la actividad desacetilasa. Más aún, la disociación de este complejo parece ser un potencial mecanismo de activación farmacológica. Conocer cómo afecta una situación de estrés oxidativo/inflamación a la asociación de estas proteínas, contribuirá a comprender los mecanismos de regulación de SIRT1 *in vivo*, y de posibles intervenciones farmacológicas.

2.1. Objetivos específicos

- 1) Caracterizar las posibles modificaciones oxidativas en SIRT1 recombinante, generadas por el tratamiento con especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Determinar cambios estructurales y/o de actividad de la enzima.
- 2) Estudiar cómo afecta la oxidación de SIRT1 (y/o DBC1) en la interacción DBC1-SIRT1.

3. Materiales y métodos

3.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

3.1.1. Expresión de rhSIRT1

Se transformaron por shock térmico células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 Star™(DE3) (Invitrogen), con el plásmido de expresión de SIRT1. Con las células transformadas, se procedió a plaquear en LB-Agar con 0,1 mg/ml de ampicilina y a incubar la placa toda la noche a 37 °C.

A partir de una colonia aislada crecida en placa se inoculan matraces de 20 ml de LB con ampicilina 0,1 mg/ml. Se incuba toda la noche a 37 °C a 200 rpm. A partir de este cultivo se procede a realizar un cambio de escala inoculando matraces de 1 L de LB, ampicilina 0,1 mg/ml, con el volumen necesario para que el valor de absorbancia a 600 nm (DO_{600nm}) sea de 0,04. Se incuba a 37 °C a 220 rpm hasta que el cultivo alcance una DO_{600nm} entre 0,6-0,8 para luego inducir la expresión de la proteína agregando isopropilo- β -D-tiogalactopiranososa (IPTG) 0,5 mM. Se incuba a 16 °C a 220 rpm 20 h. Las células se cosechan centrifugando a 7.000 g durante 20 min. El pellet obtenido se resuspende en amortiguador fosfato salino (PBS) y se vuelven a precipitar las células centrifugando a 10.000 g durante 15 min. Se descarta el sobrenadante y el pellet se puede guardar a -20 °C hasta su utilización.

3.1.2. Preparación de extracto libre de células

Para el lisado de las células se resuspenden las mismas en amortiguador de lisis Tris/Cl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, β -mercaptoetanol (β ME) 3 mM, lisozima 0,5 mg/ml, PMSF 0,1 mM, leupeptina 10 μ g/ml y aprotinina 5 μ g/ml, durante 30 min en baño de hielo. Se utilizan 5 ml de amortiguador de lisis por gramo de pellet para resuspender a las células. Se agregan 2 μ g/ml ADNasa I inmediatamente antes de sonicar con un macrotip (1 s on - 3 s off), amplitud 40%, durante 40 s tres veces. Se sedimentan los restos celulares centrifugando a 20.000 g durante 30 min. El sobrenadante es filtrado por filtros de 0,45 μ m.

3.1.3. Purificación por cromatografía de afinidad

El clarificado se carga en una columna de IMAC (cromatografía de afinidad por iones inmovilizados) HisTrap FF 5ml (GE), a un flujo 5 ml/min. La cromatografía se realiza conectando la columna a un sistema de cromatografía líquida de proteínas ÄKTA Prime Plus (GE). Los amortiguadores utilizados para la corrida son: A (Tris base 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM, β ME 3 mM); B (Tris/HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM, β ME 3 mM).

3.1.4. Purificación por cromatografía de intercambio aniónico

El eluido de la IMAC es dializado toda la noche para remover el NaCl y el Imidazol de la muestra. El amortiguador de diálisis utilizado es Bis-Tris 25 mM pH 6. Se carga la muestra en una columna Hitrap Q de 1 ml. La elución se realiza eluyendo con un gradiente de NaCl de 50 mM a 1 M en Tris/HCl 50 mM pH 7,5 β ME 3 mM.

3.1.5. Purificación por gel filtración

Para este paso se utiliza una columna de exclusión molecular Superdex 16/60 200 pg (GE). La fase móvil es amortiguador C (Tris/HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, β ME 5mM). En esta ocasión también fue utilizado el equipo ÄKTA Prime Plus.

3.1.6. Expresión de ryPnc1

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 en tandem con cola de histidina. A partir de precultivos ON (over night) de las bacterias transformadas se cambia de escala a 1 L de LB. Se deja crecer el cultivo hasta que alcance una Abs. a 600 nm de 0,6. Una vez alcanzada la Abs. deseada se induce la expresión

de la enzima durante 4 h a 25 °C con 0,5 mM IPTG. De aquí en más se procede a cosechar las células como se describe en el punto 3.1.1.

3.1.7. Purificación de Pnc1

El extracto libre de células preparado como se describe en 3.1.2., es cargado en una columna His Trap de 1 ml. Se utiliza amortiguador A (Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, β ME 3 mM, Imidazol 30 mM), amortiguador B (Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 150, β ME 3 mM, Imidazol 500 Mm). El eluido de la IMAC se pasa por una columna PD10 para eliminar el imidazol contra un amortiguador 50 mM Na_2PO_4 pH 7,5 , 150mM NaCl, 3mM β ME.

3.1.8. Clonado del vector de expresión de hDBC1

Se utilizó la tecnología de clonado libre de enzimas de restricción. La secuencia de hDBC1 fue levantada de un vector de expresión de hDBC1 para células eucariota. Referenciado con el número #38082 en el repositorio de Adgene. Los cebadores utilizados para la primer ronda de PCR fueron:
 For:GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCCATGTCCCAGTTTAAGCGC
 CAGCGG
 Rev:GAACTGCGGGTGGCTCCAGCTGCCGGATCCTCAGTTGCTAGGTGCC
 GGCTCCTCC

Se utilizaron 40 ng de plásmido molde 400 nM de cada uno de los cebadores, 250 μ M de cada dNTP y 1 U de polimerasa Phusion (New England Biolabs) en un volumen mezcla de reacción 50 μ l. En la Tabla 2 se muestra las condiciones de las PCR

Tabla 2. Condiciones de ciclado

<i>Primera ronda de PCR</i>			<i>Segunda ronda de PCR</i>		
Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones	Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
95 °C	3 min	1	95 °C	3 min	1
95 °C	30 s		95 °C	30 s	
62 °C	30 s	32	69 °C	1 s	32
72 °C	1,30 min		72 °C	5 min	
72 °C	5 min	1	72 °C	5 min	1

El producto de la primer PCR es purificado corriendo primero un gel de agarosa 1 %, para extraer del gel la banda de 3 kD correspondiente con el producto de PCR esperado. El ADN se extrae del gel y es purificado utilizando un kit de Invitrogen. La concentración de ácidos nucleicos se cuantifica a 260 nm.

Para la segunda ronda de PCR se utilizaron 30 ng de vector pQE-80L vacío, 120 ng de megaprimer, 400 nM de cada uno de los cebadores, 250 μ M de cada dNTP y 1 U de polimerasa Phusion (New England Biolabs) en un volumen mezcla de reacción de 50 μ l.

3.1.9. Expresión y purificación de DBC1

Para la expresión y purificado de DBC1 se procedió de igual manera que con SIRT1, como se describió en los puntos 3.1.1-3 con algunas modificaciones en la purificación por IMAC. Para DBC1 se utilizaron columnas HisTrap de 1 ml, y se eluyó la fracción unida a la columna en 3 ml de amortiguador Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM, β -Mercaptoetanol 3 mM, utilizando una jeringa

3.2. Control de calidad y rendimiento de la producción de las enzimas recombinante

3.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las fracciones de los pasos de purificación se analizan por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida discontinuo (SDS-PAGE) con entrecruzamiento del 10% para el gel resolutivo y de 5% para el gel concentrador. 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. Las muestras son calentadas a 100 °C durante 5 minutos.

Para el revelado de las bandas proteicas en los geles, éstos se tiñen con solución coloidal Azul de Coomassie [90].

3.2.2. 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 trípica 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*.

3.2.3. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determina por el método de Bradford, utilizando ovoalbúmina como estándar [91].

En algunas ocasiones se calcula concentración de rhSIRT1 midiendo absorbancia a 280 nm utilizando un coeficiente de absortividad molar calculado teóricamente según la ecuación que se presenta a continuación:

$$\epsilon_{280} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}] = 5500 \times n_{\text{Trp}} + 1490 \times n_{\text{Tyr}} + 125 \times n_{\text{ss}}$$

Para hSIRT1 que contiene 4 residuos de triptófano, 16 de tirosina y despreciando el aporte de los enlaces disulfuros, el coeficiente de absortividad molar a 280 nm teórico es: $\epsilon_{280} = 45.840 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [92]. Las medidas de absorbancia se realizaron en espectrofotómetro Cary 50 (Varian).

3.3. Medidas de Actividad

3.3.1. Método fluorescente

Las medidas de actividad se realizan mediante un método discontinuo de dos pasos que se esquematiza en la Figura 4A. El método es ampliamente utilizado en la literatura y se basa en la utilización del péptido FdLP como sustrato de la enzima [86]. El ensayo se lleva a cabo en amortiguador Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,5 % BSA. Las medidas se realizan utilizando distintas concentraciones de la hSIRT1r y concentraciones casi saturantes de los sustratos: 500 μM de NAD⁺ y 25 μM de péptido acetilado. Las reacciones de desacetilación se llevan a cabo a 25 °C.

Las reacciones se inician con el agregado de NAD^+ al resto de los componentes de la mezcla de reacción. Se toman alícuotas a distintos tiempos deteniendo la reacción con el agregado de nicotinamida (NAM) a una concentración final de 5 mM. Una vez hechas todas las tomas, se les agrega una solución de tripsina disuelta en amortiguador de ensayo para alcanzar una concentración final de 1 mg/ml de tripsina. Esta mezcla se deja incubando durante 30 min a 37 °C y luego se mide la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm en lector de placas Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific Inc.).

3.3.2. Método acoplado

También se puso a punto la medida de actividad de SIRT1 mediante un método acoplado continuo reportado en [110] y esquematizado en la Figura 4B. Este método se basa en acoplar la actividad desacetilasa de las sirtuinas con la actividad nicotinamidasa de Pnc1, que produce NH_3 , uno de los sustratos de la glutamato deshidrogenasa junto con α -cetoglutarato y NADPH. Se puede seguir la reacción en forma continua registrando en el tiempo la caída de la absorbancia a 340 nm del NADPH al oxidarse. Las concentraciones de los componentes del sistema pueden variar un poco según la medida pero generalmente se utiliza: NADPH 200 μM , α -cetoglutarato 3 mM, Pnc1 3 μM , NAD 500 μM , péptido TARK(Ac)STG 600 μM . La reacción se comienza con el agregado de enzima a los 10 min de haber mezclado el resto de los componentes de reacción.

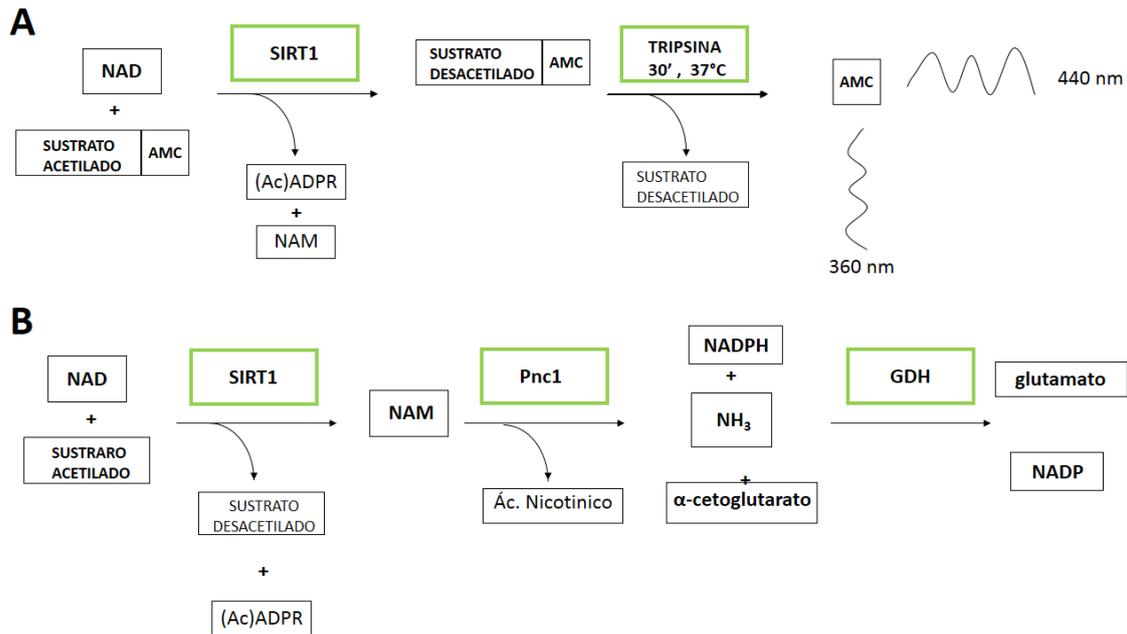


Figura 4. Esquema de funcionamiento de los métodos de medida de actividad de SIRT1. **A.** Método de medida con el péptido fluorescente en dos pasos. Se toman alicuotas en el tiempo a medida que avanza la reacción deteniendo la misma con NAM. Luego, a cada una de las alicuotas colectadas se les agrega tripsina durante 30 min a 37 °C. La fluorescencia de la AMC es medida a 360 nm = λ_{ex} , 440 nm = λ_{em} . **B.** El método acoplado se basa en registrar espectrofotométricamente la caída de la absorbancia a 340 nm del NADPH al oxidarse. En este método se acopla la actividad desacetilasa de la SIRT1 a la actividad nicotinamidasas de Pnc1 y a la actividad oxidasa de a glutamato deshidrogenasa.

3.4. Tratamiento con oxidantes biológicos

3.4.1. Medidas de peróxidos

El H_2O_2 se cuantifica espectrofotométricamente a 240 nm realizando diluciones intermedias en agua destilada ($\epsilon_{240nm} = 43,6 M^{-1}cm^{-1}$).

El peroxinitrito es diluido en NaOH 10 mM midiendo inmediatamente la absorbancia a 302 nm ($\epsilon_{302nm} = 1670 M^{-1}cm^{-1}$).

Los stocks de trabajo se preparan frescos para la realización de cada uno de los experimentos.

3.4.2. Exposición de la proteína a los oxidantes

Previo a los tratamientos con los oxidantes, se realizan cambios de amortiguador para remover el DTT a un amortiguador fosfato 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, DTPA 100 μ M, mediante gel filtración utilizando en algunos casos columnas de PD-10 y en otros columnas Hi Trap Desalting (GE). En la sección

de resultados se explicita las concentraciones de proteína y oxidante utilizadas en cada ensayo así como el tiempo de exposición a los compuestos oxidantes (en particular para H₂O₂).

3.5. Western blots para detección de especies oxidadas

3.5.1. Western anti-nitrotirosina

Las muestras tratadas y control se prepararon para correr SDS-PAGE diluyéndolas en amortiguador Laemmli [111]. La muestra se corre según las condiciones descritas en el punto 3.2.1. Luego de la corrida las proteínas son transferidas a una membrana de PVDF durante 1 h 30 min a 100 V a 4 °C. El bloqueo se realiza durante una hora bajo agitación utilizando TBS 0,3% Tween, 5% BSA. Para la inmunodetección la membrana se incuba toda la noche con anticuerpo policlonal anti-NO₂Y diluido 1:1000 en TBS-T. Luego de sucesivos lavados con TBS-T para eliminar el anticuerpo secundario no unido a las proteínas transferidas a la membrana, se incuba la membrana 1 h con anticuerpo anti-conejo conjugado a HRP. Se procede a lavar nuevamente a la membrana y a revelar por quimioluminiscencia utilizando ECL plus (GE Healthcare).

3.6. Cuantificación de tioles

3.6.1. Cuantificación de tioles con ditiodipiridina

Primeramente se llevan las muestras a una concentración adecuada para hacer la medida. Luego las muestras se diluyen a la mitad con una solución de ditiodipiridina 500 µM en amortiguador fosfato y se mide absorbancia a 324 nm. Se calcula la concentración de tioles utilizando $\epsilon = 21400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Se tienen en cuenta los factores de dilución y la concentración inicial de proteína para calcular la concentración de tioles reducidos. Este método fue adaptado de [112].

3.6.2. Cuantificación de tioles titulando con PCMB

Para la titulación con p-cloro mercuribenzoato (PCMB) se preparan stocks 2 mM PCMB y se titulan las muestras agregando de a 1 μ l y siguiendo absorbancia a 250 nm.

3.7. Cuantificación de Zn²⁺

Para cuantificar el Zn²⁺ desprendido de la enzima se utiliza 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR) . Se prepara PAR en agua a una concentración 2 mM. Se utiliza una concentración final de PAR en la cubeta de 40 μ M. La concentración de Zn²⁺ se determina según el $\epsilon_{500nm} = 66.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, para el complejo PAR:Zn²⁺ [113].

3.8. Espectros de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular en el UV cercano y lejano fueron adquiridos a 20°C en un espectropolarímetro Jasco 810 con control de temperatura (Facultad de Ciencias Exactas, UBA, Argentina). Para el UV cercano se realizaron medidas con una velocidad de barrido de 20 nm/min y para el lejano 50 nm/min. Las medidas en el UV cercano fueron realizadas en celdas de 1 cm con 10 μ M de SIRT1 ($A_{280} \approx 0.45$) en amortiguador fosfato 20 mM, NaCl 50 mM pH 7,4. Para las medidas en el UV lejano se utilizaron celdas de 0,1 cm con la proteína diluida a 5 μ M ($A_{280} \approx 0.22$) en el mismo amortiguador fosfato

3.9. Espectros de emisión de fluorescencia

Se obtuvieron espectros de emisión excitando a 280 nm. Los espectros fueron obtenidos a 25 °C en un espectrofluorímetro Chronos FD (ISS, Inc.). Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de paso, diluyendo la proteína a una concentración de 400 nM.

3.10. Interacción SIRT1/DBC1

3.10.1. Transfección de células HEK293 y HeLa y tratamientos

Las distintas células fueron cultivadas en placas de 60 mm, mantenidas con *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementadas con suero fetal bovino (FBS, Gibco) al 10% y antibióticos (Penicilina-Estreptomicina-Neomicina, Invitrogen). Una vez que los cultivos alcanzaron una confluencia del 70%-80% se transfectaron a las células con Lipofectamina (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante. Se utilizaron distintas cantidades de plásmido según el constructo. Las células transfectadas fueron sometidas a los distintos tratamientos 48 h luego de la transfección. Los tratamientos se realizaron cambiando el medio por medio DMEM fresco sin FBS y con las concentraciones adecuadas de H₂O₂ durante 1 h.

3.10.2. Inmunoprecipitaciones

Luego de los tratamientos las células se cosecharon lavándolas primero con PBS y luego desprendiéndolas mecánicamente y resuspendiéndolas en 1 ml de PBS. A continuación se centrifugaron las muestras a 5000 rpm durante 30 segundos a 4°C, se les remueve el sobrenadante y el pellet se resuspende en amortiguador NTEN (Tris 20 mM pH 7,4 NaCl 100Mm, EDTA 1 mM, NP40 0.5%) suplementado con inhibidores de proteasas. Se incubaron las muestras bajo agitación durante 20 minutos a 4°C y a continuación se centrifuga 10000 rpm, durante 10 min a 4°C. Se descarta el pellet y la concentración de proteína es medida por Bradford.

Las inmunoprecipitaciones (IP) se llevaron a cabo incubando un volumen suficiente de sobrenadante para que hubiese 1 mg de proteína total, junto con 50 µl de A-G Sepharosa (Santa Cruz) y 5 µl de anticuerpo, durante una hora a 4°C en agitación constante. Luego del tiempo de incubación las muestras son centrifugadas brevemente para decantar las perlas de agarosa y se lavan dos veces con amortiguador NETN para remover contaminantes. Finalmente las muestras son preparadas para electroforesis de SDS-PAGE.

4. Resultados y discusión

4.1. Purificación de proteínas recombinantes

4.1.1. rhSIRT1

Como primer paso para la concreción de nuestros objetivos, procedimos a la expresión, purificación y caracterización bioquímica de la proteína SIRT1 recombinante humana (hSIRT1). Los niveles de expresión de hSIRT1 en *E. coli* resultan ser bajos por lo que se debe partir de volúmenes grandes de cultivo para obtener cantidades de proteína adecuadas para utilizar en los experimentos propuestos. En la Figura 5 se muestran los resultados de la expresión y luego de la purificación por gel filtración evaluados por electroforesis y western blot anti-SIRT1. Se puede ver que aún antes de la inducción con IPTG la proteína se expresa en alguna medida y que la expresión es algo mayor luego de la inducción (AI, DI).

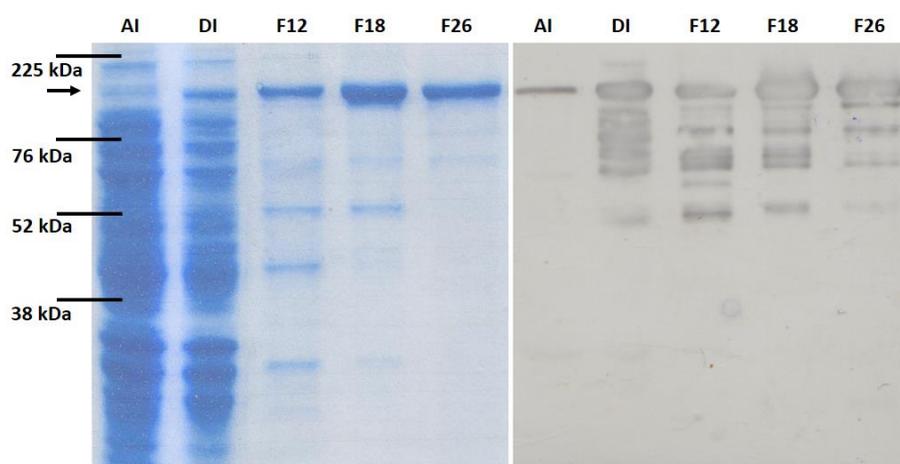


Figura 5. SDS-PAGE de fracciones obtenidas en la purificación de SIRT1 y Western Blot anti-hSIRT1. Se corrieron 2 geles en paralelo, uno se tiñó con azul de coomassie para proteínas y otro se transfirió a membrana para revelar con anti-hSIRT1. **AI**- lisado bacteriano antes de la inducción **DI** – lisado bacteriano luego de la inducción **F#**-Distintas fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína por gel filtración.

Cabe mencionar que a pesar de que hSIRT1 pesa 81,6 kDa migra en un SDS-PAGE como una proteína de más de 100 kDa. Además de la banda principal con movilidad electroforética de 100 kDa, se observan bandas de menor

peso molecular que igualmente reaccionan con el anticuerpo anti-SIRT1. Por otra parte el western evidencia que ya dentro de las bacterias la proteína se encuentra fragmentada. No se logró determinar por qué sucede esto. Si es que se trunca la síntesis obteniéndose fragmentos incompletos de la enzima con cola de histidina, o que la proteína completa sufre algún tipo de proteólisis dentro de la bacteria. En la Figura 6 se muestra un cromatograma típico del primer paso de purificación de la enzima por IMAC. La fracción que eluye con 500 mM imidazol, si bien contiene mayoritariamente hSIRT1 completa, se puede apreciar en el gel que también co-eluyen otras proteínas. Sabemos que ya en el extracto celular se encuentran fragmentos de la enzima, según el resultado del western blot anti-SIRT1 de la Figura 5.

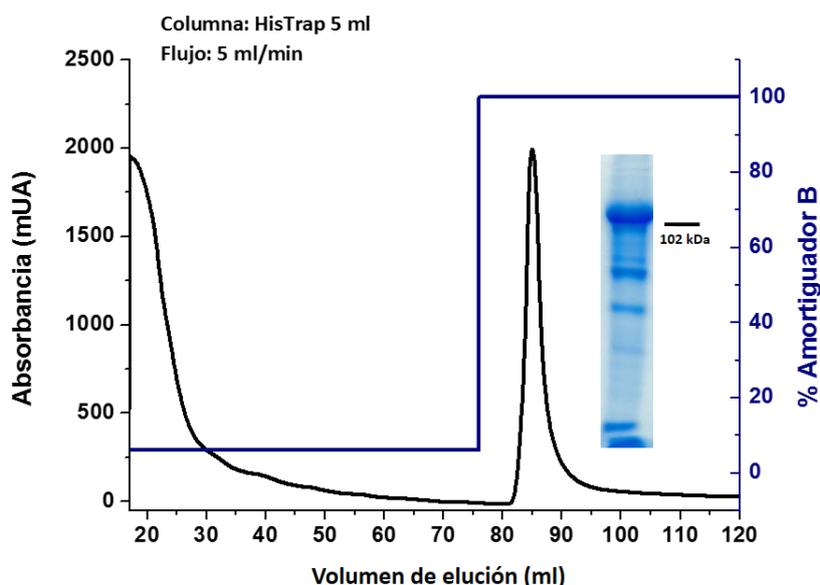


Figura 6. Cromatografía de afinidad IMAC. Cromatograma del primer paso de la purificación de hrSIRT1. La fracción proteica unida a la columna se eluye con 500 mM de Imidazol. El inserto muestra la fracción eluída a 85 mL corrida en gel de SDS-PAGE revelado con Coomassie.

Para intentar deshacerse de estos contaminantes co-purificados durante IMAC se agregó un paso más de purificación, una cromatografía por exclusión molecular. Como se puede ver en la Figura 7, en este segundo paso se logran separar algunos contaminantes pero de todas formas la SIRT1 eluye en un volumen grande acompañada de otras proteínas o fragmentos de proteínas (incluso la misma SIRT1 fragmentada ya en el extracto celular). Se midió

actividad enzimática de las distintas fracciones y se encontró la mayor actividad específica en el pico (C) de la cromatografía de exclusión molecular (Figura 7).

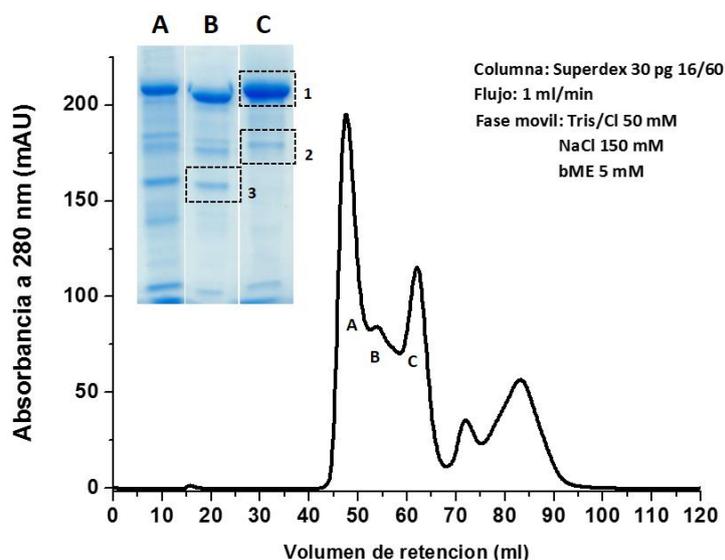


Figura 7. Segundo paso de purificación por gel filtración. Cromatograma típico obtenido en una exclusión molecular cargada con el eluido de la IMAC. En el gel de SDS-PAGE se corren las fracciones indicadas A, B, C de la cromatografía gel filtración. Recuadrado se marcan las bandas 1, 2, 3 del gel que se identificaron por espectrometría de masa. En los recuadros 2 y 3 se señala a los contaminantes más abundantes.

Se intentó aumentar la pureza de los preparados de hSIRT1 agregando un paso más de purificación previo a la separación por exclusión molecular. Se optó por una cromatografía de intercambio aniónico teniendo en cuenta que el punto isoeléctrico (PI) teórico de hSIRT1 es de 4,55. Al eluido de la IMAC se lo diluyó 1:100 en amortiguador 50 mM Tris para sembrar en la columna de DEAE-Sephrose. En la Figura 8 se muestra el cromatograma de este intercambio aniónico, y el pico eluido al aumentar la fuerza iónica analizado por electroforesis SDS-PAGE. Se observa que no se logra separar bien a la hSIRT1 de secuencia completa del resto de los contaminantes, por lo que se decide agregar un tercer paso de purificación, una gel filtración. Como se aprecia en la Figura 9, nuevamente co-eluyen con SIRT1 proteínas de menor peso molecular..

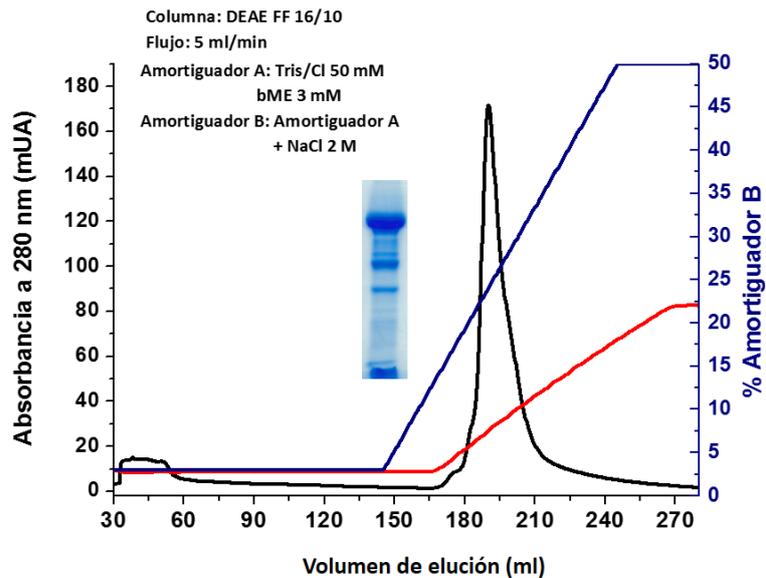


Figura 8. Cromatograma de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose). Segundo paso de purificación de la rhSIRT1, posterior a la cromatografía de afinidad IMAC. El trazo rojo muestra el cambio de conductancia a medida que aumenta la concentración de NaCl en la fase móvil..

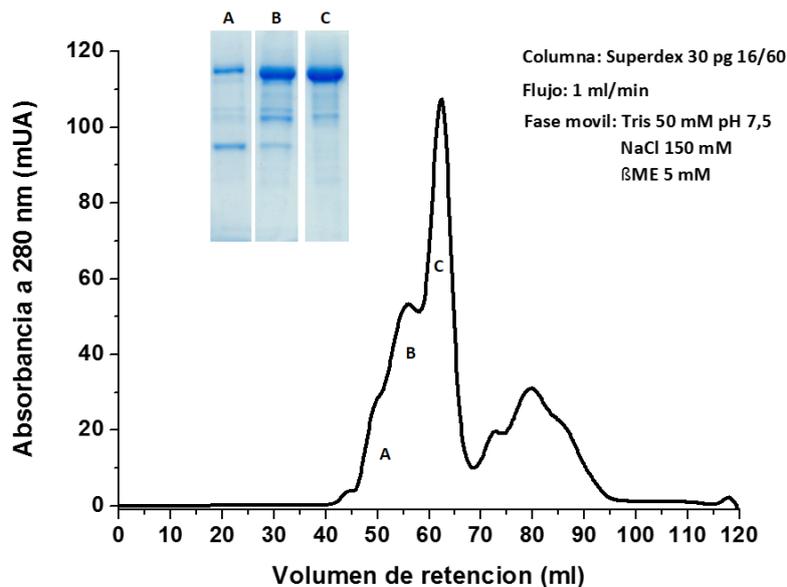


Figura 9. Tercer paso de purificación por gel filtración. Cromatograma de gel filtración como tercer paso en la purificación de rhSIRT1, luego de IMAC y DEAE-Sepharose .

Si se comparan la pureza (según la electroforesis) del preparado obtenido luego de solo la gel filtración o luego del intercambio iónico y gel filtración, no se observan diferencias importantes, de hecho, las actividades específicas son las mismas. Teniendo en cuenta que agregar otro paso de purificación aumenta el tiempo del proceso y la posibilidad de que la proteína se inactive, en un principio, se decidió hacer sólo un paso de gel filtración luego de la IMAC.

Las bandas del gel que se marcan como (1), (2) y (3) en la Figura 3 fueron recortadas del gel y enviadas al servicio de espectrometría de masa del Instituto Pasteur donde se analizaron las muestras mediante MALDI TOF/TOF. Como era de esperar, se identificó con un buen porcentaje de cobertura a la banda (1) como hSIRT1 (Figura 10). En la banda (3) se identificó a la chaperonina de *E. coli* GroEL junto con hSIRT1. El resultado de la identificación de la banda (2) fue el más sorprendente. Ésta resulta ser una proteína de *E. coli* implicada en las vías de síntesis de lipopolisacárido de la membrana externa bacteriana llamada arnA. Se sabe que arnA es un contaminante que aparece comúnmente en purificaciones de proteínas recombinantes con cola de histidina. Cuando la expresión de la proteína de interés es baja, hay algunas proteínas con motivos de unión al Ni²⁺ que se expresan a nivel similar y figuran entonces como contaminantes en la purificación [114].

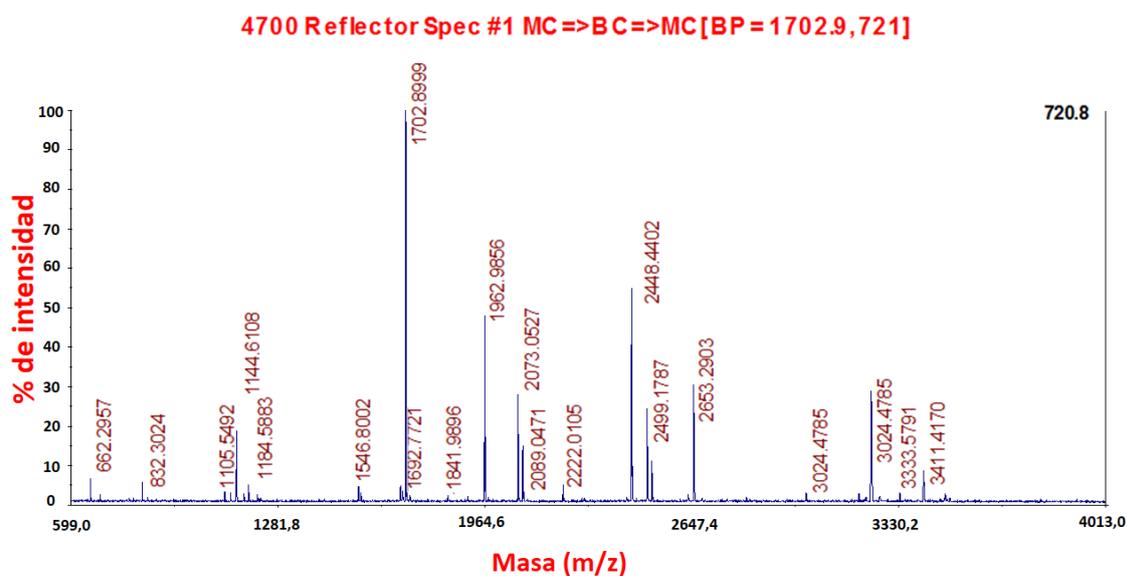


Figura 10 Espectro de masa de hSIRT1 Espectro de masa de la banda (1) del gel de la Figura 3. Se identificó con un 38 % de cobertura a hSIRT1

Estas proteínas compiten por los sitios de unión a la columna de afinidad y co-eluyen con la proteína recombinante con cola de histidina cuando se aumenta la concentración de imidazol.

Se intentó nuevamente recurrir a la cromatografía de intercambio iónico para aislar mejor a la hSIRT1, sabiendo que el PI teórico de ArnA es de 6,39. En la

Figura 11 se presenta un cromatograma representativo de la purificación. Tampoco en este intento de separar al contaminante se logró una buena separación de la enzima. Aunque en el pico (C) se observa sólo una banda correspondiente a la hSIRT1, esta fracción resultó tener una menor actividad específica en comparación con la actividad del pico (B) donde eluye mayoritariamente la proteína de interés.

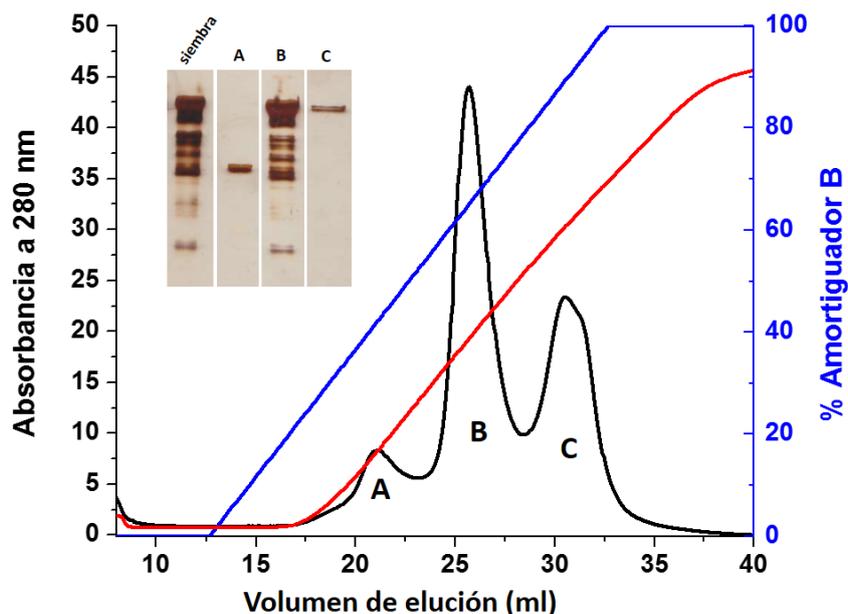


Figura 11. Cromatograma de intercambio aniónico. Se muestra el cromatograma de intercambio aniónico en este caso utilizando una columna HiTrap Q. El trazo rojo muestra la variación de la conductancia a medida que aumenta la concentración de NaCl en la fase móvil. Amortiguador A- Bis-Tris pH 6 y B-Bis-Tris, NaCl 1 M pH 6.. También se muestra un gel de SDS-PAGE teñido con plata donde se corrieron fracciones A, B, C, indicadas en el cromatograma.

Finalmente se decidió que la estrategia más eficiente para la purificación de la proteína, teniendo en cuenta los tiempos insumidos, la pureza electroforética y rendimiento finales, es la de realizar un solo paso de gel filtración posterior a la IMAC.

4.1.2. ryPNC1

Se expresó y purificó nicotinamidasas de levadura Pnc1 recombinante para realizar medidas de actividad SIRT1 con otro método alternativo al método con el péptido fluorescente. La enzima Pnc1 se purificó correctamente mediante un solo paso de purificación por IMAC. La Figura 12 muestra un gel representativo de dicha purificación. Se determinaron los parámetros cinéticos de la Pnc1 recombinante purificada para compararlos con parámetros reportados y determinar la calidad de la enzima purificada. La Figura 13 muestra un gráfico de velocidades iniciales en función de la concentración del sustrato nicotinamida utilizando el ensayo acoplado descrito en materiales y métodos. Se determinó un K_M para nicotinamida de $56 \mu\text{M}$ que está en el orden del K_M reportado para la nicotinamidasas purificada de levadura [115].

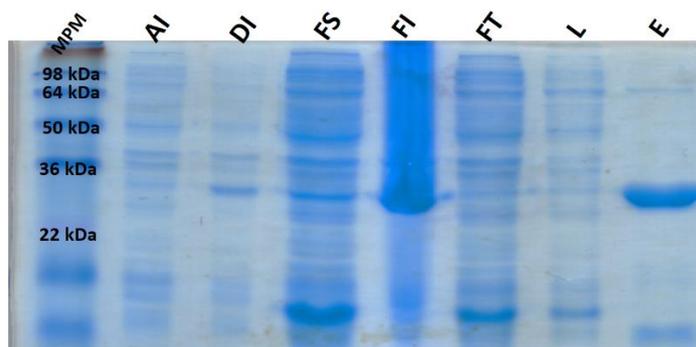


Figura 12. Expresión y purificación de Pnc1. En el gel se sembraron distintas muestras obtenidas durante los pasos de purificación: **AI** lisado bacteriano previo a la inducción, **DI** lisado bacteriano luego de la inducción, **FS** fracción soluble del homogenizado bacteriano, **FI** fracción insoluble del homogenizado bacteriano, **FT** “flow through” de lo sembrado en la columna de IMAC, **E** eluido de la columna de IMAC con 500 mM de imidazol.

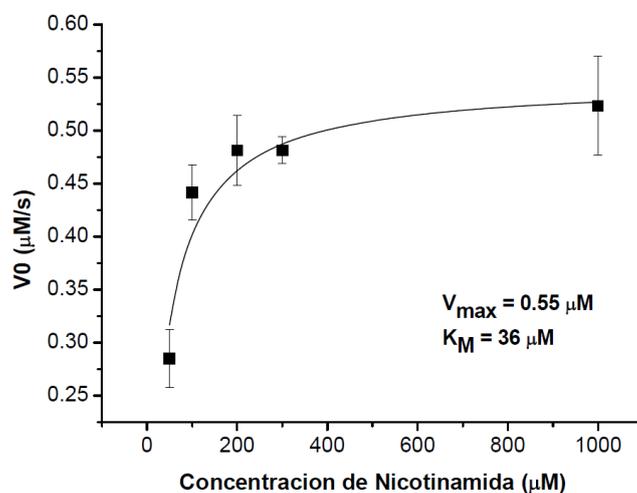


Figura 13. Determinación de parámetros cinéticos para yPnc1 purificada. Gráfico de velocidades iniciales en función de la concentración de nicotinamida de ryPnc1. Las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente con 1 μ M de enzima.

4.1.3. rhDBC1

Para la producción y purificación de hDBC1 en *E. coli* se debió construir un vector de expresión para la proteína adecuado. El vector fue construido utilizando la tecnología de clonado libre de enzimas de restricción (restriction free cloning, RFC). La secuencia de hDBC1 fue amplificada de un plásmido de expresión de hDBC1 para células eucariotas con el cual se contaba en el laboratorio. El plásmido de expresión elegido es una modificación del vector pQE-80L (Qiagen) [116]. En la Figura 14C se muestra un esquema del vector de expresión de hDBC1. La técnica de RF cloning requiere de dos pasos de PCR los cuales hubo que poner a punto. El primer paso de clonado implica la amplificación de la secuencia de interés con secuencias en los extremos complementarias a la región donde se quiere insertar. Para esta PCR se utilizaron los cebadores descritos en materiales y métodos. En la Figura 14A se muestra un gel de agarosa con bromuro de etidio, revelado en el UV, donde se sembró el producto de la primer PCR. La banda que corre a la altura de 3 kb se escinde del gel y los ácidos nucleicos son extraídos del fragmento de gel y purificados en columnas de sílica. El megaprimer se eluye en agua ultrapura y es utilizado como cebador para la segunda ronda de PCR donde se agrega el vector pQE-80L modificado vacío. El producto de la segunda PCR es sometido a una digestión con Dnpl para degradar plásmido sin inserto remanente. Finalmente se transformaron células quimiocompetentes de *E coli* preparadas con el protocolo descrito en [117].

Además de obtener el vector de expresión de DBC1 con cola de histidinas se obtuvo también un vector de expresión de Trx-DBC1, pero como la proteína quimérica no presentó ninguna ventaja con respecto a la solubilidad de DBC1 no se utilizó el vector de expresión de Trx-DBC1.

Las células fueron plaqueadas en LB AGAR 1,5 % y se dejaron crecer toda la noche. A partir de las colonias obtenidas, se crecieron cultivos de LB líquido para la preparación de crioinóculos y para la extracción de ADN plasmidico mediante minipreps. En la Figura 14B se muestra un gel de electroforesis en gel de

agarosa de una doble digestión con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII. Se pueden constatar dos bandas al revelar bajo luz UV al gel. Una banda de 5 kb correspondiente al vector pQE80L lineal vacío y una banda de 3 kb correspondiente a la secuencia de hDBC1. Se transformó con el plásmido obtenido distintas cepas de *E. coli* y se ensayaron distintas condiciones de inducción. La proteína se presentó insoluble en las distintas condiciones. La condición con la cual se obtuvo una mayor proporción de proteína soluble se logró transformando células de *E. coli* ArticExpress (Agilent). Esta cepa está optimizada para la síntesis de proteínas a baja temperatura. La inducción a bajas temperaturas funciona en algunos casos de proteínas proclives a insolubilizarse, enlenteciendo la síntesis ribosomal favoreciendo el correcto plegamiento de la cadena polipeptídica recién sintetizada y por lo tanto la solubilidad de la proteína.

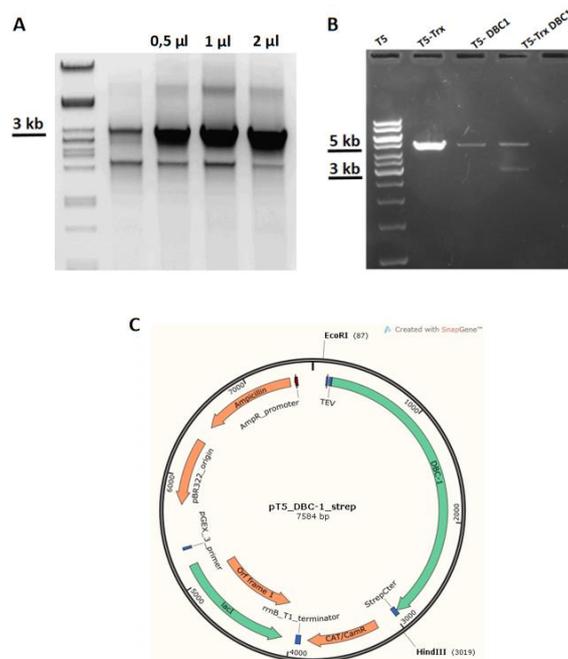


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa y esquema del vector de expresión de hDBC1. **A.** se muestra gel de agarosa 1% sembrado con los productos de la primer PCR. Los volúmenes señalados indican la cantidad de DMSO agregada a la mezcla de reacción en cada uno de los casos. **B.** Se muestra otro gel de agarosa al 1% donde se corrieron los productos de una doble digestión de los vectores clonados con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII, del vector de expresión obtenido por clonado libre en enzimas de restricción. **C.** se muestra un esquema del vector generado.

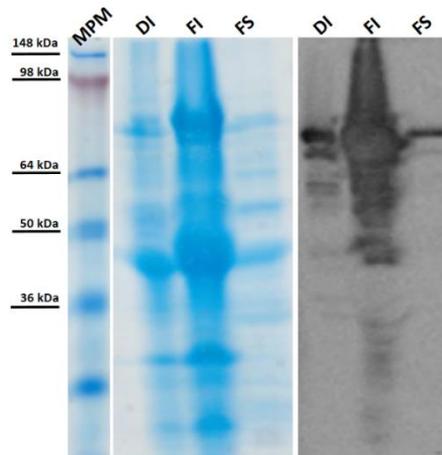


Figura 15. Gel de SDS PAGE y WB α DBC1 DI lisado bacteriano de *E. coli* transformado con plásmido de expresión de hDBC1 FI fracción insoluble del homogenizado bacteriano FS fracción soluble del homogenizado bacteriano. A la derecha se muestra el resultado de un western anti- hDBC1. Se revelo por quimioluminiscencia con ECL

En la Figura 15 se muestra un gel SDS-PAGE en donde se corrieron un lisado bacteriano de la célula Artic Express luego de la inducción junto con la fracción insoluble y soluble del homogenizado bacteriano. También se muestra un western blot anti-hDBC1 donde se ve que la proteína se encuentra principalmente en la fracción insoluble del homogenizado bacteriano y que una fracción menor de ésta se encuentra como proteína soluble. En la Figura 16 se muestran dos gels donde se sembraron fracciones de distintas etapas en la producción de hDBC1.

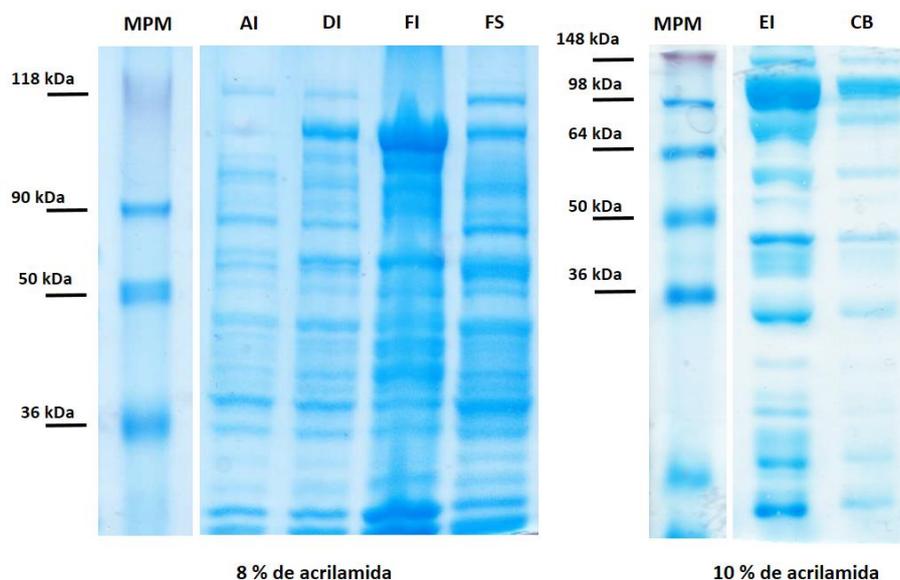


Figura 16. Expresión y purificación de DBC1 SDS-PAGE conmuestras de distintas etapas durante la expresión y purificación de DBC1. AI- lisado bacteriano antes de la inducción DI- lisado bacteriano luego de la inducción FI- fracción insoluble FS- fracción soluble EI- fracción

eludida de la IMAC **CB**- muestra gel filtrada por PD-10 para cambiar de amortiguador a la proteína

Nuevamente se puede constatar que la proteína se encuentra principalmente precipitada luego de la inducción. Para la lisis bacteriana se procede como se describe en materiales y métodos. La fracción soluble del homogenizado es cargada en una columna IMAC y eluida con amortiguador Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, e Imidazol 500 mM. En el gel de la Figura 16 se puede ver que la proteína eluye de la columna de IMAC acompañada de otras proteínas. Luego de la IMAC se intentó cambiar de amortiguador a la proteína principalmente para remover las sales en exceso. Se utilizó para el cambio de amortiguador una columna PD-10 (GE) equilibrada con amortiguador Tris 50 mM pH 7,5 NaCl 150 mM, β mercaptoetanol 5 mM y 10% glicerol. Durante el cambio de buffer parte de la proteína precipita dentro de la columna. Es necesario encontrar las condiciones adecuadas para mantener a DBC1 recombinante de manera soluble.

4.2. Efecto de oxidantes sobre rhSIRT

4.2.1. Medidas de actividad desacetilasa

Primeramente, se utiliza la medida de actividad desacetilasa de SIRT1 como manera de evaluar la calidad de la proteína recombinante purificada. La mayoría de las medidas de actividad que se presentan en este trabajo se realizaron usando el método discontinuo fluorescente (el más utilizado en la literatura para el cual se dispone de un kit comercial). Como sustrato peptídico se utiliza un tetrapéptido con una lisina acetilada en su extremo carboxiterminal unido al fluoróforo 4-amino 7-metil cumarina (AMC). La secuencia de este péptido (RHKK(Ac)AMC) comprende los residuos 379-382 de p53 humana, uno de los sustratos biológicos de SIRT1. En la Figura 17 se presenta una curva de velocidades iniciales en función de la concentración de péptido sustrato de donde se derivan los parámetros cinéticos.

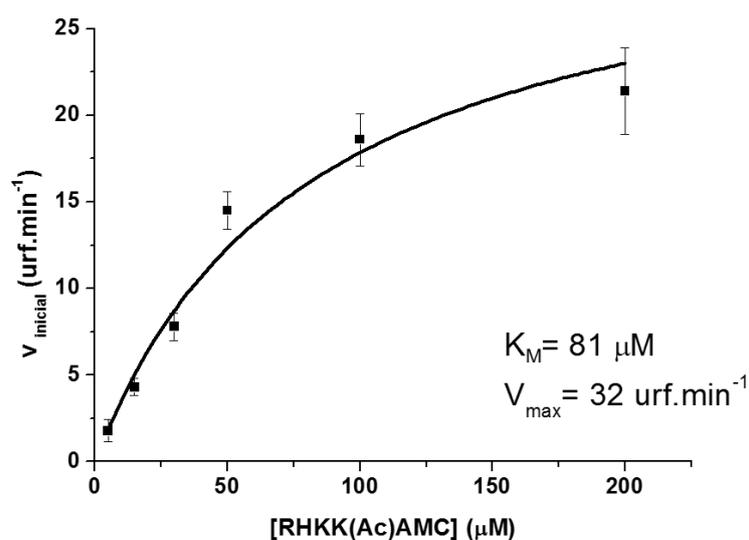


Figura 17. Determinación de parámetros cinéticos para rhSIRT1 . Curva de velocidades iniciales en función de la concentración de péptido fluorescente. Las medidas se realizaron con 2 mM de NAD⁺ como segundo sustrato y 500 nM de SIRT1. K_M 81 μM y V_{max} 32 urf.min⁻¹.

El K_M obtenido para el péptido es de 81 μM. Este valor es cercano al provisto por el fabricante del kit para medidas de actividad de SIRT1 “SIRT1 Fluorometric Drug Discovery Kit” (ENZO life science). Estos reportan un K_M de 64 μM para el mismo péptido, en el orden del valor obtenido para la enzima obtenida en este trabajo. La validez de utilizar este método para medir actividad enzimática SIRT1 en la evaluación de compuestos activadores ha sido ampliamente cuestionada. Se argumenta que el efecto activador de algunos compuestos (como el resveratrol) es dependiente del sustrato unido al fluoróforo utilizado.

Se pone a punto además otro método de medida de actividad desacetilasa de rhSIRT1, el método acoplado descrito en materiales y métodos, utilizando la rPnc1. El ensayo acoplado presenta la ventaja de que se trata de un método continuo de seguimiento de la reacción. En este caso se utilizó como péptido sustrato TARK(Ac)STG que no necesita de la etiqueta fluorescente. La K_M para este sustrato peptídico no estaba reportada. La Figura 18 muestra las medidas realizadas con el método acoplado.

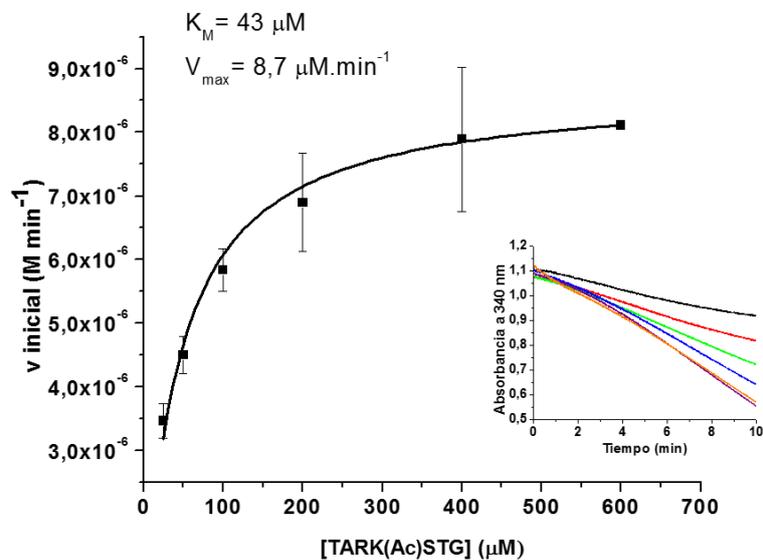


Figura 18 Determinación de parámetros cinéticos para rhSIRT1 . Curva de velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato usando el ensayo acoplado. En el inserto se muestra un ejemplo de los cursos temporales obtenidos para determinar K_M y V_{max}

4.2.2. Oxidación de tioles y otras modificaciones oxidativas

Como se menciona en la introducción, hoy se sabe que SIRT1 sufre modificaciones oxidativas que provocan cambios en su actividad o promueven su degradación dentro de la célula. De todas formas, los mecanismos de una potencial regulación redox de la SIRT1 todavía no están claros. Si bien las sirtuinas no tienen residuos de cisteínas críticos, en este trabajo se buscó explorar qué sucede con la actividad de SIRT1 cuando se modifican químicamente alguno de sus tioles.

Se realizaron tratamientos con N-etil-maleimida, NEM, un agente alquilante de tioles. En la Figura 19 se puede apreciar que la actividad de SIRT1 cae al tratar a la enzima con concentraciones crecientes de NEM. Este resultado demuestra claramente que la enzima, contiene alguna cisteína que a pesar de no formar parte su mecanismo catalítico, su modificación ocasiona la pérdida de actividad enzimática.

El siguiente paso fue tratar a la enzima con H_2O_2 . En proteínas, los grupos $-\text{SH}$ de las cisteínas son los más susceptibles a la oxidación por

peróxidos. El amortiguador utilizado para hacer las reacciones contenía DTPA para evitar que trazas de Fe^{2+} en presencia de H_2O_2 dieran lugar por reacción de tipo Fenton a la formación de radical hidroxilo, un oxidante muy reactivo. Por lo tanto, se esperaba una oxidación de tioles post-tratamiento, que se confirmó cuantificando tioles con ditiodipiridina (Figura 20). De los 19 residuos de cisteína que posee hSIRT1, se logran cuantificar 12 tioles por mol de proteína. No se observa oxidación de tioles con el tratamiento equimolar de peróxido, pero un exceso de 50x H_2O_2 por 30 minutos, lleva sistemáticamente a la pérdida de 2 mol $-\text{SH}$ y exceso mayor (100x) logra oxidar 2 residuos de cisteína más, 4 en total. Parece entonces que las cisteínas de hSIRT1 no son particularmente reactivas con H_2O_2 y/o muy expuestas para facilitar su oxidación, pero aún así la oxidación de algunas de ellas afecta su funcionalidad, hay una pérdida significativa de su actividad enzimática como se detalla a continuación.

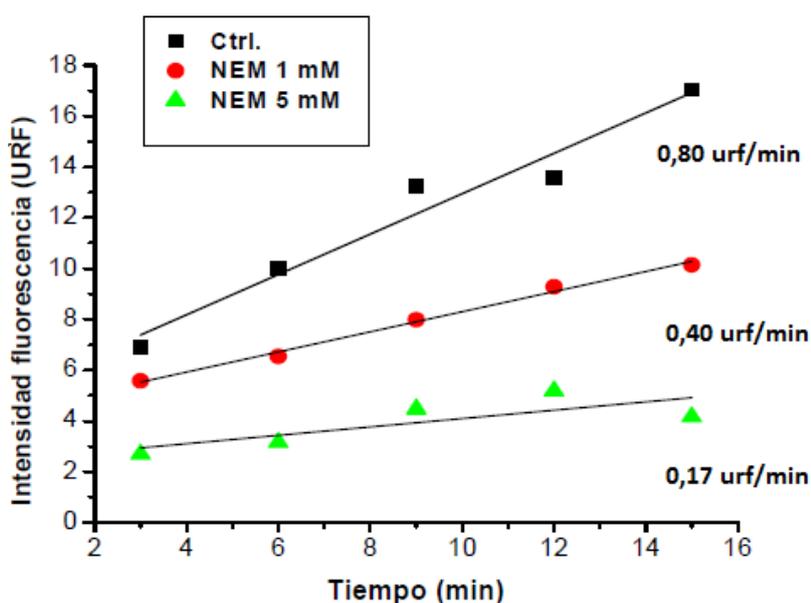


Figura 19. Actividad de rhSIRT1 post tratamiento con NEM. Previamente a las medidas de actividad, el exceso de NEM fue removido por gel filtración. Las medidas de actividad se realizaron con $1 \mu\text{M}$ de enzima, utilizando el método fluorescente según se detalla en materiales y métodos.

En la Figura 21 se muestran medidas de actividad de la enzima post tratamiento con distintas concentraciones de H_2O_2 en excesos de 10, 50 y 100 veces con respecto a la concentración de enzima y con incubaciones a temperatura ambiente de 30 minutos. Lo que se aprecia en estas medidas es que no hay

cambios en la actividad con tratamientos equimolares de peróxido, donde sabemos no se oxidaron cisteínas. En cambio, un exceso 100x de H₂O₂ por 30 min que lleva a oxidar 4 residuos de cisteína de hSIRT1, logra reducir la actividad desacetilasa a la mitad.

El otro oxidante biológico utilizado en este trabajo para evaluar el efecto de la oxidación de SIRT1 fue el peroxinitrito ONOO⁻. La oxidación de tioles proteicos por peroxinitrito es similar al resultado obtenido para la oxidación de tioles con H₂O₂. La Figura 22 muestra resultados de titulación de los tioles con DTDPy donde se observa la oxidación de tres residuos de cisteína con un exceso 5x de peroxinitrito, y excesos mayores oxidan un tiol más, 4 tioles en total con la mayor concentración de ONOO⁻. En la Figura 23 se muestra la inactivación de la enzima al tratarla con concentraciones crecientes de peroxinitrito. Un exceso de diez veces más peroxinitrito que enzima ocasiona una pérdida de actividad enzimática del 50 %.

No podemos decir que la pérdida de actividad se deba exclusivamente a la oxidación de ese residuo de cisteína, ya que otras modificaciones oxidativas pueden ocurrir en la enzima por tratamiento con peroxinitrito, por ejemplo, nitración de tirosinas. La muestra tratada con un exceso 5x de peroxinitrito fue analizada por western blot anti-nitrotirosina, donde se comprueba que efectivamente hSIRT1 sufre la nitración de alguna de sus tirosinas.

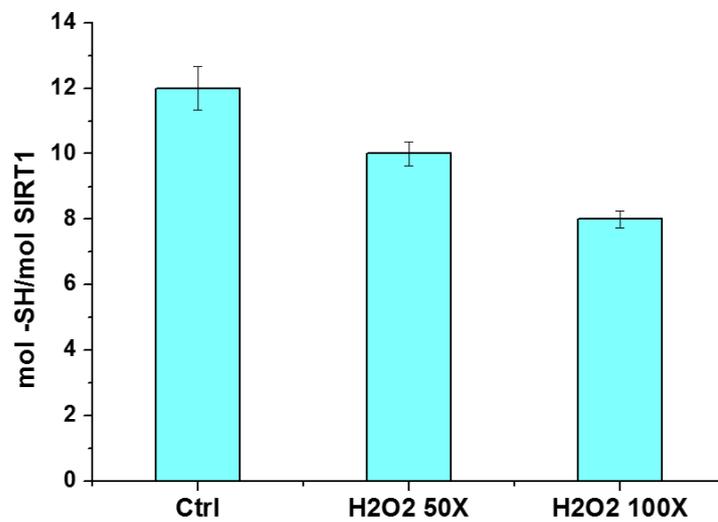


Figura 20. Cuantificación de tioles en rhSIRT1. Antes y después del tratamiento con H_2O_2 , se cuantificaron tioles proteicos con DTDPy según se detalla en materiales y métodos.

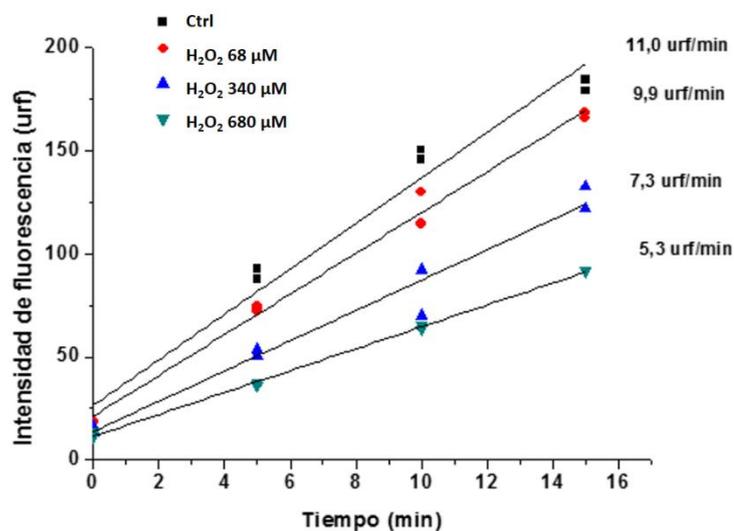


Figura 21. Medidas de actividad post tratamiento con distintas concentraciones de H_2O_2 Se trata 68 μM rhSIRT1 con equimolar H_2O_2 exceso 5x y 10x durante 30 minutos, para luego ensayar actividad con el método fluorescente como se describe en materiales y métodos.

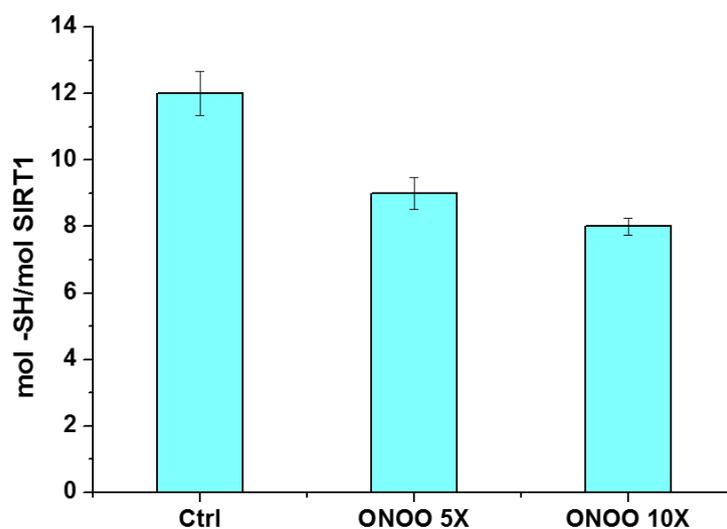


Figura 22. Cuantificación de tioles en rhSIRT1. Antes y después del tratamiento con peroxinitrito, se cuantificaron tioles proteicos con DTDPy según se detalla en materiales y métodos.

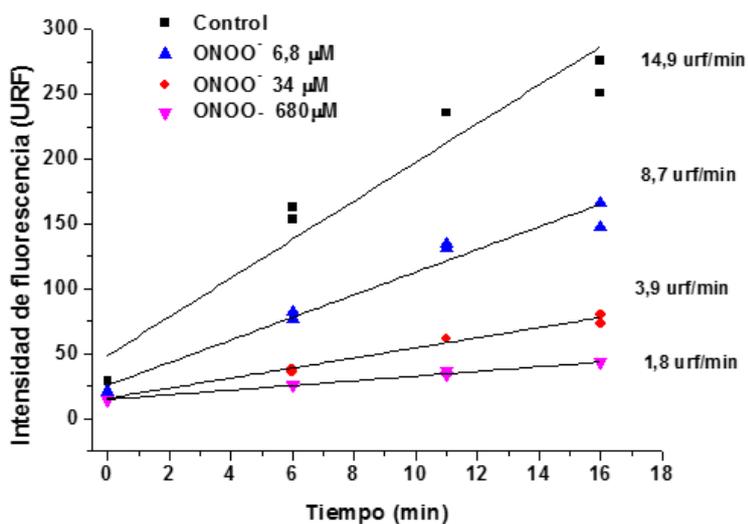


Figura 23. Medidas de actividad post tratamiento con peroxinitrito. Se trata 6,8 μM rhSIRT1 con equimolar, exceso 5x y 10x de peroxinitrito, para luego ensayar actividad con el método fluorescente como se describe en materiales y métodos.

En la Figura 24 se muestra el resultado del western blot anti Y-NO₂ . Está reportado para SIRT6 la ocurrencia de esta modificación oxidativa in vivo con pérdida de la actividad enzimática [104]

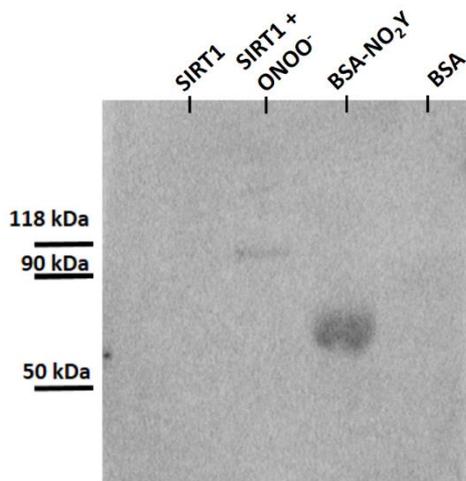


Figura 24. Western blot anti-nitrotirosina. En cada caso se sembraron 10 ng de proteína, en un gel de SDS-PAGE 10%, Se sembró SIRT1 sin tratar y SIRT1 tratada con exceso de ONOO⁻ . Para el control positivo se nitró albumina bovina incubando 1 mg/ml de albumina con 200 μM de ONOO⁻ . Como control negativo se sembró en el gel la misma cantidad de albumina sin tratar. Se utilizó para revelar le western blot a los anticuerpos que se describen más arriba en materiales y métodos

4.2.3. Espectros de dicroísmo circular y fluorescencia

También se realizaron espectros de dicroísmo circular para constatar posibles cambios conformacionales que pudieran ocurrir tras el tratamiento con oxidantes. En la zona espectral del UV cercano se puede obtener información sobre la estructura terciaria de proteínas. En esta zona del espectro es que absorben aminoácidos aromáticos y los enlaces disulfuros. El DC en el UV lejano da en cambio información al respecto de la estructura secundaria de la proteína ya que en esta región del espectro absorbe bien el grupo amida del enlace peptídico.

Se realizaron espectros de dicroísmo circular de la enzima nativa y oxidada a la misma concentración. La oxidación de la enzima se realizó en condiciones que previamente observamos producen significativa disminución de la actividad enzimática. Alícuotas de 10 μM de SIRT1 fueron tratadas, por un lado con 1 mM de H₂O₂ durante media hora en amortiguador fosfato 10 mM pH 7,4 y por otro lado con 50 μM peroxinitrito en el mismo amortiguador. Luego de gel filtrar para

remover el exceso de H_2O_2 o los productos de descomposición de peroxinitrito (nitrito/nitrato), la concentración final de enzima fue de $5 \mu\text{M}$. La enzima recombinante sin tratar con oxidante, de todas formas fue sometida a gel filtración para que tuviera el mismo tratamiento que las muestras oxidadas. Las muestras se concentraron por ultra filtración hasta $10 \mu\text{M}$. A dichas muestras fue que se le realizaron espectros de dicroísmo circular en el UV cercano y lejano a las concentraciones adecuadas. En espectro en el UV lejano (Figura 25) se observa que la oxidación de SIRT1 por H_2O_2 produce cambios a nivel de la estructura secundaria de la enzima (pérdida de estructura alfa-hélice). En cambio, el tratamiento con peroxinitrito, no produjo cambios significativos en la estructura secundaria de SIRT1 con respecto a la proteína nativa. Por otra parte, observando el espectro DC UV cercano (Figura 26) se puede apreciar que la oxidación por el H_2O_2 no altera significativamente la estructura terciaria de SIRT1. Contrariamente, el tratamiento con peroxinitrito, altera ligeramente la estructura terciaria de la proteína, a pesar de no observarse pérdida de estructura secundaria.

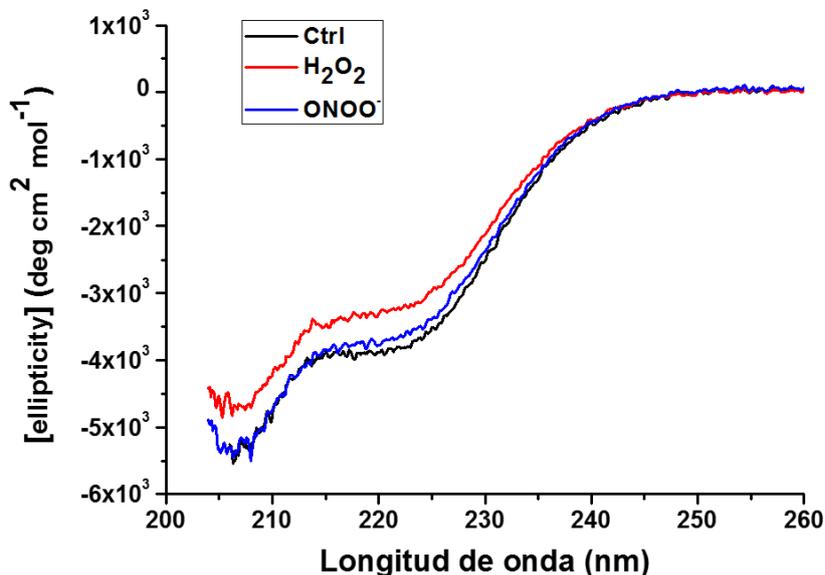


Figura 25. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano post tratamiento de la hSIRT1 con H_2O_2 y peroxinitrito. Se trató $10 \mu\text{M}$ de SIRT1 con 1 mM de H_2O_2 o con $50 \mu\text{M}$ de ONOO^- .

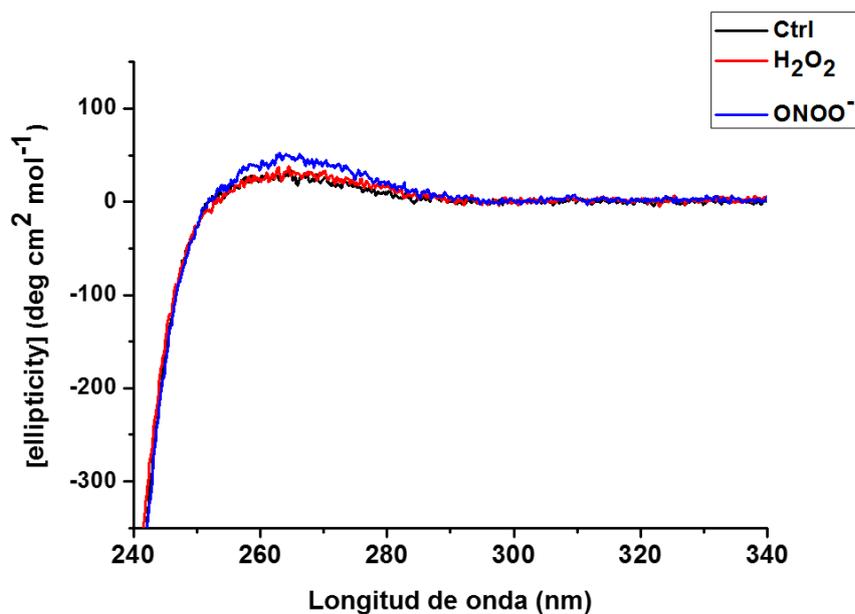


Figura 26. Espectro de dicroísmo circular en el UV cercano post tratamiento de la hSIRT1 con H_2O_2 y peroxinitrito. Se trató 10 μM de SIRT1 con 1 mM de H_2O_2 o con 50 μM de $ONOO^-$.

Por otra parte también se realizaron espectros de fluorescencia para seguir posibles cambios estructurales que provoquen cambios en el entorno de los residuos de triptófano fluorescentes. La Figura 27 muestra los espectros de fluorescencia de la proteína no tratada y tratada con H_2O_2 donde no se observan cambios. Este resultado es concordante con el obtenido para los espectros de dicroísmo circular donde no se ven cambios en la estructura terciaria de la proteína.

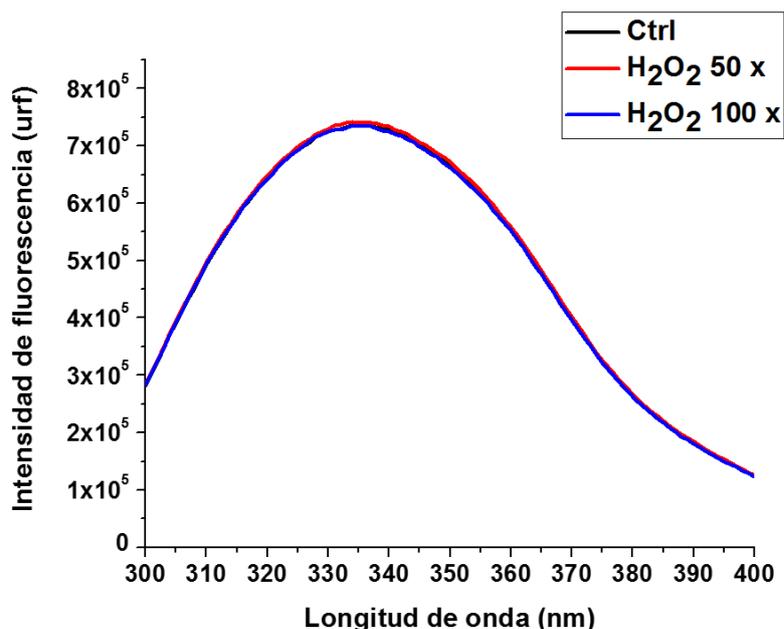


Figura 27. Espectro de emisión de SIRT1 tratada con H₂O₂ Se registraron los espectros de fluorescencia de 400 nM de SIRT1 previo y luego al tratamiento con H₂O₂ durante 30 minutos a temperatura ambiente ($\lambda_{exc} = 280$ nm). En este caso a 4 μ M de SIRT1 se la trató con 200 μ M y 400 μ M de H₂O₂ como se indica en materiales y métodos

Para el caso de la proteína tratada con ONOO⁻ como se puede ver en la Figura 28, tampoco hay cambios en los espectros de emisión de fluorescencia.

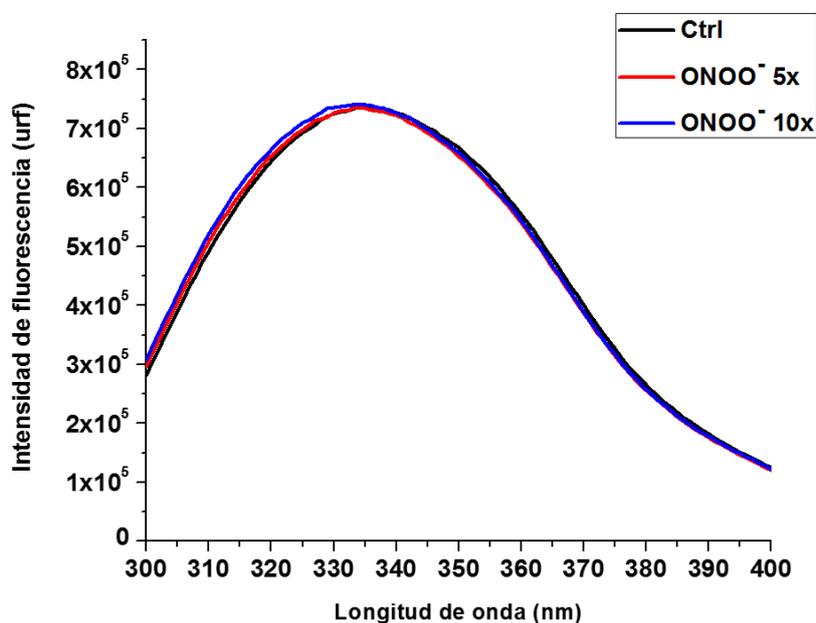


Figura 28. Espectro de emisión de SIRT1 tratada con ONOO⁻ Se midieron los espectros de fluorescencia de 400 nM de SIRT1 previo y luego al tratamiento con de ONOO⁻ ($\lambda_{exc} = 280$ nm). Se trató 4 μ M de SIRT1 con 20 μ M y 40 μ M de ONOO⁻ como se indica en materiales y métodos.

4.2.4. Oxidación de tioles y liberación del Zn^{2+}

Las sirtuinas son metaloenzimas, poseen un átomo de Zn^{2+} que tiene un rol estructural (a diferencia de las otras clases de HDAC donde el zinc juega un rol catalítico). El Zn^{2+} en las sirtuinas se encuentra coordinado por 4 cisteínas, C295, C298, C371 y C374 en SIRT1 humana.

Para evaluar la potencial liberación del átomo de Zn al tratar la enzima con peróxidos oxidantes de tioles, se utilizó el quelante 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR). La Figura 29 se muestra el espectro de absorción de PAR 50 μM en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de Zn^{2+} donde se observa el correspondiente aumento de absorptividad a 500 nm, a medida que se forma más complejo PAR: Zn^{2+} .

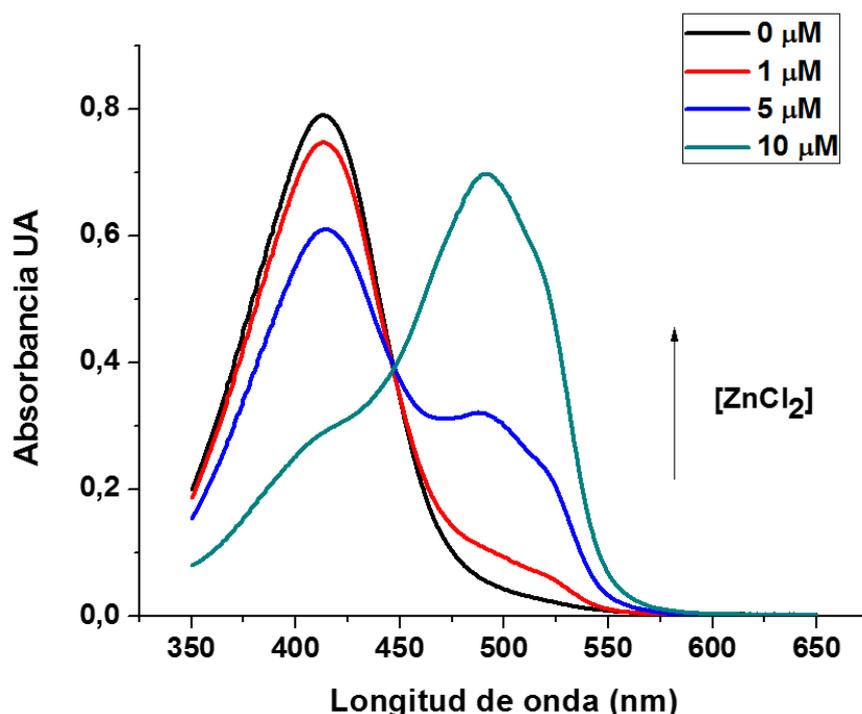


Figura 29. Espectros de absorción del complejo PAR: Zn^{2+} Se realizaron espectros con 50 μM de PAR y las distintas concentraciones de $ZnCl_2$ indicadas.

Posteriormente se titularon tioles de hSIRT1 con p-clormercuriobenzoato (PCMCB), que reacciona específicamente con los tiolatos en una estequiometría 1:1 y se puede seguir a esta reacción midiendo absorbancia a 250 nm. La cantidad de tioles reducidos en la proteína se evidencia como un cambio en la pendiente cuando se grafica absorbancia a 250 nm en función de la concentración de PCMB como se muestra en la Figura 31.

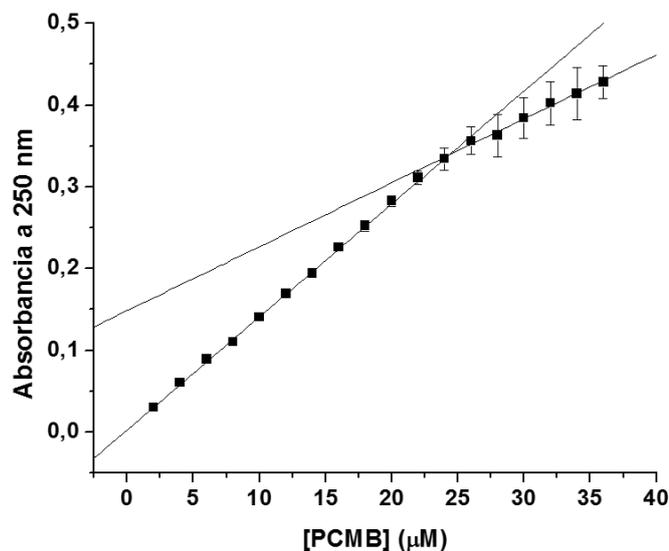


Figura 31. Titulación de tioles de hSIRT1 con PCMB. Se partió de 2 μM de enzima. Se graficó el promedio de las medidas por triplicado con sus errores. Se observa donde se da el cambio de pendientes como la intersección de las 2 rectas

El tratamiento con el mercurial se realizó en presencia del quelante PAR para determinar si se desprende el Zn^{2+} de la enzima durante la titulación (Figura 30).

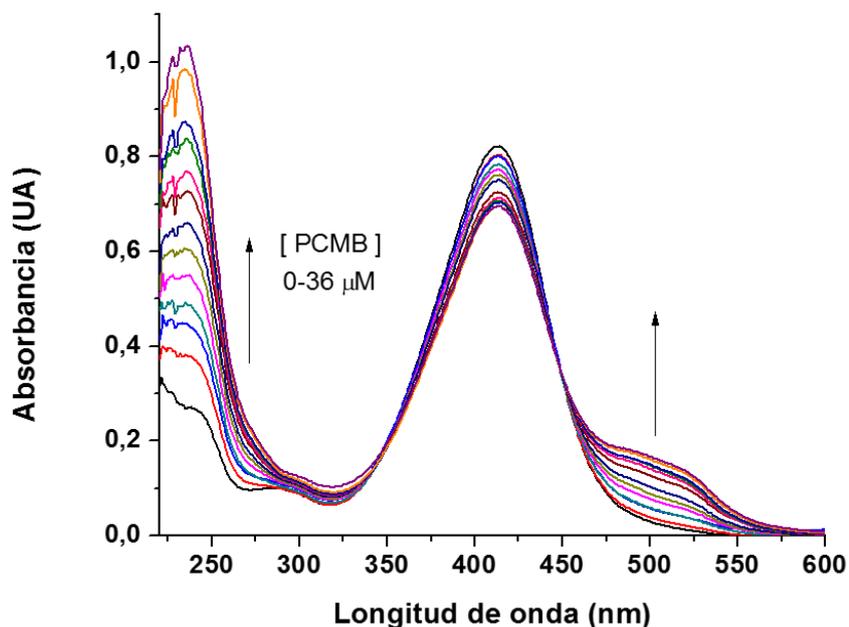


Figura 30. Titulación de la enzima con PCMB en presencia de PAR. A 250 nm se observa un incremento de la absorbancia a medida que se aumenta la concentración de PCMB y éste reacciona con los tioles. A 500 nm se observa un incremento de la absorbancia a medida que el PAR se acompleja con el Zn^{2+}

Al tratar a la enzima con PCMB se puede constatar la liberación del Zn^{2+} a medida que los tioles reaccionan con el mercurial. No parece que sean los tioles que coordinan al Zn^{2+} los primeros en reaccionar con el mercurial ya que el

aumento de absorbancia a 500 nm continúa hasta que todos los tioles reducidos reaccionaron ya con el PCMB (Figura 32). Se puede titular el Zn^{2+} liberado usando el $\Delta\epsilon(500\text{ nm}) = 6.6 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [113] que corresponde a 3 μM , equimolar con la concentración de SIRT1 utilizada.

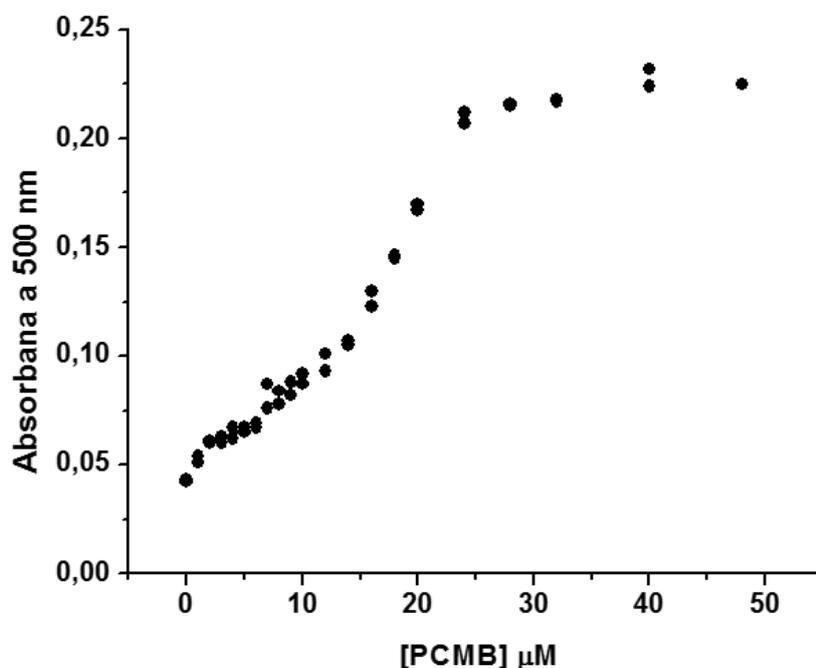


Figura 32 Titulación del zinc liberado siguiendo absorbancia del complejo $PAR+Zn^{2+}$ a 500 nm a medida que se hacen reaccionar los tioles con concentraciones crecientes de PCMB. Sirt1 2 μM

Se midió actividad enzimática a la proteína luego de ser titulada con PCMB (Figura 32) y como era de esperarse la proteína post tratamiento con PCMB se inactiva, otra vez apuntando a que es indispensable para que la proteína este activa que al menos algunos de su tioles estén reducidos. La proteína tratada con DTT luego de ser modificada por PCMB vuelve a ser activa. Una posibilidad es que el PCMB al reaccionar con los tioles que coordinan al Zn^{2+} provoque que este último se desprenda de la enzima. El DTT revertirá esto volviendo a dejar a las cisteína reducidas para que puedan coordinar nuevamente al Zn^{2+} , y recuperar su actividad.

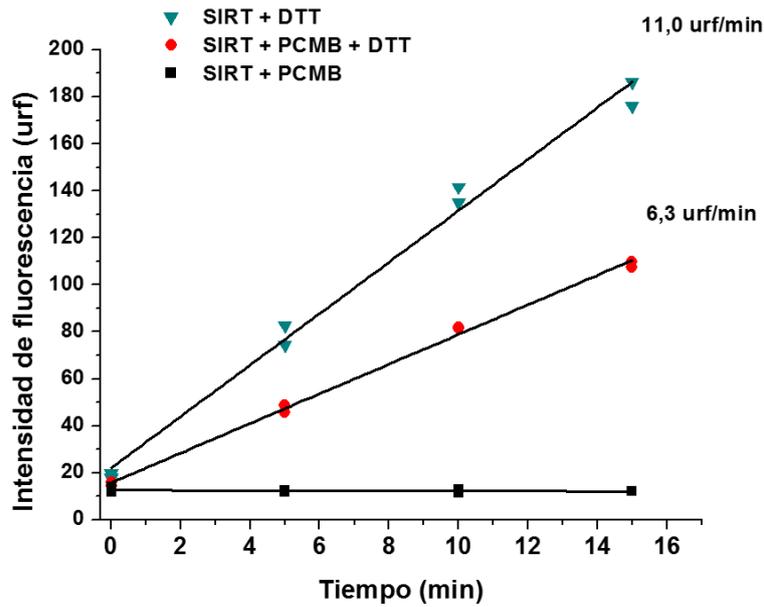


Figura 33. Medidas de actividad de la muestra tratada con PCMB. SIRT1 2 μM fue tratada con 30 μM de p-cloromercuriobenzoato y luego reducida con un exceso de 5 mM DTT. Las medidas de actividad se realizaron con 1 μM de enzima, 50 μM péptido y 1 mM NAD como se describe en materiales y métodos.

En alguno de los trabajos publicados se ha encontrado que las modificaciones oxidativas de SIRT1 se dan en alguna de las cisteínas que coordinan al Zn^{2+} . Si esto sucede así cuando se expone la proteína a H_2O_2 , se espera que Zn^{2+} se desprenda de la enzima, lo que explicaría la caída en la actividad enzimática. Para determinar si esto es lo que estaba sucediendo con rhSIRT1, se trató a la enzima con distintas concentraciones de H_2O_2 y luego se procedió a medir Zn^{2+} utilizando PAR. En la Figura 34 queda evidenciado que los tratamientos con H_2O_2 no están afectando la unión de Zn^{2+} a la enzima a pesar de observarse una caída en la actividad enzimática.

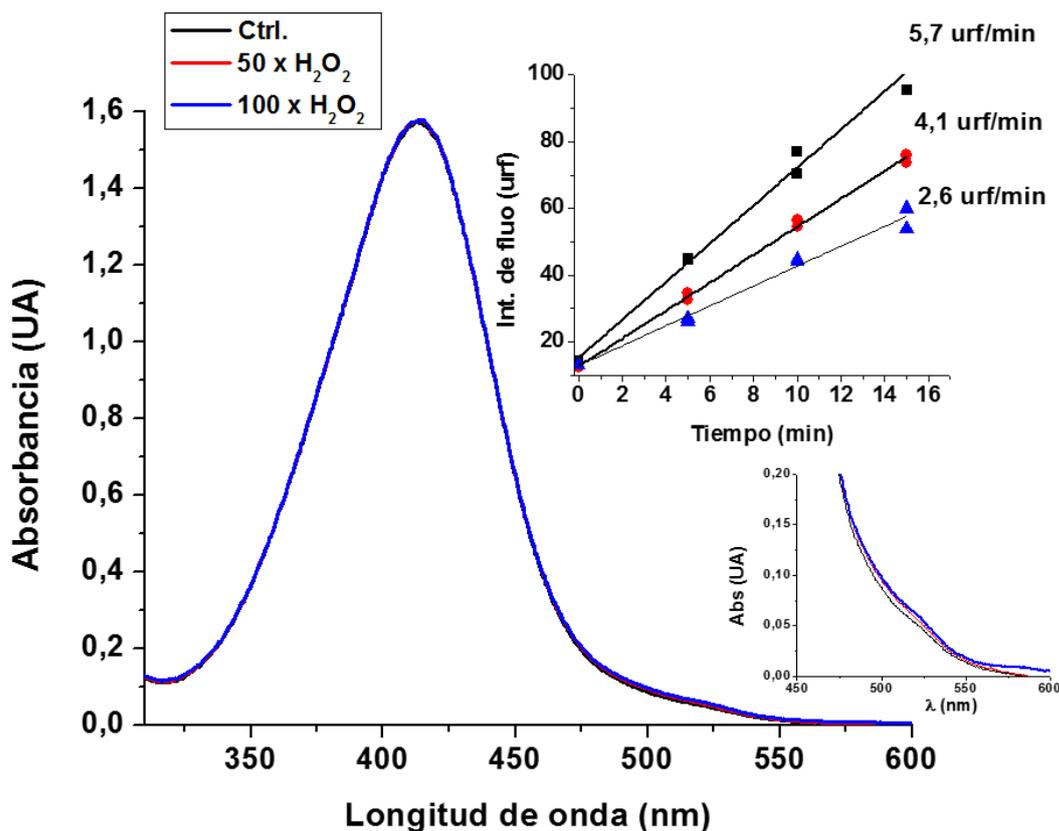


Figura 34. Espectro de absorción de PAR en presencia de SIRT1 oxidada con H_2O_2 . Se puede ver que no hay un aumento en la absorbancia a 500 nm lo que significa que el H_2O_2 no provoca la liberación del Zn^{2+} de la enzima. Para este experimento se trató 5 μM de enzima con 250 μM o 500 μM H_2O_2 . El espectro control es de 5 μM SIRT1.

4.3. Interacción DBC1/SIRT1

La interacción de SIRT1 con la proteína inhibitoria DBC1 se ve afectada *in vivo* en condiciones de estrés oxidativo [107]. Resulta interesante investigar cuáles son las razones de estos cambios.

Se realizaron algunos experimentos en células para determinar si es que existe un efecto del H_2O_2 en la interacción entre SIRT1 y DBC1. Como ya se ha reportado, la exposición a peróxido de hidrogeno aumenta la unión de las dos proteínas al gatillar la fosforilación de la T454 de DBC1 [107]. Buscando un cambio en la interacción entre las proteínas, independiente de la fosforilación de la treonina, se realizaron experimentos con DBC1 wt y un mutante de DBC1 donde se sustituyó el residuo treonina 454 por alanina mediante mutagénesis dirigida (T454A). Se cotransfectaron células T293 con plásmidos de expresión para SIRT1-Flag y DBC1/DBC1T454A-HA. En la Figura 35 se muestran resultados de western blot donde se inmunoprecipitó a SIRT1-Flag utilizando

anticuerpos α -Flag. El control negativo de la inmunoprecipitación fue bueno pero no se lograron detectar cambios en la unión de SIRT1 a DBC1 wt/T454A en ninguna de las condiciones. En este experimento falló el control positivo con etopósido, un compuesto que aumenta la interacción de DBC1 con SIRT1, pero en este caso no se logró ver ese aumento (más bien hubo menos complejo DBC1-SIRT1). Esto puede haber ocurrido porque los niveles de expresión transitoria en células T293 son tan altos que el efecto fisiológico que pudiera ocasionar el peróxido o el etopósido podría quedar enmascarado.

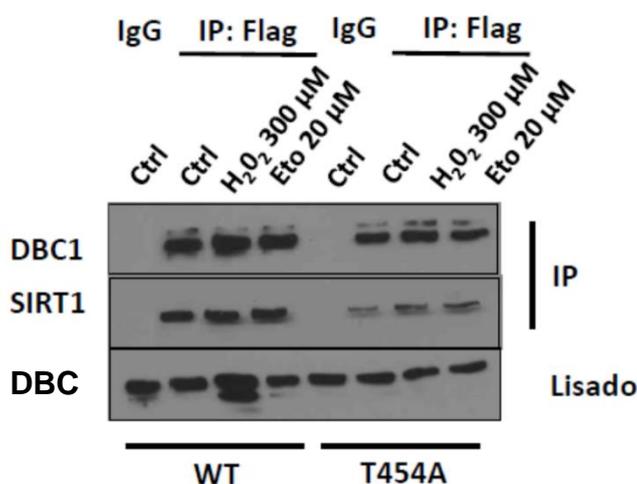


Figura 35 Coinmunoprecipitación del complejo SIRT1/DBC1 en HEK293 Western blot de coimmunoprecipitación de SIRT1/DBC1 en células HEK293 cotransfectadas con FLAG-SIRT1 y HA-DBC1, y de los respectivos controles.

Se decidió entonces, hacer experimentos similares pero utilizando células HeLa. A diferencia de las células HEK293T, la línea celular HeLa expresa menores niveles de proteína, entonces se esperaba evidenciar los cambios en la unión que no se lograron ver con los experimentos con la línea HEK293. Se utilizaron células HeLa modificadas para expresar constitutivamente flag-DBC1 wt o flag-DBC1 T454A. Se transfectaron las células para que expresaran de manera transitoria SIRT1. Se inmunoprecipitó DBC1 utilizando anticuerpos anti-flag, y se realizaron los westerns blots correspondientes para determinar la unión de las dos proteínas. No se logró obtener buenos resultados con las células HeLa. La calidad de los western no fue suficiente como para sacar conclusiones sobre el efecto de los tratamientos en la unión DBC1-SIRT1. Se necesita afinar un poco más las condiciones del ensayo para la obtención de resultados concluyentes.

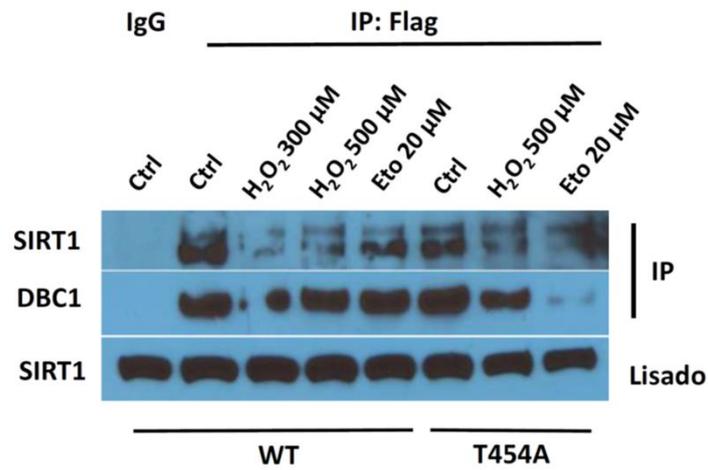


Figura 36 Western blot de coimmunoprecipitación de SIRT1/DBC1 en células HeLa
 Western blot del resultado de la coimmunoprecipitación de SIRT1/DBC1 en células HeLa modificadas para expresar constitutivamente DBC1 wt o DBC1 T454A, transfectadas transitoriamente con HA-SIRT1. Se trataron a las células con distinta concentración de H₂O₂ o Etopósido,

5. Conclusiones y perspectivas

Para la caracterización de las modificaciones oxidativas en SIRT1 se produjo la hSIRT1 recombinante en *E coli*. Se trata de una proteína grande (81,6 kDa) con dominios desestructurados [37], lo que hace que se exprese con un bajo rendimiento en este sistema procariota. Se logró purificar a la proteína en dos pasos de purificación con un alto grado de pureza, aunque se constató la presencia minoritaria de otras proteínas. Sería interesante en el futuro hacer el intento de expresar la proteína en un sistema eucariota como por ejemplo levaduras.

Se confirmó la identidad de hSIRT1 recombinante por espectrometría de masas y se evaluó su calidad funcional según su capacidad enzimática. Los parámetros cinéticos obtenidos para la enzima, fueron coherentes con los ya reportados en la bibliografía. Esto nos da el indicio de que estructuralmente la enzima está correctamente plegada. El espectro de dicroísmo circular en el uv lejano demuestra que la proteína obtenida tiene una estructura secundaria definida, mayoritariamente estructura alfa hélice.

El método fluorescente es usado comúnmente para medir actividad desacetilasa de SIRT1, principalmente en la búsqueda de compuestos inhibidores y activadores de la enzima. Este cuenta con la desventaja de ser un método discontinuo y utilizar un péptido unido a un fluoróforo que en algunos casos genera resultados artefactuales [97], [118]. En este trabajo se logró además la puesta a punto de un método alternativo, el ensayo acoplado propuesto en [110]. Este último permite el seguimiento de la actividad en forma continua, y el sustrato peptídico utilizado no necesita de una etiqueta fluorescente, lo que lo hace más similar al sustrato endógeno y evita interacciones artefactuales. Para la implementación del método se purificó a nicotinamidasasa Pnc1 de levadura recombinante con un buen rendimiento y un excelente grado de pureza.

Se exploró la posibilidad de que oxidantes biológicos afecten la actividad de hSIRT1 en condiciones de estrés oxidativo, como las que se pueden dar en determinados contextos inflamatorios y establecer una conexión entre las

funciones que se le atribuyen a SIRT1 y enfermedades asociadas con estrés oxidativo. Los tratamientos se realizaron con peróxido de hidrógeno y peroxinitrito, dos reconocidos oxidantes biológicos producidos en situaciones de estrés oxidativo. Teniendo en cuenta que los residuos aminoacídicos más susceptibles a ser oxidados por estos compuestos son cisteínas y que SIRT1 cuenta con 19 de éstas en su estructura primaria, se hizo foco en lo que sucede con estos residuos. A pesar de que no hay cisteínas participando en el mecanismo catalítico, encontramos que al tratar a hSIRT1 con N-etilmaleimida, un alquilante de los grupos sulfhidrilo, la actividad de la enzima disminuye significativamente. Se intentó identificar por espectrometría de masa a los residuos alquilados pero la cobertura del análisis no pudo identificar cisteínas modificadas. La optimización de las condiciones experimentales que permitan analizar las modificaciones oxidativas de hSIRT1 queda pendiente. La alquilación de SIRT1 por NEM ya ha sido sugerida en un trabajo donde se exponen cultivos celulares a este agente alquilante [101] aunque no se determina el efecto de la alquilación sobre la actividad desacetilasa sino que se observan menores niveles intracelulares de SIRT1 luego del tratamiento con NEM. De nuestros resultados queda claro entonces que la modificación de al menos algunas de las cisteínas tiene un efecto inhibitorio en la actividad desacetilasa.

Tanto con DTDPy como con PCMB se logran cuantificar 12-13 SH por hSIRT1 luego de reducir a la enzima con DTT, por lo tanto concluimos que los 6-7 SH restantes se encuentran menos expuestos o en regiones donde se hace menos accesible la interacción con los reactivos para tioles utilizados. Al comparar la cantidad de tioles reducidos antes y luego del tratamiento con un exceso de 50:1, H₂O₂:hSIRT1 se observa la oxidación de dos tioles por proteína acompañado de una caída del 37% en la actividad enzimática. Excesos mayores de H₂O₂ (100:1) generan la oxidación de 4 cisteínas y la disminución de 48% en la actividad enzimática con respecto al control. Estos resultados indican hSIRT1 no presenta cisteínas particularmente reactivas con H₂O₂, y muy interesante, que algunas cisteínas aunque no participan de la catálisis, son críticas para la actividad ya que la oxidación de algunas de ellas definitivamente disminuye la actividad desacetilasa de SIRT1.

Se ha reportado que los tioles que coordinan al Zn²⁺ pueden oxidarse produciendo que se desprenda el zinc, generando un cambio estructural que

lleva a la inactivación de SIRT1 [98], [100]. En los experimentos de titulación de tioles con PCMB, a medida que las cisteínas reaccionan con el mercurial se puede seguir el desprendimiento del Zn^{2+} de la enzima. La titulación con PCMB, en concordancia con los resultados anteriores, induce la inactivación de la enzima. Esta inactivación es revertida al reducir la proteína tratada con DTT. La recuperación de la actividad puede estar debiéndose a la reincorporación del Zn^{2+} en la enzima. Ahora, nuestros resultados muestran que la oxidación de tioles de SIRT1 con H_2O_2 no conduce a la liberación del metal de la enzima, por lo que el mecanismo de inactivación por H_2O_2 responde a la oxidación de cisteínas distintas a las que coordinan al Zn^{2+} .

En los tratamientos con $ONOO^-$ se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con la enzima tratada con H_2O_2 . Se oxidan entre 3 y 4 SH en los tratamientos 5:1 y 10:1 $ONOO^-$:hSIRT1, respectivamente. Este resultado acompañado del resultado de los tratamientos con H_2O_2 sugiere que solo cuatro de las 12 cisteínas que logramos cuantificar son susceptibles a ser oxidadas. La caída en la actividad en los tratamientos con $ONOO^-$ es mucho más drástica, si la comparamos con la que generan los tratamientos con H_2O_2 . Los tratamientos con $ONOO^-$ 5:1 generan una disminución del 74 % en la actividad de la enzima tratada con respecto a la reducida y en tratamiento 10:1 la actividad enzimática baja un 90%. No podemos afirmar que se oxiden los mismos residuos de cisteína con el tratamiento con ambos peróxidos. Además, se pueden estar modificando otros residuos. De hecho, el análisis por western blot de la muestra tratada con $ONOO^-$ evidenció nitración de tirosinas. La nitración de una tirosina muy conservada asociada a la pérdida de actividad enzimática ha sido reportada para la hSIRT6 [104]. La identificación de cuáles son los residuos (cisteínas, tirosinas) modificados por el tratamiento con peróxidos sería de interés abordar próximamente.

En los análisis estructurales realizados por dicroísmo circular y fluorescencia se constata que no hay cambios significativos post-tratamiento con los peróxidos, salvo una pérdida de estructura alfa-hélice en la oxidación con H_2O_2 . Tampoco se logró determinar liberación de zinc asociada con la oxidación de tioles y pérdida de actividad.

En conclusión podemos afirmar que en un contexto inflamatorio las especies reactivas generadas pueden oxidar cisteínas (y otros residuos) de hSIRT1

disminuyendo su actividad lo que podría generar una retroalimentación positiva de los procesos inflamatorios.

Es bien conocida la interacción de SIRT1 con la proteína inhibitoria DBC1. En los trabajos publicados respecto al tema se han utilizado modelos celulares y animales. Esto nos motivó a intentar obtener DBC1 recombinante para realizar estudios *in vitro* que permitan profundizar en aspectos termodinámicos y estructurales de la interacción proteína-proteína, SIRT1- DBC1. Se generó un vector de expresión de DBC1 para *E coli*. La proteína se logró expresar en una cepa de expresión de *E coli* y aunque se trata de una proteína que se agrega fácilmente encontrándose mayoritariamente en la fracción insoluble durante su purificación, una parte importante se mantiene soluble. La purificación de DBC1 mediante un solo paso de cromatografía no es suficiente para obtenerla pura. Es necesario seguir avanzando en la puesta a punto de condiciones donde la proteína se mantenga en solución lo que permitirá sumar pasos de purificación que permitan el aislamiento de la enzima.

Se incursionó en el estudio del efecto de H₂O₂ sobre la interacción de DBC1-SIRT1 *in vivo*. Aunque los resultados obtenidos no fueron concluyentes, se logró obtener experiencia en el manejo de la técnica de inmunoprecipitación, la cual es sumamente útil para determinar la interacción entre macromoléculas *in vivo*. Se debe continuar con la optimización de las condiciones experimentales para estudiar *in vivo* las interacciones SIRT1-DBC1.

6. Referencias

- [1] D. Shore, M. Squire, and K. A. Nasmyth, "Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes.," *EMBO J.*, vol. 3, no. 12, pp. 2817–2823, Dec. 1984.
- [2] S. Greiss and A. Gartner, "Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation," *Mol. Cells*, vol. 28, no. 5, pp. 407–415, Nov. 2009.
- [3] R. A. Frye, "Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 273, no. 2, pp. 793–798, Jul. 2000.
- [4] R. H. Houtkooper, E. Pirinen, and J. Auwerx, "Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 4, pp. 225–238, Apr. 2012.
- [5] D. Rauh, F. Fischer, M. Gertz, M. Lakshminarasimhan, T. Bergbrede, F. Aladini, C. Kambach, C. F. W. Becker, J. Zerweck, M. Schutkowski, and C. Steegborn, "An acetylome peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms," *Nat. Commun.*, vol. 4, Sep. 2013.
- [6] B. J. North, B. L. Marshall, M. T. Borra, J. M. Denu, and E. Verdin, "The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD⁺-Dependent Tubulin Deacetylase," *Mol. Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 437–444, Jan. 2003.
- [7] M. Gotta, S. Strahl-Bolsinger, H. Renauld, T. Laroche, B. K. Kennedy, M. Grunstein, and S. M. Gasser, "Localization of Sir2p: the nucleolus as a compartment for silent information regulators," *EMBO J.*, vol. 16, no. 11, pp. 3243–3255, Jun. 1997.
- [8] S. Imai, C. M. Armstrong, M. Kaeberlein, and L. Guarente, "Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase," *Nature*, vol. 403, no. 6771, pp. 795–800, Feb. 2000.
- [9] L. Guarente and F. Picard, "Calorie Restriction— the SIR2 Connection," *Cell*, vol. 120, no. 4, pp. 473–482, Feb. 2005.
- [10] C. M. McCay, M. F. Crowell, and L. A. Maynard, "The Effect of Retarded Growth Upon the Length of Life Span and Upon the Ultimate Body Size One Figure," *J. Nutr.*, vol. 10, no. 1, pp. 63–79, Jul. 1935.
- [11] R. Weindruch, P. H. Naylor, A. L. Goldstein, and R. L. Walford, "Influences of Aging and Dietary Restriction on Serum Thymosinal Levels in Mice," *J. Gerontol.*, vol. 43, no. 2, pp. B40–B42, Mar. 1988.
- [12] R. Weindruch, R. L. Walford, S. Fligiel, and D. Guthrie, "The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake," *J. Nutr.*, vol. 116, no. 4, pp. 641–654, Apr. 1986.
- [13] R. M. Anderson, M. Latorre-Esteves, A. R. Neves, S. Lavu, O. Medvedik, C. Taylor, K. T. Howitz, H. Santos, and D. A. Sinclair, "Yeast life-span extension by calorie restriction is independent of NAD fluctuation," *Science*, vol. 302, no. 5653, pp. 2124–2126, Dec. 2003.
- [14] S.-J. Lin, M. Kaeberlein, A. A. Andalis, L. A. Sturtz, P.-A. Defossez, V. C. Culotta, G. R. Fink, and L. Guarente, "Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration," *Nature*, vol. 418, no. 6895, pp. 344–348, Jul. 2002.

- [15] H. A. Tissenbaum and L. Guarente, "Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*," *Nature*, vol. 410, no. 6825, pp. 227–230, Mar. 2001.
- [16] S. J. Lin, P. A. Defossez, and L. Guarente, "Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*," *Science*, vol. 289, no. 5487, pp. 2126–2128, Sep. 2000.
- [17] B. Rogina and S. L. Helfand, "Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 45, pp. 15998–16003, Nov. 2004.
- [18] R. J. Colman, T. M. Beasley, J. W. Kemnitz, S. C. Johnson, R. Weindruch, and R. M. Anderson, "Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys," *Nat. Commun.*, vol. 5, Apr. 2014.
- [19] Y. Kanfi, S. Naiman, G. Amir, V. Peshti, G. Zinman, L. Nahum, Z. Bar-Joseph, and H. Y. Cohen, "The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice," *Nature*, vol. 483, no. 7388, pp. 218–221, Mar. 2012.
- [20] S. Naiman and H. Y. Cohen, "The contentious history of sirtuin debates," *Rambam Maimonides Med. J.*, vol. 3, no. 4, p. e0022, Oct. 2012.
- [21] A. Satoh, C. S. Brace, N. Rensing, P. Cliften, D. F. Wozniak, E. D. Herzog, K. A. Yamada, and S.-I. Imai, "Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH," *Cell Metab.*, vol. 18, no. 3, pp. 416–430, Sep. 2013.
- [22] D. Chen, J. Bruno, E. Easlson, S.-J. Lin, H.-L. Cheng, F. W. Alt, and L. Guarente, "Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction," *Genes Dev.*, vol. 22, no. 13, pp. 1753–1757, Jul. 2008.
- [23] Z. Gerhart-Hines, J. T. Rodgers, O. Bare, C. Lerin, S.-H. Kim, R. Mostoslavsky, F. W. Alt, Z. Wu, and P. Puigserver, "Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha," *EMBO J.*, vol. 26, no. 7, pp. 1913–1923, Apr. 2007.
- [24] F. Picard, M. Kurtev, N. Chung, A. Topark-Ngarm, T. Senawong, R. Machado De Oliveira, M. Leid, M. W. McBurney, and L. Guarente, "Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma," *Nature*, vol. 429, no. 6993, pp. 771–776, Jun. 2004.
- [25] E. Michishita, J. Y. Park, J. M. Burneskis, J. C. Barrett, and I. Horikawa, "Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins," *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 10, pp. 4623–4635, Oct. 2005.
- [26] M. Tanno, J. Sakamoto, T. Miura, K. Shimamoto, and Y. Horio, "Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 9, pp. 6823–6832, Mar. 2007.
- [27] H. Vaziri, S. K. Dessain, E. Ng Eaton, S. I. Imai, R. A. Frye, T. K. Pandita, L. Guarente, and R. A. Weinberg, "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase," *Cell*, vol. 107, no. 2, pp. 149–159, Oct. 2001.
- [28] M. C. Haigis, R. Mostoslavsky, K. M. Haigis, K. Fahie, D. C. Christodoulou, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, M. Karow, G. Blander, C. Wolberger, T. A. Prolla, R. Weindruch, F. W. Alt, and L. Guarente, "SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic β Cells," *Cell*, vol. 126, no. 5, pp. 941–954, Aug. 2006.

- [29] T. Shi, F. Wang, E. Stieren, and Q. Tong, "SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 14, pp. 13560–13567, Apr. 2005.
- [30] R. A. Frye, "Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 260, no. 1, pp. 273–279, Jun. 1999.
- [31] J. Du, Y. Zhou, X. Su, J. J. Yu, S. Khan, H. Jiang, J. Kim, J. Woo, J. H. Kim, B. H. Choi, B. He, W. Chen, S. Zhang, R. A. Cerione, J. Auwerx, Q. Hao, and H. Lin, "Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase," *Science*, vol. 334, no. 6057, pp. 806–809, Nov. 2011.
- [32] L. Santos, C. Escande, and A. Denicola, "Potential Modulation of Sirtuins by Oxidative Stress," *Oxid. Med. Cell. Longev.*
- [33] B. D. Sanders, B. Jackson, and R. Marmorstein, "Structural Basis for Sirtuin Function: What We Know and What We Don't," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1804, no. 8, pp. 1604–1616, Aug. 2010.
- [34] H. Kang, J.-Y. Suh, Y.-S. Jung, J.-W. Jung, M. K. Kim, and J. H. Chung, "Peptide switch is essential for Sirt1 deacetylase activity," *Mol. Cell*, vol. 44, no. 2, pp. 203–213, Oct. 2011.
- [35] M. Pan, H. Yuan, M. Brent, E. C. Ding, and R. Marmorstein, "SIRT1 Contains N- and C-terminal Regions That Potentiate Deacetylase Activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 4, pp. 2468–2476, Jan. 2012.
- [36] A. M. Davenport, F. M. Huber, and A. Hoelz, "Structural and functional analysis of human SIRT1," *J. Mol. Biol.*, vol. 426, no. 3, pp. 526–541, Feb. 2014.
- [37] I. Autiero, S. Costantini, and G. Colonna, "Human sirt-1: molecular modeling and structure-function relationships of an unordered protein," *PloS One*, vol. 4, no. 10, p. e7350, 2009.
- [38] J. Min, J. Landry, R. Sternglanz, and R. M. Xu, "Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex," *Cell*, vol. 105, no. 2, pp. 269–279, Apr. 2001.
- [39] M. S. Finnin, J. R. Donigian, and N. P. Pavletich, "Structure of the histone deacetylase SIRT2," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 8, no. 7, pp. 621–625, Jul. 2001.
- [40] K. Zhao, X. Chai, A. Clements, and R. Marmorstein, "Structure and autoregulation of the yeast Hst2 homolog of Sir2," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 10, no. 10, pp. 864–871, Oct. 2003.
- [41] J. L. Avalos, I. Celic, S. Muhammad, M. S. Cosgrove, J. D. Boeke, and C. Wolberger, "Structure of a Sir2 enzyme bound to an acetylated p53 peptide," *Mol. Cell*, vol. 10, no. 3, pp. 523–535, Sep. 2002.
- [42] S. T. Rao and M. G. Rossmann, "Comparison of super-secondary structures in proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 76, no. 2, pp. 241–256, May 1973.
- [43] J. L. Avalos, J. D. Boeke, and C. Wolberger, "Structural Basis for the Mechanism and Regulation of Sir2 Enzymes," *Mol. Cell*, vol. 13, no. 5, pp. 639–648, Mar. 2004.
- [44] B. M. Hirsch, Y. Hao, X. Li, C. Wesdemiotis, Z. Wang, and W. Zheng, "A mechanism-based potent sirtuin inhibitor containing N ϵ -thiocarbamoyl-lysine (TuAck)," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 21, no. 16, pp. 4753–4757, Aug. 2011.
- [45] B. M. Hirsch and W. Zheng, "Sirtuin mechanism and inhibition: explored with N(ϵ)-acetyl-lysine analogs," *Mol. Biosyst.*, vol. 7, no. 1, pp. 16–28, Jan. 2011.

- [46] A. N. Khan and P. N. Lewis, "Use of substrate analogs and mutagenesis to study substrate binding and catalysis in the Sir2 family of NAD-dependent protein deacetylases," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 17, pp. 11702–11711, Apr. 2006.
- [47] A. A. Sauve and V. L. Schramm, "Sir2 regulation by nicotinamide results from switching between base exchange and deacetylation chemistry," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 42, no. 31, pp. 9249–9256, Aug. 2003.
- [48] A. A. Sauve, "Sirtuin chemical mechanisms," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1804, no. 8, pp. 1591–1603, Aug. 2010.
- [49] Y. Zhou, H. Zhang, B. He, J. Du, H. Lin, R. A. Cerione, and Q. Hao, "The bicyclic intermediate structure provides insights into the desuccinylation mechanism of human sirtuin 5 (SIRT5)," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 34, pp. 28307–28314, Aug. 2012.
- [50] Y. Shi, Y. Zhou, S. Wang, and Y. Zhang, "Sirtuin Deacetylation Mechanism and Catalytic Role of the Dynamic Cofactor Binding Loop," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 4, no. 3, pp. 491–495, Feb. 2013.
- [51] M. D. Jackson, M. T. Schmidt, N. J. Oppenheimer, and J. M. Denu, "Mechanism of nicotinamide inhibition and transglycosidation by Sir2 histone/protein deacetylases," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 51, pp. 50985–50998, Dec. 2003.
- [52] L. Jin, W. Wei, Y. Jiang, H. Peng, J. Cai, C. Mao, H. Dai, W. Choy, J. E. Bemis, M. R. Jirousek, J. C. Milne, C. H. Westphal, and R. B. Perni, "Crystal structures of human SIRT3 displaying substrate-induced conformational changes," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 36, pp. 24394–24405, Sep. 2009.
- [53] Y. Cen and A. A. Sauve, "Transition State of ADP-Ribosylation of Acetyllysine Catalyzed by *Archaeoglobus fulgidus* Sir2 Determined by Kinetic Isotope Effects and Computational Approaches," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 35, pp. 12286–12298, Sep. 2010.
- [54] P. Hu, S. Wang, and Y. Zhang, "Highly Dissociative and Concerted Mechanism for the Nicotinamide Cleavage Reaction in Sir2Tm Enzyme Suggested by Ab Initio QM/MM Molecular Dynamics Simulations," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 49, pp. 16721–16728, Dec. 2008.
- [55] Z. Liang, T. Shi, S. Ouyang, H. Li, K. Yu, W. Zhu, C. Luo, and H. Jiang, "Investigation of the catalytic mechanism of Sir2 enzyme with QM/MM approach: SN1 vs SN2?," *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 36, pp. 11927–11933, Sep. 2010.
- [56] A. A. Sauve and D. Y. Youn, "Sirtuins: NAD(+)-dependent deacetylase mechanism and regulation," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 16, no. 5–6, pp. 535–543, Dec. 2012.
- [57] B. C. Smith and J. M. Denu, "Sir2 protein deacetylases: evidence for chemical intermediates and functions of a conserved histidine," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 45, no. 1, pp. 272–282, Jan. 2006.
- [58] M. T. Borra, M. R. Langer, J. T. Slama, and J. M. Denu, "Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 43, no. 30, pp. 9877–9887, Aug. 2004.
- [59] G. Liszt, E. Ford, M. Kurtev, and L. Guarente, "Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 22, pp. 21313–21320, Jun. 2005.

- [60] Z. Mao, C. Hine, X. Tian, M. V. Meter, M. Au, A. Vaidya, A. Seluanov, and V. Gorbunova, "SIRT6 Promotes DNA Repair Under Stress by Activating PARP1," *Science*, vol. 332, no. 6036, pp. 1443–1446, Jun. 2011.
- [61] W. F. Hawse and C. Wolberger, "Structure-based Mechanism of ADP-ribosylation by Sirtuins," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 48, pp. 33654–33661, Nov. 2009.
- [62] D. Frescas, L. Valenti, and D. Accili, "Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 21, pp. 20589–20595, May 2005.
- [63] A. Purushotham, T. T. Schug, Q. Xu, S. Surapureddi, X. Guo, and X. Li, "Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation," *Cell Metab.*, vol. 9, no. 4, pp. 327–338, Aug. 2009.
- [64] J. T. Rodgers, C. Lerin, W. Haas, S. P. Gygi, B. M. Spiegelman, and P. Puigserver, "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1," *Nature*, vol. 434, no. 7029, pp. 113–118, Mar. 2005.
- [65] J. T. Rodgers and P. Puigserver, "Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 31, pp. 12861–12866, Jul. 2007.
- [66] D. M. Erion, S. Yonemitsu, Y. Nie, Y. Nagai, M. P. Gillum, J. J. Hsiao, T. Iwasaki, R. Stark, D. Weismann, X. X. Yu, S. F. Murray, S. Bhanot, B. P. Monia, T. L. Horvath, Q. Gao, V. T. Samuel, and G. I. Shulman, "SirT1 knockdown in liver decreases basal hepatic glucose production and increases hepatic insulin responsiveness in diabetic rats," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 27, pp. 11288–11293, Jul. 2009.
- [67] Y. Nie, D. M. Erion, Z. Yuan, M. Dietrich, G. I. Shulman, T. L. Horvath, and Q. Gao, "STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1," *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 4, pp. 492–500, Apr. 2009.
- [68] Y. Liu, R. Dentin, D. Chen, S. Hedrick, K. Ravnskjaer, S. Schenk, J. Milne, D. J. Meyers, P. Cole, J. Yates, J. Olefsky, L. Guarente, and M. Montminy, "A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange," *Nature*, vol. 456, no. 7219, pp. 269–273, Nov. 2008.
- [69] P. W. Caton, N. K. Nayuni, J. Kieswich, N. Q. Khan, M. M. Yaqoob, and R. Corder, "Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis through induction of SIRT1 and GCN5," *J. Endocrinol.*, vol. 205, no. 1, pp. 97–106, Apr. 2010.
- [70] R.-H. Wang, H.-S. Kim, C. Xiao, X. Xu, O. Gavrilova, and C.-X. Deng, "Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 11, pp. 4477–4490, Nov. 2011.
- [71] W. C. Hallows, W. Yu, and J. M. Denu, "Regulation of glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase-1 by Sirt1 protein-mediated deacetylation," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 6, pp. 3850–3858, Feb. 2012.
- [72] C. Escande, C. C. S. Chini, V. Nin, K. M. Dykhouse, C. M. Novak, J. Levine, J. van Deursen, G. J. Gores, J. Chen, Z. Lou, and E. N. Chini, "Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to

- high-fat diet-induced liver steatosis in mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 2, pp. 545–558, Feb. 2010.
- [73] Y. Li, S. Xu, A. Giles, K. Nakamura, J. W. Lee, X. Hou, G. Donmez, J. Li, Z. Luo, K. Walsh, L. Guarente, and M. Zang, “Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver,” *FASEB J.*, vol. 25, no. 5, pp. 1664–1679, May 2011.
- [74] A. K. Walker, F. Yang, K. Jiang, J.-Y. Ji, J. L. Watts, A. Purushotham, O. Boss, M. L. Hirsch, S. Ribich, J. J. Smith, K. Israelian, C. H. Westphal, J. T. Rodgers, T. Shioda, S. L. Elson, P. Mulligan, H. Najafi-Shoushtari, J. C. Black, J. K. Thakur, L. C. Kadyk, J. R. Whetstone, R. Mostoslavsky, P. Puigserver, X. Li, N. J. Dyson, A. C. Hart, and A. M. Näär, “Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP,” *Genes Dev.*, vol. 24, no. 13, pp. 1403–1417, Jul. 2010.
- [75] K. A. Moynihan, A. A. Grimm, M. M. Plueger, E. Bernal-Mizrachi, E. Ford, C. Cras-Méneur, M. A. Permutt, and S.-I. Imai, “Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice,” *Cell Metab.*, vol. 2, no. 2, pp. 105–117, Aug. 2005.
- [76] L. Bordone, M. C. Motta, F. Picard, A. Robinson, U. S. Jhala, J. Apfeld, T. McDonagh, M. Lemieux, M. McBurney, A. Szilvasi, E. J. Easlson, S.-J. Lin, and L. Guarente, “Sirt1 Regulates Insulin Secretion by Repressing UCP2 in Pancreatic β Cells,” *PLoS Biol.*, vol. 4, no. 2, Feb. 2006.
- [77] S. Rajendrasozhan, S.-R. Yang, V. L. Kinnula, and I. Rahman, “SIRT1, an Antiinflammatory and Antiaging Protein, Is Decreased in Lungs of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 177, no. 8, pp. 861–870, Apr. 2008.
- [78] T. Yoshizaki, J. C. Milne, T. Imamura, S. Schenk, N. Sonoda, J. L. Babendure, J.-C. Lu, J. J. Smith, M. R. Jirousek, and J. M. Olefsky, “SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, no. 5, pp. 1363–1374, Mar. 2009.
- [79] T. Yoshizaki, S. Schenk, T. Imamura, J. L. Babendure, N. Sonoda, E. J. Bae, D. Y. Oh, M. Lu, J. C. Milne, C. Westphal, G. Bandyopadhyay, and J. M. Olefsky, “SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity,” *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 298, no. 3, pp. E419–428, Mar. 2010.
- [80] T. T. Schug, Q. Xu, H. Gao, A. Peres-da-Silva, D. W. Draper, M. B. Fessler, A. Purushotham, and X. Li, “Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 30, no. 19, pp. 4712–4721, Oct. 2010.
- [81] P. T. Pfluger, D. Herranz, S. Velasco-Miguel, M. Serrano, and M. H. Tschöp, “Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 28, pp. 9793–9798, Jul. 2008.
- [82] F. Xu, Z. Gao, J. Zhang, C. A. Rivera, J. Yin, J. Weng, and J. Ye, “Lack of SIRT1 (Mammalian Sirtuin 1) activity leads to liver steatosis in the SIRT1 \pm mice: a role of lipid mobilization and inflammation,” *Endocrinology*, vol. 151, no. 6, pp. 2504–2514, Jun. 2010.
- [83] F. Yeung, J. E. Hoberg, C. S. Ramsey, M. D. Keller, D. R. Jones, R. A. Frye, and M. W. Mayo, “Modulation of NF- κ B-dependent transcription and

- cell survival by the SIRT1 deacetylase," *EMBO J.*, vol. 23, no. 12, pp. 2369–2380, Jun. 2004.
- [84] P. Li, Y. Zhao, X. Wu, M. Xia, M. Fang, Y. Iwasaki, J. Sha, Q. Chen, Y. Xu, and A. Shen, "Interferon gamma (IFN- γ) disrupts energy expenditure and metabolic homeostasis by suppressing SIRT1 transcription," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 4, pp. 1609–1620, Feb. 2012.
- [85] M. Dvir-Ginzberg, V. Gagarina, E. J. Lee, R. Booth, O. Gabay, and D. J. Hall, "Tumor Necrosis Factor α -Mediated Cleavage and Inactivation of SirT1 in Human Osteoarthritic Chondrocytes," *Arthritis Rheum.*, vol. 63, no. 8, pp. 2363–2373, Aug. 2011.
- [86] A. Chalkiadaki and L. Guarente, "High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction," *Cell Metab.*, vol. 16, no. 2, pp. 180–188, Aug. 2012.
- [87] H. Sies, "Introductory remarks, In: Oxidative Stress (H. Sies, ed.)," in *Oxidative stress*, London: Academic Press, 1985.
- [88] L. Flohé, "Changing paradigms in thiology from antioxidant defense toward redox regulation," *Methods Enzymol.*, vol. 473, pp. 1–39, 2010.
- [89] C. Jacob and P. G. Winyard, *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine*. Wiley, 2009.
- [90] D. P. Jones, "Redefining oxidative stress," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 8, no. 9–10, pp. 1865–1879, Oct. 2006.
- [91] B. Halliwell, M. V. Clement, and L. H. Long, "Hydrogen peroxide in the human body," *FEBS Lett.*, vol. 486, no. 1, pp. 10–13, Dec. 2000.
- [92] P. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease," *Physiol. Rev.*, vol. 87, no. 1, pp. 315–424, Jan. 2007.
- [93] I. Fridovich, "[5] Overview: Biological sources of O₂⁻," vol. 105, B.-M. in *Enzymology*, Ed. Academic Press, 1984, pp. 59–61.
- [94] M. Schrader and H. D. Fahimi, "Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 122, no. 4, pp. 383–393, Jul. 2004.
- [95] B. Alvarez and R. Radi, "Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins," *Amino Acids*, vol. 25, no. 3–4, pp. 295–311, Dec. 2003.
- [96] R. S. Zee, C. B. Yoo, D. R. Pimentel, D. H. Perlman, J. R. Burgoyne, X. Hou, M. E. McComb, C. E. Costello, R. A. Cohen, and M. M. Bachschmid, "Redox regulation of sirtuin-1 by S-glutathiolation," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 13, no. 7, pp. 1023–1032, Oct. 2010.
- [97] D. Cao, M. Wang, X. Qiu, D. Liu, H. Jiang, N. Yang, and R.-M. Xu, "Structural basis for allosteric, substrate-dependent stimulation of SIRT1 activity by resveratrol," *Genes Dev.*, vol. 29, no. 12, pp. 1316–1325, Jun. 2015.
- [98] M. D. Kornberg, N. Sen, M. R. Hara, K. R. Juluri, J. V. K. Nguyen, A. M. Snowman, L. Law, L. D. Hester, and S. H. Snyder, "GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins," *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 11, pp. 1094–1100, Nov. 2010.
- [99] D. Shao, J. L. Fry, J. Han, X. Hou, D. R. Pimentel, R. Matsui, R. A. Cohen, and M. M. Bachschmid, "A redox-resistant sirtuin-1 mutant protects against hepatic metabolic and oxidant stress," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 11, pp. 7293–7306, Mar. 2014.
- [100] S.-B. Jung, C.-S. Kim, Y.-R. Kim, A. Naqvi, T. Yamamori, S. Kumar, A. Kumar, and K. Irani, "Redox factor-1 activates endothelial SIRTUIN1

- through reduction of conserved cysteine sulfhydryls in its deacetylase domain,” *PloS One*, vol. 8, no. 6, p. e65415, 2013.
- [101] S. Caito, S. Rajendrasozhan, S. Cook, S. Chung, H. Yao, A. E. Friedman, P. S. Brookes, and I. Rahman, “SIRT1 is a redox-sensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress,” *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 24, no. 9, pp. 3145–3159, Sep. 2010.
- [102] K. S. Fritz, J. J. Galligan, R. L. Smathers, J. R. Roede, C. T. Shearn, P. Reigan, and D. R. Petersen, “4-Hydroxynonenal inhibits SIRT3 via thiol-specific modification,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 24, no. 5, pp. 651–662, May 2011.
- [103] J. Yang, V. Gupta, K. S. Carroll, and D. C. Liebler, “Site-specific mapping and quantification of protein S-sulphenylation in cells,” *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 4776, 2014.
- [104] S. Hu, H. Liu, Y. Ha, X. Luo, M. Motamedi, M. P. Gupta, J.-X. Ma, R. G. Tilton, and W. Zhang, “Posttranslational modification of Sirt6 activity by peroxyntirite,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 79, pp. 176–185, Feb. 2015.
- [105] J.-E. Kim, J. Chen, and Z. Lou, “DBC1 is a negative regulator of SIRT1,” *Nature*, vol. 451, no. 7178, pp. 583–586, Jan. 2008.
- [106] E.-J. Kim, J.-H. Kho, M.-R. Kang, and S.-J. Um, “Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity,” *Mol. Cell*, vol. 28, no. 2, pp. 277–290, Oct. 2007.
- [107] J. Yuan, K. Luo, T. Liu, and Z. Lou, “Regulation of SIRT1 activity by genotoxic stress,” *Genes Dev.*, vol. 26, no. 8, pp. 791–796, Apr. 2012.
- [108] C. Escande, V. Nin, T. Pirtskhalava, C. C. S. Chini, T. Tchkonja, J. L. Kirkland, and E. N. Chini, “Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype,” *Diabetes*, vol. 64, no. 1, pp. 12–22, Jan. 2015.
- [109] D. Volonte, H. Zou, J. N. Bartholomew, Z. Liu, P. A. Morel, and F. Galbiati, “Oxidative stress-induced inhibition of Sirt1 by caveolin-1 promotes p53-dependent premature senescence and stimulates the secretion of interleukin 6 (IL-6),” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 7, pp. 4202–4214, Feb. 2015.
- [110] B. C. Smith, W. C. Hallows, and J. M. Denu, “A continuous microplate assay for sirtuins and nicotinamide-producing enzymes,” *Anal. Biochem.*, vol. 394, no. 1, pp. 101–109, Nov. 2009.
- [111] U. K. Laemmli, “Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4,” *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, Aug. 1970.
- [112] C. K. Riener, G. Kada, and H. J. Gruber, “Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman’s reagent and with 4,4’-dithiodipyridine,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 373, no. 4–5, pp. 266–276, Apr. 2014.
- [113] J. B. Hunt, S. H. Neece, and A. Ginsburg, “The use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in studies of zinc release from *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase,” *Anal. Biochem.*, vol. 146, no. 1, pp. 150–157, Apr. 1985.
- [114] K. R. Andersen, N. C. Leksa, and T. U. Schwartz, “Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification,” *Proteins*, vol. 81, no. 11, pp. 1857–1861, Nov. 2013.

- [115] C. Yan and D. L. Sloan, "Purification and characterization of nicotinamide deamidase from yeast.," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 19, pp. 9082–9087, Jul. 1987.
- [116] A. Correa, C. Ortega, G. Obal, P. Alzari, R. Vincentelli, and P. Oppezzo, "Generation of a vector suite for protein solubility screening," *Front. Microbiol.*, vol. 5, p. 67, 2014.
- [117] H. Inoue, H. Nojima, and H. Okayama, "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids," *Gene*, vol. 96, no. 1, pp. 23–28, Nov. 1990.
- [118] M. T. Borra, B. C. Smith, and J. M. Denu, "Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 17, pp. 17187–17195, Apr. 2005.

7. Agradecimientos

- A CSIC Universidad de la República por el apoyo al desarrollo de la investigación en el laboratorio.
- Al SNB de la ANII.
- A PEDECIBA
- Comisión Académica de Posgrados (CAP)