

Tesina de Grado Licenciatura en Bioquímica

Sirtuinas, enzimas moduladoras del metabolismo energético

Leonardo Santos

Tutora: Dra. Ana Denicola
Laboratorio de Físicoquímica Biológica
Facultad de Ciencias, UdelaR

Diciembre 2011

INDICE

	Pág.
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
1. Síndrome metabólico vs restricción calórica	8
2. Sirtuinas	9
2.1 Descubrimiento de la familia	9
2.2 Isotipos en mamíferos	10
2.3 Mecanismo catalítico de las sirtuinas como desacetilasas	12
2.4 Estructura	16
3. SIRT1	18
3.1 Regulación	19
3.2 Funciones	21
4. Moléculas moduladoras de SIRT1	24
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y METODOS	29
1. Reactivos	32
2. Expresión y purificación de hSIRT1	
2.1 Expresión	
2.2 Preparación de extracto libre de células	
2.3 Purificación por cromatografía de afinidad	
2.4 Purificación por gel filtración	
3. Control de calidad y rendimiento de la producción de la hSIRT1-r	32
3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida	
3.2 Análisis por espectrometría de masa	
3.3 Espectro UV-Vis y espectro de fluorescencia	
3.4 Cuantificación de proteínas	
4. Medidas de Actividad	34

4.1 Método con péptido fluorescente

4.2 Medida de actividad por HPLC

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
1. Purificación de hSIRT1 recombinante	36
2. Análisis fisicoquímico de la proteína purificada	40
3. Ensayo de actividad de la proteína obtenida	42
4. Método cromatográfico de medida de actividad	43
5. Ensayo de compuestos polifenólicos como potenciales moduladores de la actividad de SIRT1	45
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	50
REFERENCIAS	51
AGRADECIMIENTOS	57

Índice de abreviaturas

AADPR - Adenosil difosfato acetil ribosa

ADPR - Adenosil difosfato ribosa

AMC - 7-amino-4-metilcumarina

β ME - β mercaptoetanol

BSA - Albumina sérica bovina

FdIP - Péptido sustrato acetilado fluorescente (RHKK(Ac)-AMC)

HPLC - Cromatografía líquida de alta performance

hSIRT1- Sirtuina de tipo 1 humana

hSIRT1-r - Sirtuina de tipo 1 humana recombinante

IMAC - Cromatografía de afinidad por iones metálicos

NAD⁺ - Dinucleótido de nicotinamida y adenina

NAM - Nicotinamida

p53mer - Péptido sustrato acetilado (RHKK(Ac)-NH₂)

PMSF - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RC - Restricción Calórica

RSV - Resveratrol

SDS - Dodecilsulfato sódico

SEC - Cromatografía de exclusión molecular

SM - Síndrome Metabólico

STACs - Compuestos activadores de SIRT1

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

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 el silenciamiento génico y la regulación metabólica, las cuales son claves en la promoción de la salud y sobrevivencia de dichos organismos. 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.

Dentro del grupo, la 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. Estos resultados posicionan a la SIRT1 como un excelente blanco terapéutico para el tratamiento de síndrome metabólico, de alta incidencia en nuestros días.

En el presente trabajo se expresó y purificó hSIRT1 recombinante. Se pusieron a punto dos técnicas de medida de actividad enzimática de SIRT1. Una de ellas fue una adaptación del método más utilizado en la bibliografía el cual utiliza un péptido sintético fluorescente como sustrato acetilado. El otro método se basó en la cuantificación de la nicotinamida producida en la reacción enzimática, utilizando cromatografía de fase reversa (HPLC-DAD). Se ensayaron diferentes compuestos polifenólicos y derivados, sintetizados en el Lab. Química Orgánica, Facultad de Química, como potenciales moduladores de actividad SIRT1. Con ninguno de los compuestos ensayados se logró una activación de la enzima, presentado algunos de ellos incluso una leve inhibición de la actividad enzimática *in vitro* de SIRT1.

Introducción

1. Síndrome metabólico vs restricción calórica

Se define como síndrome metabólico (SM) a una combinación de parámetros fisiopatológicos que incluyen a la hipertensión, obesidad abdominal, resistencia a la insulina, dislipidemia (altos niveles de triglicéridos y LDL y bajos de HDL circulando en sangre) y estados pro-trombótico y pro-inflamatorio [1]. Las causas principales que llevan al desarrollo de SM son una dieta desbalanceada (rica en carbohidratos y lípidos) y la falta de actividad física. En la actualidad existe una gran preocupación a nivel mundial a causa del aumento alarmante de la población obesa y por tanto un aumento de las patologías asociadas a la obesidad [2]. En la primer encuesta de factores de riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles, realizada en Uruguay en el 2006, se determinó que casi un 57% de la población adulta sufre de sobrepeso y/u obesidad, en tanto un 30% sufre de hipertensión arterial. Estos números no hacen más que confirmar la alta prevalencia de SM en los tiempos que corren [3].

Se sabe que la esperanza de vida de muchos organismos aumenta al ser sometidos a dietas restringidas en calorías, pero dentro de los parámetros saludables [4]. En 1935, McCay et al. publican el primer trabajo donde someten ratas a una restricción calórica (RC) y observan que se extiende su esperanza media de vida [5]. Estudios posteriores demostraron que la RC no sólo extiende la esperanza de vida máxima de otros organismos (levadura, moscas, gusanos y peces) sino también retarda su envejecimiento [4]. Se ha demostrado además que la RC impide o atenúa la gravedad de algunas enfermedades crónicas como diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares [6].

El efecto de la RC en la longevidad de los seres humanos es difícil de determinar debido a que, entre otras cosas, no es práctico llevar a cabo estudios a largo plazo. Sin embargo, hay datos epidemiológicos que sugieren que la RC también tiene efectos beneficiosos en los seres humanos con respecto a enfermedades asociadas con la vejez así como en la prolongación de la esperanza de vida [6].

Si bien el SM y la RC se relacionan con enfermedad y salud, respectivamente, parecen compartir varios de los mecanismos moleculares implicados en la manutención de la homeostasis del metabolismo energético.

Entender cuáles son los mecanismos moleculares que vinculan a la RC con el aumento de la esperanza de vida y la salud de organismos de distintas especies despierta gran interés. De un tiempo a esta parte se ha acumulado evidencia experimental que sugiere que las sirtuinas juegan un papel importante en la respuesta fisiológica a situaciones de estrés nutricional, mediando respuestas que favorecen la salud en varias clases de organismos incluyendo mamíferos [7, 8].

2. Sirtuinas

Las sirtuinas constituyen una familia de enzimas altamente conservadas en la evolución, presentes en todos los filos, desde arqueas a eucariotas superiores e incluso virus [9, 10]. Las sirtuinas o desacetilasas de histonas de clase III (HDAC III) catalizan la desacetilación de proteínas con lisinas ϵ -amino-acetiladas, utilizando como cosustrato dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (NAD⁺). Esto último las diferencia de las HDAC de clase I, II y IV, las cuales cuentan con un mecanismo catalítico dependientes de Zn²⁺ e independiente de NAD⁺[11].

2.1 Descubrimiento de la familia

Dentro de la familia de las sirtuinas se incluyen todas las enzimas homólogas a la Sir2 (Silence information regulator 2) de *Saccharomyces cerevisiae*, la primer enzima descrita de esta familia. La Sir2, formando complejos con otras proteínas, cumple funciones de silenciamiento génico, por ejemplo los loci HM (mating-type loci) y las regiones teloméricas son blancos de esta proteína [12]. Otra región del genoma de levadura bajo la regulación de Sir2 son los loci de ADNr, donde se encuentran los genes que codifican para los componentes del ribosoma. Estas regiones cuentan con secuencias repetidas donde pueden darse eventos de recombinación homóloga y la recombinación excesiva en genes esenciales como los que allí se encuentran puede ser deletérea. Además, la recombinación homóloga en los loci de ADNr da lugar a la generación de círculos extracromosómicos de ADNr (ERC sigla en inglés). La acumulación de múltiples copias de estos ERC se asocia con el envejecimiento en levaduras [13], por lo tanto Sir2 es responsable de silenciar las regiones de ADNr disminuyendo la formación de ADNr circular extracromosómico [14].

Además se ha observado que la introducción de otra copia del gen SIR2 en la levadura aumenta un 30% la esperanza de vida de las mismas [14] y estudios posteriores demostraron que la sobreexpresión de la enzima en eucariotas superiores como *D. melanogaster* y *C. elegans* también aumenta su sobrevivencia [15, 16]. En este sentido se ha asociado la activación de sirtuinas con la prolongación de la vida media del organismo. Sin embargo, un trabajo publicado recientemente desató controversia en este aspecto, ya que en el mismo no se observa el aumento de la sobrevivencia esperado al aumentar la expresión de la enzima en eucariotas inferiores, y aducen artefactos experimentales en las observaciones anteriores [17].

2.2 Isotipos en mamíferos

En mamíferos se han reportados siete isotipos de sirtuinas SIRT1-7. Todas las isoformas presentan un núcleo catalítico conservado, denominado dominio sirtuina, de entre 240-276 aa y regiones N-C-terminales muy variables en longitud y secuencia aminoácidas. El análisis filogenético de los núcleos catalíticos de 60 sirtuinas procariotas y eucariotas, dio lugar a una nueva clasificación de las sirtuinas en distintas clases y subclases (Fig.1) [18].

Los isotipos SIRT1-3 pertenecen a la clase I; además SIRT1 se subclasifica en Ia, siendo el isotipo que guarda mayor homología con respecto a Sir2, la cual también pertenece a la subclase Ia (Fig.1). Por otro lado, los isotipos SIRT4 y SIRT5 pertenecen a la clase II y III, respectivamente y SIRT6-7 a la clase IV [18].

Los diferentes isotipos tienen distintas ubicaciones subcelulares [19]. Las SIRT1, 6 y 7 fueron identificadas como proteínas nucleares, aunque se sabe que SIRT1 puede translocarse al citosol celular dependiendo del tejido [19, 20]. Así, dentro del núcleo, SIRT6 se localiza predominantemente en las regiones ricas en heterocromatina mientras que SIRT7 se encuentra en el nucléolo [19].

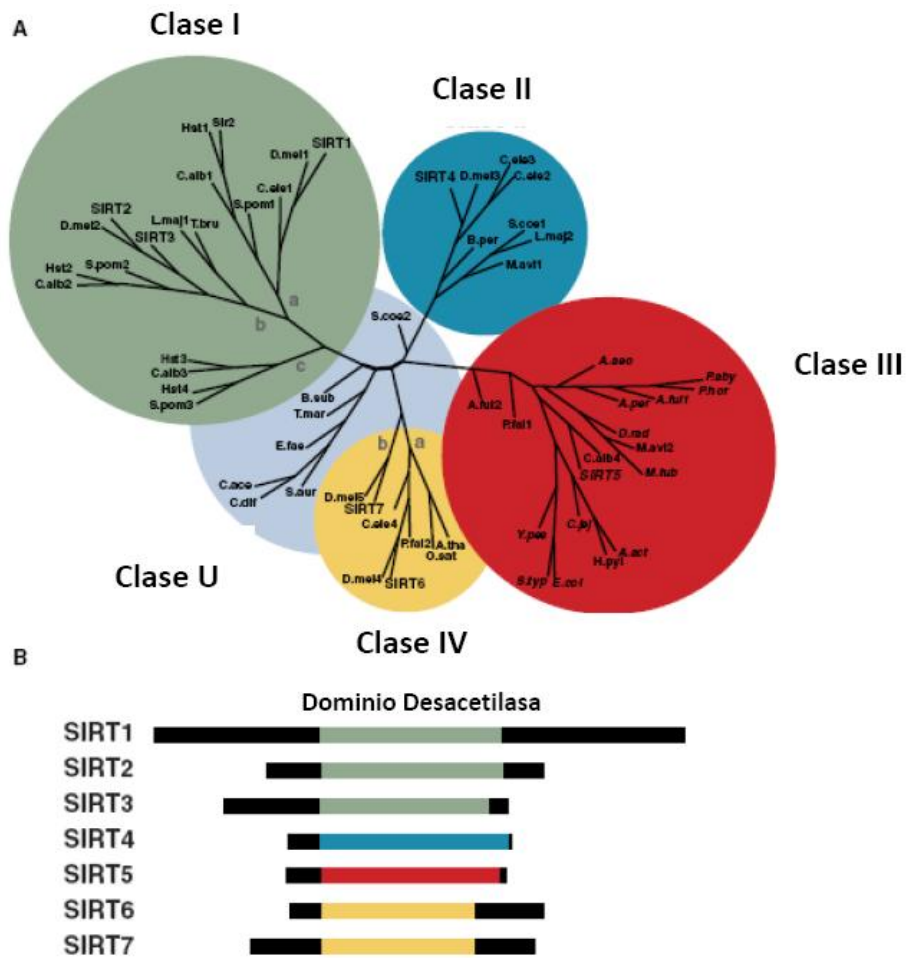


Figura 1. Subclasificación de sirtuinas de mamíferos. A) Diagrama filogenético del análisis de secuencia de dominios conservados de 60 sirtuinas. Se observa que la Sir2 de levadura y SIRT1 se encuentran muy próximas en la filogenia. B) Se representa en forma esquemática a las siete isoformas de sirtuinas de mamíferos. El dominio catalítico de la enzima se encuentra coloreado según el subgrupo al que pertenecen. En negro se ven los dominios amino y carboxilo terminal no conservados entre los distintos isotipos y como se ve con distintas extensiones. Figura extraída de [21].

SIRT2 se encuentra principalmente en el citosol, siendo uno de sus sustratos la α -tubulina [22], en tanto SIRT3-5 son sirtuinas mitocondriales [19, 23]. También es sabido que algunas sirtuinas catalizan otro tipo de reacciones además de la desacetilación. SIRT1 es una desacetilasa NAD-dependiente, en tanto SIRT4 cuenta con actividad ADP-ribosiltransferasa (Fig. 2) [24, 25]. Se ha reportado que SIRT2, SIRT3 y SIRT6 cuentan tanto con actividad desacetilasa como ADP-ribosiltransferasa [22, 26, 27]. SIRT5 cuenta con una baja eficiencia como desacetilasa pero en trabajos recientes se señala que este isotipo tiene actividad desmalonilasa y desuccinilasa NAD-dependiente [28].

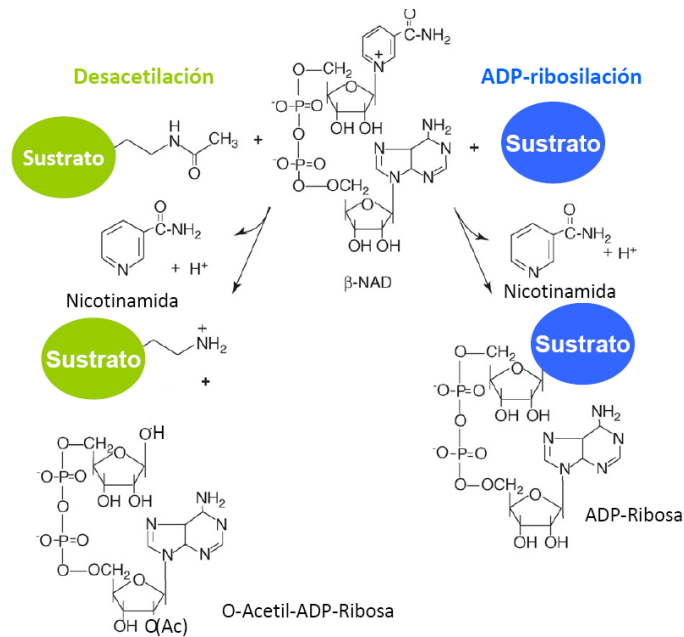


Figura 2. Esquema de las reacciones típicas catalizadas por sirtuinas. Las sirtuinas según su isotipo pueden catalizar la desacetilación de proteínas acetiladas y/o catalizar la ADP-Ribosilación de proteínas. Esquema adaptado de [29].

2.3 Mecanismo catalítico de las sirtuinas como desacetilasas

Una de las características de las sirtuinas que llama la atención es la participación de NAD^+ en el proceso de desacetilación de lisinas proteicas ϵ -amino-acetiladas.

La mayoría de las sirtuinas catalizan la hidrólisis de un enlace amida transfiriendo el grupo acetilo a la ribosa del NAD^+ a expensas de la hidrólisis de un enlace N-glicosídico. Los productos de esta reacción son nicotinamida (NAM), O-acetil-ADP-ribose (AADPr) y la lisina con su ϵ -amino libre (Fig. 3) [30].

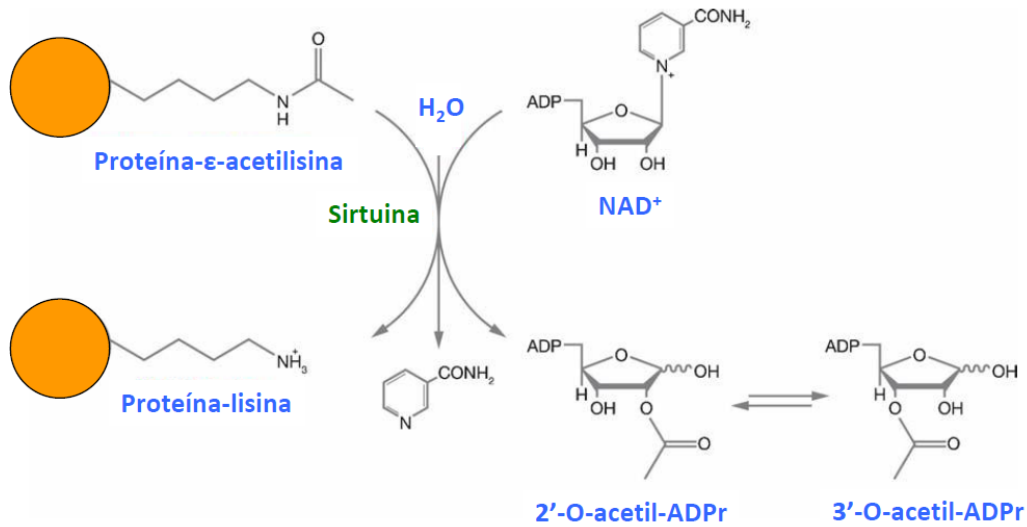


Figura 3. Reacción de desacetilación catalizada por las sirtuinas. Esquema adaptado de [31].

El consumo de NAD^+ en la reacción de desacetilación es termodinámica y cinéticamente innecesario. Entonces, ¿cuál es la razón de la química tan peculiar de este tipo de enzimas? Una de las hipótesis que se manejan, es que el producto AADPr podría estar cumpliendo un rol de segundo mensajero y/o participando en la regulación metabólica junto a la desacetilación de las proteínas blanco de sirtuinas.

Por otra parte, el requerimiento de NAD^+ en la catálisis, aleja a las sirtuinas del resto de las desacetilasas pero las asemeja a las ribosil transferasas, enzimas que catalizan la ribosilación de proteínas modificando su actividad biológica (Fig. 2). De hecho, los isotipos de mamíferos SIRT4/6, cuentan con actividad ADP-ribosiltransferasa [25, 32].

Por último cabe destacar que el uso de NAD^+ por las sirtuinas podría estar estableciendo un puente entre la modulación de sus proteínas blanco y el estado metabólico de la célula, censando la relación $NAD^+/NADH$ [33].

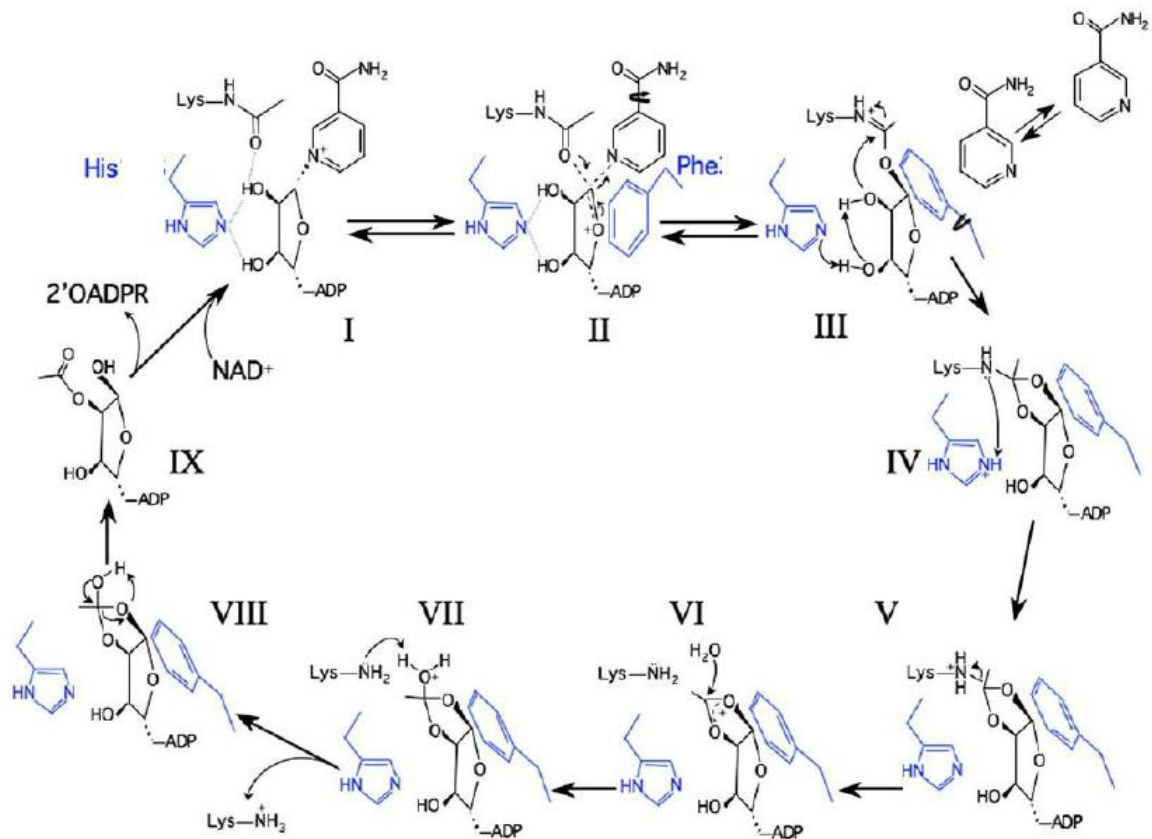


Figura 4. Mecanismo de reacción de las sirtuinas. (I) Una vez unido el sustrato acetilado y al NAD^+ , el anillo de la nicotinamida se ubica en un bolsillo hidrofóbico C y quedan enfrentadas la cara α de la N-ribose al carbonilo de la acetil lisina. La carga positiva sobre el anillo nicotinamídico dentro del bolsillo hidrofóbico se relocaliza sobre la ribosa debilitando el enlace N-ribosílico. En simultáneo el oxígeno carbonílico se aproxima a $\text{C1}'$ electrodeficiente para formar el intermediario O-alkilimidato (II) Los electrones π del fenilo de una Phe dentro del sitio activo estabiliza la carga positiva que se relocaliza en la ribosa y provee un escudo hidrofóbico evitando el ataque de una molécula de agua a $\text{C1}'$. Una vez hidrolizado el enlace glicosídico, el fenilo de la Phe rota previniendo la reformación de NAD^+ retrasando la reacción de intercambio de base. (III) Una His conservada dentro del sitio activo atrae al protón de hidroxilo 2' o 3' activando el ataque del 2' oxígeno al enlace imidato para formar el intermediario amino-acetal cíclico. (IV) Ahora la His actúa como un ácido, protona el intermediario amino acetal. (V) El enlace amida se rompe dando un ión acil-oxonio. (VI) Una molécula de agua media el ataque al intermediario cíclico. (VII) Subsecuentemente se da la sustracción de un protón por el grupo amina de la Lys del sustrato. (VIII) El $\text{O} 1'$ resuelve el acil-oxonio formando (IX) 2'-O-acetil-ADP-ribose. No se muestra en este esquema pero en solución el 2'-O-acetil-ADP-ribose entra en equilibrio con el 3'-O-acetil-ADP-ribose. Esquema extraído de [34].

Estudios cinéticos revelaron que la lisina acetilada se une primero al sitio activo de la enzima y que el NAD^+ lo hace en segundo lugar [35].

El primer paso de reacción implica el ataque nucleofílico del oxígeno del grupo acetilo sobre el $\text{C1}'$ de la ribosa del NAD^+ para formar el intermediario de reacción $\text{C1}'$ -O-alkilimidato (Fig. 4,

I,II). Aunque todavía no está claro si se trata de un ataque nucleofílico del tipo S_N1 o S_N2 , la formación del intermediario fue comprobada en varios estudios químicos y estructurales.

Por un lado se realizaron experimentos utilizando péptidos con tioacetil lisina como sustrato, en donde se observó que el ciclo catalítico de la enzima queda detenido tras la formación de un intermediario C1'-S-alkilimidato interrumpiendo la función de la misma [36]. En trabajos donde utilizan péptidos marcados con ^{18}O en el carbonilo de la lisina acetilada, como sustrato de Hst2, una de las sirtuinas de levaduras, queda demostrado que se da la transferencia directa del grupo acetilo marcado al 1'-hidroxilo de AADPr [37]. Suve et al. [38] sugieren que este intermediario puede formarse reversiblemente explicando tanto la capacidad de las sirtuinas para catalizar la ruptura y reformación del enlace N^1 - ribosilico como el requerimiento de péptidos acetilados para que se de esta segunda reacción de intercambio de base [39].

Luego de la formación del intermediario C1'-O-alkilimidato, el grupo 2'-hidroxilo del NAD^+ ribosa es activado por un residuo de histidina en el sitio activo de la enzima. El hidroxilo activo ataca el C1'-O-alkilimidato para formar el intermediario 1',2'-cíclico (Fig. 4, III-V) [39].

Por último, una molécula de agua ataca al intermediario cíclico para dar la lisina desacetilada y el OAADPr (Fig. 4, VI-IX). Esto se constata en experimentos donde se utiliza como solvente agua marcada con ^{18}O en donde se puede encontrar una mezcla de 2'AADPr y 3'AADPr con ^{18}O en el grupo acetilo [39].

Con respecto a los parámetros cinéticos de la enzima, en trabajos donde se realizaron estudios cinéticos de SIRT1 se obtuvieron valores de K_M^{NAD} en el rango de 90-600 μM [40-42]. La K_M para el péptido derivado de p53 conjugado con el fluoróforo: 64 μM y 87 μM , pero para el péptido sin fluoróforo el valor de K_M es de 10 μM [41, 42].

Las sirtuinas son inhibidas no-competitivamente, con respecto a sus dos sustratos, por nicotinamida (NAM), uno de los productos de reacción. Los valores de la constante de inhibición (K_i) para NAM reportados están en el rango de 50-150 μM [38, 43-45]. La inhibición de la actividad desacetilasa sucede porque se da la reacción reversa entre el intermediario ADPr-peptidil-imidato y la nicotinamida. Esta reacción de intercambio de base da lugar a la reformación de NAD^+ . De esta manera, la reacción de intercambio de nicotinamida compite por el intermediario peptidil imidato con la reacción de desacetilación, consumiendo al

intermediario e inhibiendo así la desacetilación [38, 45]. Además, los valores de la K_M para la reacción de intercambio de NAM y de K_i para la inhibición por NAM son muy similares, lo que sustenta el mecanismo de inhibición postulado [45].

2.4 Estructura

La información estructural disponible sobre las sirtuinas proviene principalmente de datos cristalográficos de sirtuinas de organismos inferiores.

Si bien SIRT1 es la isoforma de mamíferos más estudiada, no se ha podido cristalizar aunque se cuenta con un modelo construido computacionalmente [46]. De mamíferos, la única estructura cristalográfica reportada al momento es de SIRT2, la isoforma citosólica (Fig.5) [47]. 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 [47-52].

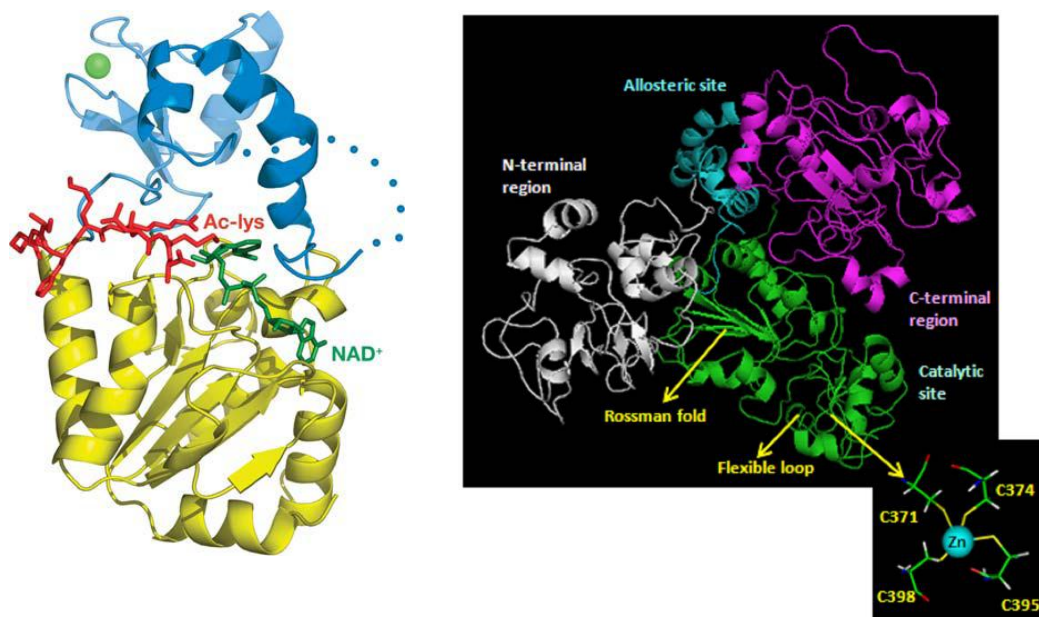


Figura 5. Estructura de dos sirtuinas. A la izquierda se puede observar la estructura cristalográfica de la hSIRT2 unido a sus dos sustratos (péptido acetilado en rojo y NAD⁺ en verde). En amarillo está coloreado el dominio grande con plegamiento de Rossman. El dominio pequeño bilobular con el sitio de unión al Zn⁺² en celeste claro y el dominio globular en azul oscuro. A la derecha se muestra el modelo computacional de hSIRT1 obtenido por Autiero et al. [46]. En verde se indica la región catalítica conservada con plegamiento Rossman y sitio de unión a sustratos (zoom del sitio de unión al Zn⁺² no catalítico). En turquesa se marca el sitio de unión a AROS, proteína activadora de SIRT1. Se indican además las regiones N- y C-terminal.

Se sabe que el núcleo catalítico de la enzima es la región más conservada en virtualmente todos los organismos. Esta región comprende aproximadamente 250 aminoácidos y está conformada por dos dominios globulares: un dominio pequeño conformado a su vez por dos módulos y un dominio grande.

El dominio grande adopta un plegamiento clásico de unión a dinucleótidos de piridina, llamado plegamiento de Rossman, característico de proteínas con sitios de unión a NAD y NADP en su forma oxidada y reducida [53]. 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.

El dominio pequeño del centro catalítico se conforma por dos módulos 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 [47]. 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 átomo de Zn²⁺ [48]. El zinc no participa en el mecanismo catalítico de las sirtuinas pero su presencia es requerida 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 [47], por lo tanto el zinc estaría cumpliendo un rol estructural en 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. En el trabajo de Auterio et. al. se propone un modelo de SIRT1 construido mediante herramientas bioinformáticas [46]. 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 [46]. 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 [20].

Tanto la región carboxilo como amino terminal sufren modificaciones que modulan la actividad enzimática. En un trabajo recientemente publicado se caracteriza una secuencia aminoácida específica dentro del extremo N-terminal de la SIRT1 que se une al núcleo catalítico y es indispensable para que la enzima sea activa [54]. 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* [54]. 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 [49]. 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 [49].

3. SIRT1

De los siete isotipos de sirtuinas en mamíferos es SIRT1 la proteína más estudiada de la familia. Está demostrado que esta enzima participa en varios procesos fisiológicos como son: el control del ciclo celular, la resistencia al estrés, la apoptosis, la diferenciación celular y el metabolismo energético, entre otros.

En humanos se la postula como un blanco terapéutico claro para el tratamiento del síndrome metabólico. Esto se debe a resultados como el que arroja un estudio en la población holandesa donde se observa que las variantes en los alotipos de *SIRT1* se correlacionan con el desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2 [55, 56].

3.1 Regulación

SIRT1 es una enzima muy versátil en el sentido de que participa en la regulación de varios mecanismos fisiológicos por lo que no resulta para nada extraño que su regulación se dé a todos los niveles: transcripcional, postranscripcional, postraducciona, y mediante la interacción con proteínas regulatorias.

Por ejemplo, la transcripción basal del gen de Sirt1 en mamíferos es regulada por E2F1, un regulador del ciclo celular y de la apoptosis. E2F1 se une a un sitio consenso que se encuentra a 65 pb corriente arriba del gen que codifica para Sirt1, induciendo la transcripción del mismo. A su vez SIRT1 se une a E2F1 e inhibe su actividad, estableciendo un bucle en el cual la expresión de la proteína es en parte regulada por si misma [57]. Por otra parte SIRT1 también regula su transcripción formando complejos con el factor de transcripción HIC1 [58].

La expresión es regulada a nivel traduccional mediante la unión de la proteína HUR que se une al extremo 3'UTR del ARNm de Sirt1 estabilizando a la molécula y por consiguiente aumentando el nivel de traducción de la proteína [59].

La actividad de la enzima esta también regulada por modificaciones postraduccionales como son la sumoilación y fosforilación. Está reportado que la sumoilación en la lisina 743 aumenta la actividad *in vitro* de la enzima con respecto a la actividad de la enzima mutada en el residuo 743 o a la enzima desumoilada por SENP1, una desumoilasa nuclear [60].

Con respecto a la fosforilación, tres trabajos diferentes reportaron la fosforilación de la proteína en distintos sitios ubicados en las regiones C- y N-terminal [61-63] y se muestra que varias proteína-quinatas tienen como blanco a SIRT1. La quinasa DIRK fosforila la Thr522 en el extremo C-terminal activando a la enzima, promoviendo la liberación del producto y en consecuencia aumentando la tasa de recambio de la misma [63]. JNK1 fosforila los residuos de Ser27, Ser47 y Thr530 aumentando la actividad desacetilasa y la localización en el núcleo de la SIRT1 [62]. Se sabe que CiclinaB/Cdk1 fosforila a la SIRT1 en los residuos Thr530 y Ser540 también activando a la enzima [63].

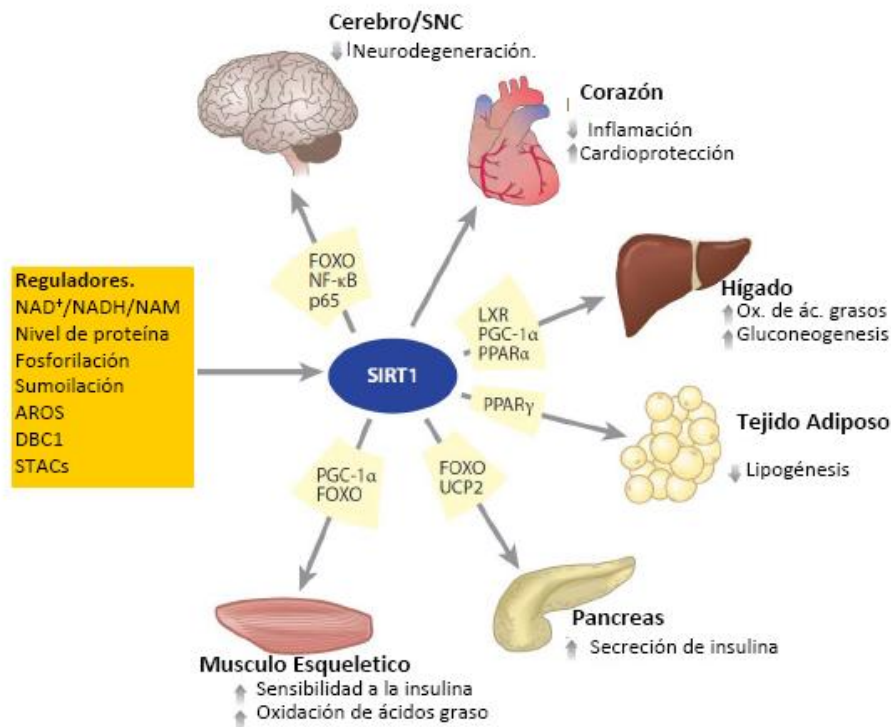


Figura 5. Efecto de la actividad de SIRT1 en distintos tejidos. Acción de SIRT1 a nivel de distintos tejidos y órganos. Se muestran los diferentes tipos de reguladores de la actividad de SIRT1. También se muestra los efectos a nivel metabólico y fisiológico que tiene el aumento o disminución de la actividad de la enzima en distintos tipos de tejidos. Figura tomada y modificada de [64].

Se ha constatado también la modulación de la enzima vía la interacción con otras proteínas. Se han identificado al menos dos proteínas que regulan la actividad enzimática de SIRT1 formando complejos con la misma. La primera proteína reguladora identificada fue AROS (Active Regulator of SIRT1). AROS fue identificada en ensayos de doble híbrido en levaduras y confirmado utilizando ensayos de co-inmunoprecipitación y GST-pulldown [65]. Kim et al. determinaron que AROS puede estimular la desacetilación de p53 *in vivo* y aumenta al doble la actividad de la enzima *in vitro* [65]. Otra proteína descrita como moduladora de la actividad de SIRT1 es la DBC-1 (Deleted in Breast Cancer 1). Zhao et. al. y Kim et al. demostraron que DBC-1 reprime la desacetilación de p53 y FOXO3 *in vivo* e *in vitro* [65, 66]. Por el contrario, el silenciamiento de la expresión de DBC-1 utilizando ARNi estimula la desacetilación de p53 de forma SIRT1 dependiente [66]. DBC-1 interacciona con SIRT1 pero no con los otros isotipos. La proteína inhibidora cuenta en su estructura terciaria con un motivo cierre de leucinas (leu zipper) que media la unión con el núcleo catalítico de SIRT1. No está todavía claro cuál es el

mecanismo de acción de DBC-1, aunque en un trabajo reciente se propone que DBC1 podría competir por el mismo sitio de unión en el centro catalítico, con una región del extremo carboxiterminal de SIRT1, esencial para la actividad catalítica de la enzima [54].

Más recientemente se ha planteado (tímidamente) que podría haber una regulación redox de SIRT1 [67, 68]. Se sabe que SIRT1 reduce el estado de estrés oxidativo asociado con varias condiciones de inflamación, a través de la desacetilación de factores de transcripción como NF- κ B, p53, FOXO que inducen la expresión de enzimas antioxidantes como SOD, catalasa. Se ha demostrado que SIRT1 es una enzima redox-sensible que se modifica postraduccionalmente por oxidantes, con reducción significativa de su actividad desacetilasa [67].

3.2 Funciones

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 (Fig. 5).

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 (Forkhead box protein O1) [69].

La 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 de la PGAM1 disminuyendo su actividad y por lo tanto disminuyendo la tasa de glucólisis[70].

En modelos animales donde se somete a ratones a periodos cortos de ayuno, se observa que SIRT1 inhibe la fase temprana de la gluconeogénesis vía TORC2 [71]. En periodos de ayuno prolongado se observa una mayor desacetilación de PGC-1 α , un coactivador de un gran número de factores de transcripción que inducen la expresión de genes que median el aumento de la

oxidación de ácidos grasos y modulan la homeostasis de la glucosa [72]. En tanto, en trabajos donde la expresión de SIRT1 es silenciada utilizando shRNA (small 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 [73]. La disminución de 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 [74]. 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 [75]. También se ha visto, que la sobreexpresión hepática de SIRT1, atenúa la esteatosis hepática y restituye la homeostasis de la glucosa [76].

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 [77]. A nivel del tejido adiposo blanco participa en el almacenaje de ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa reprimiendo la actividad de PPAR γ [78].

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 [79]. En tanto en líneas celulares β de páncreas donde se disminuye la expresión de SIRT1 mediante siARN (pequeños ARNi), se observa que disminuye el efecto de la glucosa en la estimulación de secreción de insulina [80]. En ambos trabajos se concluye que SIRT1 promueve la secreción de insulina reprimiendo la transcripción de UCP2.

4. Moléculas moduladoras de SIRT1

Hace algunos años Howitz et al. publicaron un trabajo donde se reportan algunos estilbenos, chalconas y flavonas con capacidad de incrementar varias veces la actividad de SIRT1 *in vitro* [41]. Estos compuestos polifenólicos son producidos en el metabolismo secundario de algunas plantas y presentan estructuras químicas similares (Fig. 6).

Ensayos *in vivo* en levaduras determinaron que la buteina (3,4,2',4'-tetrahidroxichalcona) y la fisteina (3,7,3',4'-tetrahidroxiflavona) eran capaces de aumentar la sobrevivencia de las células hasta un 31% y 55%, respectivamente, y de aumentar varias veces la actividad enzimática de hSIRT1 *in vitro* [41].

De los compuestos naturales ensayados en la literatura el 3,5,4 trihidroxiestilbeno o resveratrol (RSV) fue el que presentó mayor potencia como activador, aumentando la vida media de las células de levadura hasta en un 70% y multiplicando por trece la actividad de la hSIRT1 *in vitro* [41].

Sorprendentemente se ha observado que el RSV tiene la capacidad de emular en levaduras el estado de restricción calórica, aún cuando la ingesta calórica no disminuye [41]. En otros estudios donde se trabaja con modelos animales se reporta que el RSV, como activador de SIRT1, prolonga la vida de ratones obesos disminuyendo los niveles de glucosa e insulina y elevando la capacidad mitocondrial [81, 82]. Por otro lado, estudios de expresión génica revelaron que la mitad de las vías alteradas por la RC también se encuentran afectadas por RSV en hígado de ratones, por ejemplo disminuyendo el flujo de la glicólisis [81]. En otros trabajos donde estudian la expresión génica en músculo esquelético cardíaco y cerebro, también se observan alteraciones a nivel de la transcripción génica similares a las observadas en ratones suministrados con RSV o sometidos a una RC [83].

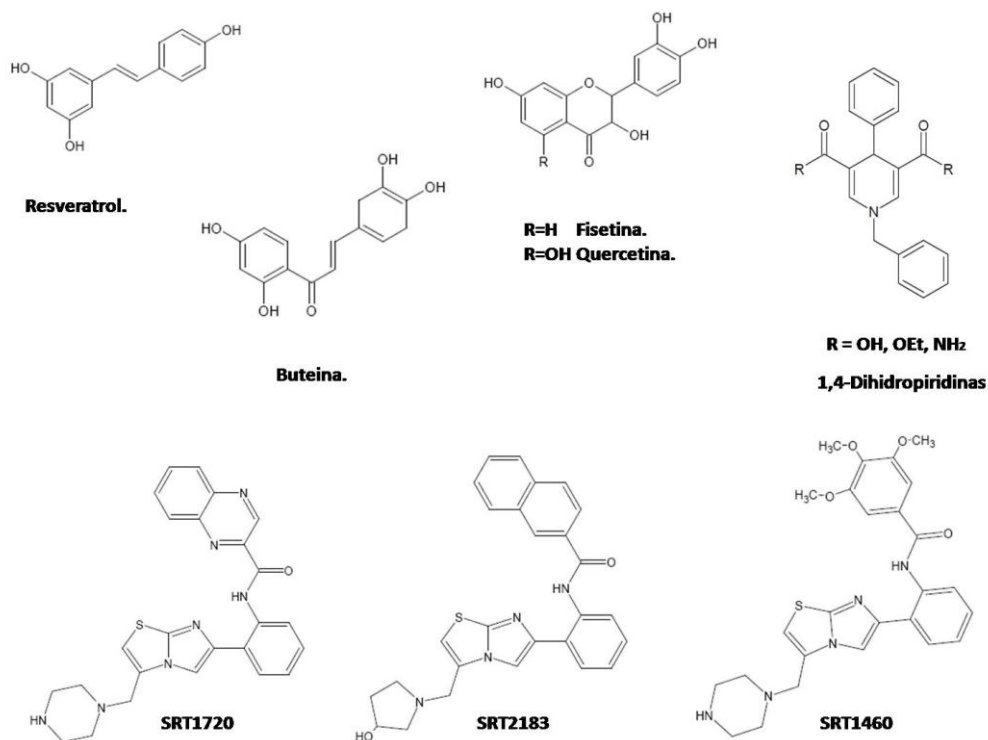


Figura 6. Algunos compuestos activadores. Aquí se muestran las estructuras de varios activadores de SIRT1 (STACs, sirtuin activating compound).

Basados en los resultados obtenidos por Howitz et al. en donde se demostró que el RSV activa a la enzima *in vitro* utilizando como sustrato acetilado un péptido conjugado a un fluoróforo, se asumió que el mecanismo de acción del RSV era mediante la interacción directa del polifenol con la enzima [41]. Recientemente se ha cuestionado esta activación directa por RSV, aduciendo un resultado artefactual relacionado con este ensayo fluorescente de medida de actividad, lo que ha convertido al mecanismo de activación por RSV en un tema controversial [40, 42, 84].

El método de medida de actividad utilizado por Howitz et al. y que es utilizado ampliamente para constatar la actividad de las sirtuinas en varios trabajos y para el testeo de compuestos potencialmente moduladores de su actividad, es el método conocido con el nombre de “Fluor de Lys assay” (BIOMOL Inc., Pennsylvania, EEUU, Fig. 7). El ensayo se basa en la utilización de un tetrapéptido derivado de la secuencia primaria de p53 que contiene la Lys382 acetilada y al fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina (AMC) unido covalentemente a su extremo C-terminal. Es un ensayo de actividad enzimática a tiempo final de dos pasos, en primer lugar la enzima

cataliza la desacetilación del péptido sintético y en un segundo paso el fluoróforo se libera por digestión con tripsina [85, 86].

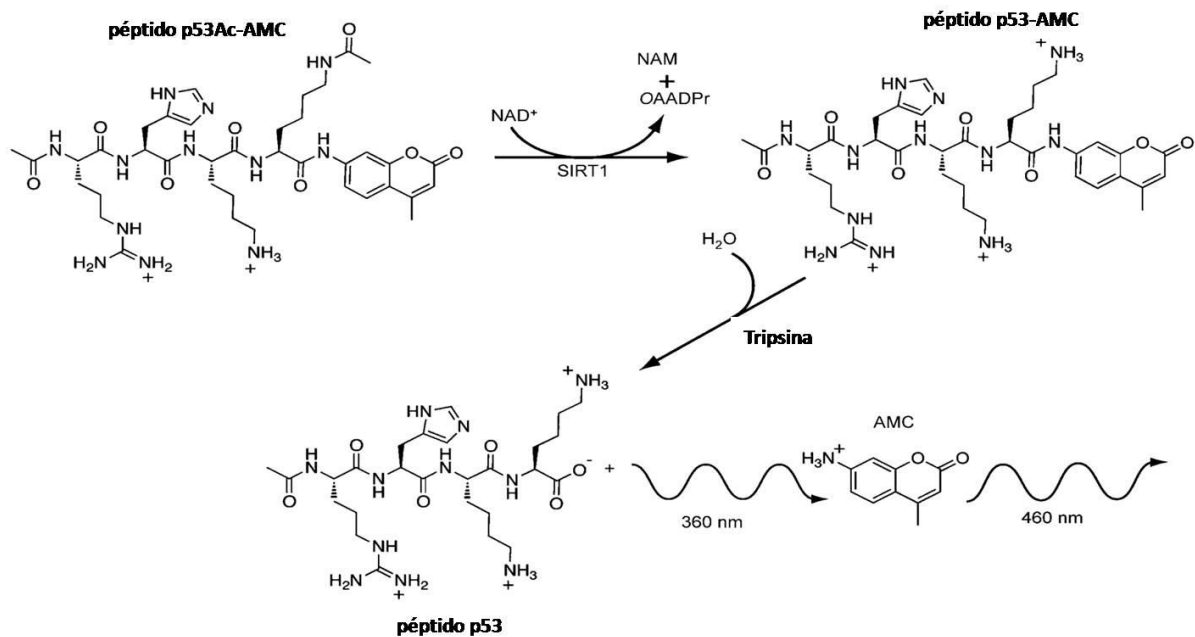


Figura 7. Esquema del ensayo de actividad tipo Fluor de Lys (BIOMOL).

La polémica entorno al efecto directo del RSV sobre la actividad de la enzima surge de algunos trabajos como el de Borra et al., donde se mide la actividad enzimática utilizando moléculas etiquetadas con isótopos radiactivos, donde se cuantifican los productos por HPLC o ensayos de unión a carbono activado (todos ensayos a tiempo final)[84]. Como sustrato se utilizaron dos péptidos acetilados con diferente secuencia y unidos o no a moléculas fluorescentes. Allí se vio que la activación por RSV es independiente de la secuencia peptídica pero dependiente de que el sustrato acetilado esté unido a un fluoróforo [84]. En ese mismo trabajo se hacen también estudios de competición y se concluye que el péptido fluorescente tiene menor afinidad por la enzima que el mismo péptido sin fluoróforo, y que el RSV actúa entonces favoreciendo la unión del péptido fluorescente a la enzima. Esto sugiere que la unión del RSV a la enzima provoca un cambio conformacional que le permite unirse con mayor afinidad al fluoróforo [84]. En términos cinéticos se determinó que el K_M del péptido derivado de p53 utilizado en el ensayo de BIOMOL conjugado al fluoróforo es casi nueve veces mayor que para el péptido no conjugado [42]. También se observó la misma activación dependiente de un fluoróforo

conjugado al péptido sustrato, en otro trabajo donde las medidas de actividad fueron realizadas mediante la cuantificación de las especies acetiladas y desacetiladas del péptido mediante HPLC [40].

Se han descrito más recientemente una serie de compuestos sintéticos no polifenólicos (serie SRT), que no guardan similitud estructural con el RSV y que son 1000 veces más potentes que el mismo [87]. Se trata de compuestos que contienen un anillo bicíclico imidazotiazol (Fig. 6). Estos compuestos disminuyen el K_M de la enzima por el sustrato acetilado pero no afectan los parámetros cinéticos para el NAD^+ [87]. Utilizando varios mutantes de SIRT1 se logró identificar el sitio de unión para los mismos y se concluyó que la unión del péptido acetilado a la enzima expondría el sitio de unión a la molécula activadora en la región amino terminal [87]. Utilizando también un ensayo de actividad a tiempo final en dos pasos, Milne et al. realizaron el screening de 290.000 compuestos, 127 de los cuales presentaron una buena actividad activadora y de los cuales se han reportado los resultados de tres de los mismos (Fig 6). En este ensayo se utiliza un péptido de 20 aminoácidos también derivado de p53 pero conjugado al fluoróforo TAMRA (5'carboxil-tetrametil-rodamina). El primer paso de la técnica implica la desacetilación del péptido por la enzima y el segundo la hidrólisis del péptido catalizada por tripsina, determinando finalmente la polarización de fluorescencia [87]. A su vez se observó que en ratones alimentados con dietas ricas en grasas, con resistencia a la insulina, el tratamiento con el compuesto SRT1720 (Fig. 6) mejoró la sensibilidad a la insulina y en consecuencia la homeostasis de la glucosa [88].

De todos modos, posteriormente se ha planteado que estos compuestos, al igual que el RSV, no activan directamente a la SIRT1 en condiciones *in vitro* y con sustratos nativos, ya que no se observa un cambio en la actividad en presencia o ausencia de los compuestos activadores [40]. La activación de SIRT1 *in vitro* por esta familia de compuestos también dependería de la presencia de un grupo fluoróforo en los péptidos sustrato utilizados en el ensayo de actividad de la enzima [40].

Basados en el hecho de que tanto la nicotinamida (producto de la reacción) como la isonicotinamida pueden modular la actividad de sirtuinas, Mai et al. prepararon una serie de 1,4-dihidropiridinas, algunas de las cuales resultaron activadoras (Fig. 6) con $EC_{150} \sim 1 \mu M$ [89].

En general, SIRT1 regula varios procesos metabólicos que permiten a la célula adaptarse al estrés de falta de nutrientes y desempeña un papel fundamental en las enfermedades metabólicas relacionadas con el envejecimiento. No cabe duda de que SIRT1 juega un papel importante en enfermedades metabólicas asociadas con la obesidad como diabetes tipo 2 y esteatosis hepática. Los resultados obtenidos con suplementación de RSV en modelos animales son sorprendentes y abrieron paso a ensayos clínicos que están en marcha. La evidencia experimental acumulada hasta hoy sostiene que controlar la actividad de SIRT1 con nutrientes o la suplementación con moléculas pequeñas activadoras de dicha actividad, podría ser una estrategia de tratamiento muy valiosa.

Objetivos

- 1-** Obtención de sirtuina 1 humana recombinante
- 2-** Puesta a punto de ensayos de actividad enzimática
- 3-** Ensayo de compuestos polifenólicos como potenciales moduladores de la actividad enzimática de SIRT1

Materiales y Métodos

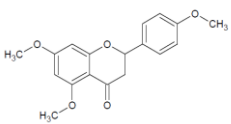
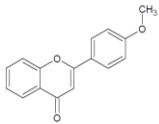
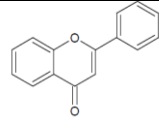
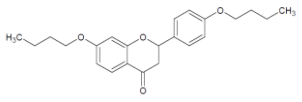
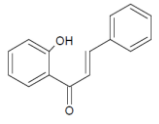
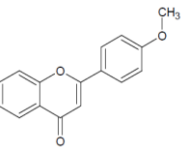
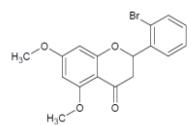
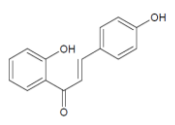
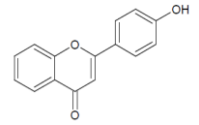
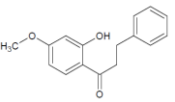
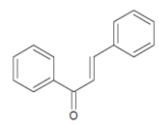
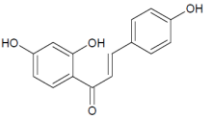
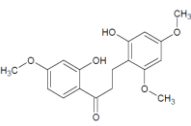
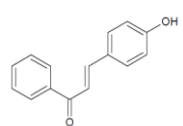
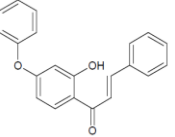
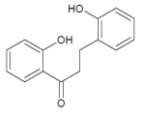
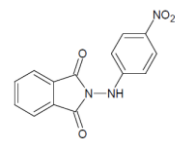
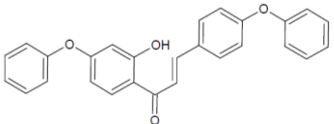
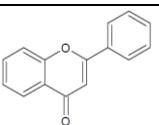
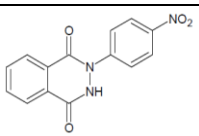
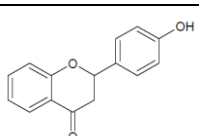
1. Reactivos

Los reactivos generales fueron de calidad analítica y adquiridos en Sigma-Aldrich (EEUU).

Los péptidos utilizados como sustrato para las medidas de actividad p53mer (RHKK(Ac)-NH₂) y el FdLP (RHKK(Ac)-AMC) fueron adquiridos en PEPTIDE 2.0 (EEUU).

Los compuestos polifenólicos y derivados ensayados fueron provistos por la cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de la República, y se presentan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1.

1 	8 	15 
2 	9 	16 
3 	10 	17 
4 	11 	18 
5 	12 	19 
6 	13 	20 
7 	14 	21 

Se prepararon soluciones stock, 10 mM en DMSO de cada uno de los compuestos, que luego fueron diluidas en amortiguador Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA 0,5 %, previo al ensayo. Los compuestos que presentaron problemas de solubilidad en fase acuosa, se indican más adelante en Resultados.

2. Expresión y purificación de hSIRT1

2.1 Expresión

Contamos con la secuencia de hSIRT1 con cola de histidinas clonada en el vector pHEX, una versión modificada del pGEX-2T (GE) en el que la secuencia codificante para GST fue remplazada por una secuencia codificante para 6 histidinas en tandem. El vector con el inserto fue cedido gentilmente por el Dr. Z. Lou, Mayo Clinic Research Foundation, MN, USA.

Se transformaron por shock térmico células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 Star™(DE3) (Invitrogen). Con las células transformadas, se procedió a plaquear en LB 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} de entre 0,6-0,8 para luego inducir la expresión de la proteína agregando isopropilo-β-D-tiogalactopiranososa (IPTG) 1 mM. Se incuba a 16 °C a 220 rpm 16-20 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.

2.2 Preparación de extracto libre de células

Para el lisado de las células se resuspenden las mismas en amortiguador de lisis Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, 1% tritón X-100, β -mercaptoetanol (β ME) 3 mM, lisozima 1 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 (10 s on-15 s off), amplitud 30%, durante 2 min. Se sedimentan los restos celulares centrifugando a 20.000 g durante 30 min. El sobrenadante es filtrado por filtros de 0,45 μ m.

2.3 Purificación por cromatografía de afinidad

El clarificado se carga en una columna de IMAC (cromatografía de afinidad por iones inmovilizados) HisTrap FF 1ml (GE), a un flujo 1 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 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM, β ME 3 mM); B (Tris/Cl 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM, β ME 3 mM).

2.4 Purificación por gel filtración

Para este paso se utiliza una columna de exclusión molecular Superdex 16/60 200 μ g (GE). La fase móvil es amortiguador C (Tris/Cl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, β ME 5mM). En esta ocasión también fue utilizado el equipo ÄKTA Prime Plus.

3. Control de calidad y rendimiento de la producción de la hSIRT1 recombinante

3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las fracciones de los pasos de purificación se analizan por electroforesis desnaturalizante 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 Análisis por espectrometría de masa

La fracción purificada de la enzima fue analizada por espectrometría de masa MALDI-TOF (Instituto Pasteur de Montevideo).

3.3 Espectro UV-Vis y espectro de fluorescencia

Los espectros de absorción y emisión de la enzima purificada fueron realizados en espectrofotómetro Cary 50 y espectrofluorímetro Aminco Bowman a una concentración de 0,5 mg/ml y 0,25 mg/ml, respectivamente.

3.4 Cuantificación de proteínas

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

En algunas ocasiones se calcula concentración de proteínas (como hSIRT1) midiendo absorbancia a 280 nm utilizando un coeficiente de absortividad molar calculado teóricamente según la ecuación que se presenta a continuación:

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

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

4. Medidas de Actividad

4.1 Método con péptido fluorescente

Las medidas de actividad se realizan mediante un método discontinuo de dos pasos que se esquematiza en la Figura 7. 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 realizaron utilizando distintas concentraciones de la hSIRT1r y concentraciones casi saturantes de los sustratos: 500 μM de NAD⁺ y 25 μM de péptido. 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 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 al término se mide la intensidad de fluorescencia a λ_{ex} = 360 nm, λ_{em} = 440 nm en lector de placas Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific Inc.).

4.2 Medida de actividad por HPLC

Se trata también de un método discontinuo de medida de actividad. Las reacciones se llevan a cabo a 37 °C utilizando amortiguador de ensayo sin BSA (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1 mM). El sustrato acetilado en este caso es el p53mer (sin la sonda fluorescente conjugada). La reacción se inicia con el agregado del NAD⁺ a la mezcla de reacción. Se toman alícuotas en el tiempo deteniendo la reacción con ácido trifluoroacético (TFA) para alcanzar una concentración final 1%. Las distintas alícuotas son filtradas e inyectadas en un columna de fase reversa C18 ZORBAX Eclipse Plus C18 (© Agilent, EEUU) para separar la nicotinamida del resto de los componentes de la muestra [93]. Se utilizó equipo Agilent 1200 con detector de arreglo de diodos.

Resultados y Discusión

1. Purificación de hSIRT1 recombinante

Para la evaluación de la capacidad moduladora de la actividad de SIRT1 de los distintos compuestos, fue necesaria la producción de la proteína recombinante en el laboratorio, la cual se utilizaría para realizar las medidas de actividad ya sea por el método fluorescente (ampliamente utilizado en la literatura) o por el método cromatográfico, cuantificando la nicotinamida producida en la reacción por HPLC (ambos métodos discontinuos).

La producción de hSIRT1 se realizó según se describe en Materiales y métodos, purificando la enzima en dos pasos cromatográficos. El resultado de una de las purificaciones se muestra a continuación.

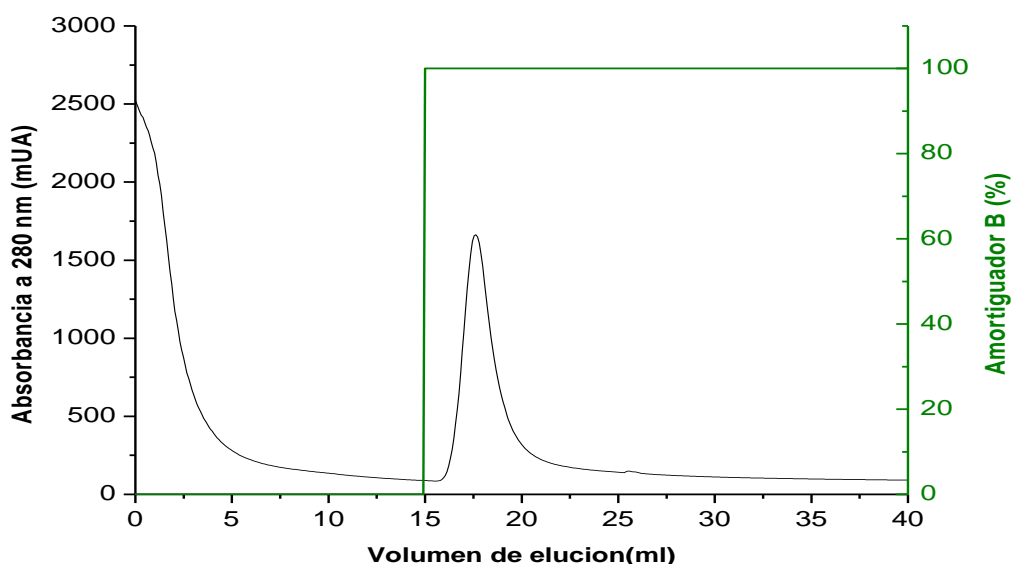


Figura 8. Cromatograma de elución de la IMAC. Se sigue la elución por absorbancia a 280 nm. El pico entre 16 y 20 ml del volumen de elución se corresponde con las fracciones donde eluye la enzima recombinante.

En la Fig. 8 se muestra el perfil cromatográfico del primer paso de purificación de la SIRT1 recombinante. Para este paso se conectaron dos columnas His-Trap de un 1ml en serie y se cargó con 75 ml de un clarificado del lisado de bacterias transformadas con el vector de expresión que contiene a la proteína. Los detalles de la expresión se detallan en Materiales y métodos. El primer pico corresponde a la fracción no unida a la resina de la columna. Las proteínas unidas son eluidas cambiando la fase móvil, aumentando de imidazol 20mM a 500

mM en un solo paso. Aproximadamente entre los 16 y 20 ml, inmediatamente después del cambio de fase móvil, se observa un pico donde se espera eluya la proteína recombinante (Fig. 8). Se tomaron alícuotas a los distintos volúmenes de elución y se prepararon las mismas para electroforesis (Fig. 9).

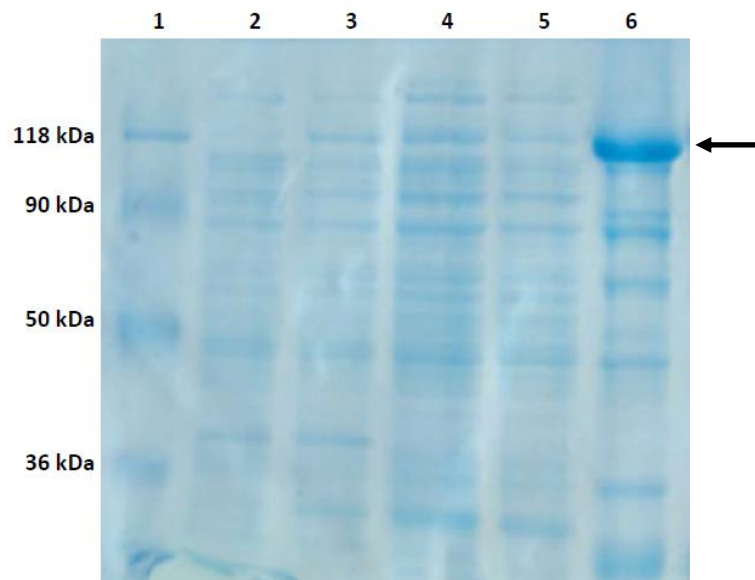


Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE 10% de la primera etapa de purificación por IMAC. Carriles 1: Marcador de peso molecular; 2: Lisado de bacterias antes de la inducción con IPTG; 3: Lisado de bacterias luego de la inducción; 4: Fracción soluble del lisado bacteriano; 5: Fracción no unida a la columna; 6: Fracción del pico de elución al cambiar la fase móvil a 500 mM imidazol. La flecha indica la banda correspondiente a SIRT1.

La banda mayoritaria en el carril 6 (Fig. 9) correspondería a la SIRT1 recombinante. Esto fue corroborado por espectrometría de masa MALDI-TOF de la banda proteica mayoritaria. La banda correspondiente a la SIRT1 presenta una movilidad electroforética algo inferior a la esperada para una proteína de 81,68 kDa, o sea corre por encima de los 100 kDa.

La SIRT1 co-eluye de la IMAC junto a otras proteínas de menor peso molecular (Fig. 9) que se estarían uniendo inespecíficamente a la resina de Ni^{+2} o mismo podrían estar interactuando con la propia SIRT1 recombinante.

Para aumentar la pureza de la muestra se procedió a juntar las alícuotas correspondientes al pico que eluyó de la IMAC, aproximadamente 5 ml, y cargar en una columna de gel filtración Superdex 16/60 previamente equilibrada con amortiguador C. El perfil cromatográfico de esta corrida de exclusión molecular se presenta en la Figura 10. En el transcurso de la gel filtración se tomaron alícuotas a los distintos tiempos de retención y se prepararon para electroforesis,

para de esta forma monitorear la composición de los distintos picos observados en el cromatograma (Fig. 11).

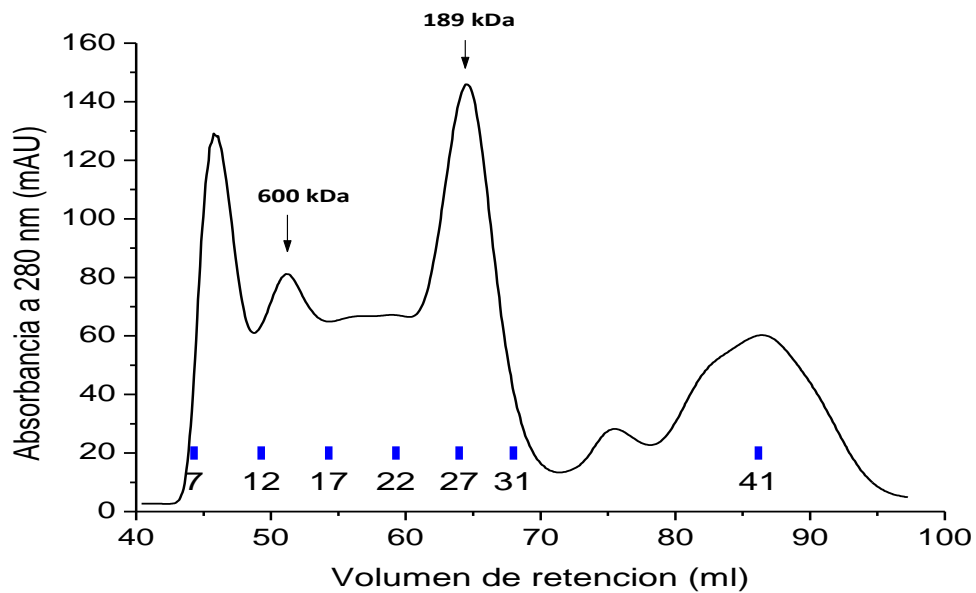


Figura 10. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular. Se sembraron los 5 ml correspondientes al pico que eluyó de la IMAC, en una columna Superdex 16/60 200 µg (GE). Flujo 1 ml/min y detección en línea a 280nm (-). En azul se marcan algunas de las alícuotas recogidas durante la corrida como referencia.

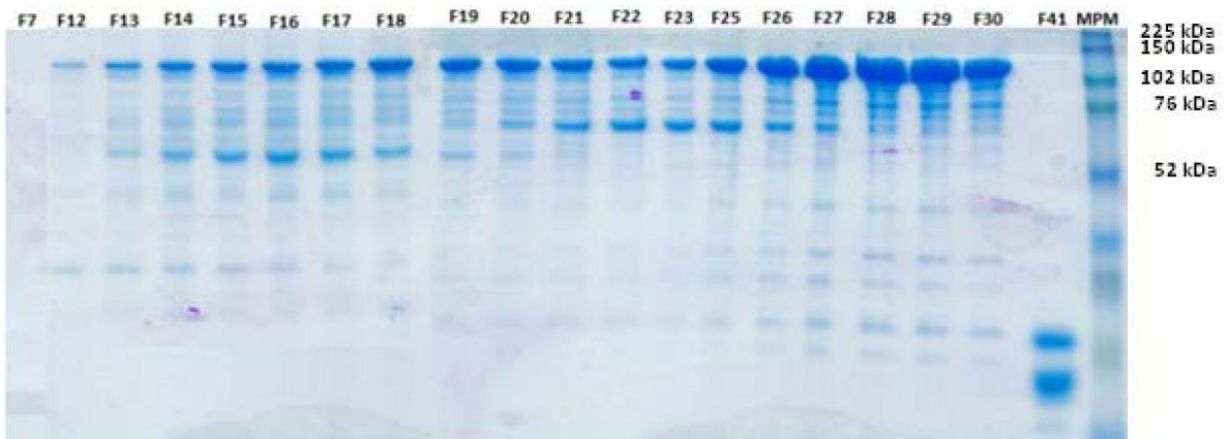


Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE.10% del segundo paso de purificación (exclusión molecular). En los distintos carriles se sembraron muestras de las distintas fracciones (F#) colectadas durante la gel filtración.

El primer pico que se aprecia en el cromatograma de la Figura 10 (45 ml) eluye en el volumen muerto de la columna y no se observaron bandas de proteína en el SDS-PAGE en el carril donde

se sembró una fracción de este pico (Fig. 10,11). Podemos afirmar que lo que estamos detectando son moléculas de alto peso molecular, que absorben a longitudes de onda cercanas a 280 nm, pero que no son proteínas. Esto nos sugiere que se trata de ácidos nucleicos, presentes en la muestra inyectada en la columna.

A los 50 ml se empieza a constatar la presencia de SIRT1 recombinante como una banda que migra por encima de los 102 kDa (Fig. 11). Según la calibración de la columna Superdex 16/60 (Fig. 12) a este volumen de retención eluyen proteínas de aproximadamente 600 kDa. El siguiente pico definido (65 ml) y el más intenso, se corresponde con especies de 189 kDa según la calibración de la columna. En gel se constata la presencia de la hSIRT1 entre los 50 y los 65 ml de elución (Fig. 11) lo que está indicando que la proteína se comporta como un oligómero en solución. Según el resultado de la gel filtración, teniendo en cuenta la calibración realizada para la columna (Fig. 12) la proteína eluye en forma de tetramero y dímero. La oligomerización de una sirtuina ya se había reportado para la enzima Hst2 de levadura [49]. En el gel, este pico se corresponde con las fracciones F27-30 y es donde se observa mayor intensidad de las bandas que corresponden con la SIRT1 (Fig. 11). También se constata en el gel que es en este pico donde la proteína se presenta con mayor pureza. Luego de los 70 ml, lo que eluyen son especies de menor peso molecular, como se puede ver en el carril F41 de la SDS-PAGE (Fig. 11).

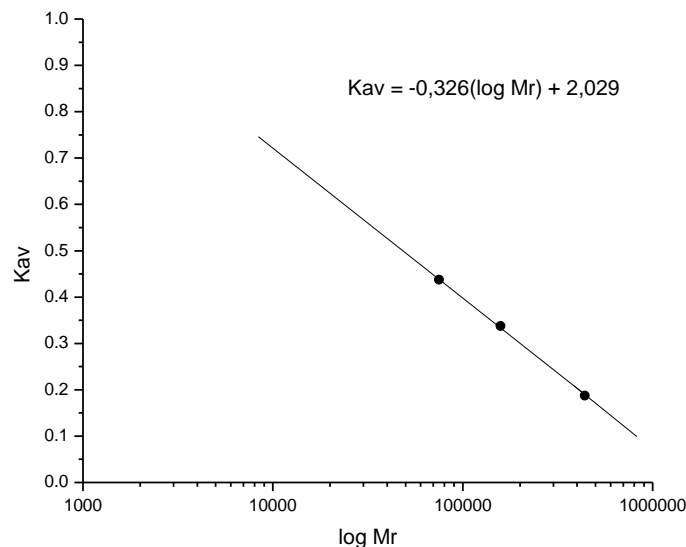


Figura 12. Curva de calibración de columna de gel filtración Superdex 16/60 200 pg. Se realizó una corrida donde se separó una mezcla de estándares de peso molecular (proteínas globulares) con ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa) y conalbúmina (75 kDa). A partir de la ecuación de la recta se pueden estimar los pesos moleculares de las especies que eluyen de la columna.

La concentración proteica de cada alícuota fue medida por Bradford, y el rendimiento aproximado de la purificación (con estos dos pasos cromatográficos) es de entre 1-2 mg de proteína por litro de cultivo.

A las distintas fracciones colectadas se les agrega glicerol hasta alcanzar una concentración final del 10% y son almacenadas a -80°C .

Se realizaron ensayos de actividad enzimática y concentración total de proteínas para las distintas alícuotas obteniendo una mayor actividad específica para el segundo pico (F27-F31, Fig. 11) y éstas fueron las alícuotas empleadas para los ensayos de activadores de la enzima.

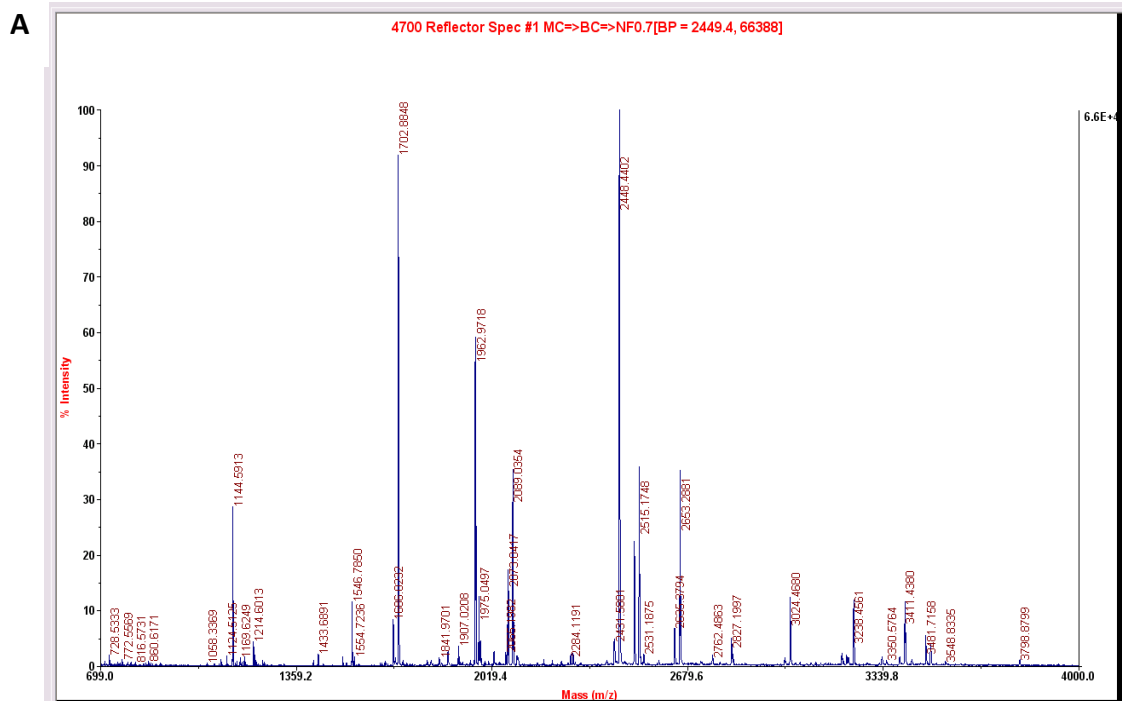
2. Análisis fisicoquímico de la proteína purificada

La banda proteica mayoritaria en el gel de poliacrilamida (luego de los dos pasos de purificación), que se supone corresponde a la hSIRT1r, fue preparada para analizar por espectrometría de masa y enviada al Instituto Pasteur para su identificación por mapeo peptídico. La Figura 13 A muestra el espectro de masa obtenido en modo reflector positivo luego de la digestión con tripsina. Utilizando el motor de búsqueda Mascot con la base de datos local (www.matrixscience.com) se identificaron 21 péptidos de 74, con un score de 145 (> 34 son significativos con $p < 0.05$). La cobertura fue del 43% (Fig. 13 B). Este resultado permitió identificar a la SIRT1 de forma estadísticamente significativa con un peso molecular = 81.630.

Se realizó el espectro UV de la fracción purificada pudiéndose constatar un perfil espectral característico de una muestra proteica pura (Fig. 14 A), con un máximo de absorción definido a 280 nm por la presencia de residuos aminoácidos aromáticos. El espectro indica la ausencia de agregados moleculares y/o contaminantes que generen turbidez. No se observa absorción en la región del visible, lo que era de esperar para una proteína que no contiene grupos prostéticos.

La Figura 14 B muestra el espectro de emisión de fluorescencia con $\lambda_{exc} = 280$ nm (negro) y $\lambda_{exc} = 295$ nm (azul). Excitando a 295 nm sólo absorben los residuos de triptófano; en este caso se observa un máximo de emisión a 345 nm indicando la presencia de residuos de triptófanos bastante expuestos al solvente polar. El espectro de emisión cuando se excita a 280 nm (donde absorben triptofanos y tirosinas) presenta un máximo de emisión bastante menor, 334 nm, lo

que indica una contribución de los residuos de tirosina al espectro de fluorescencia de la proteína nativa.



B

```

1  MADEAALALQ PGGSPSAAGA DREAASSPAG EPLRKRPRD GPGLERSPGE
51  PGGAAPEREV PAAARGCPGA AAAALWREAE AAAAAAGGEQ EAQATAAAGE
101 GDNGPGLQGP SREPLADNL YDEDDDEGE EEEEEAAAAI GYRDNLLFGD
151 EIITNGFHSC ESDEEDRASH ASSSDWTPRP RIGPYTFVQQ HLMIGTDPRT
201 ILKDLLPETI PPELDDMTL WQIVINILSE PPKRKRKDI NTIEDAVKLL
251 QECKKIIVLT GAGVSVSCGI PDFRSRDIY ARLAVDFPDL PDPQAMFDIE
301 YFRKDPRPFF KFAKEIYPGQ FQPSLCHKFI ALSDKKGLL RNYTQNIIDL
351 EQVAGIQRII QCHGSFATAS CLICKYKVC EAVRGDIFNQ VVPRCPRCPA
401 DEPLAINKPE IVFFGENLPE QFHRAMKYDK DEVLLIVIG SSLKVRPVAL
451 IPSSIPHEVP QILINREPLP HLHFDVELLG DCDVIINELC HRLGGEYAKL
501 CCNPVKLSEI TEKPPRTQKE LAYLSELPT PLHVEDSSS PERTSPDSS
551 VIVTLLDQAA KSNDLDVSE SKGCMEKPQ EVQTSRNVES IAEQMPDL
601 KNVGSSTGEK NERTSVAGTV RKCWPNRVAK EQISRRLDGN QYLFLPPNRY
651 IFHGAEVYSD SEDDLSSSS CGSNSDSGTC QSPSLEEPME DESEIEEFYN
701 GLEDEPDVPE RAGGAGFGTD GDDQEAINEA ISVKQEVTDN NYPSNKS

```

Figura 13. Espectrometría de masa de la proteína purificada. A. Se registran los tiempos de vuelo de los péptidos producto de la digestión triptica de la banda que corre en el SDS-PAGE entre 150 y 102 kDa. **B.** Esquema de la secuencia aminoacídica de SIRT1 donde en rojo se marcan los péptidos producidos en la digestión triptica, según el análisis del espectro.

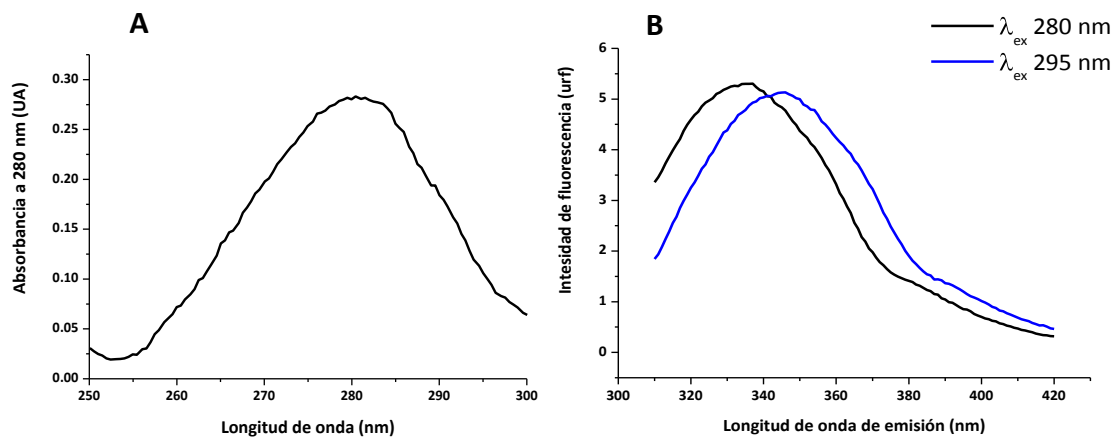


Figura 14. Espectros de absorción y emisión de la proteína purificada. A. Espectro de absorción UV con máximo a $\lambda = 280$ nm. B. Espectros de emisión usando λ excitación 280 nm (negro) o 295 nm (azul). Los máximos de emisión se dan a $\lambda = 337$ nm y $\lambda = 345$ nm, respectivamente.

3. Ensayo de actividad de la proteína obtenida

Para constatar la funcionalidad de la enzima se realizaron medidas de actividad utilizando el método fluorescente descrito en Materiales y métodos. Brevemente el método consta en un primer paso donde se prepara una mezcla de reacción incubando a la enzima con el péptido fluorescente y NAD^+ , y a medida que se va dando la reacción se toman alícuotas en el tiempo en las cuales se detiene la reacción con el agregado de NAM. El segundo paso consta de la hidrólisis del péptido desacetilado en la reacción catalizada por SIRT1, por tripsina, liberándose AMC cuya fluorescencia es medida en un lector de placas.

En la Figura 15 se muestra el cambio de actividad enzimática en función de la concentración de la enzima SIRT1 observándose un aumento lineal de la actividad (V_{max} proporcional a la concentración de enzima).

Se decide fijar las condiciones del ensayo de actividad para el screening de potenciales activadores/inhibidores, de la siguiente manera:

Amortiguador Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl_2 1 mM, 0,5 % BSA, NAD 500 μM , péptido 25 μM . Las reacciones se llevan a cabo a 25 $^\circ\text{C}$, las alícuotas son tomadas a distintos tiempos y llevadas a una concentración final de NAM 5 mM. Luego de tripsinizar por 30 min a 37 $^\circ\text{C}$, se procede a medir la fluorescencia del AMC (λ_{ex} 360 nm, λ_{em} 460 nm).

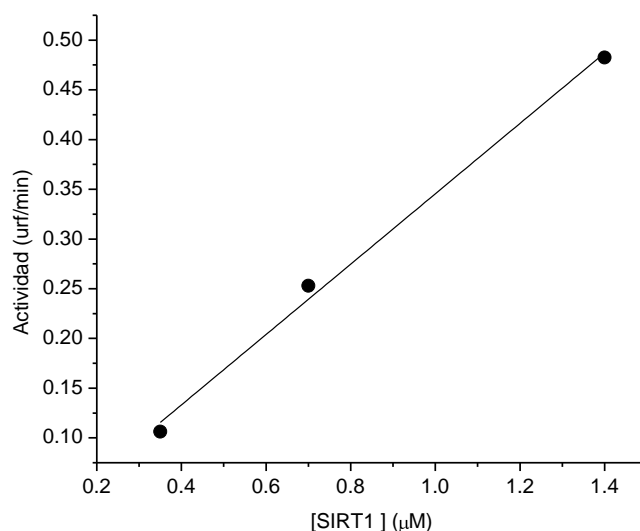


Figura 15. Actividad enzimática en función de la concentración de SIRT1. Las medidas de actividad fueron realizadas con 500 μM NAD⁺, 25 μM FdLP, amortiguador 50 mM Tris pH 7.5, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 % BSA a 25 °C

4. Método cromatográfico de medida de actividad

Se realizan las medidas de actividad SIRT1 siguiendo la aparición de producto NAM por HPLC. Primeramente se puso a punto la separación de mezclas conteniendo NAD⁺ y NAM en el menor tiempo posible para poder disminuir el tiempo de duración del ensayo. En la Figura 16 se muestra un cromatograma con el perfil característico de la separación de una mezcla de NAD⁺ y NAM que eluyen a los 3,5 min y los 4,3 min, respectivamente.

Una vez puesto a punto el método de separación de los nucleótidos se procedió a realizar medidas de actividad con y sin resveratrol. El ensayo de actividad consiste en una mezcla de reacción que contiene SIRT1 3 μM, NAD⁺ 500 μM, p53mer 130 μM. La reacción se inicia con el agregado de NAD⁺ y es llevada a cabo a 37°C. A medida que transcurre la reacción, se toman alícuotas y la reacción es detenida con el agregado de ácido trifluoroacético, que además acidifica las muestras para la corrida HPLC, neutralizando en parte las cargas negativas del NAD⁺. Las alícuotas se filtran (0,22 μm) previo a la inyección en la columna de fase reversa C18.

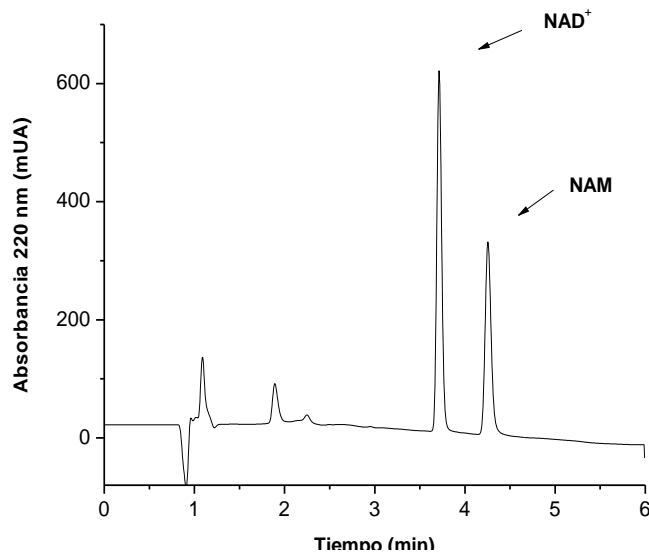


Figura 16. Cromatograma de HPLC para separar y cuantificar NAM. Se utilizó una columna de fase reversa C18, fase móvil amortiguador 20 mM AcNH_4 , 0-20% MeOH en 5 min, flujo 1 ml/min. Se inyecta una mezcla de NAD^+ y NAM disueltos en el amortiguador de ensayo. $[\text{NAD}^+] = [\text{NAM}] = 250 \mu\text{M}$.

En la Figura 17 se presenta una curva de calibración realizada para poder cuantificar el NAM producido en la reacción de desacetilación. Se realizaron varias corridas con concentraciones conocidas de NAM estándar y se integran las áreas de los picos donde ésta eluye. Con estos valores se construye la curva de calibración (Fig. 17 B).

En la Figura 18 se muestran en un mismo par de ejes dos medidas de actividad obtenidas por HPLC, en presencia y ausencia de RSV $100 \mu\text{M}$. En la figura se puede ver que las pendientes de las rectas son muy similares. Utilizando este método de medida de actividad, el RSV no parece afectar la actividad de la enzima.

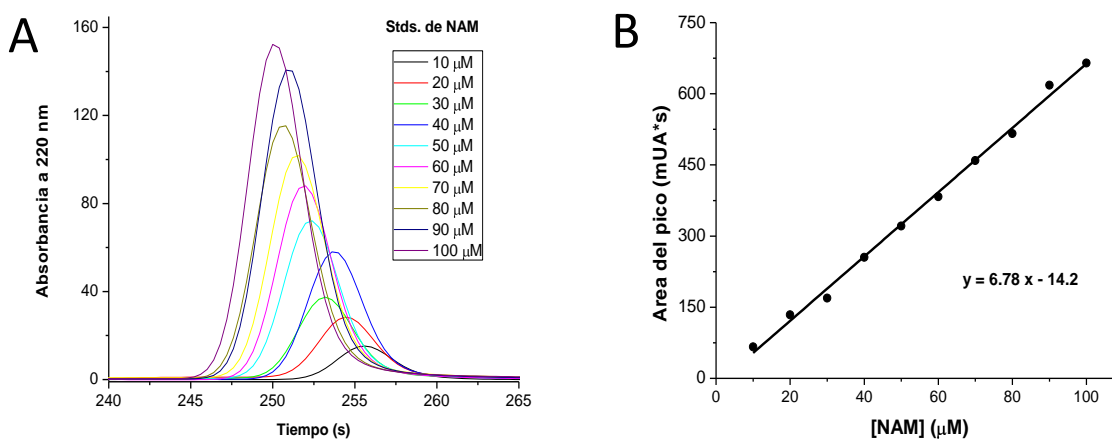


Figura 17. Cuantificación de nicotinamida (NAM) por HPLC. A) Se muestran los cromatogramas de las corridas HPLC para varias concentraciones de nicotinamida estándar. A partir de las integrales de estos picos se construye la curva de calibración (B) A partir de la ecuación de la recta a la que ajusta la curva es que se calcula el producto.

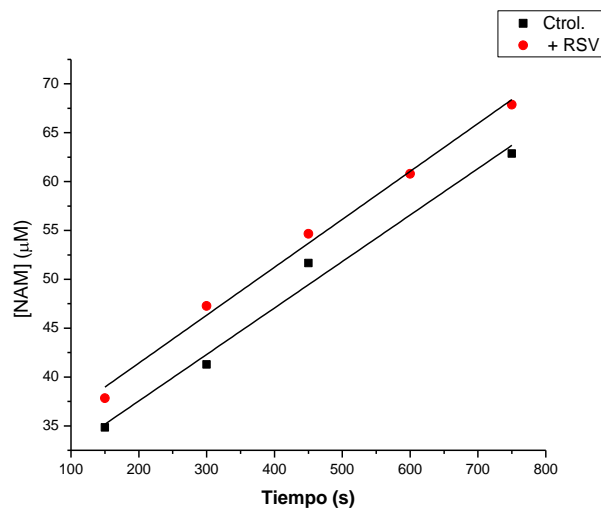


Figura 18. Gráficos de velocidad reacción catalizada por SIRT1 en presencia y ausencia de RSV. Las condiciones de reacción fueron 3 µM SIRT1, 500 µM NAD⁺, 130 µM p53mer, y la reacción fue llevada a cabo a 37°C.

5. Ensayo de compuestos polifenólicos como potenciales moduladores de actividad SIRT1

Para realizar las medidas se utilizaron mezclas de reacción NAD⁺ 500 µM, FdLP 25 µM y SIRT1 750 nM en presencia o ausencia de 100 µM de compuesto a ensayar. Se disolvieron los componentes en Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,5 % BSA. Las reacciones se inician con el agregado de NAD⁺ y se llevaron a cabo a 25°C. Una vez iniciada la reacción se toman alícuotas en el tiempo a las que se le mide la intensidad de fluorescencia luego de detener y la reacción de desacetilación con NAM y digerir con tripsina las muestras. Los valores de intensidad de fluorescencia se grafican en función del tiempo y así se construyen los cursos temporales que se muestran como ejemplo en la Figura 18.

Los compuestos a ensayar fueron todos disueltos primeramente en DMSO a una concentración final de 10 mM. Varios de los compuestos no pudieron ser solubilizados en el amortiguador de ensayo a la concentración de trabajo utilizada (100 µM).

En la Tabla 2 se presentan los resultados de las medidas de actividad para los distintos compuestos solubles en el amortiguador de ensayo (compuestos 4, 6, 7, 9-13, 15, 17, 18, 21).

Como se aprecia en la Tabla 2, ninguno de los compuestos solubles tuvo capacidad activadora de la actividad de SIRT1. La mayoría de los compuestos no afectaron significativamente la actividad, o fueron ligeramente inhibidores de la actividad de la enzima. El compuesto 21 y el 7 fueron los que presentaron mayor capacidad inhibitoria. En un trabajo recientemente publicado donde se testean también algunas chalconas y flavanonas, se observa también una actividad inhibitoria [94].

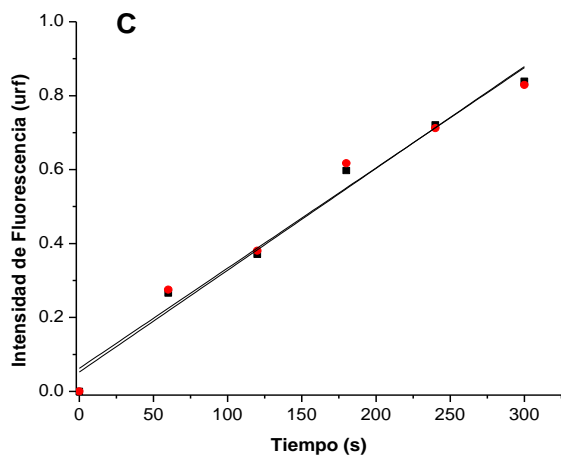
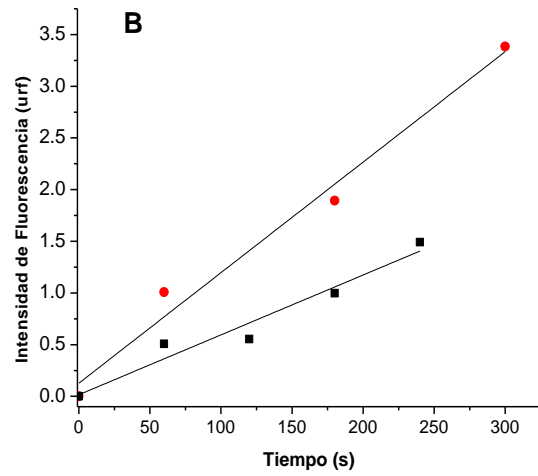
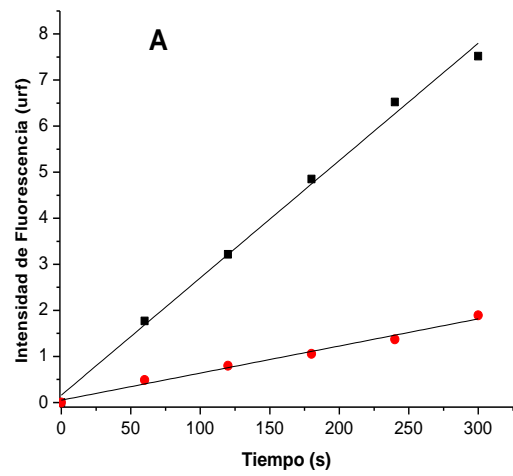
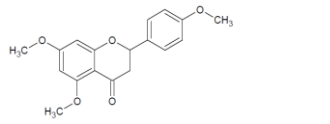
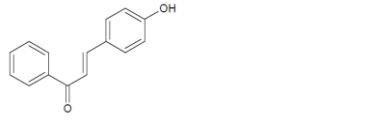
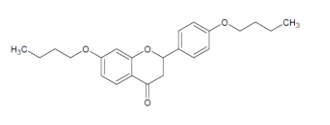
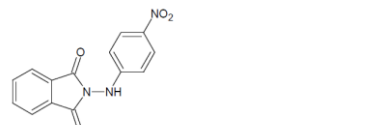
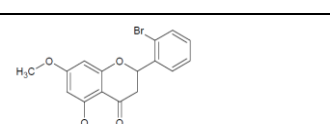
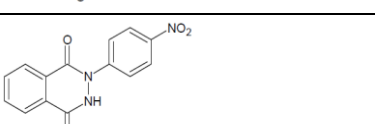
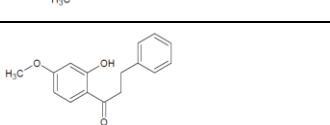
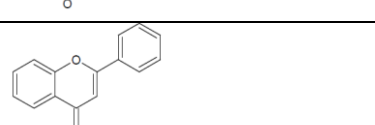
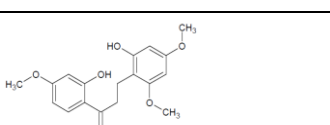
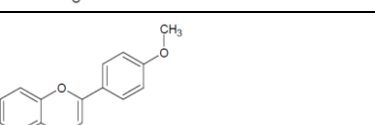
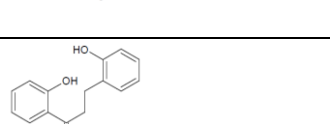
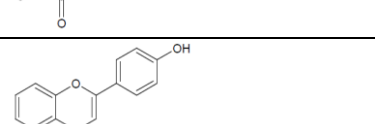
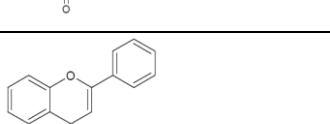
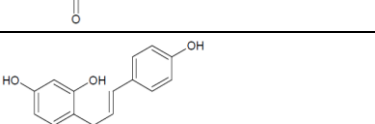
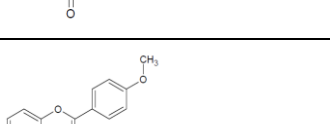
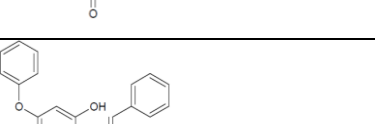
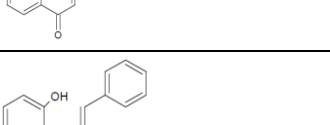
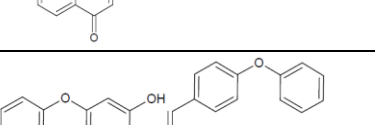
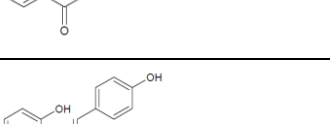
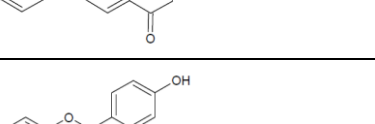



Figura 18. Se presentan como ejemplo tres medidas de actividad realizadas con el método fluorescente. Se grafica la corrida control, o sea sin compuesto (rojo), y la corrida en presencia de 100 μM del compuesto (negro). **A)** Resveratrol. **B)** Compuesto 21. **C)** Compuesto 10. Las medidas fueron realizadas utilizando péptido sustrato 25 μM , SIRT1 750 nM y NAD^+ 500 μM , excepto para B donde se utilizó NAD^+ 1 mM.

Tabla 2.

1		Insoluble	12		0,65
2		Insoluble	13		0,8
3		Insoluble	14		Insoluble
4		0,84	15		0,84
5		Insoluble	16		Insoluble
6		0,70	17		0,70
7		0,65	18		0,80
8		Insoluble	19		Insoluble
9		0,87	20		Insoluble
10		1,0	21		0,50
11		0,87			

Conclusiones

- Se obtuvo a la hSIRT1r en dos pasos cromatográficos con una alta pureza y buena actividad enzimática. El rendimiento de la purificación no es alto pero se logró obtener enzima suficiente como para poder realizar las medidas de actividad enzimática.
- La proteína se comporta en solución como un oligomero (dímeros y tetrameros en equilibrio).
- Se puso a punto una técnica para la cuantificación de la nicotinamida producida en la reacción de desacetilación por la SIRT1 mediante HPLC.
- A pesar de tratarse también de un método de medida de actividad discontinuo se pudo constatar que la activación por resveratrol observada con el método fluorescente no se observa utilizando un sustrato sin la molécula fluorogénica unida.
- Se ensayó la capacidad moduladora de la actividad de hSIRT1 de 12 compuestos, la mayoría flavonoides (chalconas y flavanonas). En general los compuestos testeados no afectaron sustancialmente la actividad de la enzima, presentando una leve capacidad inhibitoria.
- De los compuestos ensayados el que presentó mayor capacidad inhibitoria fue la flavanona 21.

Perspectivas

La sobreexpresión de SIRT1 así como su knockdown en distintos sistemas celulares y modelos animales han sostenido la idea de que SIRT1 no sólo participa activamente en la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos sino en la reparación del ADN, senescencia, muerte y diferenciación celular. Se ha focalizado en la regulación de su actividad como blanco terapéutico de varias patologías, no sólo síndrome metabólico, diabetes, hígado graso, sino enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer. La regulación bioquímica de SIRT1 es compleja; se han identificado distintos mecanismos de regulación pero hay muchos otros poco explorados. Nos interesa profundizar en las modificaciones oxidativas que puede sufrir esta enzima, capaces de modular su actividad y su interacción con otras proteínas.

Por otro lado, tenemos una serie de compuestos polifenólicos sintéticos (estilbenos y derivados) cuya capacidad de modular la actividad SIRT1 queremos ensayar y en los casos más prometedores, profundizar en el estudio de la interacción del activador/inhibidor con la enzima o complejos enzima-proteína.

Nos interesa también seguir explorando un ensayo de actividad desacetilasa continuo y sensible, además del uso de diferentes sustratos peptídicos/proteicos acetilados, en particular, utilizar histonas acetiladas ya que representan un sustrato más fisiológico. En ese sentido, cabe destacar la importancia de la estructura del sustrato utilizado en el ensayo de actividad para observar activación de STACs. Todavía no se tiene un mecanismo claro de activación por estas moléculas pequeñas que explique la activación de SIRT1 *in vitro* y correlacione con el efecto indudable observado en células e *in vivo*.

Referencias

1. Matyus, P., *Welcome to new insights into 'Metabolic Syndrome'*. *Future Med Chem*, 2010. **2**(12): p. 1719-20.
2. Aasheim, E.T. and T.T. Søvik, *Global trends in body-mass index*. *The Lancet*, 2011. **377**(9781): p. 1916-1917.
3. M.S.P. *1^{ra} Encuesta nacional de factores de riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles*. 2006 [cited 2011; Available from: http://www.msp.gub.uy/ucepidemiologia_5551_1.html].
4. Masoro, E.J., *Overview of caloric restriction and ageing*. *Mech Ageing Dev*, 2005. **126**(9): p. 913-22.
5. McCay, C.M., Crowel, M.F. and Maynard, L.A. , *The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size*. . *J. Nutr.*, 1935. **10**: p. 63–79
6. Omodei, D. and L. Fontana, *Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(11): p. 1537-42.
7. Cohen, H.Y., et al., *Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase*. *Science*, 2004. **305**(5682): p. 390-2.
8. Heilbronn, L.K., et al., *Glucose tolerance and skeletal muscle gene expression in response to alternate day fasting*. *Obes Res*, 2005. **13**(3): p. 574-81.
9. Blander, G. and L. Guarente, *The Sir2 family of protein deacetylases*. *Annual Review of Biochemistry*, 2004. **73**: p. 417-35.
10. Miller, E.S., et al., *Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage*. *J Bacteriol*, 2003. **185**(17): p. 5220-33.
11. Peserico, A. and C. Simone, *Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 371832.
12. Aparicio, O.M., B.L. Billington, and D.E. Gottschling, *Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in S. cerevisiae*. *Cell*, 1991. **66**(6): p. 1279-87.
13. Sinclair, D.A. and L. Guarente, *Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast*. *Cell*, 1997. **91**(7): p. 1033-42.
14. Kaerberlein, M., M. McVey, and L. Guarente, *The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms*. *Genes & Development*, 1999. **13**(19): p. 2570-2580.
15. Tissenbaum, H.A. and L. Guarente, *Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2001. **410**(6825): p. 227-30.
16. Bauer, J.H., et al., *dSir2 and Dmp53 interact to mediate aspects of CR-dependent lifespan extension in D. melanogaster*. *Aging (Albany NY)*, 2009. **1**(1): p. 38-48.

17. Burnett, C., et al., *Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in C. elegans and Drosophila*. Nature, 2011. **477**(7365): p. 482-5.
18. Frye, R.A., *Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(2): p. 793-8.
19. Michishita, E., et al., *Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4623-35.
20. Tanno, M., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6823-32.
21. Hirschey, M.D., *Old Enzymes, New Tricks: Sirtuins Are NAD(+)-Dependent Deacetylases*. Cell Metab, 2011.
22. North, B.J., et al., *The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 437-44.
23. Onyango, P., et al., *SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13653-8.
24. Vaziri, H., et al., *hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase*. Cell, 2001. **107**(2): p. 149-59.
25. Haigis, M.C., et al., *SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells*. Cell, 2006. **126**(5): p. 941-54.
26. Shi, T., et al., *SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13560-7.
27. Frye, R.A., *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, 1999. **260**(1): p. 273-9.
28. Du, J., et al., *Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase*. Science, 2011. **334**(6057): p. 806-9.
29. Westphal, C.H., M.A. Dipp, and L. Guarente, *A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging?* Trends Biochem Sci, 2007. **32**(12): p. 555-60.
30. Jackson, M.D. and J.M. Denu, *Structural identification of 2'- and 3'-O-acetyl-ADP-ribose as novel metabolites derived from the Sir2 family of beta -NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 18535-44.
31. Sauve, A.A., et al., *The biochemistry of sirtuins*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 435-65.
32. Liszt, G., et al., *Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21313-20.
33. Zhang, T. and W.L. Kraus, *SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(8): p. 1666-75.
34. Hoff, K.G., et al., *Insights into the sirtuin mechanism from ternary complexes containing NAD⁺ and acetylated peptide*. Structure, 2006. **14**(8): p. 1231-40.

35. Borra, M.T., et al., *Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases*. *Biochemistry*, 2004. **43**(30): p. 9877-87.
36. Hawse, W.F., et al., *Structural insights into intermediate steps in the Sir2 deacetylation reaction*. *Structure*, 2008. **16**(9): p. 1368-77.
37. Smith, B.C. and J.M. Denu, *Sir2 protein deacetylases: evidence for chemical intermediates and functions of a conserved histidine*. *Biochemistry*, 2006. **45**(1): p. 272-82.
38. Jackson, M.D., et al., *Mechanism of nicotinamide inhibition and transglycosidation by Sir2 histone/protein deacetylases*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(51): p. 50985-98.
39. Sauve, A.A., et al., *Chemistry of gene silencing: the mechanism of NAD⁺-dependent deacetylation reactions*. *Biochemistry*, 2001. **40**(51): p. 15456-63.
40. Pacholec, M.B., J. E. Chrnyk, B. Cunningham, D. Flynn, D. Garofalo, R. S. Griffith, D. Griffor, M. Loulakis, P. Pabst, B. Qiu, X. Stockman, B. Thanabal, V. Varghese, A. Ward, J. Withka, J. Ahn, K., *SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(11): p. 8340-51.
41. Howitz, K.T., et al., *Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan*. *Nature*, 2003. **425**(6954): p. 191-6.
42. Kaerberlein, M., et al., *Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(17): p. 17038-45.
43. Bitterman, K.J., et al., *Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(47): p. 45099-107.
44. Landry, J., J.T. Slama, and R. Sternglanz, *Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **278**(3): p. 685-90.
45. Sauve, A.A. and V.L. Schramm, *Sir2 regulation by nicotinamide results from switching between base exchange and deacetylation chemistry*. *Biochemistry*, 2003. **42**(31): p. 9249-56.
46. Autiero, I., S. Costantini, and G. Colonna, *Human sirt-1: molecular modeling and structure-function relationships of an unordered protein*. *PLoS One*, 2009. **4**(10): p. e7350.
47. Min, J., et al., *Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex*. *Cell*, 2001. **105**(2): p. 269-79.
48. Finnin, M.S., J.R. Donigian, and N.P. Pavletich, *Structure of the histone deacetylase SIRT2*. *Nat Struct Biol*, 2001. **8**(7): p. 621-5.
49. Zhao, K., et al., *Structure and autoregulation of the yeast Hst2 homolog of Sir2*. *Nat Struct Biol*, 2003. **10**(10): p. 864-71.
50. Avalos, J.L., et al., *Structure of a Sir2 enzyme bound to an acetylated p53 peptide*. *Mol Cell*, 2002. **10**(3): p. 523-35.
51. Avalos, J.L., K.M. Bever, and C. Wolberger, *Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme*. *Mol Cell*, 2005. **17**(6): p. 855-68.

52. Zhao, K., X. Chai, and R. Marmorstein, *Structure and substrate binding properties of cobB, a Sir2 homolog protein deacetylase from Escherichia coli*. J Mol Biol, 2004. **337**(3): p. 731-41.
53. Rossmann, M.G. and P. Argos, *The taxonomy of binding sites in proteins*. Mol Cell Biochem, 1978. **21**(3): p. 161-82.
54. Kang, H., et al., *Peptide switch is essential for sirt1 deacetylase activity*. Mol Cell, 2011. **44**(2): p. 203-13.
55. Zillikens, M.C., et al., *SIRT1 genetic variation is related to BMI and risk of obesity*. Diabetes, 2009. **58**(12): p. 2828-34.
56. Zillikens, M.C., et al., *SIRT1 genetic variation and mortality in type 2 diabetes: interaction with smoking and dietary niacin*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(6): p. 836-41.
57. Wang, C., et al., *Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(9): p. 1025-31.
58. Chen, W.Y., et al., *Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses*. Cell, 2005. **123**(3): p. 437-48.
59. Abdelmohsen, K., et al., *Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression*. Mol Cell, 2007. **25**(4): p. 543-57.
60. Yang, Y., et al., *SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(11): p. 1253-62.
61. Sasaki, T., et al., *Phosphorylation regulates SIRT1 function*. PLoS One, 2008. **3**(12): p. e4020.
62. Nasrin, N., et al., *JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8414.
63. Guo, X., et al., *DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1*. J Biol Chem, 2010. **285**(17): p. 13223-32.
64. Haigis, M.C. and D.A. Sinclair, *Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 253-95.
65. Kim, E.J., et al., *Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity*. Mol Cell, 2007. **28**(2): p. 277-90.
66. Zhao, W., et al., *Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1*. Nature, 2008. **451**(7178): p. 587-90.
67. Caito, S., et al., *SIRT1 is a redox-sensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress*. Faseb J, 2010. **24**(9): p. 3145-59.
68. Zee, R.S., et al., *Redox regulation of sirtuin-1 by S-glutathiolation*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(7): p. 1023-32.
69. Frescas, D., 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, 2005. **280**(21): p. 20589-95.
70. Hallows, W.C., W. Yu, and J.M. Denu, *Regulation of glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase-1 by Sirt1-mediated deacetylation*. J Biol Chem, 2011.

71. Liu, Y., et al., *A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange*. *Nature*, 2008. **456**(7219): p. 269-73.
72. Rodgers, J.T., et al., *Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1*. *Nature*, 2005. **434**(7029): p. 113-8.
73. Rodgers, J.T. and P. Puigserver, *Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(31): p. 12861-6.
74. Purushotham, A., et al., *Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation*. *Cell Metab*, 2009. **9**(4): p. 327-38.
75. Escande, C., et al., *Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(2): p. 545-58.
76. Li, Y., et al., *Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver*. *Faseb J*, 2011. **25**(5): p. 1664-79.
77. Walker, A.K., et al., *Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP*. *Genes Dev*, 2010. **24**(13): p. 1403-17.
78. Picard, F., et al., *Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma*. *Nature*, 2004. **429**(6993): p. 771-6.
79. Moynihan, K.A., et al., *Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice*. *Cell Metab*, 2005. **2**(2): p. 105-17.
80. Bordone, L., et al., *Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells*. *PLoS Biol*, 2006. **4**(2): p. e31.
81. Baur, J.A., et al., *Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet*. *Nature*, 2006. **444**(7117): p. 337-42.
82. Lagouge, M., et al., *Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha*. *Cell*, 2006. **127**(6): p. 1109-22.
83. Barger, J.L., et al., *A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice*. *PLoS One*, 2008. **3**(6): p. e2264.
84. Borra, M.T., B.C. Smith, and J.M. Denu, *Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(17): p. 17187-95.
85. Heltweg, B., J. Trapp, and M. Jung, *In vitro assays for the determination of histone deacetylase activity*. *Methods*, 2005. **36**(4): p. 332-7.
86. Wegener, D., et al., *A Fluorogenic Histone Deacetylase Assay Well Suited for High-Throughput Activity Screening*. *Chemistry & Biology*, 2003. **10**(1): p. 61-68.
87. Milne, J.C., et al., *Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes*. *Nature*, 2007. **450**(7170): p. 712-6.
88. Feige, J.N., et al., *Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation*. *Cell Metab*, 2008. **8**(5): p. 347-58.
89. Mai, A., et al., *Study of 1,4-dihydropyridine structural scaffold: discovery of novel sirtuin activators and inhibitors*. *J Med Chem*, 2009. **52**(17): p. 5496-504.

90. Dyballa, N. and S. Metzger, *Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels*. J Vis Exp, 2009(30): p. e1431.
91. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
92. Creighton, T.E., *Protein Structure*. Segunda ed. The Practical Approach Series, ed. B.D. Hames. 1997, Leeds: IRL PRESS. 383.
93. Cen, Y., et al., *Mechanism-based affinity capture of sirtuins*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2011. **9**(4): p. 987-993.
94. Kahyo, T., et al., *A novel chalcone polyphenol inhibits the deacetylase activity of SIRT1 and cell growth in HEK293T cells*. J Pharmacol Sci, 2008. **108**(3): p. 364-71.

Agradecimientos

A la ANII por otorgarme la beca de iniciación.

A CSIC Universidad de la República por el apoyo al desarrollo de la investigación en el laboratorio.