

Tesis de Posgrado

Regulación de la expresión génica de la delta-aminolevulinato sintetasa por cAMP y glucosa : participación de las quinasas de proteínas A y C

Varone, Cecilia Laura

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Varone, Cecilia Laura. (1998). Regulación de la expresión génica de la delta-aminolevulinato sintetasa por cAMP y glucosa : participación de las quinasas de proteínas A y C. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3046_Varone.pdf

Cita tipo Chicago:

Varone, Cecilia Laura. "Regulación de la expresión génica de la delta-aminolevulinato sintetasa por cAMP y glucosa : participación de las quinasas de proteínas A y C". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3046_Varone.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Regulación de la expresión génica de la
 δ -aminolevulinato sintetasa por cAMP y
glucosa. Participación de las quinasas de
proteínas A y C.**

Autor:

Cecilia Laura Varone

Director de tesis:

Eduardo Tomás Cánepa

Lugar de trabajo:

Departamento de Química Biológica

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

-1998-

27472
#3046

h.2

Agradecimientos

Deseo expresar mi sincero agradecimiento

a Eduardo por su constante estímulo y consejos, por su calidez y su entusiasmo, por compartir el placer de los buenos resultados y también los fracasos, por enseñarme a trabajar rigurosamente,

a Santiago por su paciencia infinita y por enseñarme a repartir los tiempos,

a mi familia por acompañarme en todo momento,

a mis compañeras de laboratorio a lo largo de estos años Lilian, Mariela, Luciana y Alejandra por compartir el trabajo y una linda amistad,

a las vecinas: Silvia Moreno por estar siempre disponible, por su empuje, y a sus chicas Vani, Silvia y Elba por su solidaridad,

a Silvia, Silvina, Juan Carlos, Andrea, María del Carmen, Gabriela, María, Marta, por compartir lo cotidiano del trabajo,

a Pablo por su estímulo y ayuda técnica, a Adri por las charlas de pasillo, a Adalí por facilitarme materiales y por su buen humor, a Nelly por sacarme de un apuro más de una vez,

a todos mis compañeros del Departamento de Química Biológica, autoridades, secretarías y personal docente y no docente por su cooperación,

al los Dres. Mario Zakin y Alberto Ochoa de la Unidad de Expresión de Genes Eucarióticos (Instituto Pasteur, Francia) por su colaboración en el clonado del promotor de ALA-S,

al Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular y al Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, por facilitarme el uso del cuarto de cultivo de células, y por toda su amabilidad y buena disposición,

al Dr. Moisés Grinstein y la Dra. Elena B.C. Llambías,

a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,

a la Universidad de Buenos Aires por el apoyo brindado al proyecto de investigación.

Trabajos publicados

La mayor parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis dieron origen a las siguientes publicaciones:

- "Cyclic AMP regulation of phenobarbital mediated induction of δ -aminolevulinate synthase mRNA in hepatocytes from normal and experimental-diabetic rats."
Cecilia L. Varone, Eduardo T. Cánepa, Elena B.C. Llambías y Moisés Grinstein. 1994.
Biochemistry and Cell Biology 72: 381-390.
- "Glucose inhibits phenobarbital induced δ -aminolevulinate synthase expression in normal but not in diabetic rat hepatocytes."
Cecilia L. Varone, Eduardo T. Cánepa, Elena B.C. Llambías y Moisés Grinstein. 1996.
Biochemistry and Cell Biology 74: 271-281
- "Evidence that protein kinase C is involved in δ -aminolevulinate synthase expression in rat hepatocytes"
Cecilia L. Varone and Eduardo T. Cánepa. 1997. Archives of Biochemistry and Biophysics 341:259-266.
- "Transcriptional regulation of δ -aminolevulinate synthase by cAMP dependent protein kinase"
Cecilia L. Varone, Luciana Giono, Alberto Ochoa, Mario M. Zakin and Eduardo T. Cánepa. (artículo en preparación)

Resumen

Título: Regulación de la expresión génica de la δ -aminolevulinato sintetasa por cAMP y glucosa. Participación de las quinasas de proteínas A y C.

Autor: Cecilia L. Varone

Director: Dr. Eduardo T. Cánepa

El primer paso en la biosíntesis del hemo en las células animales es catalizado por la enzima mitocondrial δ -aminolevulinato sintetasa (ALA-S), que condensa glicina y succinil CoA para formar ácido δ -aminolevulínico y que, al menos en hígado, es la limitante de la velocidad. En hígado esta enzima constitutiva regula la producción de hemo necesario para sintetizar las proteínas citocromos P-450.

Aunque en los tejidos animales el nivel de enzima es muy bajo, la transcripción del gen de ALA-S en hígado de animales de experimentación aumenta cuando se les administran compuestos porfirinogénicos como el fenobarbital. Diferentes mecanismos fueron propuestos por los que el hemo puede regular la expresión de ALA-S a nivel transcripcional reprimiendo la síntesis del RNA, a nivel postranscripcional disminuyendo la estabilidad del mensajero y a nivel postraduccional inhibiendo la entrada de la enzima a la mitocondria.

En el presente trabajo examinamos el mecanismo ejercido por cAMP y glucosa sobre la expresión génica de ALA-S en hepatocitos de ratas normales y con diabetes experimental, y en cultivos de células HepG2. Se ha demostrado que el cAMP potencia la inducción mediada por fenobarbital, aumentando la cantidad del mRNA de ALA-S a través de la activación de la quinasa de proteínas dependiente de cAMP. El efecto inductor ejercido por el fenobarbital es mayor en hepatocitos diabéticos que en normales debido probablemente al nivel de cAMP elevado que presentan. Por otro lado, se ha demostrado que la glucosa inhibe la inducción de la expresión de ALA-S mediada por fenobarbital en hepatocitos normales pero no en diabéticos. Este efecto glucosa es revertido por la presencia de dibutilil cAMP, de activadores de la adenilil ciclase o de un inhibidor de fosfodiesterasa. Se presentan evidencias que los efectos del cAMP y la glucosa son ejercidos a nivel transcripcional. La vida media del mRNA de ALA-S no se modifica en presencia de ellos. Mas aún, los efectos de cAMP y la glucosa se manifiestan en el análisis de tranfecciones transientes de células HepG2 con un vector que contiene la región promotora del gen ALA-S clonada en 5' del gen de la cloramfenicol acetiltransferasa. En este tipo de experimentos hemos confirmado además que el efecto de cAMP requiere la activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP ya que hemos obtenido resultados similares cotransfectando con la subunidad C de la PKA. Finalmente se demuestra que la activación de la PKC actúa negativamente sobre el mRNA de ALA-S, probablemente a nivel transcripcional, de acuerdo a las determinaciones por Northern, slot blot y análisis de transfecciones transientes de células HepG2. Asimismo se observa que el efecto del éster de forbol TPA anula el efecto inductor del cAMP. Es posible que ambos caminos de transducción de señales, que involucran la activación de PKA y PKC, estén interconectados en la regulación de la expresión génica de ALA-S.

Palabras clave: δ -aminolevulinato sintetasa; hepatocitos; fenobarbital; hemo; expresión génica; cAMP; quinasa de proteínas dependiente de cAMP; glucosa; ésteres de forbol; quinasa de proteínas C.

Abstract

Title: Cyclic AMP and glucose regulation of δ -aminolevulinate synthase gene expression. Rol of protein kinases A and C.

Author: Cecilia L. Varone

Director: Dr. Eduardo T. Cánepa

The first step of heme biosynthesis pathway in animal cells is catalyzed by the mitochondrial enzyme δ -aminolevulinate synthase (ALA-S), which condensates glycine and succinyl-CoA to form δ -aminolevulinic acid, and -at least in liver- is rate controlling. In liver, this housekeeping enzyme regulates the supply of heme necessary to form respiratory cytochrome P-450 proteins.

Although the enzyme level in animal tissues is usually very low, the transcriptional rate of ALA-S gene is greatly increased in experimental animal livers after the administration of a variety of porphyrinogenic effectors such as phenobarbital. Different mechanisms have been proposed to show that heme can regulate ALA-S gene expression at the transcriptional level by repressing mRNA biosynthesis, at the post-transcriptional level by diminishing ALA-S mRNA stability, and at the post-translational level by inhibiting the enzyme entrance to the mitochondria.

In the present work we examined the mechanisms underlying the effect of cAMP and glucose on ALA-S synthase gene expression both in isolated hepatocytes from normal and experimental diabetic rats, and in HepG2 cells.

It was demonstrated that cAMP potentiates phenobarbital-mediated induction, increasing the amount of ALA-S mRNA by means of the activation of cAMP dependent protein kinase. The inducing effect exerted by the phenobarbital is greater in diabetic hepatocytes than in normal cells, due probably to the high level of endogenous cAMP in diabetic cells. On the other hand, it was shown that glucose inhibits phenobarbital-induced ALA-S expression in normal hepatocytes, but not in diabetic ones. This glucose effect can be prevented adding dibutyryl cAMP, adenylate cyclase activators, or a phosphodiesterase inhibitor.

There are evidences that both cAMP and glucose effects would operate at the transcriptional level. ALA-S mRNA half life was not modified in their presence. Moreover cAMP and glucose effects were manifested in transfection analysis of HepG2 cells using ALA-S promoter region cloned 5' upstream chloramphenicol acetyltransferase reporter gene. With this kind of experiments we were also able to confirm that the effect of cAMP requires the activation of cAMP dependent protein kinase, since it was possible to bypass this activation cotransfecting with PKA subunit C. Finally there are evidences that protein kinase C activation influences negatively ALA-S mRNA -probably at the transcriptional level-, according to Northern, slot blot and transient transfection analysis of HepG2 cells. We could also observe that the effect of phorbol ester TPA overcomes dibutyryl cAMP induction. Thus, it is feasible that both signal transduction pathways involving PKA and PKC activation are interconnected in the regulation of ALA-S gene expression.

Key words: δ -aminolevulinate synthase; gene expression; hepatocytes; cAMP; phenobarbital; heme; cAMP dependent protein kinase; glucose; phorbol esters; protein kinase C.

Objetivos

El desarrollo y mantenimiento de la vida de los organismos eucarióticos multicelulares presenta una intrincada red de eventos que se suceden de una manera ordenada. Como requisito fundamental las células deben responder a las señales extracelulares con una serie de mecanismos específicos que regulan o modulan su expresión génica.

El proceso de la transducción de la señal entre el estímulo y el gen depende de distintos sistemas de componentes celulares que garantizan la especificidad del proceso.

De esta manera los distintos caminos en la transducción de señales aún difiriendo en los componentes celulares y en su complejidad, obedecen ciertos principios que son conservados evolutivamente y están distribuidos ubicuamente en los organismos vivos.

Las señales extracelulares o ligandos se unen a receptores ya sea de la membrana plasmática o del interior de la célula. Los receptores activados, pueden regular directamente la expresión génica, o asociarse con otros transductores capaces de producir variaciones de segundos mensajeros que, activando proteínas blanco en sucesivos pasos, modulan la expresión génica.

En el presente trabajo se estudian mecanismos básicos vinculados con la regulación de la expresión génica de la δ -aminolevulinato sintetasa (ALA-S), principal punto de control del camino biosintético del hemo. Se utilizan como modelos experimentales cultivos primarios de hepatocitos de ratas, y cultivos establecidos de células HepG2.

Los objetivos del trabajo son:

- I) Estudiar el efecto de la droga porfirinogénica fenobarbital sobre la expresión génica de ALA-S en hígado de rata. Se analizará con especial énfasis si el fenobarbital modula la síntesis del mRNA de ALA-S.
- II) Determinar a qué nivel de la transferencia de la información genética se encuentran involucrados el cAMP y la glucosa en la expresión de ALA-S de hígado de rata.

- III) Estudiar los factores causantes de la mayor sensibilidad de los hepatocitos diabéticos a la acción de drogas porfirinogénicas. Evaluar la acción de cAMP y glucosa en la expresión de ALA-S en hígado de ratas con diabetes experimental.
- IV) Estudiar la transducción de la señal desencadenada por cAMP a través de la quinasa de proteínas A en la regulación de la expresión génica de ALA-S.
- V) Estudiar la modulación de la expresión de ALA-S por la quinasa de proteínas C, evaluando si esta vía de transducción de señales cumple un rol regulatorio sobre dicho gen.

Abreviaturas

4 α PDA: 4 α -forbol 12,13-diacetato
8-AHA-cAMP: 8-(6-aminoheptil)amino-cAMP
8-CPT-cAMP: 8-(4-clorofeniltio)-cAMP
AIA: alilisopropilacetamida
AKAP: proteínas de anclaje de PKA
ALA: ácido δ -aminolevulínico
ALA-S: δ -aminolevulinato sintetasa
AP-1: proteína activadora 1
AP-2: proteína activadora 2
ATF: factor activador de la transcripción
benzoil cAMP: N⁶-benzoil-cAMP
Bt₂cAMP: N⁶,O²-dibutilil adenosina 3'-5' monofosfato cíclico
CAT: cloramfenicol acetiltransferasa
CBP: proteína de unión a CREB
CRE: elemento que responde a cAMP
CREB: proteína de unión al elemento CRE
CREM: proteína moduladora de unión a CRE
CYP: citocromo
DAG: diacilglicerol
DOG: 1,2-dioctanoil-sn-glicerol
EGTA: etilen glicol-bis (beta aminoetiléter) N,N'-tetraacético
G3PD: gliceraldehído 3-fosfo deshidrogenasa
GIRE: elemento que responde a glucosa
HNF-4: factor nuclear hepático 4
HRM: motivo en proteínas reguladas por hemo
IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina
ICER: represores tempranos inducibles por cAMP
IDDM: diabetes tipo I insulina dependiente
IgG: inmunoglobulina G
IMPP: buffer de inmunoprecipitación
IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranosido
LB: medio Luria-Bertani
L-PK: piruvato quinasa tipo L
MAPK: quinasa de proteínas activadoras de la mitosis
MAPKK: quinasa de quinasa de proteínas activadoras de la mitosis
MAPKKK: quinasa de quinasa de quinasa de proteínas activadoras de la mitosis
MEM: medio mínimo Eagle
MLTF/USF: familia de proteínas activadoras "upstream"
NIDDM: diabetes de tipo II insulina independiente (NIDDM)

NRF-1 factor nuclear respiratorio 1
ONPG: ortonitrofenilgalactopiranosido
PAGE-SDS: electroforesis en gel desnaturizante con SDS
PBS: buffer fosfato salino
PCR: reacción de amplificación con DNA polimerasa
PKA: quinasa de proteínas dependiente de cAMP
PKC: quinasa de proteínas dependiente de calcio
PKI: proteína inhibidora de PKA
PLC: fosfolipasa C
PP-1: fosfatasa 1
PP-2: fosfatasa 2
RACKs: receptores de PKC activada
SDS: sodio duodecil sulfato
SSC: solución de citrato y sodio
SV40: virus de simios 40
TE: solución de Tris-EDTA
TEA: solución de Tris-EDTA-acético
Tm: temperatura de desnaturización media
TPA: 12-*O*-tetradecanoilforbol 13 acetato
TRE: elemento que responde a TPA
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido

Agradecimientos	III
Trabajos publicados	IV
Resumen	V
Abstract.....	VI
Objetivos.....	VII
Abreviaturas.....	IX

ÍNDICE.....	XII
--------------------	------------

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1: Camino metabólico del hemo

A. Estructura, función.....	2
B. Metabolismo del Hemo	
B.1 Biosíntesis.....	3
B.2 Degradación	6
C. Citocromo P-450	8
D. Porfirias	
D.1 Generalidades.....	10
D.2 Porfirias tóxica y experimental.....	13
D.3 Porfirias y diabetes	14

Capítulo 2: Regulación de la transcripción

A. Transducción de señales por fosforilación de factores de transcripción.....	16
B. Regulación de la expresión génica por cAMP	
B.1 La cascada de la transducción de señales por cAMP	17
B.2 Blancos nucleares del camino del cAMP	20
B.3 Factores de transcripción de respuesta a cAMP	22
B.4 Mecanismos de activación de genes que responden a cAMP.....	24
B.5 Mecanismos de represión de genes que responden a cAMP	27
C. Regulación de la expresión génica por glucosa	
C1. Aspectos generales	30
C2. Regulación transcripcional de genes que responden a glucosa en hígado.....	31
C3. Elementos de respuesta a glucosa (GlRE) y proteínas de unión.....	33
D. Regulación de la expresión génica mediada por la quinasa de proteínas C	
D.1 Aspectos estructurales de la familia de la PKC	35
D.2 Mecanismo de activación de PKC.....	37
D.3 Regulación de la PKC	40

D.4 Modulación de la expresión génica por PKC	41
E. Entrecruzamiento de las señales mediadas por PKA y PKC	44

Capítulo 3: Regulación de la δ -aminolevulinato sintetasa

A. Acción catalítica.....	45
B. Estructura génica de ALA-S	46
C. Regulación de ALA-S.....	50
C.1 Regulación ejercida por hemo	51
C.2 Regulación ejercida por fenobarbital.....	54
C.3 Regulación ejercida por cAMP.....	55
C.4 Regulación ejercida por glucosa.....	57
C.5 Regulación ejercida por hormonas	58

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES	60
2. CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA	
A. Animales utilizados- obtención del hígado.....	61
B. Inducción de diabetes experimental	61
C. Determinación de glucosa	61
D. Preparación de hepatocitos.....	61
E. Determinación del número de células y de su viabilidad	62
F. Incubación de los hepatocitos.....	63
G. Determinación de proteínas.....	63
H. Medición del nivel de cAMP endógeno.....	63
3. OBTENCIÓN DE RNA	
A. Purificación del RNA total.....	64
B. Aislamiento de poli (A) ⁺ RNA en batch.....	65
C. Electroforesis de RNA en gel de agarosa	66
4. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL mRNA DE ALA-S	
A.Traducción <i>in vitro</i>	66
B.Inmunoprecipitación de ALA-S sintetizada <i>in vitro</i>	67
C.Electroforesis desnaturizante de proteínas en gel de poliacrilamida	68
D.Cuantificación de la actividad del mRNA ALA-S relativa a la actividad del mRNA total	68
5. MEDICIÓN DE LA CANTIDAD DE mRNA	
A Análisis del mRNA por Northern y slot blot	69

B Obtención de la sonda para ALA-S	
B.1 Purificación del oligonucleótido	70
B.2 Marcación del oligonucleótido	71
C Obtención de la sonda para gliceraldehído 3-fosfo-deshidrogenasa.....	72
D Hibridización y autoradiografía.....	72
6. CLONADO DE LA SECUENCIA PROMOTORA DE ALA-S	
A. Aislamiento de DNA genómico	73
B. Diseño y purificación de los primers	74
C. Reacción de PCR	75
D. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.....	76
E. Clonado del fragmento amplificado en Bluescript II KS+	
E.1 Preparación plasmídica.....	76
E.2 Corte con enzimas de restricción y ligado.....	77
E.3 Preparación de bacterias competentes	77
E.4 Transformación de bacterias competentes	78
F. Subclonado del promotor de ALA-S en pBLCAT6	79
7. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE ALA-S EN CÉLULAS EN CULTIVO	
A. Cultivo de la línea celular HepG2	80
B. Plásmidos utilizados en las transfecciones	81
C. Maxipreparación plasmídica	82
D. Transfección celular	82
E. Preparación de los extractos celulares.....	83
F. Determinación de proteínas.....	84
G. Determinación de la actividad β -galactosidasa.....	84
H. Determinación de la actividad cloramfenicol acetiltransferasa	84

RESULTADOS

Capítulo 1: Análisis de la expresión de ALA-S a nivel de la actividad del mRNA.

<u>A-Optimización de las preparaciones de hepatocitos y RNA, y de la determinación de la actividad del mRNA de ALA-S</u>	
A.1 Obtención de suspensiones de hepatocitos	87
A.2 Aislamiento de RNA total y poli (A) ⁺ RNA	87
A.3 Especificidad del anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar ALA-S	89
A.4 Sistema de traducción <i>in vitro</i>	91

Conclusiones.....	96
<u>B-El fenobarbital induce y el cAMP potencia la actividad del mRNA de ALA-S.</u>	
B.1 Efecto de fenobarbital, dibutilil cAMP y 8-CPT-cAMP.....	97
B.2 Curva de tiempo del efecto de fenobarbital y dibutilil cAMP en la actividad del mRNA de ALA-S	97
B.3 Curva dosis respuesta de dibutilil cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S	100
B.4 Efecto del aumento intracelular de cAMP en la actividad del mRNA de ALA-S	100
B.5 Efecto de hemo sobre el mRNA de ALA-S.....	103
B.6 Efecto de cicloheximida sobre el mRNA de ALA-S	104
<u>C-La glucosa inhibe la actividad del mRNA de ALA-S inducida por fenobarbital.</u>	
C.1 Efecto de la glucosa en la actividad del mRNA de ALA-S	106
C.2 Curva de tiempo del efecto de fenobarbital y glucosa en la actividad del mRNA de ALA-S.....	107
C.3 Efecto de la preincubación con glucosa sobre el mRNA de ALA-S inducido con fenobarbital	107
C.4 Curva dosis respuesta de glucosa en la actividad del mRNA de ALA-S.....	108
<u>D-La inducción de la actividad del mRNA de ALA-S por fenobarbital es mayor en hepatocitos de ratas diabéticas que en normales.</u>	
D.1 Efecto de fenobarbital y cAMP en la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas.....	112
D.2 Curva de tiempo del efecto de fenobarbital y dibutilil cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas.....	113
D.3 Curva dosis respuesta de dibutilil cAMP en la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas	113
<u>E-La glucosa no inhibe la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas</u>	
Efecto de glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas	116
<u>F-El aumento intracelular de cAMP revierte el efecto inhibitorio de la glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S.</u>	
F.1 Efecto de dibutilil cAMP, activadores de adenilil ciclase y de un inhibidor de la fosfodiesterasa sobre el efecto glucosa en la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas normales	120
F.2 Efecto del fenobarbital y la glucosa sobre el mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas con el contenido de cAMP disminuido a niveles normales	122

Capítulo 2: Análisis de la expresión de ALA-S a nivel transcripcional.

A-Fenobarbital, dibutilil cAMP y glucosa modifican el nivel del mRNA de ALA-S.

- A.1 La sonda utilizada reconoce un único mRNA y del tamaño predicho..... 124
- A.2 Efecto de fenobarbital y dibutilil cAMP sobre los niveles de mRNA de ALA-S en hepatocitos provenientes de ratas normales y diabéticas..... 126
- A.3 Efecto de la glucosa sobre los niveles de mRNA de ALA-S en hepatocitos provenientes de ratas normales y diabéticas 128

B-Fenobarbital, dibutilil cAMP y glucosa no modifican la vida media del mRNA de ALA-S.

- B.1 Determinación de la vida media del mRNA de ALA-S luego del tratamiento con fenobarbital y dibutilil cAMP 131
- B.2 Determinación de la vida media del mRNA de ALA-S luego del tratamiento con glucosa 134

C-Clonado de la zona promotora del gen de ALA-S de hígado de rata 139

D-Fenobarbital, cAMP y glucosa regulan la transcripción a partir del promotor de ALA-S en células HepG2.

- D.1 Experimentos de transfección en células HepG2 143
- D.2 El fenobarbital y el 8-CPT-cAMP aumentan la transcripción a partir del promotor de ALA-S en células HepG2 145
- D.3 La glucosa disminuye la transcripción a partir del promotor de ALA-S en células HepG2 145

Capítulo 3: Modulación de la expresión génica de ALA-S por las quinasas de proteínas A y C.

A-La activación de la quinasa de proteínas A induce la expresión del gen de ALA-S.

- A.1 Análisis del efecto de pares de análogos de cAMP sitio selectivos para la PKA..... 148
- A.2 Efecto de la sobreexpresión de la subunidad C de PKA sobre la actividad del promotor de ALA-S en ensayos de transfección de células HepG2 152

B-La activación de la quinasa de proteínas C inhibe la expresión de ALA-S

- B.1 El TPA disminuye el nivel del mRNA de ALA-S en hepatocitos de rata..... 154
- B.2 Curva dosis respuesta del efecto inhibitorio ejercido por TPA 156
- B.3 Curva de tiempo del efecto de TPA sobre el mRNA de ALA-S 156
- B.4 Efecto del agonista de PKC, DOG sobre el mRNA de ALA-S..... 156

B.5 Determinación de la vida media del mRNA de ALA-S en presencia de activadores de PKC	159
B.6 Efecto de TPA y DOG sobre el promotor de ALA-S	162
B.7 Activación prolongada de PKC	162
B.8 Efecto de inhibidores de PKC sobre el mRNA de ALA-S	163
B.9 Efecto de calfosfín C sobre el promotor de ALA-S en ensayos de transfección de células HepG2	167
B.10 Estudios sobre el efecto combinado de cAMP y TPA sobre el mRNA de ALA-S	167
 DISCUSIÓN	 170
El fenobarbital aumenta la transcripción del gen de ALA-S	172
El cAMP regula la expresión del gen de ALA-S a través de la activación de la quinasa de proteínas A	176
La glucosa inhibe la expresión del gen de ALA-S	182
Los efectos sobre ALA-S del cAMP y la glucosa no se manifiestan en hepatocitos con diabetes experimental.....	186
El cAMP revierte el efecto inhibitorio ejercido por glucosa	188
La quinasa de proteínas C participa de la regulación de la expresión de ALA-S	190
Integración de la regulación de la expresión de ALA-S. Análisis de la secuencia del promotor.....	194
Representación esquemática de los mecanismos que regulan la expresión de ALA-S..	197
 BIBLIOGRAFÍA	 199

Introducción

Capítulo 1: Camino metabólico del hemo

A) ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El hemo posee una estructura porfirínica planar que tiene en su centro un átomo de metal. El catión metálico quelado consiste en el hierro (II) y la porfirina es la protoporfirina IX.

Todas las células de los animales superiores son capaces de sintetizar hemo. Este hemo es utilizado como grupo prostético por una gran variedad de proteínas (hemoproteínas) relacionadas, entre otras funciones, con el transporte y transferencia de oxígeno (hemoglobina y mioglobina), la protección de la célula frente a tóxicos oxidantes (catalasa, peroxidasa), transferencia de electrones acoplada a la síntesis de ATP (citocromos mitocondriales), y el metabolismo de ácidos grasos, esteroides, y xenobióticos (citocromos microsomales).

La capacidad de las hemoproteínas de llevar a cabo dichas funciones, reside en la propiedad del ión metálico central de ser capaz de cambiar su estado de oxidación reversiblemente. El núcleo básico de las porfirinas consiste en cuatro anillos pirrólicos unidos por cuatro puentes metílenos que forman un macrociclo. Éste posee una estructura rígida planar sobre la cual puede haber 8 cadenas laterales que determinan, de acuerdo a sus ubicaciones y tipo, un gran número de isómeros diferentes. Se han clasificado cuatro series de isómeros, aunque sólo los del tipo III se han encontrado en organismos eucariotas. En la Figura I.1 se esquematiza la estructura del hemo.

En los vertebrados, aproximadamente el 85% de la producción de hemo ocurre en las células eritroides de la médula ósea y es principalmente destinado a la síntesis de hemoglobina. El resto es sintetizado por los diversos tejidos, especialmente el hígado, y es derivado en su mayor parte a la síntesis de los citocromos P-450. (Granick y Sassa, 1971).

Tanto en la médula ósea como en el hígado la velocidad de síntesis está estrictamente regulada y puede incrementarse en gran medida por causa de una demanda de eritrocitos

circulantes, o en respuesta a inductores de los citocromos P-450 respectivamente, como se discutirá mas adelante.

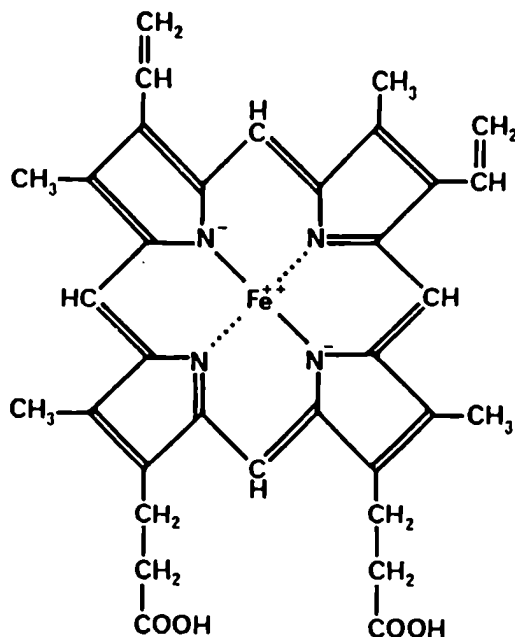


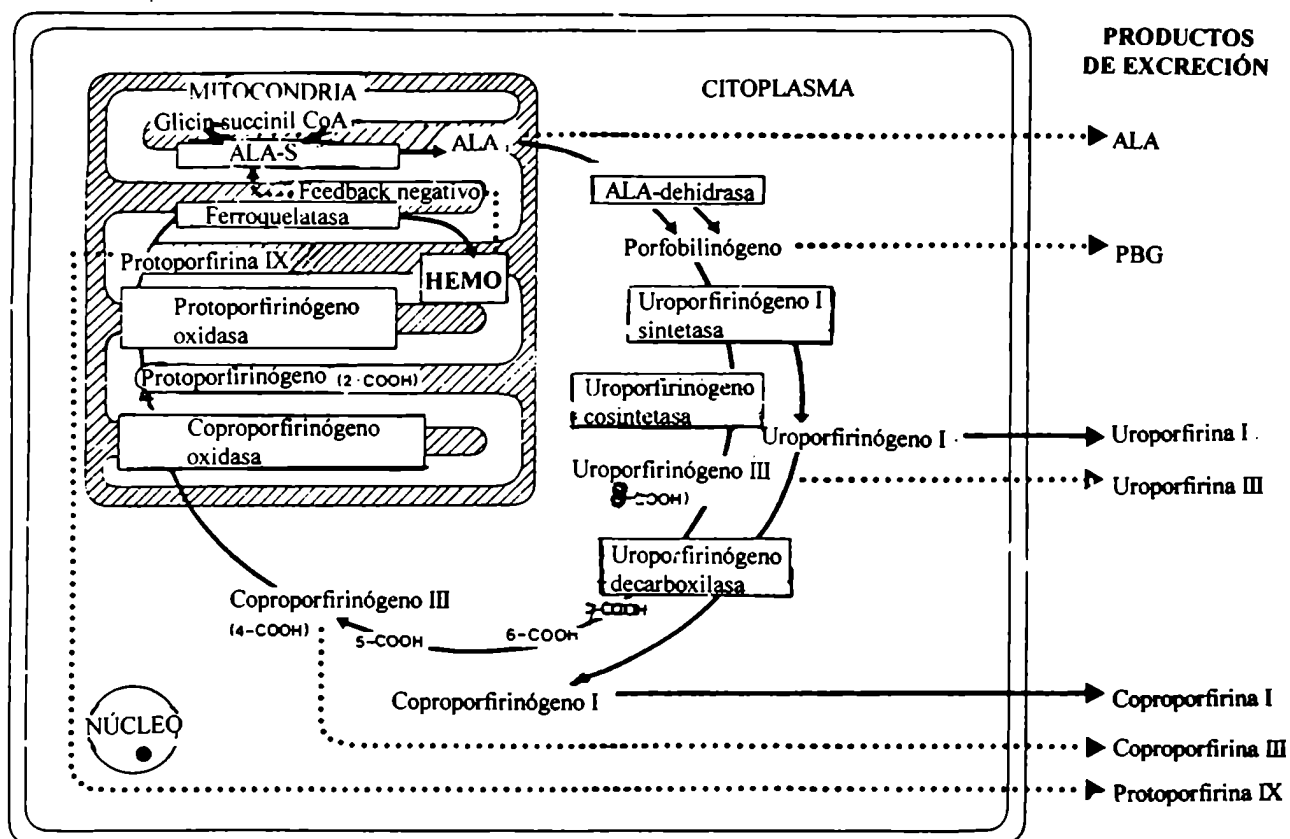
Figura I.1: Estructura del hemo

B) METABOLISMO DEL HEMO.

B.1 Biosíntesis

La síntesis de ácido δ -aminolevulínico (ALA) es el primer paso y es el limitante en la producción de hemo. Shemin y colaboradores, determinaron que la formación de ALA se produce por la condensación de glicina y succinil CoA en la reacción catalizada por la enzima δ -aminolevulinato sintetasa (succinil CoA: glicina C-succinil transferasa (EC 2.3.1.37) (Jordan y Shemin, 1972). Se tratará en detalle la acción de esta enzima en el capítulo 3 de la Introducción. Como se ilustra en la Figura I.2, las enzimas involucradas en la síntesis del hemo se encuentran distribuidas en distintos compartimentos en las células eucarióticas.

La δ -aminolevulinato sintetasa es una enzima de matriz mitocondrial, aunque puede estar débilmente unida a la membrana interna. El ALA producido en la matriz se desplaza al citoplasma donde la ALA dehidrasa, una enzima que requiere zinc para su acción, cataliza a partir de dos moléculas de ALA, la formación de porfirinógeno.



compuesto uroporfirinógeno I, pero éste y los metabolitos que derivan de él carecen de actividad biológica y se acumulan en ciertas condiciones patológicas.

El paso siguiente consiste en sucesivas decarboxilaciones de los restos acéticos a grupos metilos de las cadenas laterales, llevadas a cabo por la uroporfirinógeno decarboxilasa (uro-D). De esta manera se obtienen los intermediarios con siete, seis, cinco y finalmente con cuatro grupos carboxilos en el coproporfirinógeno III (coprogen) (San Martín de Viale and Grinstein, 1968).

El coprogen ingresa a la mitocondria donde, en el espacio intermembrana, sufre la decarboxilación de dos de las cuatro cadenas laterales de propionato a grupos vinilo en las posiciones 2 y 4 del anillo pirrólico. Esta reacción es catalizada por la coproporfirinógeno oxidasa, requiere oxígeno y da como producto protoporfirinógeno IX (protopogen IX) (Elder and Evans, 1978).

El protoporfirinógeno IX se oxida a protoporfirina IX por la protoporfirinógeno oxidasa, una enzima unida a la membrana interna de la mitocondria que requiere oxígeno para su acción (Deybach et al., 1985). Estos mismos autores determinaron que el sustrato posee acceso a la enzima por ambas caras de la membrana interna mitocondrial, de manera que no está claro en que compartimento mitocondrial se desarrolla la reacción. Se especula que la enzima acompañaría el proceso de transporte de los precursores de hemo a través de la membrana.

El último paso en la formación de hemo es la inserción de un átomo de hierro en la protoporfirina, esta reacción sucede en la matriz mitocondrial y es catalizada por la ferroquelatasa, enzima de la membrana interna (Ferreira, 1995).

En total se requieren ocho moléculas de ALA, para ensamblar una de hemo.

El proceso de transporte de hemo y de los precursores que lo forman, a través de los compartimentos celulares, requiere posiblemente de proteínas transportadoras. Se ha propuesto que los intermediarios de la biosíntesis del hemo entrarían y saldrían de la mitocondria a través de un canal voltaje dependiente de la membrana externa mitocondrial (Verma et al., 1987). Por otro lado, el hemo posee baja solubilidad en soluciones acuosas y es probable que se encuentre asociado a proteínas que le ayuden a dispersarse en la célula. Existen dos posibles grupos de moléculas candidatas para cumplir con dicha función, las proteínas asociadas a ácidos grasos, y las glutathion

sulfotransferasas. Las primeras son una familia de proteínas tejido específicas que unen moléculas anfipáticas, entre ellas el hemo, constituyendo el 3% de las proteínas del hígado (Bass, 1988). Las últimas son un grupo de enzimas involucradas en la detoxificación de xenobióticos, y tienen capacidad de unirse a compuestos hidrofóbicos y anfipáticos sin metabolizarlos (Boyer, 1989).

B.2 Degradación

Las hemoproteínas requieren para su degradación de enzimas proteolíticas que liberen el grupo hemo de la parte proteica para luego entrar en la etapa de degradación.

La secuencia catabólica de la degradación del hemo se inicia con la acción de la enzima microsomal hemoxigenasa que requiere NADPH y oxígeno para realizar la ruptura oxidativa de los puentes α -metileno que unen los cuatro anillos pirrólicos, resultando en la formación del tetrapirrol lineal biliverdina-LX α , y liberación de dióxido de carbono y Fe³⁺ (Tenhunen, 1976). En rata, el bazo es donde se encuentra la mayor actividad de hemoxigenasa, siguiendo en orden decreciente, médula, hígado, cerebro y riñón.

La secuencia de degradación del hemo se esquematiza en la Figura I.3. En este paso de degradación participa no sólo la enzima hemoxigenasa sino también el sistema de NADPH-citocromo P-450 reductasa, componente del transporte de electrones microsomal.

La hemoxigenasa posee un peso molecular de 32 000, une hemo en una relación 1:1 y lo degrada a través de una serie de oxidaciones autocatalíticas (Kikuchi y Yoshida, 1983). Esta enzima puede ser inducida por hemo y por sustancias no hémicas como insulina, epinefrina y endotoxinas, este efecto estaría mediado por un aumento de la síntesis de su mRNA. El compuesto zinc mesoporfirina es un potente inhibidor de la hemoxigenasa (Cable et al., 1996).

En aves, reptiles y anfibios, la biliverdina es el producto final de la degradación de hemo y es excretada. Sin embargo en mamíferos este compuesto es reducido a bilirrubina IX α por la enzima citoplasmática biliverdina reductasa. Esta enzima ha sido purificada de hígado de rata, presentando un peso molecular de 35.000. En hígado, aproximadamente el 25% de la bilirrubina producida diariamente, proviene de la

degradación de hemoproteínas hepáticas, principalmente citocromos P-450 microsomales, un 15% correspondería a la eliminación de hemo derivado de la eliminación de glóbulos rojos, o hemólisis intravascular. La bilirrubina es una sustancia insoluble y altamente tóxica, por ello, en el organismo, se conjuga con ácido glucurónico para formar un compuesto mas soluble que puede ser excretado fácilmente (Smith, 1981).

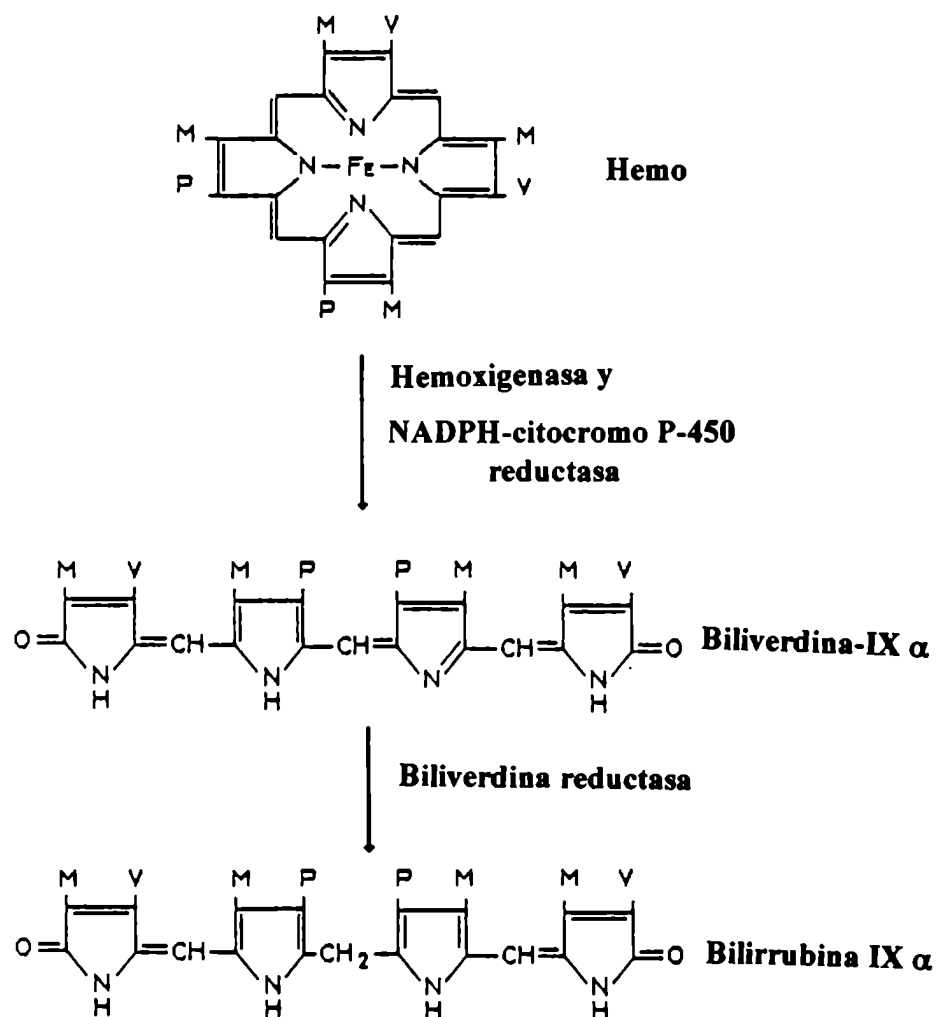


Figura I.3: Degradación del hemo.

C) CITOCROMOS P-450

Las hemoproteínas citocromo P-450 (CYP), abundantes en el retículo endoplasmático de hepatocitos, juegan un rol importante en el metabolismo de compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos, ácidos biliares, prostaglandinas, leucotrienos; y de numerosos compuestos químicos exógenos incluyendo compuestos estimulantes del sistema nervioso central y procarcinógenos. Estas moléculas son convertidas en formas más solubles y de esta manera pueden ser eliminadas del organismo.

Los citocromos P-450 constituyen una superfamilia donde cada uno posee actividad sobre un sustrato específico. Se han descrito 36 familias, que a su vez incluyen numerosas subfamilias, de acuerdo a la similitud de sus secuencias aminoacídicas (Nelson et al., 1993). La representación abreviada para cada gen de citocromo es *CYP* seguido de un número arábigo que indica la familia, una letra indicando la subfamilia y nuevamente un número especificando cada citocromo en particular.

Dado que los citocromos son las más importantes hemoproteínas en el hígado, la inhibición de la síntesis de hemo puede interferir con la biogénesis de CYP funcional (De Matteis and Marks, 1996). Por ejemplo, en pacientes que poseen alguna alteración en la producción de hemo se ha visto que tienen capacidad reducida de metabolizar compuestos antipirénicos (Mustajoki et al., 1992). Los mecanismos por los cuales la baja producción de hemo altera los niveles de CYP no se conocen totalmente. Meyer y colaboradores postulan dos hipótesis para explicar este fenómeno (Jover et al, 1996). Una de ellas argumenta que un deficiente suministro de hemo conduciría a la incompleta saturación de la apoproteína CYP. Bajo condiciones normales, la producción de hemo no es limitante, ya que cuando los niveles de hemo disminuyen, por un mecanismo de retroalimentación negativo se estimula su síntesis. Pero el bloqueo de la síntesis de hemo llevaría a una formación deficiente de CYP. En la segunda alternativa se postula que una disminución en la actividad de CYP, podría deberse a una disminución en su síntesis. En este caso el hemo actuaría a través de mecanismos a nivel de la transcripción, traducción o transporte de CYP. Hasta el momento, ninguna de estas posibilidades se ha descartado.

Por otro lado se ha determinado que la expresión de los citocromos puede ser constitutiva o inducida por diversos compuestos. Es muy interesante conocer el mecanismo por el cual muchos compuestos químicos inducen determinados citocromos. En rata luego de la administración de fenobarbital se ha observado, mediante experimentos de transcripción “run-on”, un incremento en la síntesis de los mRNA de los *CYP2*, *CYP2B1* y *CYP2B2* (Waxman and Azaroff, 1992). También se inducen por fenobarbital *CYP2C1*, *CYP2C2* y *CYP2C4* en conejo y *CYP2H1* en pollo (Hahn et al., 1991). Estos citocromos también son inducidos por otros compuestos sin aparente similitud estructural con el fenobarbital, como el 2-alil-2-isopropilacetamida (AIA), 3,5-dietilcarbonil-11,4-dihidrocolidina y glutetimida. No se han encontrado evidencias de la existencia de un receptor para el barbitúrico, como es el caso para otros inductores de *CYP*. Sin embargo la naturaleza lipofílica del fenobarbital, llevaría a pensar en la existencia de un receptor intracelular, tal vez análogo a los usados por las hormonas esteroides. Este es el caso de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) cuya administración en ratas y ratones induce la familia de los *CYP1* (Fisher et al., 1990), mediante la unión del TCDD a un receptor citosólico que se trasloca al núcleo e interacciona con secuencias de DNA específicas ubicadas 5’ “upstream” de los genes inducibles. El mecanismo por el cual el fenobarbital induce determinados genes no se ha esclarecido totalmente. May y colaboradores describen que la regulación por fenobarbital de *CYP2H1* en embriones de pollo, opera por mecanismos a nivel transcripcional (Hahn et al., 1991). Por otro lado se observó que la incubación con cicloheximida y otros inhibidores de la síntesis proteica, produce una superinducción de la transcripción de los mRNA de *CYP2H1/2*, sin alterar sus vidas media, por lo tanto en este mecanismo estaría involucrado un represor de rápida degradación (Hamilton et al., 1992; Dogra et al., 1993). Recientemente el grupo de Anderson ha reportado resultados de transfección transiente de células hepáticas con distintas construcciones conteniendo el promotor de *CYPB2* de rata, y ensayos *in vitro* de DNAsa “footprinting” de dichas zonas, y han definido una región necesaria para conferir máxima respuesta a fenobarbital. Dicha secuencia contiene un sitio de unión del factor NF1 (nuclear factor 1), un elemento de respuesta a glucocorticoides, y un medio sitio de unión de receptores nucleares (Stoltz et al., 1998). De esta manera han definido esta zona como unidad de

respuesta a fenobarbital (PBRU) constituida por un enhancer de múltiples componentes donde se unirían varios factores de transcripción.

Trabajos del grupo de Padmanaban también muestran que el agregado de fenobarbital en experimentos con núcleos aislados aumenta marcadamente la transcripción de *CYP2B1/B2* y se ve incrementada la unión de proteínas del extracto nuclear a secuencias 5' "upstream" (Upadhyay et al., 1992). Estos efectos son bloqueados cuando los niveles de hemo son deficientes, y pueden reconstituirse por el agregado de hemina exógena. Padmanaban concluye que el pool de hemo nuclear regula la transcripción de dichos *CYP* modulando la interacción de factores de transcripción que estarían involucrados en la activación por fenobarbital.

Integrando todas estas observaciones, se ha postulado un modelo en el cual, un pool de hemo regulatorio actuaría modulando positivamente la transcripción de *CYP* inducida por fenobarbital (Venkateswar et al., 1991). Sin embargo existen otros reportes que no apoyan esta idea (Mackie et al., 1991; Hamilton et al., 1988).

También se ha observado recientemente que sería necesaria la participación de serin/treoninquinazas específicas para obtener la inducción génica de *CYP2B10* de ratón mediada por fenobarbital (Honkakoski and Negishi, 1998).

D) LAS PORFIRIAS

D.1 Generalidades

Las porfirias son un grupo de enfermedades metabólicas, cada una asociada con un defecto parcial en alguna de las enzimas que catalizan la biosíntesis del hemo. Como consecuencia de esto, cada porfirinopatía muestra anormalidades metabólicas específicas en la producción de precursores de hemo. Estos defectos en general son compensados por un incremento en la concentración intracelular del sustrato de la enzima defectiva, para permitir que se restaure la velocidad normal de síntesis de hemo. La sobreacumulación de porfirinas y sus precursores se evidencian por análisis clínicos en sangre, orina y heces de los individuos afectados.

En la Tabla I.1 se resumen los distintos tipos de porfirias indicando el paso metabólico de la síntesis de hemo que se encuentra alterado (Batlle, 1993).

Las porfirias denominadas agudas poseen la característica de presentar ataques agudos desencadenados por diversos factores, entre ellos la administración de medicamentos que afectan el sistema nervioso, el alcohol, el tabaco (Moore, 1993). Estos ataques son también desatados por cambios en los niveles de esteroides, como los que ocurren durante el pasaje a la pubertad o durante el período menstrual.

Las porfirias no agudas es un grupo más heterogéneo y aunque poseen un componente hereditario es generalmente adquirida a través de la exposición a compuestos desencadenantes como los tóxicos químicos 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina y hexaclorobenceno (Moore, 1993; Wainstok et al. 1984; Billi de Catabbi et al., 1997).

Desórden	Enzima afectada
Hepáticas	
Porfiria aguda intermitente	Porfirinógeno deaminasa
Coproporfiria hereditaria	Coproporfirinógeno oxidasa
Porfiria Variegata	Protoporfirinógeno oxidasa
Porfiria cutánea tarda	Uroporfirinógeno decarboxilasa
Eritropoyéticas	
Porfiria congénita	Uroporfirinógeno III sintetasa
Protoporfiria eritropoyética	Ferroquelatasa

Tabla I.1: Clasificación de las porfirias

Ninguno de los distintos tipos de porfiria conocido presenta una alteración en la enzima ALA-S. Probablemente alteraciones serias a este nivel, resultarían letales, dado que esta enzima es la que controla principalmente el camino, y el hemo es esencial para

la síntesis de las proteínas respiratorias. Sin embargo, se ha observado una deficiencia en la actividad de ALA-S en las anemias sideroblásticas hereditarias. Estas anemias son un grupo de enfermedades ligadas al cromosoma X (Elder, 1993). Pacientes que padecen esta enfermedad, responden favorablemente al tratamiento con piridoxina, cofactor de ALA-S (Bottomley, 1993). Se ha detectado en un paciente, una transición T-A en una región conservada del exón 4 del gen de ALA-S eritrocitaria, cercana a la zona que codifica para el dominio de unión a piridoxal. Esta mutación produce un cambio de isoleucina por asparragina (Cotter et al., 1992).

Los defectos enzimáticos en la mayoría de las porfirias son heredados de manera autosómica dominante. Sin embargo estas mutaciones se hacen evidentes con manifestaciones clínicas en una muy baja proporción.

Varias de las mutaciones autosómicas dominantes, han sido estudiadas en familias porfíricas. Por ejemplo, para el caso de la porfiria aguda intermitente (PAI), se observó en siete de diez pacientes no relacionados, una mutación que afecta el splicing del exón 1 durante el procesamiento del mRNA de la porfobilinógeno deaminasa. En otros casos se observaron mutaciones sin sentido en el exón 10 (Q198 stop), que provocarían la terminación temprana de la proteína, (Lee and Anvret, 1991), mutaciones en el exón 3 (R26H), que afectarían a la unión del cofactor (Llewellyn et al., 1993), entre otras. Para el caso de la protoporfiria eritropoyética (EPP), también se ha avanzado en el conocimiento de sus causas a nivel molecular. La EPP, se caracteriza por una severa fotosensibilidad y, en algunos pacientes, la acumulación de protoporfirina lleva a una disfunción hepática irreversible. Se han encontrado mutaciones puntuales en la ferroquelatasa, que provocan un splicing aberrante o sustituciones de aminoácidos que conducen a una actividad enzimática disminuida (Nakahashi et al., 1992; Sarkany et al., 1992).

Otras porfirias se transmiten con carácter recesivo, en estos casos, no se ha establecido fehacientemente la relación entre los fenotipos y las alteraciones genotípicas observadas, resultando en una amplia heterogeneidad entre los diversos casos (Nordmann et al., 1990).

D.2 Porfiria tóxica y experimental

En los últimos años se ha demostrado que una gran cantidad de sustancias producen porfiria en animales de laboratorio (Moore and Hift, 1997). En la Tabla I.2 se resume el efecto sobre el camino metabólico del hemo de un representante de cada grupo de diferentes drogas que mimetizan estados porfíricos.

Estas sustancias tienen la propiedad comun de inducir la actividad de ALA-S hepática. El hecho de que compuestos de tan diversas estructuras ejerzan efectos sobre la misma enzima se explica si se considera que todos ellos producen una disminución del hemo intracelular. La griseofulvina (GSF) y el hexaclorobenceno (HCB), inhibiendo su formación, la alilisopropilacetamida (AIA) y el 3,5-dietoxicarbonil-1,6-dihidrocolidina (DDC) aumentando su degradación y el fenobarbital, aumentando su consumo. La característica entonces de estas drogas de aumentar la actividad de ALA-S y mimetizar el estado porfírico, ha sido ampliamente usada para el estudio experimental de estas patologías en laboratorio.

DROGA	ACCIÓN BIOQUÍMICA	ACUMULACIÓN Y EXCRECIÓN	PORFIRIA
AIA	Aumenta degradación de hemoproteínas	ALA, PBG y porfirinas en hígado y orina	Porfiria hepática aguda
DDC	Inhibe ferroquelatasa. Aumenta degradación hemoproteínas	Protoporfirina en hígado y heces.	Variegata
GSF	Inhibe ferroquelatasa	Copro y protoporfirina hígado y heces. ALA y PBG en orina	Protoporfiria
HCB	Inhibe URO-D	Porfirinas de 4 a 8 carboxilos, hígado, orina y heces	Porfiria cutánea tarda

Tabla I.2: Acción de drogas porfirinogénicas

En el presente trabajo hemos utilizado como modelo experimental hepatocitos de ratas y células de la línea HepG2, y como droga porfirinogénica hemos elegido al fenobarbital.

D.3 Porfirias y diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad caracterizada por estar alterada en el organismo la capacidad de utilizar hidratos de carbono y está afectada por factores genéticos y ambientales, los cuales se influyen mutuamente produciendo trastornos complejos y de múltiple variabilidad. Estos trastornos se han agrupado en dos síndromes principales conocidos como diabetes tipo I, insulina dependiente (IDDM) y diabetes tipo II insulina independiente (NIDDM).

En la fase inicial de la diabetes de tipo I llamada insulinitis, las células T y otros leucocitos se infiltran en los islotes pancreáticos y destruyen las células β productoras de insulina, llevando a una pérdida de la regulación homeostática de la glucosa y el desarrollo de la diabetes (Tisch and McDevitt, 1996). La etiología y la patogénesis de la enfermedad es muy compleja, desconociéndose aún los mecanismos que llevan a la ruptura de los sistemas de inmunoregulación y autotolerancia en los pacientes diabéticos. Esta enfermedad presenta un fuerte componente genético, aunque no se han determinado con certeza los genes responsables, a excepción del complejo mayor de histocompatibilidad, cuyos genes de clase II presentan un factor dominante sobre la susceptibilidad a la IDDM (González et al., 1997). Se han reportado otros 15-20 loci implicados en la sensibilidad a esta enfermedad, además de la presencia de polimorfismo en un minisatélite cercano al gen de la insulina. El análisis de algunos de estos loci se está llevando a cabo (Podolin et al., 1997), aunque hasta ahora la implicancia individual de la mayoría de estos loci presenta un limitado impacto sobre la enfermedad y la integración conjunta de todos los componentes genéticos es extremadamente difícil.

La diabetes de tipo II es la enfermedad metabólica más frecuente, asociada a distintas características como la obesidad, hipertensión, hiperlipidemia y puede llevar a complicaciones a largo plazo como aterosclerosis y problemas cardiovasculares, además de las consecuencias propias de la diabetes como son la retinopatía, nefropatía y

neuropatía. Patofisiológicamente los pacientes con NIDDM exhiben dos defectos principales: una disminución de la respuesta a insulina por los tejidos periféricos (resistencia a insulina) e incapacidad de las células β pancreáticas de compensar dicha resistencia con la producción de mayores niveles de insulina. Es altamente probable que ambos defectos posean una causa genética dado que ambos muestran una distribución familiar característica (Martin et al., 1993), aunque la presencia de factores ambientales condicionan fuertemente la incidencia de la enfermedad en poblaciones genéticamente similares, y también la habilidad de determinados cambios como el embarazo, el stress quirúrgico, la presencia de esteroides, etc. Los componentes genéticos de la enfermedad son muy complejos y heterogéneos, sin embargo se han indentificado los genes de algunos tipos de NIDDM monogénicas, como por ejemplo los genes de glucoquinasa, transportador de glucosa Glut2, receptor a glucagon, receptor a insulina, canal de K^+ , ATP sensible, sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1), gucógeno sintetasa, etc. (Kahn et al., 1996).

Desde los trabajos de Sterling en 1949, varios autores han puntualizado la relativa frecuencia de coexistencia entre diabetes mellitus y algún tipo de porfiria hepática, sobre todo la aguda intermitente y la cutánea tarda. Ambas enfermedades tienen en común que se producen por un trastorno metabólico e interviene en sus etiologías un fuerte factor hereditario.

Los datos aportados en la literatura en cuanto al porcentaje de asociación de ambas enfermedades varían según las poblaciones estudiadas entre un 2 y un 25% de diabéticos que contraen porfiria (Goerz and Korda, 1977). Estas observaciones plantean el interrogante si la precipitación de porfiria en pacientes diabéticos es debida a la acción de factores endógenos o exógenos que facilitan la expresión de defectos genéticos en el camino metabólico del hemo.

La diabetes mellitus experimental puede ser producida por la administración de sustancias tales como la estreptozotocina que exhibe una toxicidad selectiva para las células β del páncreas (Kim and Steinberg, 1984).

Capítulo 2: Regulación de la transcripción

A) TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES POR FOSFORILACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

La regulación transcripcional de los genes eucarióticos en respuesta a las señales extracelulares depende del ensamblado sincronizado de complejos proteicos sobre los promotores y secuencias de activación o silenciamiento.

Los componentes principales de este proceso son los factores de transcripción con secuencias específicas de reconocimiento en el DNA (elementos) que “seleccionan” los genes a ser activados y promueven el ensamblado de la maquinaria de síntesis del RNA por la RNA polimerasa II. La especificidad de la unión estaría dada principalmente por el elemento del DNA y una vez unido se activarían los genes cercanos. Ejemplo de esto es el activador de levaduras Gal4 que ordinariamente activa genes requeridos para el metabolismo de la galactosa pero que es capaz de activar un gen en células de mamífero al cual se le han introducido cerca, las secuencias de unión de dicho factor (Ptashne, 1997).

Uno de los aspectos principales es entender como un número relativamente pequeño de factores de transcripción es capaz de regular la compleja trama de expresión génica dada por la interacción redundante de múltiples mediadores (Chang and Jaehning, 1997).

Estas proteínas presentan en general componentes modulares: un dominio de unión al DNA, uno de multimerización que permite la formación de homo o heterodímeros y un dominio de transactivación/transrepresión. Por otro lado los “enhancers” y “silencers” presentan sitios de unión para distintos factores de transcripción, y variaciones en el arreglo de estos sitios determinan la formación de complejos entre distintas familias de factores, presentando una arquitectura de unión al DNA particular. Activadores y represores pueden unirse en distintas combinaciones modificando el programa de expresión génica, lo cual ha provocado una evolución rápida en los sistemas de regulación (Ptashne and Gann, 1997). Además estos factores pueden interaccionar

cooperativa o sinérgicamente, lo que asegura la existencia de múltiples puntos de control y un alto nivel de expresión génica (Tjian and Maniatis, 1994).

El sistema de regulación de la expresión es aún mucho más complejo, evidencias recientes indican que los promotores específicamente pueden influenciar el destino postranscripcional de los transcritos sugiriendo una conexión entre los complejos ensamblados en el DNA y los eventos posteriores a la transcripción (Ladomery, 1997). Cada vez son más abundantes los ejemplos de proteínas involucradas a la vez en las distintas etapas de la expresión génica; por ejemplo se ha evidenciado que la subunidad mayor de la RNA polimerasa II posee un dominio C-terminal que se une directamente a factores esenciales para el procesamiento del RNA sólo cuando está hiperfosforilado (Neugebauer and Roth, 1997).

De los procesos que regulan la actividad de los distintos factores involucrados en la transcripción, el evento de fosforilación es la modificación postraducciona l más frecuente y conocida, originando una rápida modulación en respuesta a cambios en la actividad metabólica, señales hormonales, etc. La fosforilación puede modificar positiva o negativamene la actividad de unión al DNA, la función transcripcional o la localización subcelular de los factores. Se conocen detalladamente varios sistemas de respuesta a estímulos extracelulares mediados por eventos de fosforilación: CREB (camino de respuesta a cAMP), TCF/Elk-1 (regulación del gen c-fos), c-Jun, participando en todos éstos serin-treoninquinasa s y la familia STAT regulados por tirosinquinasa s (sistema de interferones) (Karin, 1994).

B) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR cAMP

B.1 La cascada de la transducción de señales por cAMP

Los niveles intracelulares de cAMP son regulados en primera instancia por la adenilil ciclasa. Esta enzima es a su vez modulada por distintos estímulos extracelulares mediados por receptores que interaccionan con proteínas G acopladas de la membrana plasmática. La unión de un ligando específico a su receptor resulta en la activación del camino dependiente de cAMP.

Los receptores que se acoplan a proteínas G poseen siete regiones α -hélice hidrofóbicas correspondientes a siete dominios transmembrana. La variabilidad de estas hélices en la región extracitoplasmática es responsable de la diferencia funcional de los mismos con respecto a la especificidad de ligando. Son importantes también el dominio de acoplamiento con la proteína G y el dominio que media la desensibilización del receptor (Gudermann et al., 1997).

Las proteínas G están ubicadas topológicamente y funcionalmente entre el receptor y el efector y son heterotrímeros compuestos por las subunidades α , β y γ . Las subunidades β y γ se encuentran formando un complejo y pueden unirse a distintas subunidades α que es la que define la identidad de la proteína G (Birnbaumer and Birnbaumer, 1995). La subunidad α presenta un sitio de unión a nucleótidos de guanina. La forma α -GDP se une fuertemente al complejo $\beta\gamma$ y es inactiva, mientras que la forma α -GTP se disocia de dicho complejo y actúa como activadora de la adenilil ciclasa. La subunidad α también presenta actividad de GTPasa intrínseca, hidrolizando el GTP unido y liberando GDP y fosfato libre (Clapham and Neer, 1993; Coleman et al., 1994).

En ausencia de ligando el receptor interactúa directamente con el heterotrímero G. En presencia de ligando se forma el complejo hormona-receptor que promueve la disociación del GDP de la subunidad α que puede activar a la adenilil ciclasa, y permite la unión de GTP. Además disminuye la afinidad del receptor por el ligando y se induce la actividad GTPasa de la subunidad α con lo cual se frenaría el ciclo de inducción.

La adenilil ciclasa es una glicoproteína de un solo péptido que presenta 12 dominios transmembrana. La interacción con la subunidad α provoca un aumento en su actividad enzimática convirtiendo ATP en cAMP.

El cAMP formado interactúa con la quinasa dependiente de cAMP o PKA, tetrámero formado por dos subunidades regulatorias (R) y dos catalíticas (C). La activación de la PKA es mediada por la unión de alta afinidad del cAMP a las subunidades R, esto promueve la disociación del complejo en un dímero $R_2(cAMP)_4$ y dos subunidades C que poseen la actividad quinasa. La afinidad entre las subunidades R y C disminuye en 4-5 órdenes de magnitud en respuesta a la unión del cAMP (Taylor and Radzio-Andzelm, 1994).

La especificidad de la PKA fue estudiada por mapeo *in vivo* de los sitios de fosforilación y luego se utilizaron péptidos análogos sintéticos a dichos sitios. De esta manera se dedujo que posee preferencia por sitios precedidos por residuos básicos. Dos secuencias consenso generales son Arg-Arg-X-Ser/Treo-Y o Arg-X-Arg-X-X-Ser/Treo-Y donde X puede ser cualquier aminoácido e Y representa un residuo hidrofóbico (Walsh et al., 1992).

Se han descripto cuatro genes para la subunidad R que constituyen dos familias generales, tipo I y tipo II. Las subunidades R_I ($R_{I\alpha}$ y $R_{I\beta}$) no son autofosforilables y requieren la unión del ATP con alta afinidad para formar la holoenzima, mientras que las R_{II} ($R_{II\alpha}$ y $R_{II\beta}$) pueden autofosforilarse. La estructura proteica está constituida en su extremo C-terminal por dos dominios de unión al cAMP. Además presenta un segmento de interacción con la subunidad catalítica que se asemeja al sustrato de la proteína, de esta manera impide competitivamente la unión de los sustratos e inhibe la actividad quinasa de la subunidad catalítica. (Buechler et al., 1993). La porción N-terminal presenta el dominio de dimerización entre subunidades R, importante además para determinar la localización citoplasmática de la proteína. Se han identificado proteínas que “anclan” a la PKA en sitios citoplasmáticos específicos, denominadas AKAPs (A-kinase anchoring proteins). En neuronas, por ejemplo, la PKA se encuentra localizada en la región postsináptica asociada por la subunidad R a la AKAP79 la cual también interacciona con la fosfatasa 2B y la calcineurina (Faux and Scott, 1996).

La localización es importante para la función quinasa. La PKA es citoplasmática, pero cuando la holoenzima es activada, las subunidades C liberadas no solo fosforilan sustratos citoplasmáticos, sino que migran al núcleo donde fosforilan a un grupo de factores de transcripción que modulan la expresión de genes inducibles por cAMP. De esta manera la subunidad R no sólo sirve de inhibidora de la actividad catalítica de la enzima sino que también previene la entrada de la subunidad C al núcleo (Gibbs et al., 1992).

Se conocen tres genes que codifican para la subunidad C en mamíferos. La forma $C\alpha$ es la mayoritaria y se expresa en casi todos los tejidos, la $C\beta$ es tejido específica presentando niveles altos en tejido neuronal y la $C\gamma$ se encontró en testículos. Las tres formas son muy conservadas entre sí y en todos los vertebrados (Uhler et al., 1986;

Taylor et al., 1993). La estructura de la subunidad C consiste en un núcleo catalítico, que se extiende entre los residuos 40 al 300, formado por el dominio de unión al ATP o lóbulo pequeño principalmente de conformación β , y el dominio de unión a sustrato y de actividad quinasa o lóbulo mayor de α -hélices. El extremo amino terminal contiene un sitio de miristilación y es el menos conservado entre distintas especies (Olah et al., 1993).

Todas las evidencias cinéticas son consistentes con un mecanismo de catálisis ordenado, la unión del ATP precede a la interacción con el péptido y luego se realiza la transferencia del fosfato γ del ATP al péptido. Dado que la reacción química y la liberación del fosfopéptido son procesos rápidos, pareciera que la liberación del ADP es el paso limitante en la reacción de fosfotransferencia (Adams and Taylor, 1992).

Al igual que en todas las quinasas es necesario que la enzima sea secuestrada en un estado inactivo en ausencia de la señal. Existen dos clases de moléculas capaces de inhibir la subunidad catalítica, una es la subunidad R según se discutió anteriormente, y la otra es un grupo de proteínas pequeñas (PKIs) que se unen fuertemente a la subunidad C y la inhiben por un mecanismo similar al ejercido por la subunidad R (Van Patten et al., 1991; Scarpetta and Uhler, 1993).

B.2 Blancos nucleares del camino del cAMP

En el núcleo, el estado de fosforilación de algunos factores de transcripción y proteínas relacionadas modula la expresión de genes inducibles por cAMP. El análisis de las secuencias promotoras de estos genes permitió la identificación de elementos que median la respuesta a un incremento de cAMP. La secuencia mejor caracterizada es el elemento de respuesta a cAMP o CRE constituido por un palíndromo de 8 pb TGACGTCA (Della Fazia et al., 1997). La habilidad de la secuencia CRE de mediar la respuesta a cAMP es dependiente del promotor. Cuando se inserta cercana a la secuencia TATA de hsp70 o EIIa es muy activa, en cambio no lo es cuando se ubica próxima a una TATA de SV40 (Taylor and Kingston, 1990). Tampoco responde a cAMP una secuencia similar a CRE presente en el motivo X asociado a los genes del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (Liouet al., 1988). En otro caso una secuencia “enhancer” de 21 pb ubicada en la repetición terminal de HTLV-I contiene

secuencias CRE que son activadas en este contexto por la proteína viral tax (Wagner and Green, 1993).

Otro elemento regulatorio es el sitio de unión del factor activador de la transcripción (ATF), presente en los promotores tempranos de adenovirus, que media la activación transcripcional realizada por la proteína oncogénica E1A (Sassone-Corsi, 1995). En la Tabla I.3 se muestran las secuencias CRE y de unión a ATF presentes en diversos promotores, para la mayoría de estos casos se ha demostrado la inducibilidad por cAMP (Foulkes and Sassone-Corsi, 1996). Como se observa, la secuencia 5' (TGACG) es más conservada que la secuencia 3' (TCA). Otra característica del elemento CRE es su gran parecido a la secuencia consenso de respuesta al éster de forbol TPA (TRE) que es TGA^G/cTCA, esta secuencia es el sitio de unión de las oncoproteínas Fos y Jun (Borelli et al., 1992).

Promotor	Secuencia	Ubicación
Somatostatina	TGACGTCA	-48/-41
<i>c-fos</i>	TGACGTTT	-66/-59
	TGACGCAG	-297/-290
Proencefalina	TGACGCAG	-86/-93
Tirosina hidroxilasa	TGACGTCA	-39/-46
Fibronectina	TGACGTCA	-173/-166
PEPCK	TTACGTCA	-83/-90
VIP	TGACGTCT	-70/-77
Hormona paratiroide	TGACGTCA	-68
Gonadotrofina α -coriónica	TGACGTCA	-117/-124 y -135/-142
<i>c-jun</i>	TGACATCA	-71/-64
<i>jun-D</i>	TGAGCTCA	-53/-46
GHF-1	TGACGTCA	-200/-193
	GTACGTCA	-157/-150
<i>Krox-20</i>	CGACGTCA	+248/+255
T α -1	TGACGTCA	TCR A enhancer 3'
LDH-A	TGACGTCA	-48/-41
A α (MHC II)	TGACGTCA	elemento "X-box"
IL-6	TGACGTCC	-158/-165
Tirosina aminotransferasa	CTGCGTCA	-3651/-3644
TPA	TGACATCA	-114/-107
Receptor adrenérgico β_2	GTACGTCA	-57/-50
HTLV-I LTR	TGACGACA	-97/-90
	TGACGTGT	-196/-189

HTLVV-II LTR	TGACGTCT	-2445/-238
	TGACGATT	-83/-76
	TGACGTCC	-176/-169
	TGACGTCT	-216/-209
BLV LTR	TGACGGCA	-125/-118
	TGACGTCT	-153/-160
	TGACGTAG	-74/-67
E2A	TGACGAAA	-55/-62
E3	TGACGTAA	-44/-51
E4	TGACGATT	-144/-137
	TGACGTAA	-168/-161
	TGACGTAG	-234/-227
	TGACGTGG	-266/-259

Tabla I.3: Secuencias CRE y de unión a ATF. (Foulkes and Sassone-Corsi, 1996)

B.3 Factores de transcripción de respuesta a cAMP.

Los primeros experimentos de retardo de la movilidad en gel (EMSA) y “DNAsa footprinting” utilizando un oligonucleótido conteniendo el elemento CRE y extractos nucleares crudos de distintos tipos celulares, revelaron la unión de tres proteínas predominantes, que luego se caracterizaron siendo de 43, 68 y 120 KDa. Luego, se logró purificar una proteína con actividad de unión a CRE (CREB) de 43 KDa por cromatografía de afinidad utilizando la secuencia CRE, y se evaluó su actividad en experimentos de transcripción *in vitro*, donde se vió que estimulaba la expresión de un fragmento de DNA conteniendo el promotor de somatostatina (Montminy and Bilezikjian, 1987).

Posteriormente, rastreando varias bibliotecas de expresión con una sonda conteniendo a CRE o al sitio de unión de ATF, se purificaron al menos otras diez proteínas de unión a estos sitios (Foulkes and Sassone-Corsi, 1996), observándose que presentan características en común:

a) Todas comparten una región de dimerización/unión al DNA del tipo bZip, compuesta por una estructura α -hélice enrollada necesaria para la dimerización, y un dominio adyacente básico conteniendo aproximadamente el 50% de los residuos arginina o lisina necesario para el contacto directo con el DNA. El número de leucinas

en la zona “zipper” de siete repeticiones, varía de 4 a 6 y en algunos factores la leucina del extremo C-terminal de esta estructura puede ser sustituida por histidina.

b) Fuera de la región bZip la homología entre estas proteínas es muy baja, sin embargo se pueden clasificar en subfamilias por ejemplo CREB/CREM (moduladores de unión a CRE), CRE-BP1, etc. (Foulkes et al 1992).

c) Los distintos factores son capaces de formar heterodímeros con otros miembros de la superfamilia pero bajo ciertas restricciones. Existe un “código de dimerización” dependiente de la estructura bZip de cada uno. Por ejemplo ATF1 puede dimerizarse con CREB pero no con CREBP1 o ATF3 (Hoeffler et al., 1991). Se ha demostrado también que algunos miembros son capaces de formar heterodímeros con Fos y Jun. Mientras que el complejo Fos/Jun presenta una afinidad elevada por los elementos TRE (elemento que responde a TPA), los heterodímeros entre Jun y ATF3, ATF4 y CREBP1 poseen mayor afinidad por el elemento CRE (Hai and Curran, 1991). La posibilidad que los factores puedan formar parejas diferentes aumenta la versatilidad de la respuesta transcripcional frente a un estímulo.

d) Es frecuente hallar “splicing” alternativo en los factores bZip de unión a CRE. Se ha descrito una familia de isoformas de mRNA de CREB formadas por este mecanismo, aunque su función fisiológica no se conoce en su totalidad (Meyer and Habener, 1993). En el caso de CREM, se genera una gran familia de transcritos entre los cuales está CREM τ un potente activador de estructura similar a CREB y cuya expresión es regulada durante la diferenciación de las células germinales masculinas (Foulkes and Sassone-Corsi, 1996).

e) Estos factores bZip tienen capacidad de activar o reprimir la transcripción. De esta manera mientras CREB, CREM τ y ATF1 median la activación, las isoformas CREM α , β y γ , y las proteínas ICER están involucradas en la represión génica como se discutirá más adelante (Molina et al., 1993).

La señal generada por el cAMP puede ser transducida por otros factores de transcripción como el factor AP-2, una proteína de 52 kDa que se une como dímero a la secuencia 5' GCCNNNGGC 3' (Williams and Tjian, 1991), y el factor NF- κ B (Koh et al., 1997). El elemento de unión a AP-2 se distingue sin embargo del CRE por su

capacidad de mediar tanto la respuesta a cAMP como la inducción de la transcripción por ésteres de forbol (García et al., 1996).

También se ha reportado recientemente que el sitio consenso de unión del factor AP-1 5' TGA^G/cTCA 3' también llamado TRE (TPA response element), es capaz de mediar la respuesta transcripcional a cAMP en células de ratón L-M (Zhou et al., 1997).

El receptor huerfano de ligando HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4), juega un rol trascendente en la regulación de la expresión de genes hepáticos involucrados en los metabolismos de la glucosa, colesterol y ácidos grasos. Recientemente se ha demostrado que la unión de esta proteína a su sitio específico del DNA es pausable de regulación por fosforilación a través de la PKA (Viollet et al., 1997) que, como se discutirá luego, interviene en la mediación de la respuesta a cAMP.

B.4 Mecanismos de activación de genes que responden a cAMP.

Por análisis cuantitativo en extractos nucleares, se ha visto que CREB se expresa aproximadamente en 50.000 moléculas por célula y que la mayoría está unida a la cromatina (Hagiwara et al., 1993). Distintas evidencias han demostrado que se requiere la activación de la PKA para estimular la transcripción dependiente de cAMP. Por un lado la línea celular PC12 mutante deficiente en PKA no es capaz de estimular la expresión del gen reportero CAT (cloranfenicol acetiltransferasa) en transfecciones transientes (Montminy et al., 1986). Además la expresión de PKI, un potente inhibidor de PKA, suprime la respuesta a cAMP (Grove et al., 1987), y finalmente la microinyección en fibroblastos de la subunidad C de la PKA es suficiente para inducir a la construcción CRE-βgalactosidasa en ausencia de cAMP (Riabowol et al., 1988). Posteriormente por ensayos de fosforilación *in vitro* de CREB y posterior análisis de los fosfopéptidos, se demostró la presencia de un sitio consenso de fosforilación para PKA. Se determinó que en respuesta al estímulo máximo de cAMP, el 50% de la proteína celular CREB es fosforilada por la PKA en su serina 133 (Montminy, M, 1997). Por estudios de unión de CREB al DNA, se ha demostrado que el evento de fosforilación en la serina 133 no altera la afinidad de la proteína al sitio consenso CRE (Hagiwara et al., 1993). Por otro lado, la proteína de fusión GAL4 (dominio de unión al DNA) - CREB (dominio de transactivación) es inducible por PKA en ensayos de transfección transiente

(Hagiwara et al., 1992). Por lo tanto se puede concluir que la fosforilación de la serina 133 estimularía primariamente la transactivación de CREB y no su actividad de unión al DNA, aunque este punto es controvertido. En las células no estimuladas con cAMP casi no se detecta PKA en el núcleo, pero luego de la inducción, la subunidad C se trasloca pasivamente al núcleo dentro de los 15-20 minutos posteriores, coincidiendo con el pico de fosforilación de CREB. La entrada de la subunidad C al núcleo es el paso limitante en la transcripción dependiente de cAMP (Montminy, 1997).

La Figura I.4 muestra la estructura general de la familia CREB/ATF. La posición relativa de los distintos dominios funcionales está muy conservada. El dominio de transactivación consiste en dos regiones independientes (Lalli and Sassone-Corsi, 1994). La región de fosforilación (P-box) o dominio inducible por quinasas (KID) contiene la serina 133 en CREB y 117 en CREM y varios otros sitios de fosforilación para PKA, PKC, p34^{cdc2}, quinasa 3-glicógeno sintasa (GSK3) y quinasas de caseína I y II. Este dominio representa la convergencia de distintas señales, por ejemplo la serina 117 del CREM puede ser también fosforilada *in vitro* por PKC, Cam K (calmodulina quinasa) y p34^{cdc2}, siendo de relevancia también *in vivo* ya que tratamientos con forskolina, TPA o el ionóforo de Ca²⁺ A23187 conducen a la fosforilación de la ser 117 (de Groot et al., 1993). El sistema de activación por fosforilación es sumamente complejo y no ha sido aún descifrado totalmente. Se demostró que la quinasa p70 S6 (p70^{sk6}) fosforila y activa a CREM τ (de Groot et al., 1994), y que una quinasa de proteínas dependiente de Ras inducible por el factor de crecimiento neuronal (NGF) es capaz de fosforilar la serina 133 de CREB (Ginty et al, 1994). Estos resultados refuerzan la posibilidad que estos factores actúen como integradores de los caminos de transducción de distintas señales.

A pesar que la fosforilación en la serina 133 es indispensable para la activación de CREB, no es suficiente para su completa actividad. La región ácida ubicada a continuación es importante para su función, especialmente el aspártico de la posición 140 (González et al., 1991).

También son importantes las regiones ricas en glutamina Q1 y Q2, en particular ésta última. Dominios ricos en glutamina se han caracterizados en otros factores como AP-2 y Sp1 (Foulkes and Sassone-Corsi, 1996). Se cree que constituyen superficies por las cuales el factor puede establecer contactos con otras proteínas de la maquinaria

transcripcional. En particular parecería que la región Q2 estimula la transcripción por asociarse a un componente del factor TFIID llamado dTAF110. Dicha interacción fue detectada utilizando ensayos de afinidad con la proteína CREB retenida sobre una resina conteniendo el oligonucleótido CRE, y también en experimentos de doble híbrido. Al deleccionar esta región Q2, en experimentos *in vivo*, se observó una pérdida de la inducción ejercida por PKA, revelando la importancia de la formación del complejo Q2-TAF110 para la actividad de CREB (Ferrerri et al., 1994; Montminy, 1997).

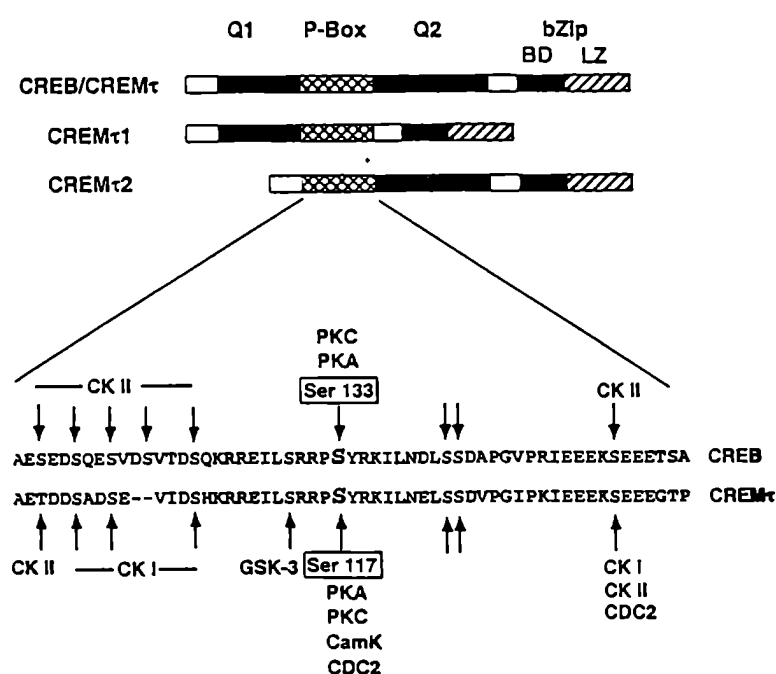


Figura I.4: Representación esquemática de la familia CREB. En la parte inferior se observa la secuencia aminoacídica de la región de fosforilación. Las flechas indican las serinas y treoninas que pueden ser fosforiladas por las quinazas indicadas, *in vivo* e *in vitro*. Las flechas no identificadas son probables sitios de fosforilación. (Foulkes and Sassone-Corsi, 1996).

Se pueden postular al menos dos mecanismos por los cuales la fosforilación de CREB altera su actividad: por modificación alostérica o por modificación del sitio activo. La observación de que la región de fosforilación y la región Q2 son capaces de actuar independientemente y que sinergizan la respuesta a PKA favorece la idea de que la región P se asociaría a otro componente de la maquinaria transcripcional luego de

fosforilarse la serina 133. Por experimentos de selección por afinidad, análisis de “far western blot” con una sonda marcada de CREB fosforilado en serina 133 y rastreo de una biblioteca de expresión con la misma sonda, se identificó una proteína de unión a CREB de 265 KDa (CBP) (Chrivia et al., 1993; Arias et al., 1994). CBP está muy emparentada a la proteína P300 de unión a E1A y cumplen funciones muy similares (Eckner et al., 1994; Arany et al., 1995). La interacción entre CBP y CREB es dependiente de la presencia de la serina 133 fosforilada y se ha demostrado que el coactivador CBP interactúa con muchos otros factores de transcripción, entre ellos con el TFIIB y la RNA polimerasa II (Janknecht and Hubter, 1996), facilitando así, por la interacción proteína-proteína, el acercamiento de la maquinaria de transcripción basal. La proteína CBP posee además actividad acetiltransferasa de histonas, relacionada directamente con la activación de la transcripción (Pennisi, 1997).

B.5 Mecanismos de represión de genes que responden a cAMP.

La fase de atenuación de la respuesta a cAMP se caracteriza por una disminución en la transcripción de los genes implicados entre 4 y 6 horas luego del estímulo. Se ha propuesto que el mecanismo que media la atenuación es la defosforilación de CREB por la fosfatasa 1 (PP-1) (Hagiwara, et al., 1992), sin embargo otros investigadores han demostrado que la fosfatasa 2 (PP-2) estaría también implicada (Wadzinski et al., 1993).

La fosfatasa PP-1 presenta varias isoformas distinguibles por la subunidad regulatoria que determinan la localización y la especificidad de sustrato de la subunidad catalítica. En el núcleo, PP-1 se halla unida a la cromatina en parte a través de su asociación con el inhibidor de PP-1 (NIPP-1) (Van Eynde et al., 1995). La PKA es capaz de fosforilar NIPP-1 reduciendo de esta manera la afinidad de este inhibidor por la PP-1. Estos resultados sugieren que el cAMP podría provocar la disociación de la subunidad regulatoria y activar a la PP-1 (Renouf et al., 1995).

Otro mecanismo de represión lo constituye la presencia de antagonistas constitutivos. El descubrimiento del gen CREM y su patrón de expresión constituye un punto central en la respuesta a cAMP. En la Figura I.5 se muestran las distintas proteínas represoras y activadoras codificadas por el mismo gen. El promotor 1 dirige la expresión constitutiva de todas las isoformas CREM que incorporan el exón de la región de fosforilación,

mientras que el promotor 2 se induce fuertemente por el camino de transducción de la señal del cAMP, y dirige la transcripción de una familia de proteínas truncadas conocidas como represores tempranos inducibles por cAMP (ICER) (Molina et al., 1993; Sassone-Corsi, 1994).

La familia de proteínas CREM cumple un papel central en la respuesta nuclear a cAMP, particularmente en el proceso de espermatogénesis y en la regulación de los ciclos circadianos regulados por la glándula pineal (Lamas and Sassone-Corsi, 1996, 1997). Las formas CREM α , β y γ generadas por splicing alternativo, fueron las primeras identificadas como antagonistas funcionales de CREB, presentan el dominio bZip y la región P pero carecen de las regiones ricas en glutamina, de esta manera o bien se unirían a CRE como homodímeros no activos o formarían heterodímeros con activadores y los bloquearían (Foulkes and Sassone-Corsi, 1996).

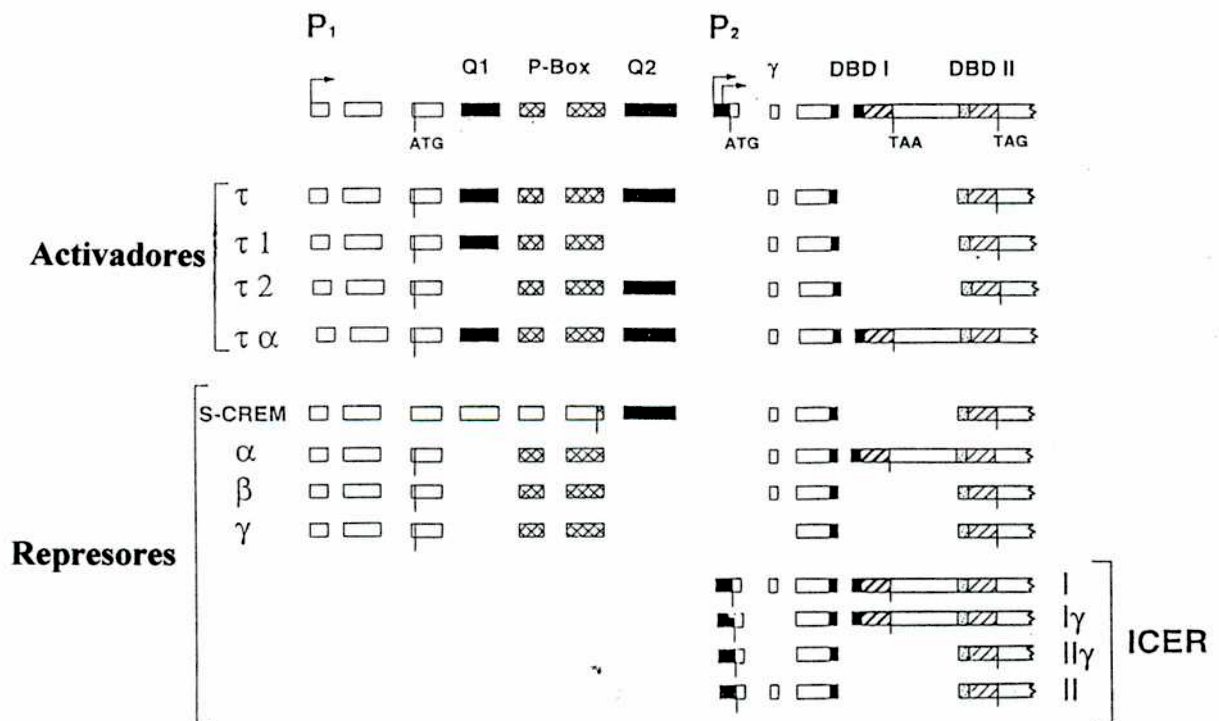


Figura I.5: Representación esquemática del gen CREM y los distintos activadores y represores codificados. (Foulkes and Sassone-Corsi, 1996).

De la expresión de este gen se obtiene una gran variabilidad dado que, además de generarse distintos mRNA por splicing alternativo, también existen señales alternativas de poliadenilación, originándose transcritos que difieren en su extremo 3'. Además puede ocurrir el uso diferencial de sitios de iniciación de la traducción, dando como resultado, aún del mismo mRNA, un activador y un represor. Tal es el caso de CREM τ , que al usarse un AUG interno, puede generarse S-CREM que actúa como represor (Foulkes and Sassone-Corsi, 1996).

Los polipéptidos ICER contienen la región bZip de unión al DNA pero carecen del dominio de transactivación, de esta manera actúan como represores debido a que pueden unirse a las secuencias CRE e impedir la interacción de activadores. Las distintas isoformas descritas en la Figura I.5 se generan por splicing alternativo. Existen evidencias que demuestran que el promotor P2 (de ICER) es negativamente regulado por el mismo factor ICER, de esta manera ejercería una autoregulación negativa (Molina et al., 1993). También se ha relacionado la expresión de ICER como un represor de la apoptosis inducida por cAMP en la línea celular IPC-81 (Ruchaud et al., 1997).

En la Figura I.6 se esquematiza un cuadro conteniendo los distintos elementos involucrados en la respuesta a cAMP.

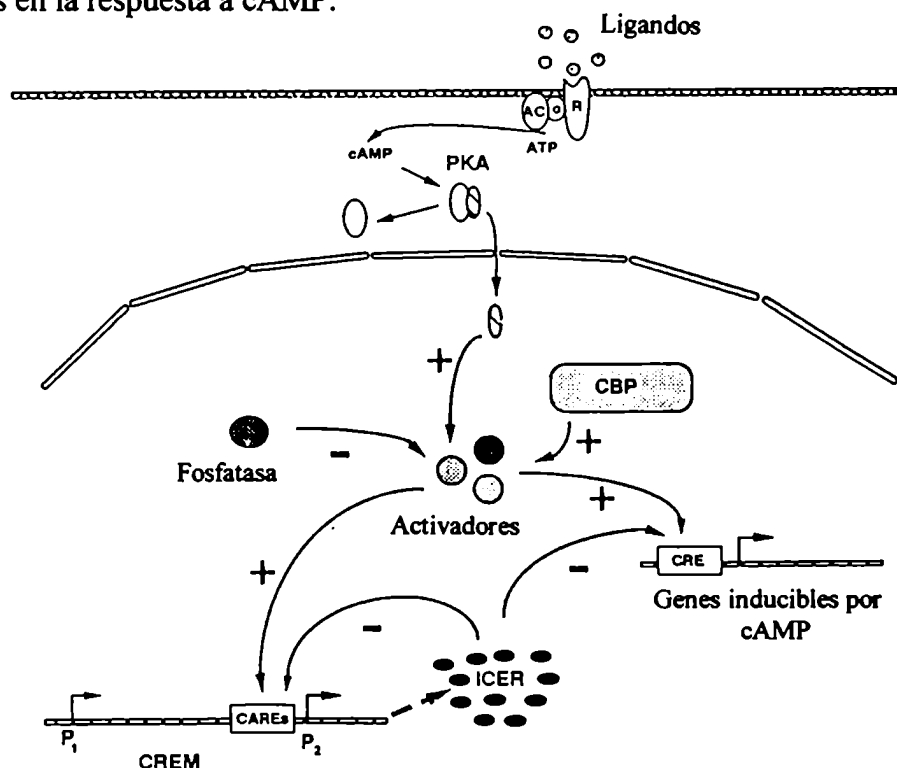


Figura I.6: Esquema resumiendo los factores involucrados en la respuesta a cAMP desde la membrana plasmática hasta el núcleo (Foulkes and Sassone-Corsi, 1996).

C) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR GLUCOSA

C.1 Aspectos generales

La glucosa es un modulador de la expresión génica muy importante en todos los organismos tanto procariontes como eucariontes. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la acción de la glucosa en la maquinaria transcripcional no han sido aún completamente dilucidados.

En los vertebrados, la glucosa puede actuar directamente, por sí misma o por un intermediario de su metabolismo, o indirectamente a través de la secreción de hormonas glucosa-dependientes como la insulina y el glucagon. El camino de transducción de señales seguido por la glucosa ha sido mejor definido últimamente y se han descrito elementos que responden específicamente a glucosa en varios genes de páncreas, hígado y tejido adiposo (Lemaigre and Rousseau, 1994; Vaulont and Kahn, 1994).

En páncreas el gen principal de respuesta a glucosa es la insulina (Mitanez et al., 1997); es sabido desde hace mucho que la biosíntesis y secreción de insulina depende de la cantidad de glucosa circulante. Las células β del páncreas poseen un sistema sensor de los niveles de glucosa. En una etapa inicial la estimulación de la biosíntesis de insulina ocurre dentro de los 20 min de exposición con glucosa e involucra una regulación traduccional del mRNA ya preexistente (Ashcroft, 1978).

La glucosa también ejerce regulación transcripcional sobre el gen de insulina. El promotor del gen de insulina es sumamente complejo y se han descrito numerosos elementos en el DNA de unión a factores de transcripción (German, et al. 1994, 1995). algunos de los cuales responden a glucosa, como el complejo nuclear específico de células β , C1 (Sharma and Stein, 1994), el IUF1 (insulin upstream factor 1), el IPF1 (insulin proximal factor 1) (MacFarlane et al., 1994), y el factor IEF 1 (insulin enhancer factor 1) (Odagiri et al., 1996).

En cuanto a la regulación de la secreción de insulina dependiente de glucosa, existen evidencias de que el ATP, a través de un canal de potasio ATP sensible, jugaría un rol importante en la estimulación de la secreción de la hormona (Henquin, 1994).

Muchos de los genes implicados en caminos metabólicos son transcripcionalmente activados por dietas ricas en hidratos de carbono. Sin embargo algunos de los estudios

llevados a cabo en animales normales o en animales diabéticos con suministro exógeno de insulina, no permiten una clara determinación del rol que cumplen la glucosa o la insulina separadamente sobre la estimulación génica glucosa dependiente. La discriminación de ambos efectos puede realizarse en cultivos celulares establecidos o en cultivos primarios donde el ambiente nutricional pueda ser estrictamente controlado.

GENES REGULADOS POR GLUCOSA
Glucólisis ⇒ Glucoquinasa de hígado ⇒ Fosfofructoquinasa-1B ⇒ Fructosa 6-fosfato 2-quinasa/fructosa 2,6- bifosfatasa (PFK-2) ⇒ Aldolasa B ⇒ Piruvato quinasa (tipo L) ⇒ Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)
Biosíntesis de ácidos grasos ⇒ ATP citrato liasa ⇒ Acetil CoA carboxilasa ⇒ Acido graso sintasa ⇒ Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ⇒ 6-fosfogluconato deshidrogenasa ⇒ Enzima málica (NADPH)
Síntesis y transporte de triglicéridos ⇒ Acetil CoA sintasa (cadena larga) ⇒ Glicerol-3-fosfato acetiltransferasa ⇒ Apolipoproteína E ⇒ Stearoil-CoA desaturasa I
Otros ⇒ 5.4 kb ⇒ Spot 14 ⇒ Glut2 ⇒ Insulina

Tabla I.4: Ejemplos de genes regulados por glucosa.

C.2 Regulación transcripcional de genes que responden a glucosa en hígado

La entrada de glucosa en los hepatocitos se realiza mediante difusión facilitada a través del transportador Glut2. La expresión de esta proteína es regulada por glucosa a

nivel transcripcional (Ferrer et al., 1993). En el promotor murino de Glut2 se determinó que la región -338 a +49 es responsable del efecto regulador de la glucosa, esto sugiere que el promotor contiene elementos que reponen a glucosa pero éstos no han sido aún identificados (Rencurel et al., 1996).

Dentro de la célula, la glucosa es rápidamente transformada en glucosa 6-fosfato (G6-P) por la glucoquinasa, cuya transcripción en hígado es activada por insulina y reprimida por glucagon. La G6-P puede luego ser almacenada como glucógeno o metabolizada en el ciclo de las pentosas fosfato o en el camino glicolítico de Embden-Meyerhof.

La pregunta que muchos investigadores se formularon, es acerca de cuál es el metabolito intracelular, intermediario de las diversas vías en que la glucosa interviene, responsable del efecto transcripcional ejercido por la misma. Se ha determinado en adipocitos que el análogo de glucosa 2-deoxiglucosa (es capaz de fosforilarse a 2-deoxiglucosa 6-fosfato pero no es capaz de ser metabolizado por el camino de Embden-Meyerhof) tiene efecto activador de la expresión de los genes de Acetil CoA carboxilasa (Foufelle et al., 1992). Sin embargo, esto no significa que la inducción observada sea un efecto directamente mediado por la misma 2-deoxiglucosa 6-fosfato. Mas aún, a pesar que la isomerización en fructosa 6-fosfato es imposible, se ha reportado que la 2-deoxiglucosa 6-fosfato puede entrar en el camino de las pentosas fosfato y ser metabolizada en un intermediario decarboxilado (Jenkins et al., 1986). Por otro lado, se sabe que el azúcar xilitol es metabolizado a xilulosa 5-fosfato, un intermediario de la rama no oxidativa del camino de las pentosas fosfato. En transfecciones transientes de células de hepatoma que responden a glucosa mhAT3F, se ha determinado que la presencia de xilitol en baja concentración (0.5 mM), induce la expresión del gen reportero CAT controlado por un fragmento promotor de 183 pb del gen de la L-piruvato quinasa (L-PK), al mismo nivel que 20 mM de glucosa, sin alterar los niveles intracelulares de G6-P (Doiron et al., 1996). En este mismo reporte, se determinó que los efectos de glucosa y xilitol sobre el promotor de la L-PK requieren la presencia de los elementos GIRE (elemento de respuesta a glucosa) intactos, y que dichas acciones no son aditivas. También que la presencia de 5 mM de xilitol induce la acumulación del mRNA de la L-PK aún en ausencia de insulina, y que no es necesaria la activación del gen de glucoquinasa dependiente de insulina. En otro reporte, Nishimura y Uyeda

(1995), han demostrado que la xilulosa 5-fosfato es capaz de estimular a la proteína fosfatasa 2A. Todos estos resultados refuerzan la hipótesis que el efecto de glucosa sobre el gen de la L-PK estaría mediado por la rama no oxidativa del camino de las pentosas fosfato a través probablemente de la xilulosa 5-fosfato. Ésta, podría luego activar a una ifosfatasa o a una quinasa y desencadenar una cascada de fosforilación/defosforilación que llevaría a la activación del complejo de respuesta a glucosa ensamblado en el GIRE del gen de la L-PK, y de otros genes que responden a glucosa.

C.3 Elementos de respuesta a glucosa (GIRE) y proteínas de unión

El primer GIRE responsable de la regulación dependiente de glucosa fue ubicado en el promotor del gen de la L-PK. En este gen la zona promotora mínima necesaria para dar respuesta a hidratos de carbono y hormonas se suscribe a 183 pb. En esta región se encuentran los elementos actuantes en *cis* denominados, de 3' a 5' luego de la TATA box, la secuencia L1 sitio de unión para el factor HNF1 (hepatic nuclear factor 1), la L2 para el factor nuclear 1 (NF1), la L3 sitio de unión para el factor hepático 4 (HNF4) y para NF1 y la secuencia L4 de unión a proteínas USF (upstream stimulatory factor) (Cuif et al., 1992; Yamada et al., 1997). A través de experimentos de transfección transiente en cultivos primarios de hepatocitos y por estudios en ratones transgénicos, se determinó que la secuencia L4 es la responsable de conferir, al promotor de la L-PK, inducibilidad por glucosa. Esta secuencia es necesaria además para que se evidencie el efecto negativo del glucagon y cAMP. Así el GIRE es a la vez un elemento de respuesta positiva para glucosa y de respuesta negativa para cAMP (CRE negativo). De esta manera el GIRE puede ser también considerado un silenciador cuya acción negativa es estimulada en ausencia de glucosa o en presencia de cAMP o glucagon (Diaz Guerra et al., 1993; Cuif et al., 1993).

El GIRE de la L-PK consiste en dos secuencias E imperfectas CACGGG separadas por 5 pb, éstas difieren de la secuencia MLTF/USF sólo en un nucleótido (CACGTG). Ambas secuencias L4 E son indispensables para la actividad GIRE (Mitancher et al., 1997).

El GIRE de la L-PK es muy parecido funcionalmente al elemento que responde a carbohidratos ChoRE descrito en la region promotora del gen S14 (Shih and Towle,

1992). Este promotor contiene entre los nucleótidos -1432 y -1441 una secuencia consenso E ACCACGTGAG.

La característica principal de estos elementos GIRE/ChoRE de unión a USF es que no son elementos de respuesta a glucosa por sí mismos, sino que es necesaria la arquitectura especial de dos de estos elementos separados por 5 pb. Cualquier inactivación de uno de los sitios MLTF/USF o la modificación de la longitud (aunque no se varíe la naturaleza de las bases) de las 5 pb espaciadoras, resulta en una pérdida absoluta de la respuesta a glucosa (Miquerol et al., 1996). Sin embargo parece no existir una correlación entre la afinidad de los elementos GIRE/ChoRE por los factores de transcripción MLTF/USF, dado que mutantes con muy baja afinidad permanecen activos en mediar la respuesta a glucosa (Kaytor et al., 1997).

Recientemente se ha investigado otro elemento de respuesta a glucosa en el promotor del gen de la acetil CoA carboxilasa. El mismo está ubicado entre los nucleótidos -340 y -249 y contiene dos secuencias ricas en GC ubicadas “downstream” de dos secuencias E CACGTC (Daniel and Kim, 1996).

Las secuencias GIRE/ChoRE de los genes de L-PK y de S14 son diferentes de las secuencias E del gen de insulina. Mientras que estas últimas se unen a proteínas de la familia b-HLH (basic helix-loop-helix), las de unión a elementos GIRE/ChoRE son factores de transcripción de la familia b-HLH-LZ (bHLH leucine zipper), las que se caracterizan por poseer un segundo dominio de dimerización en el extremo C-terminal. Además de los factores USF, esta familia incluye al producto del oncogen c-myc y a su compañera Max, las proteínas de unión a enhancers de inmunoglobulinas TFE3, TFEB, TFEC, y una proteína similar a USF denominada FIC que interacciona con Fos. Todas éstas son capaces de formar homo o heterodímeros especialmente con subunidades USF (Baxevanis and Vinson, 1993; Viollet et al., 1996). Estos factores se expresan ubicuamente y su abundancia no está regulada por la dieta u hormonas. Sin embargo esto no invalida su posible rol en la regulación transcripcional ejercida por la glucosa dado que se han observado en experimentos de “footprinting” *in vivo*, que modificaciones en la dieta que provocan una alteración de la transcripción del gen de L-PK, no producen variación alguna en los complejos unidos a las secuencias L4. Podría suceder que la respuesta a glucosa desencadenara modificaciones postraduccionales de

los complejos asociados a los elementos L4, como por ejemplo eventos de fosforilación/defosforilación (Hunter and Karin, 1992).

Los factores USF no poseen sitios de fosforilación para la PKA. Pueden ser fosforilados *in vivo* por quinasas activadas por mitógenos, aunque el efecto de transactivación no es modificado en más de dos veces, lo cual deja dudas sobre su significancia fisiológica. Finalmente, podría ser que las proteínas b-HLH-LZ unidas al GIRE sirvan como factores transcripcionales de anclaje a proteínas que son reguladas por glucosa.

Por otro lado, transfectando células de hepatoma glucosa sensibles con vectores de expresión para la proteína USF nativa o mutada, se ha observado que la sobreexpresión de la proteína USF nativa produce una estimulación del gen L-PK aún en ausencia de glucosa. La sobreexpresión de mutantes negativas carentes, ya sea del dominio de transactivación o del dominio de unión al DNA, produce una incapacidad de dicho gen de responder a glucosa. Estas últimas mutantes son interesantes dado que la proteína truncada puede dimerizar con proteínas USF endógenas pero no unirse al GIRE, de esta manera secuestraría proteína USF (Lefrancois-Martínez et al., 1995).

D) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIADA POR LA QUINASA DE PROTEÍNAS C.

D.1 Aspectos estructurales de la familia de la PKC.

La familia de las serin-treoninquinasa dependientes de fosfolípidos y Ca^{2+} como originariamente se las denominó es muy heterogénea y se la conoce familia de las quinasas de proteínas C (PKC). Actualmente se la divide en tres grupos dependiendo del cofactor que requieran para su acción y de su estructura. Las PKC convencionales (α , β y γ) requieren fosfatidilserina, un lípido de membrana, Ca^{2+} y diacilglicerol (DAG) o ésteres de forbol. El subgrupo de las PKC noveles (δ , ϵ , η y σ) requieren solamente DAG o ésteres de forbol, de manera similar a la quinasa de proteínas D y a $\text{PKC}\mu$ que tienen dominios de transmembrana y dominios de homología a la plectrina y que son

activadas por DAG en ausencia de Ca^{2+} . Las PKC atípicas (ζ y λ) no requieren ni Ca^{2+} ni DAG para desarrollar su máxima actividad (Newton, 1997).

En cuanto a su estructura, la familia de las PKC comparte una alta similitud con la familia Raf, especialmente en el dominio regulatorio. Como se observa en la Figura I.7 estas proteínas poseen un dominio regulatorio N-terminal que contiene la región de pseudosustrato (se hará referencia más adelante), una zona C1 rica en cisteínas responsable de la unión de DAG y ésteres de forbol, y en el caso de las isoformas α , β y γ , una zona denominada C2 de interacción con los fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} . Se ha sugerido que en este dominio reside la propiedad de especificidad diferencial entre los distintos miembros de la familia. La proteína se continúa luego en una región flexible que separa el dominio regulatorio del dominio catalítico C-terminal donde se encuentran los sitios de unión al sustrato y al ATP (Jaken, 1996).

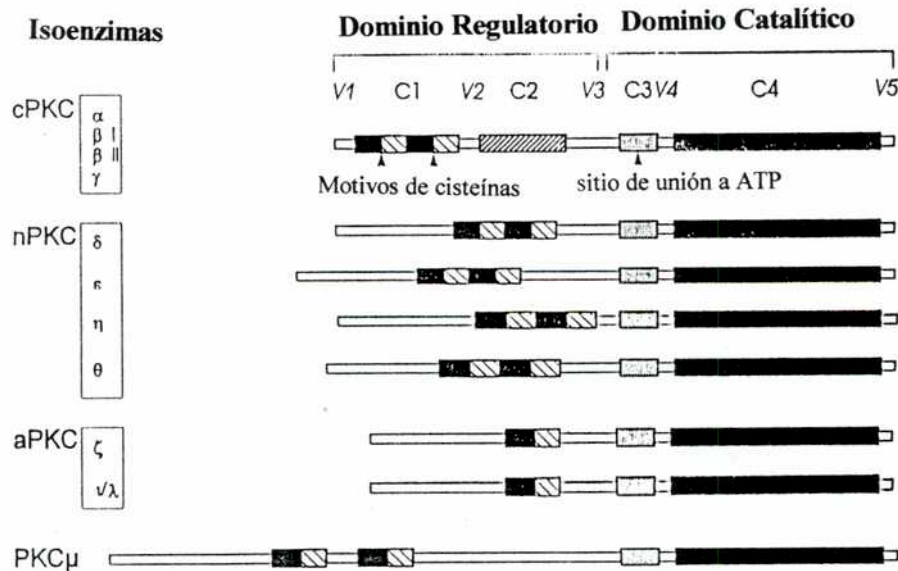


Figura I.7: Dominios estructurales de la familia PKC. Se muestran las distintas isoformas de PKC divididas en cuatro grupos: convencional, novel, atípica y PKC μ . Se indican las regiones variables (V) y las conservadas (C) entre isoformas, también los motivos ricos en cisteínas y el sitio de unión del ATP (Liu, 1995).

D.2 Mecanismos de activación de PKC.

La activación de las PKC convencionales ha sido la más estudiada e involucra interacciones complejas con los activadores. Por un lado se requiere la asociación de la enzima a través del dominio C2 con los fosfolípidos de la membrana plasmática, principalmente fosfatidil serina, al cual se une por interacciones electrostáticas (Newton, 1996). La interacción es cooperativa y se incrementa en presencia de Ca^{2+} en forma dosis dependiente, el cual forma un puente entre la quinasa y el lípido ácido (Liu et al., 1994). La quinasa se activa luego por asociación con DAG formando un complejo cuaternario de enzima, DAG, Ca^{2+} y fosfolípido ácido en relación 1:1:1:4. El DAG incrementa la afinidad de la quinasa por el fosfolípido disminuyendo los requerimientos de Ca^{2+} a los niveles fisiológicos (menor a 1 μM). En ausencia de DAG, la PKC sólo es activada cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta 100 veces.

La secuencia de pseudosustrato de la PKC en estado inactivo permanece enmascarando al sitio activo, se postula que en presencia de Ca^{2+} la unión de fosfatidil serina y DAG al dominio regulatorio N-terminal produce un cambio conformacional reversible que desplaza esta secuencia y al quedar expuesto el sitio activo la enzima es capaz de acceder a su sustrato (Parker, 1994). Otras evidencias argumentan que el cambio conformacional ejercido sobre la PKC expone la arginina 19 de la región de pseudosustrato que es proteolizada produciéndose una disociación de la región inhibitoria N-terminal del dominio catalítico C-terminal (Orr and Newton, 1994). Sin embargo, la proteólisis es un aspecto controvertido en la activación fisiológica de la PKC. No está claro si la degradación proteolítica es el medio de detener la actividad quinasa o si es la manera de liberar el fragmento catalítico al citoplasma y posiblemente a otros compartimentos celulares, y de esta manera actuar como una quinasa constitutiva independiente de activadores (Liu, 1996). Esta última posibilidad está apoyada por la observación que la PKC α mutante que carece del dominio regulatorio, expresada en células COS, es capaz de ser selectivamente translocada al núcleo (James and Olson, 1992).

El segundo mensajero DAG se produce de manera transiente por la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) al estimularse los receptores y luego se degrada rápidamente. Esta reacción es catalizada por la fosfolipasa C y resulta en la liberación de

cantidades equimolares de *myo*-inositol-D-1,4,5-trifosfato (IP₃). El IP₃ es capaz de unirse al receptor específico de los calciosomas y producir la liberación de Ca²⁺ (Zidovetzki and Lester, 1992). Se han descrito tres isoformas de fosfolipasa C, β , γ y δ , siendo la β activada a través de receptores acoplados a proteínas G y la γ por asociación a receptores con actividad tirosinquinasa (Spiegel et al., 1996). Existen evidencias que el DAG puede ser originado por otras fuentes distintas a la hidrólisis de fosfatidil inositol e incluyen la ruptura de la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y de otros fosfolípidos conteniendo inositol. Estas reacciones son catalizadas por otras formas de la fosfolipasa C y por la fosfolipasa D produciendo además ácido fosfatídico que puede convertirse en DAG por la fosfohidrolasa (Kiss, 1996).

Grandes cantidades de DAG se forman rápidamente luego de la estimulación de receptores por ejemplo en páncreas por colecitoquinina, bombesina, ácido colinérgico; en plaquetas por trombina; en hepatocitos por arginina, vasopresina, epinefrina, angiotensina II y en células pituitarias por la hormona liberadora de tiotropina (Liu, 1996).

Los ésteres de forbol, promotores de tumores, como el 12-miristato 13-acetato (TPA), posee una estructura molecular muy parecida al DAG de manera que pueden activar a la PKC directamente tanto *in vivo* como *in vitro*. Al igual que DAG, los ésteres de forbol aumentan la afinidad de la PKC por el Ca²⁺ resultando en potentes activadores a concentraciones fisiológicas de Ca²⁺, además se metabolizan lentamente y permanecen en los tejidos, provocando una activación prolongada de la PKC. Por otro lado, inducen irreversiblemente la inserción de la PKC en vesículas fosfolipídicas lo que causa posiblemente una distorsión de la membrana (Zhang et al., 1995).

La PKC también puede ser activada por los fosfoinosítidos PI, fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP), PIP₂, y PIP₃ en presencia de Ca²⁺ y fosfatidilserina, cuya afinidad y potencia activadora se incrementa con el estado de fosforilación. Sin embargo, en ausencia de cationes bivalentes, estos fosfoinosítidos producen una inactivación irreversible de la PKC (Newton, 1995). La activación por PI(3,4)P₂ y PIP₃ es particularmente interesante porque son los productos de catálisis de la PI-3 quinasa y actúan como segundos mensajeros específicos de las PKC noveles y no sobre las PKC convencionales (Toker and Cantley, 1997). La PI-3 quinasa es capaz de activarse por

asociación a través de un dominio SH2 (de homología a Src-2), a dominios de receptores de factores de crecimiento activados por fosforilación en residuos tirosina, y se la ha encontrado también en núcleo (Lu et al., 1998). De esta manera las distintas isoformas de PKC son capaces de mediar señales intracelulares originales por distintas vías.

Además, todas las PKC convencionales pueden ser activadas por ácidos grasos insaturados incluyendo el araquidónico, oleico y linoleico. Estos derivan de la ruptura de lípidos de la membrana catalizada por la fosfolipasa A₂, presentando un efecto sinérgico con los diacilglicerol sobre la activación de la PKC (Goldberg and Zidovetzki, 1998). También se ha observado estimulación de PKC α , γ y ϵ por la vitamina D₃ y de PKC ζ por ceramidas (Slater, et al. 1995).

En la Figura I.8 se observa un esquema representativo de los distintos mecanismos de activación de la PKC.

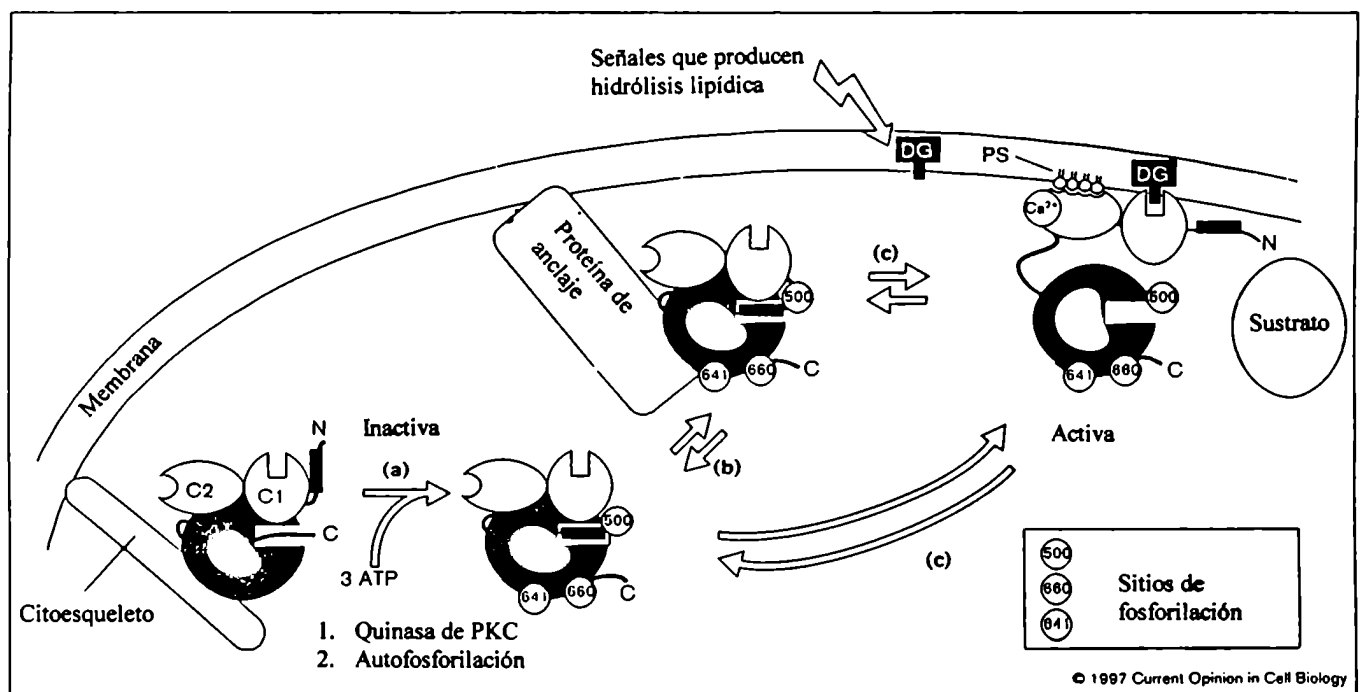


Figura I.8: Esquema representativo de los mecanismos de activación de PKC. Las explicaciones se realizan en el texto.

Todas estas observaciones sugieren que los miembros de la familia PKC responden diferencialmente a las distintas combinaciones de lípidos de la membrana y de esta manera el patrón de activación de las isoformas es susceptible en los distintos tipos celulares a variaciones en la localización celular, duración y tipo de estímulo.

D.3 Regulación de la PKC

La PKC es regulada por diversos mecanismos que son ejercidos a distintos niveles, el primero que analizaremos es el de localización celular. La PKC recién sintetizada se halla asociada a componentes del citoesqueleto de manera lípido-independiente, esta forma precursora de la enzima es inactiva y posee una migración electroforética de 4 KDa menor que la forma madura. La liberación al citosol está regulada por eventos de fosforilación, el primero sería realizado por otra quinasa en la treonina 500 de la región de activación permitiendo, esta carga negativa, alinear correctamente los residuos necesarios para la catálisis cuya consecuencia sería una autofosforilación de la PKC en el residuo treonina 641. La enzima, luego, es nuevamente autofosforilada en el residuo serina 660 resultando en la liberación al citosol (Keranen et al., 1995). En el citosol la PKC interactúa con proteínas de anclaje. En su estado inactivo puede unirse a la AKAP79, que como ya se ha descripto anteriormente se une también a la PKA y a calcineurina; se supone que la interacción con DAG o Ca^{2+} liberaría a la PKC de este complejo (Newton, 1996). La AKAP79 podría funcionar además como sustrato y efector de las quinasas y fosfatasas ancladas (Dell'Acqua, et al., 1998).

Luego de la activación de la PKC se observa una redistribución celular de la enzima. Es aceptado que la activación lleva a una translocación de la proteína citosólica a la membrana celular, donde además de interaccionar con los fosfolípidos, la enzima se asocia a proteínas de anclaje denominadas RACKs (receptores de PKC activada). Estas proteínas de anclaje serían específicas para las distintas isoformas y les conferirían la ubicación cercana a sus sustratos (Mochly-Rosen, 1995). Existen evidencias que algunas isoformas de PKC son translocadas al núcleo, por ejemplo, el tratamiento con ésteres de forbol o briostatina de células 3T3 induce la translocación de la PKC α a la membrana nuclear donde fosforila a las lamininas A, B y C, mientras que en las células HL-60 el

tratamiento con briostatina, y no con ésteres de forbol, induce la traslocación al núcleo de la PKC β II y no de la PKC α (Olson et al., 1995).

Otro mecanismo de regulación de la PKC es el de retroalimentación negativa ejercida a distintos niveles incluyendo los receptores, fosfolipasas, y sobre la misma PKC. La PKC es capaz de regular negativamente la actividad de la PLC disminuyendo la producción de DAG y de IP₃ (Eldar et al., 1993), y positivamente la actividad de la fosfolipasa D, de esta manera activaría la hidrólisis de fosfatidilcolina (Singer et al., 1997).

Otro mecanismo importante es el denominado “down-regulation” o depleción que se evidencia frente a una estimulación sostenida con ésteres de forbol. Este mecanismo, que aún no ha sido completamente aclarado, involucra la desaparición de la PKC aunque no involucraría una disminución en su síntesis. Se cree que es debido, principalmente a un aumento en la velocidad de degradación de la enzima (Liu, 1996). Este concepto se ha visto reforzado por las evidencias presentadas usando inhibidores de proteasas. Estos son capaces de inhibir el proceso de depleción (Oliver and Parker, 1992). Se sabe que la unión de la PKC activa a la membrana produce cambios conformacionales por los cuales expone sitios de clivaje a proteasas (Orr and Newton, 1994).

Se ha reportado la acción de otros componentes sobre la regulación negativa de las distintas isoformas de la PKC, por ejemplo los lisoesfingolípidos, proteínas de unión a Ca²⁺ como la calmodulina y la troponina C, la anexina V, especies reactivas de oxígeno, interferón β , cAMP, cGMP, etc. También se ha descrito la presencia de proteínas inhibitorias específicas de PKC como el inhibidor de PKC 1 y la proteína 14-3-3 (Liu, 1996).

D.4 Modulación de la expresión génica por PKC

Se postulan varias hipótesis acerca de como la PKC, una vez que es activada, transmite la información al núcleo. Unas argumentan que la PKC permanece en el citoplasma y causa efectos sobre la transcripción de manera indirecta y otras implican un papel directo de regulación en el núcleo. Ambos tipos de efectos no son excluyentes.

Por un lado está completamente demostrado que la PKC es capaz de fosforilar otras quinasas y desencadenar una cascada de activación incluyendo a Ras, Raf-1 y las quinasas activadas por mitógenos (MAPKKK, MAPKK, MAPK) (Buchner, 1995). La PKC fosforila inicialmente a Raf-1 en los residuos serina 497 y 619 y estimula su actividad quinasa sobre MAPKK que luego fosforila a otras proteínas transductoras citosólicas como la quinasa S6, la MAPK y la fosfolipasa A2 y a factores de transcripción nucleares como c-Myc y Jun en el proceso requerido para el crecimiento y la diferenciación celular (Liu, 1996). Por ejemplo, células CHO que sobreexpresan la isoforma PKC α o δ presentan, luego de la estimulación con ésteres de forbol, una activación prolongada de las MAP quinasas con un arresto de la división celular en la fase G₂/M (Watanabe et al., 1992).

Otra forma de acción consiste en fosforilar proteínas citosólicas que funcionen como anclaje de factores de transcripción. Tal es el caso de NF κ B, factor heterodimérico (p50/p65) que en ausencia de señal es retenido en el citoplasma a través de la interacción con su inhibidor, la proteína I κ B. La fosforilación de este inhibidor por la PKC y por otras quinasas, inducen a una inactivación seguida de una rápida degradación de I κ B, liberando a p50/p65 que se trasloca al núcleo donde es transcripcionalmente activa (Koh et al., 1997).

La PKC además de fosforilar productos protooncogénicos como el p46-erbA es capaz de inducir su expresión como en el caso de c-fos (Messina et al., 1992). Los genes inducibles por ésteres de forbol como el TPA poseen, en sus secuencias promotoras 5', sitios específicos de unión a factores regulatorios denominados elementos TRE (TPA response element) a los que se pueden unir los complejos AP-1, AP-2 y AP-3. El complejo AP-1 está formado por homodímeros de Jun o heterodímeros de Jun y Fos, siendo la secuencia de reconocimiento en el DNA (5' TGA^G/_CTCA 3') muy similar a la secuencia CRE descrita anteriormente. Para el factor AP-1, parte de la regulación consiste en la inducción de la expresión de los genes fos y jun, y parte consiste en modificaciones postraduccionales de las proteínas ya sintetizadas. De éstas, la más conocida es la fosforilación de c-Jun en cinco sitios regulatorios, tres de ellos involucrados en la interacción con el DNA y dos con el dominio de transactivación (Karin, 1994). Estos sitios son fosforilados de forma específica principalmente por la

quinasa de caseína II, por la ERK (quinasa regulada por señales extracelulares) y por la JNK (quinasa del N-terminal de c-Jun), siendo estas dos últimas miembros de la familia de las quinasas MAP (Lin et al, 1992; Chou et al., 1992; Dériard et al., 1994). Por otro lado, se ha demostrado que la activación de PKC produce una defosforilación de Jun ejercida por una fosfatasa dependiente de PKC activa que favorece la unión del factor al DNA (Boyle et al., 1991). Como se puede apreciar, existe una intrincada red de eventos de fosforilación que comunica a las distintas vías de transducción de señales.

En la Figura I.9 se esquematiza un resumen de los distintos mecanismos involucrados en la transducción de la señal al núcleo.

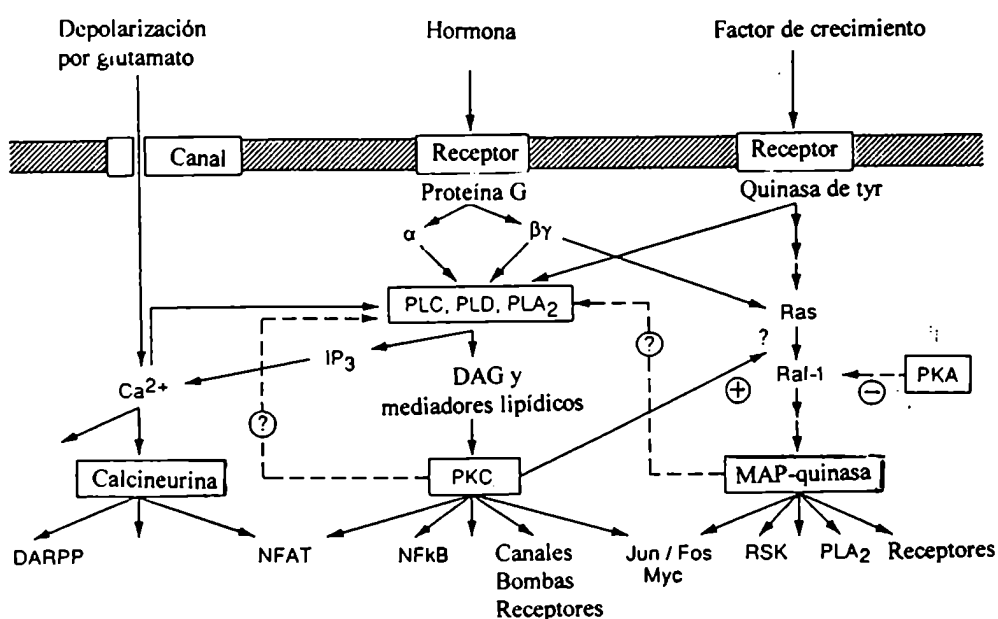


Figura I.9: Esquema de la interrelación de distintas vías de transducción de señales en las que se encuentra involucrada la PKC (Nishizuka, 1995)

En cuanto a la regulación que la PKC ejercería directamente en el núcleo también se conciben distintas posibilidades. Una es que la enzima se trasloque al núcleo luego de la activación en el citoplasma, otra contempla el hecho de que la PKC migre al núcleo de forma inactiva y luego allí sea activada por señales generadas en el citoplasma y la tercera se solapa con la última pero difiere en que las señales serían generadas en el mismo núcleo. Existen evidencias experimentales para las posibilidades descritas no siendo excluyentes sobre la fosforilación de distintos sustratos (Butchner, 1995).

E) ENTRECruzAMIENTO DE SEÑALES MEDIADAS POR PKA Y PKC

En este apartado se dará énfasis a la interrelación entre los patrones de transducción de señales originadas por estímulos extracelulares que involucran a la PKA y PKC. Resumiendo lo descripto, la conexión entre estos caminos ocurre a diversos niveles:

a) Receptores de membrana: los estímulos son captados por proteínas receptoras que para la vía de estimulación de la PKA, están acoplados a proteína G. Se describió que algunos de estos mismos receptores podrían desencadenar a través de la activación de la PLC la vía de activación de la PKC (Liu, 1996).

b) Localización celular: se ha discutido la presencia de proteínas ancladoras, cuya función principal sería localizar a las enzimas quinasas cerca de sus sustratos otorgándoles especificidad a las distintas isoformas. Además ejercerían una función regulatoria. Ejemplo de esto es la AKAP79 que interacciona con PKA, calcineurina, PKC y fosfatasa PP-2B (Faux and Scott, 1996).

c) Fosforilación de transductores de la señal: en este caso, las interrelaciones son sumamente complejas, existiendo una red de fosforilaciones y de sustratos compartidos entre las dos casacadas de fosforilación. Por ejemplo mientras que la PKC activa por fosforilación a Raf-1 la PKA ejerce un efecto negativo sobre esta quinasa por fosforilación de residuos serina específicos (Nishizuka, 1995).

d) Defosforilación de factores transductores de la señal: la actividad de las fosfatasa está estrictamente regulada actuando de manera concertada las mismas fosfatasa en los distintos caminos de transducción (Hunter, 1995).

e) Factores de transcripción: se ha encontrado promiscuidad entre factores del grupo de bZip, dentro de la familia de factores ATF. El ATF2 es capaz de formar heterodímeros con Jun, de esta manera se entrecruza un factor de unión a CRE que con Jun es capaz de unirse al elemento de unión de AP-1.

f) Elementos presentes en cis: la secuencia de reconocimiento de factores que responden a cAMP, CRE es muy parecida al elemento de unión AP-1 que media la respuesta por ésteres de forbol. También se ha descripto el elemento AP-2 al cual se unen factores que responden a señales mediadas por PKA y por PKC (Buchner, 1995).

Capítulo 3: Regulación de la δ -aminolevulinato sintetasa

A) ACCIÓN CATALÍTICA

La enzima mitocondrial δ -aminolevulinato sintetasa (succinil CoA: glicina C-succinil transferasa (EC 2.3.1.37)) cataliza el primer paso en la biosíntesis del hemo y es el principal punto de control de este camino (May et al., 1995). La reacción consiste en la condensación de glicina y succinil-CoA para producir ácido aminolevulínico (ALA), coenzima A y dióxido de carbono (Ferreira and Gong, 1995). La enzima ALA-S funciona como un homodímero y el sitio activo reside en la interfase entre las subunidades, requiriéndose para la catálisis residuos de ambas (Tan et al., 1998).

La forma activa requiere de 5' fosfato de piridoxal como cofactor. La reacción enzimática catalizada por la ALA-S comienza con la unión del fosfato de piridoxal a la superficie de la enzima a través de un grupo SH del sitio activo y la formación de una base de Schiff carbaniónica con una lisina (Lisina 313 de la ALA-S eritroide murina) (Ferreira et al., 1993). Por estudios de mutagénesis sitio dirigida se determinó que, en la interacción del cofactor con la enzima, es importante la presencia de una secuencia consenso rica en glicina (GXGXXG) conservada en todas las ALA-S conocidas y en muchas de las enzimas dependientes de fosfato de piridoxal (Gong et al., 1996). También sería importante la cercanía de un residuo aspártico que estabilizaría la forma protonada del cofactor (Gong et al., 1998). Luego la reacción procede con la unión del grupo α -carboxilato de la glicina con la arginina 439 (en la ALA-S eritroide murina) (Tan et al., 1998). El carbono electrofílico del carbonilo en la succinil CoA reacciona entonces con el carbanión, liberando CoA y produciendo ácido α -amino- β -cetoadípico que es decarboxilado para dar ALA (Ferreira and Gong, 1995). En la figura I.10 se muestra el sitio activo de ALA-S y la conformación propuesta de los residuos involucrados, como así también una representación esquemática de la reacción catalizada.

Los genes de ALA-S-N y ALA-S-E han sido aislados de diversas especies mostrando una organización de exones e intrones similar (Surinya et al., 1997).

El gen de ALA-S-E contiene once exones y diez intrones expandidos en 22 kpb en el cromosoma X. El primer exón de la ALA-S-E de pollo es no codificante y muestra alta homología con los de ratón y humano. Cuando se transcribe a RNA, la secuencia correspondiente al primer exón adopta una configuración de apareamiento de bases con nucleótidos del exón 2 formando una horquilla muy estable de estructura similar al elemento de respuesta a hierro de la ferritina (Lim et al., 1994). El primer intrón en la ALA-S-E humana corresponde a 6 kpb seguido por el exón 2 que codifica para la zona amino terminal conteniendo el péptido señal necesario para la localización de la proteína en la matriz mitocondrial. Los exones 3 y 4 codifican la porción N-terminal de la proteína madura, mientras que del 5 al 11, tanto en humanos como en pollo, está contenida la información para la región C-terminal altamente conservada de aproximadamente 440 aminoácidos. Esta región está muy relacionada a la ALA-S de bacterias sugiriendo que correspondería a la porción catalítica de la enzima (Conboy et al., 1992). En el mismo reporte se observó que el exón 4 presenta “splicing” alternativo en humanos pero no en ratón o perro, no habiéndose establecido cual es la función fisiológica de este evento.

El gen de ALA-S-N de pollo es de aproximadamente 6.9 kpb, conteniendo diez exones y nueve intrones de longitud variable (Maguire et al., 1986). En rata presenta once exones ocupando más de 14 kpb (Yomogida et al., 1993). En humanos este gen se ha mapeado por análisis de híbridos somáticos utilizando PCR y se ubica en la banda cromosómica 3p21.1 (Cotter et al., 1995).

En la Figura I.11 se muestra la organización génica comparativa entre ALA-S-E de ratón y ALA-S-N de pollo y rata.

El mRNA de ALA-S-N de rata presenta un tamaño molecular de 2.3 kb, originando a la enzima preALA-S-N de 71.000 Da aproximadamente, lo cual coincide con la determinación de peso molecular realizada por electroforesis con SDS. Su secuencia aminoacídica es clivada entre los residuos glutaminas 56 y 57 en el procesamiento de entrada a la mitocondria, generándose la forma madura de alrededor de 65.000 Da (Yamamoto et al., 1988).

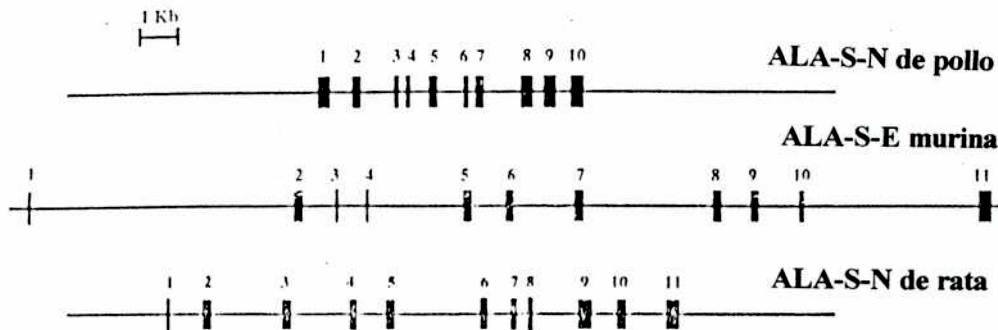


Figura I.11: La organización de ALA-S-N y E es altamente conservada. (Yomogida et al., 1993)

Si bien, no existen diferencias mayores en la organización génica de la porción transcribible de los genes de ALA-S-E y ALA-S-N, excepto en los primeros exones, la región promotora de ambos genes difieren sustancialmente. En el caso del promotor de ALA-S-E se han encontrado, además de las secuencias consenso TATA en la posición -27 y CCAAT en la posición -87, secuencias de unión a factores de transcripción específicos de células eritriodes como GATA-1, NF-E2, Ets y EKLF o proteínas de unión a CACCC (Orkin, 1995). En la Figura I.12 se esquematiza la secuencia promotora hasta -140 del gen ALA-S-E.

Por experimentos de retardo en gel electroforético se demostró que el factor GATA-1 se une a la secuencia -100 y -124. La unión de este factor y de EKLF incrementan la transcripción del gen reportero en ensayos de transfección de células COS y K562, mientras que por estudios de mutagénesis se determinó que la secuencia de unión a NF-E2 es prescindible en la inducción de la expresión del gen (Surinya et al., 1997).

La estructura de la secuencia promotora del gen de ALA-S-N de rata fue descrita por dos grupos casi simultáneamente (Yomogida et al., 1993; Braidotti et al., 1993). En ambos trabajos se describe la ubicación de la secuencia consenso TATA a -30 pb. Una

característica común con otros genes constitutivos es su alto contenido de G+C (59%) en la posición de -479 a +1 (Leonardsson, 1997).



Figura I.12: Esquema representativo de la zona promotora del gen de ALA-S-E humano. Se muestran las secuencias de unión a distintos factores indicados en el texto (Surinya et al., 1997).

Se describen también varios sitios de unión a la proteína NRF-1 (nuclear respiratory factor 1), factor de transcripción que actúa en general regulando la expresión de genes de proteínas mitocondriales, y cuya secuencia de unión al DNA es 5' T_cGCGCA^T_cGCGC^A_G 3' (Chau et al., 1992). En el promotor de ALA-S-N de rata existen dos de estas secuencias ubicadas de -59 a -47 y de -88 a -76 pb. Mediante ensayos *in vitro* de retardo de la movilidad en gel electroforético con oligonucleótidos correspondientes a esas zonas, se evidenció la formación de un complejo DNA-proteína, presentando mayor afinidad la secuencia -59. El factor involucrado sería el NRF-1 que se uniría a esos sitios de manera específica (Braidotti et al., 1993).

Mediante ensayos *ex vivo* de transfección transiente de células COS con distintas construcciones conteniendo a ambos, uno de ellos o ninguno de los sitios de unión al factor NRF-1 y el gen reportero CAT (Figura I.13), se demostró que es necesaria la integridad de ambos sitios para la expresión del gen. La ausencia del sitio ubicado a -88 pb produce una disminución drástica de la actividad promotora de esta región (Braidotti et al., 1993).

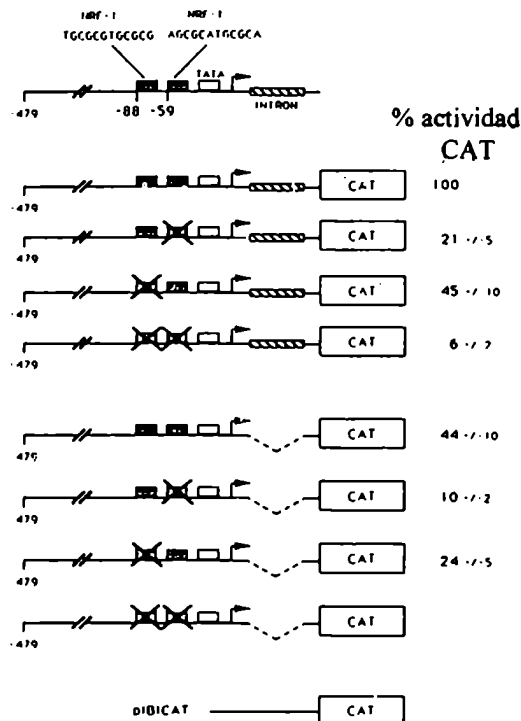


Figura I.13: Efecto de las mutaciones de los sitios a NRF-1 en la actividad promotora del gen de ALA-S-N de rata en presencia y ausencia del intrón uno (Braidotti et al., 1993).

En esa misma figura se muestran experimentos donde se analizó la importancia de la presencia del intrón 1 del gen de ALA-S-N sobre la expresión del gen reportero CAT. Estos autores demostraron con éstos y otros resultados que la presencia del intrón 1 (+81 a +891) incrementa la actividad transcripcional de CAT, lo cual indicaría que en esta región se localizarían elementos que activarían la expresión de ALA-S.

También se han encontrado por análisis de la secuencia promotora, más alejadas hacia el 5', un elemento de unión al factor Oct1 (-402 pb) y una secuencia CCAAT (-330 pb), pero no han sido aún caracterizados.

c) REGULACIÓN DE ALA-S

La biosíntesis del hemo es un camino metabólico esencial para los organismos aeróbicos, por lo tanto, un bloqueo completo de su formación resultaría en una lesión fatal para éstos. La producción de hemo está regulada y modulada eficientemente de modo de proveer la cantidad requerida para la síntesis de las hemoproteínas, siendo las

más abundantes en el hígado los citocromos P-450. El control primario en este camino se ejerce sobre la enzima ALA-S, en el primer paso metabólico, siendo éste el limitante de toda la vía (May et al., 1986). Se analizarán a continuación los distintos moduladores de ALA-S.

C.1 Regulación ejercida por hemo

La enzima ALA-S hepática está sujeta a un control de retroalimentación (“feedback”) negativo ejercido por el producto final: el hemo. Este hecho fue descrito inicialmente en bacterias (Burnham, 1968), y luego confirmado en organismos superiores (Granick and Beale, 1978), utilizándose la administración de hemo como terapia de la porfiria aguda (Tenhunen and Mustajoki, 1998). Varios investigadores han desarrollado la hipótesis sobre la existencia de un pool regulatorio de hemo, el que sería responsable del control de retroalimentación negativo (Granick, 1966; Srivastava et al., 1990). Se postula que los hepatocitos contienen una baja, pero crítica, concentración de pool de hemo que sensa los requerimientos de hemo de la célula. Cuando los hepatocitos requieren hemo, por ejemplo luego de la exposición a algún inductor de los citocromos P-450, el pool de hemo regulatorio se depleta y la actividad de la ALA-S incrementa (Sinclair and Granick, 1975; Cable et al., 1996). Por otro lado, si el contenido de hemo del pool regulatorio es excesivo, la enzima hemoxigenasa, la reguladora de la degradación de hemo, se induce produciendo una disminución de dicho pool (Srivastava et al., 1993). Comúnmente, la concentración requerida de hemo para inducir la hemoxigenasa es superior a la necesaria para inhibir a la ALA-S (May and Bawden, 1989).

El hemo podría ejercer una acción regulatoria de su propia síntesis sobre la ALA-S: a) inhibiendo la actividad enzimática, b) inhibiendo la transferencia de la ALA-S citosólica a la mitocondria, c) inhibiendo la síntesis de la proteína, d) regulando los niveles del mRNA de ALA-S.

a) Acción del hemo sobre la actividad de la ALA-S: La inhibición de la actividad enzimática de ALA-S por hemo fue observada sólo en preparaciones parcialmente purificadas y con concentraciones de hemo entre 10^{-4} y 10^{-5} M, siendo éstas muy superiores a la presente en la mitocondria (May et al., 1986), indicando que este

mecanismo de inhibición por producto, no es importante, fisiológicamente, en la regulación del hemo hepático.

b) Inhibición de la traslocación de la ALA-S a la mitocondria: La síntesis de la ALA-S se realiza en los polirribosomas citoplasmáticos. Los primeros estudios acerca de la acción del hemo sobre el transporte mitocondrial de la ALA-S fueron realizados por Hayashi y col. quienes observaron que cuando se inyecta hemina a ratas tratadas con AIA, el nivel de ALA-S en citosol se incrementaba mientras que decrecía el nivel de la enzima mitocondrial (Hayashi et al., 1972). Se determinó en un sistema experimental *in vitro* en hígado de pollo que tanto el transporte como el procesamiento del precursor citosólico es inhibido por concentraciones de hemina tan bajas como 3 μ M (Hayashi et al., 1983).

Posteriormente se identificó en la secuencia del precursor de ALA-S-E un motivo de aminoácidos repetido tres veces denominado HRM (heme regulatory motif), el cual estaría involucrado en la inhibición, mediada por hemo, de la entrada de la proteína a la mitocondria. La inserción de esta secuencia en la proteína ornitina transcarbamilasa, enzima mitocondrial no regulada por hemo, fue suficiente para conferirle inhibición por hemo del transporte a la mitocondria (Lathrop and Timko, 1993). Una secuencia muy similar a ésta fue encontrada en el factor de transcripción HAP1 repetida seis veces entre los residuos 245 y 440. Esta proteína activa en levaduras la expresión de genes de citocromos en respuesta a oxígeno/hemo (Zhang and Guarente, 1994). El dominio de unión a hemo se ubica cercano al dominio de unión al DNA, y reprime la transcripción en ausencia de hemo por la formación de un complejo estable con un represor. La presencia de hemo produce la disociación de este complejo promoviendo la unión del factor al DNA y la transcripción (Zhang and Guarente, 1995).

c) Efecto de hemo sobre la traducción: El control de la síntesis de ALA-S a nivel traduccional fue sugerido por Kikuchi y col. (Hayashi et al., 1980). Luego, por experimentos de traducción *in vitro* del mRNA de ALA-S con el sistema de reticulocitos de conejos, se observó que la síntesis de ALA-S era inhibida en presencia de hemina (Yamamoto et al., 1983), pero no se ha confirmado totalmente si este efecto es específico o se refiere a un efecto generalizado sobre la traducción de proteínas. Recientemente se ha reportado que el hemo inhibe la biosíntesis de ALA-S-E en

reticulocitos humanos y, aunque no se ha determinado el mecanismo en su totalidad, aparentemente es independiente de la regulación ejercida por el hierro (Smith and Cox, 1997).

En los últimos años se ha hecho evidente que el hemo ejerce una función efectora que puede regular diversos procesos biológicos entre ellos la traducción de proteínas. Esta acción es llevada a cabo por la inhibición de la fosforilación de la subunidad α del factor de iniciación de la traducción 2 (eIF-2 α). Cuando esta proteína se encuentra fosforilada aumenta su afinidad por el factor eIF-2B secuestrándolo y, siendo que éste es limitante, la síntesis de proteínas se detiene (Rhoads, 1993).

Hasta el momento se han determinado dos quinasas del factor eIF-2 α , la quinasa dependiente de RNA doble cadena PKR y la quinasa regulada por hemo HRI. Esta última se activa en condiciones de depleción de hemo en células eritroides (Chen and London, 1995). Se ha determinado que la unión de hemina a HRI no sólo inhibe la autofosforilación y la fosforilación de eIF-2 α , sino que también favorece la formación de puentes disulfuro entre subunidades HRI impidiendo la asociación de esta quinasa con la proteína chaperona Hsp70 (Gross et al., 1994). La interacción del hemo con HRI se realizaría a través de secuencias HRM presentes en el sitio catalítico, similares a las descritas en el punto anterior (Zhang and Guarente, 1995).

d) Efectos del hemo a nivel transcripcional y postranscripcional: La hipótesis de que el hemo altera la transcripción del gen de ALA-S comenzó con los trabajos de Granick en 1966, quien demostró que la inducción de ALA-S por diversas sustancias requiere de la síntesis de novo de la proteína y es impedida por la presencia de inhibidores de la transcripción mitomicina C y actinomicina D (Granick, 1966). Se propuso un mecanismo general para la regulación e inducción de ALA-S basado en el modelo de represión, donde el hemo reprimiría la transcripción del gen. Posteriormente se logró clonar el cDNA del gen de ALA-S y utilizarlo como sonda, permitiendo de esta manera, realizar mediciones de los niveles de mRNA de ALA-S y determinar su vida media. En el trabajo de Higara y col (Yamamoto et al., 1988), se propone que el hemo ejercería represión a nivel transcripcional sobre el gen de ALA-S, dado que observaron que la disminución del nivel del mRNA de ALA-S era el mismo en presencia de hemo que con el agregado de actinomicina D, no observando un efecto aditivo de ambos inhibidores.

Otros investigadores, sin embargo, proponen que el principal punto de regulación ejercida por el hemo sobre la ALA-S es a nivel postranscripcional. Se ha reportado que el hemo disminuye la estabilidad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de embriones de pollo (Hamilton et al., 1991). A través de mediciones del mRNA de ALA-S por ensayos de hibridización en solución, se determinó su vida media con α -amanitina, en presencia o en ausencia de hemo. Estos ensayos han revelado que el hemo produce un aumento en la tasa de degradación de dicho mensajero (Drew and Ades, 1989). Este modelo se ha visto apoyado por los resultados reportados posteriormente, donde al utilizar inhibidores de la biosíntesis del hemo, ácido 4,6-dioxoheptanoico o desferroxamina, se incrementó marcadamente la estabilidad del mRNA de ALA-S, siendo esta acción revertida por la adición de hemina 10 μ m (Cable et al., 1996).

C.2 Regulación ejercida por fenobarbital

El fenobarbital es un compuesto lipofílico que, como se ha analizado en el capítulo 1, produce una inducción de la transcripción de algunos miembros de la familia de los citocromos P-450, es decir que induce la formación de apocitocromo. Como también se discutió, los apocitocromos se asocian a hemo para formar la holoenzima activa siendo en hígado las hemoproteínas más abundantes.

Por otro lado se sabe que la administración de un gran número de sustancias, entre ellas el fenobarbital produce un incremento en la actividad de la enzima ALA-S (Granick, 1966; Cánepa et al., 1985a).

Se han postulado dos teorías sobre la acción inductora del fenobarbital sobre ALA-S. La teoría clásica argumenta a favor de un efecto indirecto ejercido por el fenobarbital a través de la inducción del citocromo P-450. De esta manera, al formarse más cantidad de apocitocromo P-450 se consumiría una mayor cantidad de hemo, disminuyendo así la concentración de hemo del pool regulador lo cual induciría a la ALA-S de acuerdo a los mecanismos que se han tratado en el apartado anterior sobre la acción de hemo sobre la regulación de ALA-S (Yamamoto et al., 1988; Srivastava et al., 1990).

La segunda teoría apoya la hipótesis que el fenobarbital ejercería su efecto directamente sobre la inducción de ALA-S (Hamilton et al., 1991; Dogra et al., 1993). Estos autores observaron que tanto los mensajeros del citocromo P-450 como de ALA-S

se incrementan rápida y simultáneamente luego de la adición del compuesto porfirinogénico a la suspensión hepática. Además el agregado de cicloheximida no afecta a la inducción del mRNA de ALA-S mediada por este compuesto indicando, de esta manera, que no es necesaria la síntesis del apocitocromo para la inducción de ALA-S. (Hamilton et al., 1988). Más aún, la presencia de inhibidores de la biosíntesis del hemo sólo producen pequeños aumentos en el nivel del mRNA de ALA-S, aunque sí tienen un efecto marcadamente inductor de los citocromos P-450 (Ryan and Ades, 1989).

Todas estas evidencias han demostrado que, al menos en hígado de embriones de pollo, las drogas porfirinogénicas pueden actuar directamente aumentando la tasa de transcripción del gen de ALA-S, y que no es necesario que disminuyan los niveles de hemo intracelular para que esta inducción tenga lugar. Además, afirman que el hemo regula la expresión de ALA-S disminuyendo la estabilidad de su mensajero, como se hizo referencia en el apartado anterior.

Sería posible, sin embargo, que la inducción del citocromo P-450 pudiera llevar a una disminución del hemo libre posterior a una primera inducción de la transcripción de ALA-S, y que esta disminución de hemo contribuyera a prolongar los niveles inducidos de ALA-S e incrementara la continuidad de su actividad (Mackie et al., 1991).

C.3 Regulación ejercida por cAMP

Desde hace tiempo, se han estudiado los efectos del cAMP sobre la enzima ALA-S, sin embargo los primeros resultados registrados en la literatura son contradictorios, ya que varían desde la ausencia total de efecto hasta acciones activadoras o inhibitoras.

Kim y Kikuchi (1972; 1974), estudiaron el efecto, *in vivo* del cAMP y del dibutilil cAMP sobre ALA-S de rata inducida por AIA, encontrando una disminución de ALA-S mitocondrial y total por administración de estos nucleótidos cíclicos. Estos autores sugirieron que el cAMP ejercería sus efectos impidiendo la transferencia de la forma citosólica a las mitocondrias, ya sea por inhibición del transporte o maduración. De este modo, los niveles hepáticos de cAMP podrían regular la síntesis de hemo de un modo similar a éste (Yamamoto et al., 1982).

Por otro lado Bonkowsky y col (1973) en hígado de rata, al igual que Sasa y Kappas (1977) en cultivos de hepatocitos de embriones de pollo, no pudieron encontrar ningún efecto del cAMP sobre ALA-S.

Trabajando con suspensiones de hepatocitos de embriones de pollo, Srivastava y col (1979) demostraron que si bien el cAMP no modificaba los niveles basales de ALA-S, era necesario para que se manifestara la inducción de esta enzima por AIA, así el cAMP ejercería un efecto permisivo sobre la inducción de ALA-S.

Giger y Meyer (1981), en cultivos de hepatocitos de embriones de pollo, encontraron un efecto potenciador del dibutilil cAMP sobre la inducción de ALA-S por fenobarbital. En este mismo sistema, Marks y col (Stephens et al., 1978) estudiando el efecto de agentes moduladores de los niveles intracelulares de cAMP, como adrenalina, teofilina y aloxano, observaron una correlación positiva entre aumento de cAMP e inducción de ALA-S por AIA y disminución de cAMP con inhibición de ALA-S.

Posteriormente, trabajos realizados por Grinstein y col (Cánepa et al., 1984) han demostrado que la presencia de dibutilil cAMP en cultivos primarios de hepatocitos de rata, produce una potenciación de las actividades de las enzimas ALA-S y ferroquelatasa inducidas por fenobarbital. Estos autores también estudiaron la regulación por fenobarbital y cAMP en hepatocitos de ratas con diabetes experimental. Han demostrado que si bien las actividades basales de las enzimas ALA-S y ferroquelatasa en los hepatocitos diabéticos no difieren de las actividades determinadas en los hepatocitos normales, la inducción ejercida por fenobarbital en aquellos es mucho mayor que en éstos últimos (Cánepa et al., 1985a). Sin embargo el mecanismo molecular por el cual el cAMP produce un aumento en la actividad de la enzima ALA-S no ha sido aún aclarado.

Por otro lado el cAMP en hepatocitos diabéticos no produce una potenciación de la inducción mediada por fenobarbital, posiblemente debido a que en este estado los hepatocitos presentan concentraciones elevadas de cAMP preexistentes a la inducción (Edwards and Elliot, 1974; Cánepa et al., 1985a).

C.4 Regulación ejercida por glucosa

En 1964, Tschudy y col. demostraron que la inducción de la ALA-S en hígado de mamíferos podía ser prevenida por una ingestión elevada de glucosa o una dieta rica en hidratos de carbono. Otra observación importante fue que la inducción de ALA-S por administración de algunos compuestos porfirinogénicos, era mayor en animales ayunados que en los no ayunados. Este efecto fue denominado “efecto glucosa”, por su similitud con lo que ya había sido descrito en bacterias.

También se ha reportado que la administración de glucosa a pacientes con porfiria hepática precipitada por compuestos químicos, produce una marcada mejoría clínica de la patología. Este efecto terapéutico está relacionado con la observación que en ratones y en embriones de pollo, la glucosa ejerce un efecto inhibitorio de la inducción mediada por AIA de la actividad de ALA-S (Kim and Kikuchi, 1974).

La acción de la glucosa podría involucrar la inhibición de la secreción del glucagon lo que conduciría a un descenso de los niveles hepáticos de cAMP (Kioussis et al., 1978). Sin embargo, Giger y Meyer (1981) observaron que la adición de glucosa a cultivos de hepatocitos de embriones de pollo, provocaba una disminución de la inducción de ALA-S y citocromo P-450 mediada por fenobarbital, en ausencia de factores extrahepáticos como suero u hormonas.

Bonkovsky y col (1973) han concluido de sus resultados que el efecto glucosa se debería a una represión de ALA-S mediada por dicho glúcido o por la glucosa-6-P. Otros autores han confirmado estos resultados.

En hepatocitos de rata, se ha demostrado que la glucosa inhibe la inducción de la actividad de ALA-S por AIA y fenobarbital (Cánepa et al., 1984, 1985a). No se observó este efecto inhibitorio cuando estos experimentos fueron realizados en hepatocitos provenientes de ratas con diabetes experimental (Cánepa et al., 1985b).

Reportes de Scott y Edwards (1985) también informan que la inducción de ALA-S por AIA era bloqueada por el agregado de glucosa a hepatocitos de rata y que este efecto podía ser revertido por agregado de cAMP. De este modo sugirieron que el efecto glucosa podría estar mediado por una disminución de los niveles intrahepáticos de cAMP.

C.5 Regulación ejercida por hormonas

El papel de las hormonas peptídicas insulina y glucagon en la regulación de la biosíntesis del hemo ha sido ampliamente estudiado aunque los resultados presentados son contradictorios.

Granick y col. (1975) informaron que la insulina en concentraciones fisiológicas, causa un incremento en la biosíntesis de porfirinas, inducida por ALA, en hepatocitos de embiones de pollo. Similares resultados fueron obtenidos por Sassa y Kappas (1977).

Por otra parte, Kim y Kikuchi (1974) encontraron que la inducción de ALA-S mediada por AIA era significativamente reducida en hígado de rata cuando glucagon o insulina se administraban junto al inductor. Sin embargo no observaron cambios cuando estas drogas se inyectaban 2 horas después del AIA. Dichos autores atribuyeron los efectos de insulina y glucagon a un aumento del pool de hemo regulatorio por inhibición de la hemoxigenasa.

De acuerdo a otros resultados (Stephens et al., 1978), el glucagon aumenta la síntesis de porfirinas inducida por AIA en células de hígado de pollo.

Se sabe que el glucagon estimula la adenilil ciclase hepática aumentando los niveles intracelulares de cAMP y que la insulina antagoniza el incremento de cAMP causado por el glucagon. Así, se ha sugerido, (Marks et al., 1979) que el efecto de estas hormonas peptídicas sobre la biosíntesis del hemo dependería de la relación en la que se encuentran dentro de la célula y se ejercería a través del cAMP.

Estudios recientes han demostrado que la insulina ejerce un efecto inhibitorio sobre el mRNA de ALA-S. Este efecto sería ejercido a nivel transcripcional sin alterar la vida media de dicho mensajero (Scassa et al., 1998 en prensa).

Las hormonas esteroides son otro de los factores fisiológicos que influyen la actividad de ALA-S hepática. Se han descrito un gran número de sustancias naturales que producen un aumento en la síntesis de porfirinas como los esteroides reducidos en C-19 y C-21, incluyendo metabolitos derivados de las transformaciones de hormonas gonadales y adrenocorticales y de intermediarios en la síntesis de ácidos biliares (Moore and Hift, 1997). Sin embargo los mecanismos moleculares de la acción de estos compuestos sobre la ALA-S no han sido aún aclarados.

Materiales y Métodos

1. Materiales

Trizma base, seroalbúmina bovina, azul tripán, collagenasa (tipo 1), hialuronidasa (tipo I-S), N⁶,O²-dibutiril adenosina 3'-5' monofosfato cíclico, 8-(4-clorofeniltio)-cAMP, 8-(6-aminohexil)amino-cAMP, N⁶ benzoil cAMP, oligo dT-celulosa, adenosina 5'-trifosfato (sal dipotásica), DL-ditiotreitol, espermidina (trihidrocloruro), agarosa, etilen glicol-bis (beta aminoetiléter) N,N'-tetraacético (EGTA), films autorradiográficos, bromuro de etidio, acrilamida, bis acrilamida, medio HAM F12, medio mínimo esencial Eagle, buffer Hepes, extracto de levadura, peptona, agar, ortonitrofenilgalactopiranósido (ONPG), butiril CoA, marcador de peso molecular fago λ , deoxinucleótidos, estaurosporina, actinomicina D, aloxano, imidazol, forskolina, glucagon, adrenalina, cicloheximida, 12-O-tetradecanoilforbol 13 acetato, 1,2-dioctanoil-sn-glicerol, 4 α -forbol 12,13 diacetato, calfofistín C, DNA de esperma de salmón, solución de Denhardt, glioxal, fueron adquiridos a Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo. El isotiocianato de guanidina se compró a Bethesda Research Laboratories, Maryland. L-[4,5-³H(N)] leucina (act. esp. 60 Ci/mol; 1 Ci= 37 GBq), [α -³²P]dCTP (act. esp. 3000 Ci/mmol), [γ -³²P]dATP (act. esp. 6000 Ci/mmol) y cloramfenicol ³H (act. esp. 60 Ci/mmol) se compraron a New England Nuclear, Dupont Co. Wilmington, DE. El kit para la medición de cAMP se obtuvo de Amersham International, Amersham U.K. y los anticuerpos de cabra anti inmunoglobulinas de conejo unidos a un soporte sólido, de Bio Rad Laboratories Richmond, C.A. Los componentes del medio de cultivo para células HepG2 (aminoácidos no esenciales, anfotericina, penicilina-estreptomicina, suero fetal bovino), tripsina, enzimas de restricción, ligasa, kit de marcación por "random primers" conteniendo fragmento Klenow, T₄ polinucleótido quinasa, Taq DNA polimerasa fueron comprados a GIBCO BRL. El kit de maxipreparación plasmídica Wizard, fue adquirido en Promega. Todos los otros reactivos químicos usados son de grado analítico.

2. Cultivos primarios de hepatocitos de rata

A) ANIMALES UTILIZADOS-OBTENCIÓN DEL HÍGADO

Se utilizaron ratas albinas chbb THOM entre 200-300 g de peso, provenientes del bioterio de la FCEN. Los animales fueron mantenidos en condiciones estandarizadas de luz (entre 6.30 y 18.30) y temperatura (21-22°C) y se ayunaron durante 24 horas antes de su utilización. Las ratas fueron decapitadas e inmediatamente, se les extrajo el hígado que se lavó dos veces con NaCl 0.9%, y se cortó con bisturí en trozos de 0.5-1 mm de espesor.

B) INDUCCIÓN DE DIABETES EXPERIMENTAL

El estado diabético experimental en ratas fue inducido por la administración intravenosa de una sola dosis de estreptozotocina (65 mg/kg de peso). La droga fue preparada en el momento de ser utilizada en buffer citrato 0.05 M. Las inyecciones se realizaron en la vena de la cola en un volumen de 0.3 a 0.4 ml (Bitar and Weiner, 1983). Los animales control recibieron, de la misma manera, buffer citrato. Los animales fueron sacrificados a los 15 días de haber sido inyectados. Para determinar el estado diabético de las ratas se realizó la determinación de glucosa en sangre, tomando como criterio de diabetes aquellas que presentaran valores por encima de 250 mg de glucosa por ml. Otros factores para determinar el estado diabético fueron descriptos anteriormente (Cánepa et al., 1985). Se encontró que aproximadamente el 70% de las ratas inyectadas resultaron diabéticas.

C) DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

La determinación de glucosa en sangre fue realizada por el método de Dubowski (1962), basado en la reacción con *o*-toluidina. El control rutinario, semicuantitativo de la glucosa en sangre de los animales, fue determinado por tiras reactivas Dextrostix, con una gota de sangre de la cola.

D) PREPARACIÓN DE HEPATOCITOS

Los hepatocitos fueron obtenidos de acuerdo al método de Fry y col. (1976), según se detalla a continuación. Los trozos de hígado se incubaron durante diez minutos a 37°C con

agitación de 60 oscilaciones/minuto en 20 ml de PBS (buffer fosfato; libre de glucosa, Mg^{2+} y Ca^{2+} (pH 7.4)). Esta solución contiene por litro NaCl 8000 mg, KCl 200 mg, KH_2PO_4 200 mg y Na_2HPO_4 140 mg. Todas las incubaciones posteriores se realizaron en estas mismas condiciones de temperatura y de agitación. Se deshechó luego el sobrenadante y se repitió una vez más este lavado, incubándose luego dos veces durante 10 minutos con 20 ml. de PBS conteniendo EGTA 190 mg/l. La presencia de EGTA en la solución facilita la dispersión no enzimática de las células hepáticas, debido a la extracción del Ca^{2+} que produce un cambio irreversible en el factor de adhesión de la membrana plasmática. A continuación se realizó un nuevo lavado con PBS, durante 10 minutos, y posteriormente se incubó durante 60 minutos con 20 ml. de solución balanceada de Hank conteniendo las enzimas dispersantes de células (solución balanceada de Hank libre de glucosa, Mg^{2+} y Ca^{2+} a pH 7.4 conteniendo por cada litro: NaCl 8000 mg, KCl 400 mg, KH_2PO_4 60 mg, Na_2HPO_4 50 mg, $NaHCO_3$ 840 mg, rojo fenol 10 mg, $CaCl_2$ 550 mg, colagenasa 500 mg, e hialuronidasa 1000 mg). El sobrenadante resultante fue filtrado a través de tres capas de gasa de algodón y centrifugado a 500 x g por 5 minutos, lavándose luego el pellet celular dos veces con PBS. Finalmente los hepatocitos obtenidos se resuspendieron en medio HAM F12 sin glucosa pH 7.4.

E) DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS Y DE SU VIABILIDAD

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó el método de exclusión del azul tripán, basado en que las células que conservan intacta la membrana plasmática excluyen los colorantes tales como el azul tripán, nigrosina y eosina (Paul, 1970). Para ello se colocaron 50 μ l de la suspensión de hepatocitos en 1 ml de PBS y 0.2 ml de la solución de azul tripán al 0.4 % (conteniendo 0.4 g de azul tripán, 0.81 g de NaCl, 0.06 g de K_2HPO_4 y 0.05 g de metil-p-hidroxibenzoato en 100 ml de agua y ajustando luego el pH a 7.4). Una gota de la suspensión así obtenida se colocó en el borde de una cámara de Neubauer.

La observación de las células se realizó en microscopio óptico con un aumento de 40X entre los 4 y los 8 minutos del agregado del colorante. De este modo la tinción del núcleo de la célula se consideró como un daño en la membrana celular y determinó la no viabilidad de la célula.

El conteo de células se realizó en los cuatro cuadrados grandes de las esquinas de la cámara y el número de células totales por ml y el porcentaje de viabilidad se calculó por las siguientes fórmulas:

$$\text{Células/ml} = N \times 1/4 \times 1000 \times 25 \times 10$$

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{células no teñidas} \times 100}{\text{células totales}}$$

F) INCUBACIÓN DE LOS HEPATOCITOS

Las células resuspendidas en medio HAM F12 se incubaron en un baño termostático con agitación de 60 oscilaciones/min a 37°C durante el tiempo indicado en cada experimento. Las distintas drogas agregadas se disolvieron según se detalla a continuación. Fenobarbital, dibutilil cAMP, 8-(4-clorofeniltio)-cAMP, 8-(6-aminoheptil)amino-cAMP, N⁶ benzoil cAMP, glucosa, aloxano, imidazol, forskolina, glucagon, adrenalina y actinomicina D, se disolvieron en HAM F12 en una concentración no inferior a 100X de lo utilizado en cada caso. TPA, DOG, estaurosporina, calphostin C, 4 α -forbol 12,13-diacetato, se disolvieron en DMSO en una concentración no inferior a 1000X de lo utilizado en cada caso.

Cada droga fue utilizada en una concentración ya sea determinada por ensayos de curvas a distintas concentraciones, o por datos obtenidos de trabajos previos de acuerdo a como se indicará en cada caso en particular. Al cabo del tiempo de incubación, descrito en cada experimento, las muestras se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos y el pellet celular se lavó dos veces con PBS. Las células así obtenidas se conservaron a -20°. En todos los ensayos se incubó en las mismas condiciones una fracción control sin el agregado de drogas.

G) DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de proteínas en los extractos celulares de hepatocitos se realizó por el método de Lowry y colaboradores (1951).

H) MEDICIÓN DEL NIVEL DE cAMP ENDÓGENO

La cuantificación de cAMP intracelular se determinó por el método de Tovey y col. (1974). El método se basa en la competencia entre el cAMP endógeno frío y cAMP tritiado

por una proteína que posee alta afinidad por el cAMP. La cantidad de complejo proteína-cAMP marcado, está inversamente relacionado con la concentración de cAMP presente en la muestra. En primer lugar se realizó una curva patrón dosando un rango de 1 a 16 pmoles de cAMP estándar. Las muestras de los extractos celulares, obtenidos según se detalló anteriormente para la obtención de RNA total, se trataron de igual manera, mezclando 50 μ l de buffer Tris 0.05 M, pH 7.5, EDTA 4 mM, con 50 μ l de [8-³H] cAMP (0.9 pmoles), 50 μ l de la muestra incógnita y 100 μ l de la proteína de unión, y enfriándolas a 4°C durante 2 horas. Luego se agregaron 100 μ l de una suspensión de carbón activado, se mezcló y se centrifugó rápidamente. Finalmente se midió la radiactividad en alícuotas de 200 μ l del sobrenadante. Del gráfico Co/Cx versus concentración de cAMP, donde Co son las cpm en ausencia de cAMP frío y Cx son las cpm para cada punto de la curva patrón, se pudo calcular la concentración de cAMP de las muestras incógnitas, expresada en pmoles/mg de proteína.

3. Obtención de RNA

A) PURIFICACIÓN DEL RNA TOTAL

El RNA fue obtenido por el método de Chomczynsky y Sacchi (1987). Este método se usó tanto en tejido hepático, para estandarizar el método, como en hepatocitos. Partiendo de 500 mg de tejido o su equivalente en células (75-100 $\times 10^6$ células), se agregó 5 ml. de solución D (isotiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7, sarcosil 0.5%, β -mercaptoetanol 0.1 M), y se homogeneizó con potter. Se le agregó luego, 0.5 ml de acetato de sodio 2 M pH 4, 5 ml de fenol saturado en buffer Tris pH 8 y 1 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), en el orden indicado. Se agitó con vortex durante diez segundos y se enfrió en hielo durante 15 minutos. A continuación se centrifugó a 10 000 x g durante 20 minutos a 4°C.

Luego se procedió a precipitar el RNA, para ello se separó la fase acuosa (superior) y se le agregó 1 volumen de isopropanol (5 ml), y se precipitó a -20°C durante una hora. Posteriormente se centrifugó a 10 000 x g durante 20 min a 4°C, descartando el

sobrenadante. El pellet se resuspendió en 0.3 ml de solución D y se realizó una segunda precipitación agregando 1 volumen de isopropanol a -20°C durante 1 hora. El pellet resultante de centrifugar a $10\,000 \times g$ durante 20 minutos se lavó dos veces con etanol 75%. La concentración de RNA se calculó midiendo DO a 260 nm, de acuerdo a la relación: $1\text{ DO}_{260} = 40\text{ }\mu\text{g RNA}$; debiendo presentar un cociente $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$ mayor que 1.7 para tener la pureza necesaria. En todo el desarrollo de la técnica se usó material estéril para evitar la degradación por ribonucleasas.

B) AISLAMIENTO DE POLI (A)⁺ RNA EN BATCH

Para la purificación del poli (A)⁺ RNA se siguió el método descrito por Aviv y Leder (1972). El RNA obtenido según se detalla anteriormente, se disolvió en SDS 0.5% y se calentó la solución a 65°C durante 5-10 minutos para desnaturalizarlo. A continuación se le agregaron 2 volúmenes de buffer de siembra (Tris 20 mM pH 7.6, NaCl 0.5 mM, EDTA 1 mM pH 8, sarcosil 0.1%) y oligo (dT) celulosa en proporción 0.3 g de resina por cada 0.5 mg de RNA. Esta mezcla se agitó durante 15 minutos y se centrifugó a $1\,500 \times g$ durante 4 minutos a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante. La resina se lavó cuatro veces con 0.8 ml de buffer de siembra. Luego se eluyó el RNA pegado con cuatro lavados de 0.4 ml de buffer de elución cada uno (Tris 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM pH 8, SDS 0.05%), centrifugando cada vez a $1\,500 \times g$ durante 5 minutos. El eluido se juntó y se precipitó el RNA adicionándole 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, y dejándolo en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a $10\,000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C , descartando el sobrenadante. El pellet se lavó una vez con etanol 75%. El RNA, así obtenido, se disolvió en SDS 0.5% y se midió DO a 260 y 280 nm, en una alícuota, y el resto se conservó a -20°C hasta su posterior utilización. Se calculó la concentración de RNA obtenido de acuerdo a la relación $1\text{ unidad de DO}_{260} = 40\text{ }\mu\text{g de RNA}$, debiendo presentar un cociente $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ mayor que 1.7 para tener la pureza necesaria. En todo el desarrollo de la técnica, se usó material estéril para evitar la degradación por ribonucleasas.

C) ELECTROFORESIS DE RNA EN GEL DE AGAROSA

La integridad de los RNA obtenidos por los métodos anteriormente descriptos se evaluó por medio de electroforesis en gel de agarosa usando como agente desnaturizante glioxal y DMSO. El método es una adaptación del desarrollado por McMaster y Carmichael (1977). Las muestras de hasta 20 µg de RNA se pretrataron durante 60 minutos a 50°C en una mezcla desnaturizante (glioxal 1.2 M, dimetilsulfóxido 7.5 M, fosfato de sodio 10 mM, pH 7). Luego se les adicionó 4 µl de buffer de siembra (glicerol 50%, fosfato de sodio 10 mM pH 7, azul de bromofenol 0.25% y xilene cianol FF 0.25%) y se sembraron inmediatamente en el gel de agarosa 1% disuelto en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7. La corrida fue realizada en el mismo buffer a 100 mV. El gel se tiñó durante 45 minutos en una solución de acetato de amonio 0.1 M conteniendo bromuro de etidio 0.5 µg/ml. Luego se observaron las bandas obtenidas, por fluorescencia al U.V. En todo el desarrollo de la técnica, se usó material estéril para evitar la degradación por ribonucleasas.

4. Medición de la actividad del mRNA de ALA-S

A) TRADUCCIÓN *IN VITRO*

La actividad del mRNA de ALA-S se midió usando el ensayo de traducción *in vitro* en un sistema con extracto de germen de trigo libre de células; según describe Anderson y col. (1983). La mezcla de reacción contenía 15 µl de extracto de germen de trigo, 10 µl de solución mezcla energética (Hepes 7 mM pH 7.6, ATP 5 mM pH 7, fosfocreatina 40 mM, creatinfosfoquinasa 0.25 mg/ml, espermidina 0.2 mg/ml pH 7, pool de aminoácidos excepto leucina 62.5 µM, acetato de potasio 420 mM, ditiotretitol 8.5 mM, GTP/Mg²⁺ 5 µM, acetato de magnesio 15 mM), con 10 µl de poli (A)⁺ RNA 200 µg/ml desnaturizado por calentamiento a 65°C durante cinco minutos, y 10 µl de L-[4,5-³H(N)] leucina (5 µCi). Las incubaciones se realizaron a 30 °C. Las concentraciones de magnesio, poli (A)⁺ RNA y el tiempo de reacción se eligieron de acuerdo a resultados obtenidos en experimentos de calibración. La reacción se detuvo con el agregado de 50 µl de Tris 10 mM pH 7.8 conteniendo 2 µg/ml de enzima ALA-S purificada como carrier. La incorporación total de

leucina tritiada en proteínas, es decir la actividad total del mRNA, se determinó por duplicado de la siguiente manera. Se colocaron dos alícuotas de 5 μ l cada una en sendos filtros de fibra de vidrio GFA de 25 mm de diámetro, sumergiéndolos en una solución de TCA 10% conteniendo leucina 2 mM durante 10 minutos. Mediante este tratamiento las proteínas precipitaron sobre el filtro. El agregado de leucina fría disminuye la presencia de marca radioactiva inespecífica. Los filtros GFA fueron luego sumergidos en una solución de TCA 5% y calentados a 90-100°C durante 15 minutos, se logró así destruir los tRNA cargados con el aminoácido leucina tritiada que no fueron incorporados a las cadenas polipeptídicas. Se prosiguió con otro lavado en solución fría de TCA 5% durante 10 minutos y por último se deshidrataron los filtros con lavados sucesivos de 10 minutos cada uno en etanol, etanol-acetona 1:1 y acetona. Una vez secos los filtros, se midió radioactividad en un contador de centelleo líquido, usando líquido centellante a base de tolueno. La incorporación de material radioactivo en ausencia de poli (A)⁺ RNA se determinó en un ensayo paralelo, restándose el valor así obtenido a cada una de las actividades encontradas.

B) INMUNOPRECIPITACIÓN DE ALA-S SINTETIZADA *IN VITRO*

La incorporación de leucina tritiada en ALA-S se midió en los restantes 90 μ l de la traducción *in vitro* por la técnica de inmunoprecipitación. Para disminuir el pegado de anticuerpos no específicos, el primer paso consistió en tratar las muestras con 15 μ l de suero de conejo preinmunizado (normal) y 100 μ l de buffer de inmunoprecipitación doblemente concentrado o IMPP 2X (Tris 40 mM pH 7.6, NaCl 300 mM, EDTA 20 mM, Tritón X-100 2%, colato de sodio 1%, seroalbúmina bovina 1% y leucina 4 mM), durante dos horas a 4°C. A continuación se agregaron 50 μ l de IMPP 1X conteniendo 1 mg de anticuerpos de cabra anti IgG de conejo unidos covalentemente a un soporte inerte (immunobeads), obtenidos de Bio Rad Laboratories Richmond, USA. Esta suspensión se agitó y se incubó 30 minutos a 4°C. Luego se separaron los complejos antígeno no específico-anticuerpo de conejo-anticuerpo de cabra por centrifugación a 8000 x g durante 5 minutos y se descartó el pellet. Al sobrenadante se le agregaron 15 μ l de suero de conejo inmunizado con ALA-S pura, en exceso y se incubó durante 3 horas a 37°C. Los complejos inmunes se separaron por centrifugación a 8000 x g durante 5 minutos, descartándose el sobrenadante. El pellet se lavó

dos veces con 300 μ l de IMPP 1X y a continuación dos veces con 300 μ l de Tris 10 mM pH:7.6.

C) ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE DE PROTEÍNAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas mediante la técnica de PAGE-SDS (Laemli, 1970). Los complejos inmunes fueron disociados por calentamiento a 100°C durante 3 minutos en 35 μ l de buffer desnaturalizante (Tris 50 mM pH 7.1, SDS 2%, β -mercaptoetanol 2%, glicerol 20%, EDTA 1 mM y azul de bromofenol). Luego se separaron los inmunobeads por centrifugación, descartando el precipitado. Los sobrenadantes se sembraron en un gel de poliacrilamida 10%. En una calle separada se sembró como testigo la enzima ALA-S purificada (5 μ g), cuya migración se reveló cortando esa franja de gel y tiñendo con azul de Coomassie R250 0.14%.

D) CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL mRNA DE ALA-S RELATIVA A LA ACTIVIDAD DEL mRNA TOTAL

Para estudiar la ubicación electroforética de la enzima ALA-S se hicieron estudios preliminares. Una vez separada la parte del gel correspondiente al testigo de ALA-S, el resto del gel se cortó a lo largo en trozos (slices) de 2 mm de altura. Los mismos se colocaron en viales plásticos y se disolvió el gel sumergiéndolos en H₂O₂ 30% durante la noche. Luego se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido usando líquido centellante a base de tolueno. En los siguientes experimentos, sólo se cortaron cinco slices de 2 mm cada uno en la ubicación coincidente con el testigo teñido con azul de Coomassie. El cálculo de la cantidad de enzima sintetizada incluye una corrección por la radiación inespecífica (background). La misma se realizó restando el promedio de la radioactividad del slice que precede y del que le sigue al correspondiente al pico de la enzima (Diesterhaft et al., 1980). Luego se calcula el valor correspondiente al volumen original (100 μ l), este valor corregido es la medida de la cantidad de ALA-S sintetizada *in vitro*. Dividiéndolo por la radioactividad incorporada en proteínas totales, se obtiene una estimación de la actividad del mRNA relativa a la actividad del mRNA total. Este valor multiplicado por 100 indica el porcentaje de actividad del mRNA, y es la forma en que se expresan los resultados obtenidos.

5. Medición de la cantidad de mRNA de ALA-S

A) ANÁLISIS DEL mRNA POR NORTHERN Y SLOT BLOT

El nivel del mRNA de ALA-S se determinó por el análisis de Northern y slot blot. Para el caso del análisis por Northern blot, 20 µg de RNA total, o 5µg de poli (A)⁺RNA, fueron desnaturalizados, sembrados por duplicado y corridos en electroforesis de agarosa 1% como se describió anteriormente, conteniendo como marcador de peso molecular fago λ digerido con EcoR I y Hind III. Una vez finalizada la corrida, el gel se cortó por el medio, conteniendo cada mitad un juego de todas las muestras a ser analizadas. Una mitad del gel fue teñida durante 45 minutos en una solución de acetato de amonio 0.1 M conteniendo bromuro de etidio 0.5 µg/ml. Luego se observaron las bandas por la fluorescencia emitida en un transiluminador de luz U.V., y se controló que las muestras presentaran el patrón típico de las bandas ribosomales para el caso de RNA total, y además que todas las calles presentaran igual cantidad de material sembrado.

La otra mitad del gel se sometió a transferencia pasiva a un filtro de nitrocelulosa, según se describe en Sambrook y col (1989). En cada ocasión, el filtro fue previamente humedecido durante 1 hora en SSC 20X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M pH 7), luego se preparó el sistema de transferencia colocando debajo del gel un papel Whatman 3MM mojado en SSC 20X que contacta la solución de transferencia con el gel. Sobre el gel, se colocó el filtro de nitrocelulosa, y luego por encima, unos 10 cm de alto de hojas de papel absorbente cortadas del mismo tamaño que el gel. Para evitar que la transferencia se realizara directamente del gel al papel absorbente, se aislaron los bordes del gel con parafilm impermeable. La transferencia se realizó por capilaridad ascendente en una solución SSC 20X durante 16 horas. Terminada la transferencia se separó el filtro de nitrocelulosa del gel, marcando previamente los pocillos sembrados, y se lo secó entre dos papeles Whatman 3MM durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para el caso del análisis por slot blot, 20 µg de cada muestra de RNA total fueron desnaturalizados en una mezcla conteniendo formamida 50%, formaldehído 7%, y SSC 1X durante 15 minutos a 68°C. Luego las muestras fueron diluídas tres veces en SSC 10X. Las membranas previamente humedecidas durante 1 hora en SSC 10X se colocaron en el

Manifold GIBCO BRL. Las muestras se sembraron directamente sobre el filtro de nitrocelulosa en los pocillos destinados a ello, y se aplicó vacío desde la cámara inferior del dispositivo. Una vez que pasó toda la muestra, los pocillos fueron lavados con 200 µl de SSC 10X. A continuación el filtro se secó entre dos papeles Watman 3MM durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Los filtros obtenidos tanto por Northern blot o slot blot, fueron luego colocados en una estufa a 80°C durante 1 hora de manera de fijar irreversiblemente las moléculas de RNA a la nitrocelulosa. Los filtros se conservaron a 4°C hasta el momento de la hibridización.

B) OBTENCIÓN DE LA SONTA PARA ALA-S

B.1 Purificación del oligonucleótido

Con el fin de detectar específicamente el mRNA de ALA-S, se construyó un oligonucleótido sintético de 24 bases complementarias a las bases +836 a +859 del mRNA de ALA-S de hígado de rata. La secuencia del cDNA es 5'-CTCCGGCACCATGCTGTTTCACAG-3' (Yamamoto et al., 1988). El oligonucleótido se sintetizó en un sintetizador automático (Applied Biosystem A381). Posteriormente se procedió a purificarlo de contaminantes y de los posibles productos de menor longitud obtenidos durante la síntesis, que pudieran luego en la hibridización dar señales inespecíficas. Para ello, una vez resuspendido en 1 ml de agua estéril, se le realizaron 3 extracciones sucesivas con 400 µl de 1-butanol descartando cada vez la fase orgánica (superior). A continuación se concentró por evaporación con vacío y se cuantificó por lectura a 260 nm, considerando 1 OD equivalente a 33 µg. El siguiente paso consistió en una purificación en gel de poliacrilamida 19% en presencia de urea 45%. La muestra se desnaturizó por tratamiento con formamida 50% durante 5 minutos a 50°C, luego se sembró en el gel precorrído durante media hora y se corrió a 400 mV durante 3 horas. Se utilizó como marcador del frente de corrida una solución de 0.05% de azul de bromofenol. Una alícuota corrida en paralelo se tiñó con bromuro de etidio y luego se cortó la zona del gel correspondiente a la misma altura donde se observó la banda del tamaño esperado por fluorescencia al U.V. El fragmento de gel conteniendo el oligonucleótido, se incubó 12 horas a 37°C en buffer de elución conteniendo SDS 0.1%, acetato de amonio 0.5 M y acetato de magnesio 10 mM. Posteriormente, se centrifugó a

12 000 x g 5 minutos y el sobrenadante se pasó por un filtro Millipore de 0.45 μm . Nuevamente se cuantificó por lectura a 260 nm. El último paso consistió en purificarlo por resina Nensorb 20 (Dupont), para lo cual el oligonucleótido se sembró en la columna en trietanolamina 10 mM. Luego se lavó con 3 ml de una solución conteniendo Tris 0.1 M pH 7, trietanolamina 10 mM y EDTA 1 mM y se eluyó con metanol 50%. Luego de concentrar y medir absorbancia a 260, como resultado se obtuvo el oligonucleótido puro en concentración 2.55 pmol/ μl . Esta fracción es la que posteriormente se utiliza en la marcación.

B.2 Marcación del oligonucleótido

El oligonucleótido puro fue marcado radiactivamente en su extremo 5' mediante una reacción enzimática con T_4 polinucleótido quinasa. La mezcla de reacción contenía 10 pmoles de oligonucleótido, 5 U de T_4 polinucleótido quinasa (GIBCO BRL), el buffer de reacción correspondiente y 150 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 6000 Ci/mmol, 0.15 Ci/ml, en 25 μl de reacción. Dicha mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C. Para determinar el porcentaje de incorporación de radiactivo en la sonda y calcular la actividad específica de la misma, una alícuota de 1 μl se deposita sobre un filtro GFA, y se precipita la sonda con TCA 10% en presencia de pirofosfato de sodio 1 mM para desplazar el nucleótido radiactivo libre. Luego se lava 3 veces con TCA 5% y 2 veces con etanol absoluto y se seca, se mide la radiactividad remanente en un contador de centelleo, con líquido centellante a base de tolueno. La reacción de marcación se detiene inactivando a la enzima por calentamiento a 68°C durante 10 min. Luego la sonda marcada se purificó del nucleótido no incorporado mediante dos precipitaciones sucesivas en presencia de 1/10 del volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Luego de permitir la precipitación a -70°C durante 30 minutos, la sonda se separó por centrifugación a 10 000 x g durante 20 minutos. Posteriormente se lavó el precipitado con etanol 70% y se resuspendió en 50 μl de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM).

La sonda obtenida de esta manera posee una actividad específica de 4.5 cpm/fmol aproximadamente.

C) OBTENCIÓN DE LA SONDA PARA LA GLICERALDEHÍDO 3-FOSFODESHIDROGENASA

Para normalizar los valores de niveles de mRNA de ALA-S en los ensayos de Northern y slot blot, se detectó en paralelo el mRNA de un gen cuya expresión fuera constitutiva en las células estudiadas. Para ello se eligió hibridizar con una sonda específica, el gen de la gliceraldehído 3-fosfo-deshidrogenasa (G3PD). La sonda se preparó por marcación de un plásmido conteniendo el cDNA de G3PD. Éste se desnaturalizó durante 10 minutos a 100°C. Luego se marcó radiactivamente mediante la técnica de extensión de primers hibridizados al azar (random primers). La reacción enzimática conteniendo 40 ng del DNA templado, dATP, dTTP y dGTP en concentración 500 μ M cada uno, buffer de reacción correspondiente, 0.25 OD de una mezcla de hexaoligonucleótidos al azar, 2 U de fragmento Klenow y 50 μ Ci de [α -³²P] dCTP (10 μ Ci/ μ l, 3000 Ci/mmol) fue incubada durante 1 hora a 25°C. La misma se detiene por el agregado de buffer stop que contiene Tris 50 mM pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM y SDS 0.5%. La sonda así obtenida fue posteriormente precipitada y su actividad específica determinada de igual manera que las descriptas para la marcación del oligonucleótido. La sonda obtenida presenta una actividad específica de $7-8 \times 10^8$ cpm/ μ g aproximadamente.

D) HIBRIDIZACIÓN Y AUTORADIOGRAFÍA

Para detectar el mRNA de ALA-S, las membranas que contenían las muestras de RNA fijadas por calor, fueron prehibridizadas en una solución bloqueante (0.15 ml/cm²), conteniendo SSC 6X, SDS 0.1%, solución de Denhardt 2X (polivinilpirrolidona 0.04%, Ficoll 0.04%, seroalbúmina bovina 0.04%) y DNA de esperma de salmón 100 μ g/ml desnaturalizado durante 10 min a 100°C. La prehibridización se llevó a cabo en bolsas plásticas selladas, durante 1 hora a 70°C. Posteriormente la sonda para ALA-S fue agregada a la bolsa de hibridización en proporción a 2.7×10^5 cpm/cm², y la hibridización se llevó a cabo durante 16 horas a 70°C. Esta temperatura fue elegida 10°C por debajo del valor de T_m calculado teóricamente para el oligonucleótido a ser usado como sonda (Sambrook et al., 1989). Finalizada la hibridización, las membranas fueron sometidas a una serie de lavados para

desplazar la sonda hibridizada inespecíficamente. Dichos lavados consistieron en tres ciclos de 2 minutos cada uno a temperatura ambiente con abundante cantidad de SSC 1X, SDS 0.1%, posteriormente se sometieron a tres lavados de 2 minutos cada uno a 70°C en SSC 0.2%, SDS 0.1%. Luego se secaron entre papeles de filtro.

Para detectar el mRNA control de G3PD las membranas que contenían las muestras de RNA fijadas por calor, fueron prehibridizadas en una solución bloqueante (0.15 ml/cm²), que contiene SSC 6X, SDS 0.1%, solución de Denhardt 2X, formamida 50% y DNA de esperma de salmón 100 µg/ml desnaturalizado durante 10 minutos a 100°C. La prehibridización se llevó a cabo en bolsas plásticas selladas, durante 1 hora a 42°C. Posteriormente la sonda para G3PD fue agregada a la bolsa y la hibridización se llevó a cabo durante 16 horas a 42°C. Finalizada la hibridización, las membranas fueron sometidas a una serie de lavados para desplazar la sonda hibridizada inespecíficamente. Dichos lavados consistieron en dos ciclos de 15 minutos cada uno a temperatura ambiente con abundante cantidad de SSC 2X, SDS 0.1%, posteriormente se sometieron a dos lavados de 15 minutos cada uno a 50°C en SSC 0.2%, SDS 0.1%. Luego se secaron entre papeles de filtro.

Los filtros envueltos en nylon impermeable se colocaron en cassetes radiográficos junto a films Kodak (X-OMAT XAR-2) y en presencia de una pantalla intensificadora. Los mismos se expusieron durante 3-5 días a -70°C. Las autoradiografías se obtuvieron por revelado de los films sumergiéndolos 1 minuto en solución reveladora comercial, 1 minuto en ácido acético 3% (solución detenedora) y 5 minutos en solución fijadora comercial. Los autorradiogramas se cuantificaron por densitometría utilizando un densitómetro Bio Rad GS-670.

6. Clonado de la secuencia promotora de ALA-S

A) AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO

Para amplificar la secuencia promotora de ALA-S, se utilizó como templado DNA genómico de hígado de rata que se preparó de acuerdo a la técnica descrita en Current

Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1992). Se utilizaron 2 g de hígado de rata obtenido como se describió anteriormente. El material se trozó y fragmentó en un homogenizador con 10 ml de buffer de digestión (NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 8, EDTA 25 mM, SDS 0,5% y proteinasa K 0.1 mg/ml). Esta preparación se incubó con agitación durante 16 horas a 50°C. A continuación el DNA se extrajo con 1 volumen de una mezcla de partes iguales de fenol saturado en buffer Tris 100 mM pH 8 y cloroformo:alcohol isoamílico 24:1; luego de centrifugar 10 minutos a 1 700 x g, se separó la fase acuosa superior. El DNA se precipitó con medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 30 minutos a -20°C. El pellet obtenido al centrifugar durante 2 minutos a 1 700 x g, se lavó una vez con etanol 70% y se resuspendió en 1 ml de buffer TE.

La preparación de DNA genómico obtenida de esta manera (5.37 mg/ml), se sometió a tratamiento con RNasa A para eliminar el RNA contaminante. La incubación se llevó a cabo en una solución conteniendo RNasa A 1 µg/ml, SDS 0.5% durante 1 hora a 37°C. Luego, para eliminar la RNasa A, se realizó una extracción con fenol, cloroformo, alcohol isoamílico, se precipitó el DNA y se lavó con etanol 70% de la misma manera como ya se describió en el párrafo anterior. El pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de buffer TE, se cuantificó y se diluyó para obtener una solución 1 mg/ml.

B) DISEÑO Y PURIFICACIÓN DE LOS PRIMERS

Los primers fueron diseñados a partir de la secuencia del gen de ALA-S publicada (Braidotti et al., 1993; Yomogida et., al. 1993), utilizando el programa de análisis de secuencias Oligo 4.

PRIMER 1: 5'CGCGGATCCAAGCATGCAGAAGACCTAG 3'

Este primer hibridiza con la zona 5' flanqueante del gen de ALA-S, correspondiendo la C marcada en negrita a la posición -833. Los nucleótidos presentes desde esta C hacia el 5', han sido agregados para facilitar el subclonado en los vectores correspondientes según se detalla más adelante. La secuencia subrayada corresponde a la secuencia de corte para la enzima Bam HI, el trinucleótido CGC se ha agregado al extremo 5' para

aumentar la eficiencia de corte de la enzima Bam HI (catálogo de GIBCO). El primer posee una $T_m = 55.5^\circ\text{C}$, PM 8729

PRIMER 2: 5'CCGCTCGAGGACGCTAAACCGACCAGTG 3'

Este primer hibridiza con la zona 3' de la secuencia a amplificar, dentro de la zona codificante del gen de ALA-S, correspondiendo la C marcada en negrita a la posición +42. Los nucleótidos presentes desde esta G hacia el 5', han sido agregados para facilitar el subclonado en los vectores correspondientes según se detalla más adelante. La secuencia subrayada corresponde a la secuencia de corte para la enzima Xho I, el trinucleótido CCG se ha agregado al extremo 5' para aumentar la eficiencia de corte de la enzima Xho I (catálogo de GIBCO). Este primer presenta una $T_m = 57.5^\circ\text{C}$, PM 8687.

El análisis de la secuencia determinó que el producto de amplificación (876 mer) posee un porcentaje de G+C de 61.4%.

Los primers sintetizados automáticamente fueron resuspendidos en 600 μl de agua estéril y se los extrajo con un volumen de fenol saturado en buffer Tris 100 mM pH 8. Luego de centrifugar a 5 000 x g durante 5 minutos la fase acuosa (superior), se sometió a precipitación con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol, a -20°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 10 000 x g durante 20 minutos y el pellet se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 100 μl de buffer TE. Luego se cuantificaron por lectura a 260 nm, considerando 1 OD equivalente a 33 μg y se diluyeron para obtener una solución 500 pmoles/ μl de cada uno.

C) REACCIÓN DE PCR

La reacción de amplificación de DNA por el método de PCR se realizó de acuerdo al protocolo standard descrito por Saiki y col. (1988). Para calibrar el sistema, se realizaron curvas de concentración de templado y de MgCl_2 . Las condiciones elegidas en que se desarrolló la reacción fueron: 2 μg de templado (DNA de hígado de rata), MgCl_2 2 mM, dNTP 0.4 mM cada uno, 16 pmoles de cada primer, buffer de reacción, y 5 U de Taq polimerasa en un volumen total de 50 μl . En todos los ensayos se realizaron controles sin el agregado de templado para evidenciar una posible amplificación a partir de DNA contaminante.

La reacción de amplificación cubierta con aceite mineral, se desarrolló en un termociclador Eppendorf de acuerdo al siguiente programa: 1 ciclo de 94°C 5 minutos; 35 ciclos de 94°C 1 minuto, 50°C 1 minuto y 72°C 1 minuto; 1 ciclo de 72°C durante 7 minutos y finalmente 4°C hasta el momento de analizar las muestras. El análisis se llevó a cabo por medio de electroforesis en gel de agarosa de las muestras amplificadas y por mapeo de restricción.

D) ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA

Los productos de amplificación se analizaron en gel de agarosa 1.5% en buffer TAE (Tris-acético 0.04 M, EDTA 1 mM). Una vez fundida por calor la agarosa, se le agrega bromuro de etidio 5 µg/ml concentración final. En una calle del gel se siembran 200 ng del marcador de peso molecular y masa, fago λ digerido con EcoR I y Hind III. Tanto las muestras como el marcador de peso molecular se colocan en los pocillos con buffer de siembra (azul de bromofenol 0.25%, xilene cianol FF 0.25% y glicerol 30%). La corrida se desarrolla en buffer TAE a 100 mV durante 1 hora. Las bandas obtenidas se observan por fluorescencia al U.V., y se fotografían.

E) CLONADO DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO EN BLUESCRIPT II KS+

E.1 Preparación plasmídica

Para obtener una minipreparación plasmídica se utilizó el método de Birnboim y Doly (1979). Se inocularon 2 ml de medio LB líquido (extracto de levadura 5g, peptona 10g, NaCl 5g, H₂O csp 1000 ml) conteniendo ampicilina 150 µg/ml y las bacterias se dejaron crecer durante la noche a 37°C. Las células se cosecharon por centrifugación a 5 000 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió vigorosamente en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH 8, EDTA 10 mM). Se agregó a continuación la solución II de lisis (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se agitó por inversión suavemente y se mantuvo en hielo durante 15 minutos. Luego se neutralizó con la solución III (acetato de potasio 3 M pH 5.2), agitando rápidamente y manteniendo en hielo durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10 000 x g durante 10 min, y el sobrenadante limpio se transfirió a otro tubo, donde se realizaron dos extracciones sucesivas, una con 1 volumen de fenol saturado en buffer Tris 100 mM

pH8, y otra con 1 volumen de una mezcla cloroformo-álcohol isoamílico (24:1). A continuación de cada agregado se agitó, centrifugó, y se descartó la fase orgánica (inferior). Finalmente, la solución conteniendo el plásmido, se concentró por precipitación, agregando 2 volúmenes de etanol absoluto, dejándolo 1 hora a -20°C, y centrifugando a 10 000 x g durante 10 minutos. El pellet obtenido se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 µl de buffer TE. Una alícuota de cada preparación se chequeó en gel de agarosa 1% de acuerdo a la metodología descrita anteriormente.

E.2 Corte con enzimas de restricción y ligado.

El producto de amplificación por PCR (banda única) y el plásmido bluescript II KS+, fueron sometidos a digestión en presencia de las enzimas de restricción Bam HI y Xho I a 37°C durante 2 horas. Para el caso de la reacción de amplificación se utilizaron 45 µl de reacción con 60 U de Bam HI y 75 U de Xho I. Para el vector se realizó la digestión en la siguiente relación 3 µg de DNA con 20 U de Bam HI y 24 U de Xho I. Las reacciones se corrieron luego en gel preparativo de agarosa 1%, de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. Las bandas obtenidas de fragmento y vector se cortaron del gel y se eluyeron utilizando el kit Gene Clean II (BIO 101) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una alícuota de cada extracción se corrió nuevamente en gel de agarosa 1% para cuantificar el material. Posteriormente se procedió a ligar fragmento más vector en relaciones molares 1:1 y 5:1 utilizando el kit de ligación de Amersham conteniendo T₄ DNA ligasa. La reacción se realizó a 16°C durante 1 hora. Se realizaron controles de ligación conteniendo vector solo (sin fragmento y sin ligasa), y vector con ligasa (sin fragmento).

E.3. Preparación de bacterias competentes

Se inoculan bacterias *E. coli* XL blue crecidas en placa en 5 ml de medio LB líquido, y se dejan crecer toda la noche a 37°C. Al día siguiente el cultivo se diluye diez veces en LB líquido y se continúa creciendo durante 3-4 horas a 37°C, hasta que el cultivo alcance la fase exponencial de crecimiento. Luego se enfría el cultivo en hielo durante 10 minutos y se cosechan las células en esterilidad por centrifugación a 5 000 x g durante 5 minutos. El pellet celular se resuspende en 10 ml de solución de CaCl₂ 60 mM y se mantiene en hielo durante 30 minutos. Se centrifuga nuevamente a 5 000 x g

durante 5 minutos, y el pellet celular se resuspende en 5 ml de solución CaCl_2 60 mM, glicerol 15%, y se conserva a -70°C .

E.4 Transformación de bacterias competentes

Se utilizaron las reacciones de ligación para transformar 100 μl de bacterias competentes obtenidas como se describió anteriormente. Luego de realizar la mezcla DNA más bacterias, la preparación se mantuvo en hielo durante 45 minutos, para permitir la adsorción de DNA sobre las células. Posteriormente las células se sometieron a un shock térmico de 42°C durante 2 minutos que favorece la entrada de DNA a la célula. Luego de dejarlas 10 minutos a temperatura ambiente, las bacterias se cultivaron 1 hora a 37°C en medio LB líquido. Posteriormente se centrifugó a 5 000 x g durante 5 minutos, el pellet celular se resuspendió en 100 μl de medio LB y se sembró por rastrillado en placas conteniendo medio LB agar 1.5%, ampicilina 150 $\mu\text{g/ml}$, IPTG 20 $\mu\text{g/ml}$ y X-Gal 40 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se observó el color de las colonias y se continuó trabajando con los clones blancos.

E.5 Chequeo de las colonias positivas por mapeo y secuenciación.

Las colonias blancas obtenidas luego de la transformación fueron repicadas y cada una de ellas se creció en 4 ml de medio LB líquido conteniendo ampicilina 150 $\mu\text{g/ml}$ durante toda la noche a 37°C . A partir de estos cultivos se realizaron minipreparaciones plasmídicas las que fueron analizadas por mapeo con la enzima de restricción Pvu II, luego a dos de las candidatas mas firmes de contener el fragmento apropiado se las secuenció por el método de secuenciación automática.

En la figura M.1 se muestra el mapa del plásmido bluescript II KS+ utilizado como vector y del plásmido recombinante obtenido luego del subclonado del promotor de ALA-S pALV21.

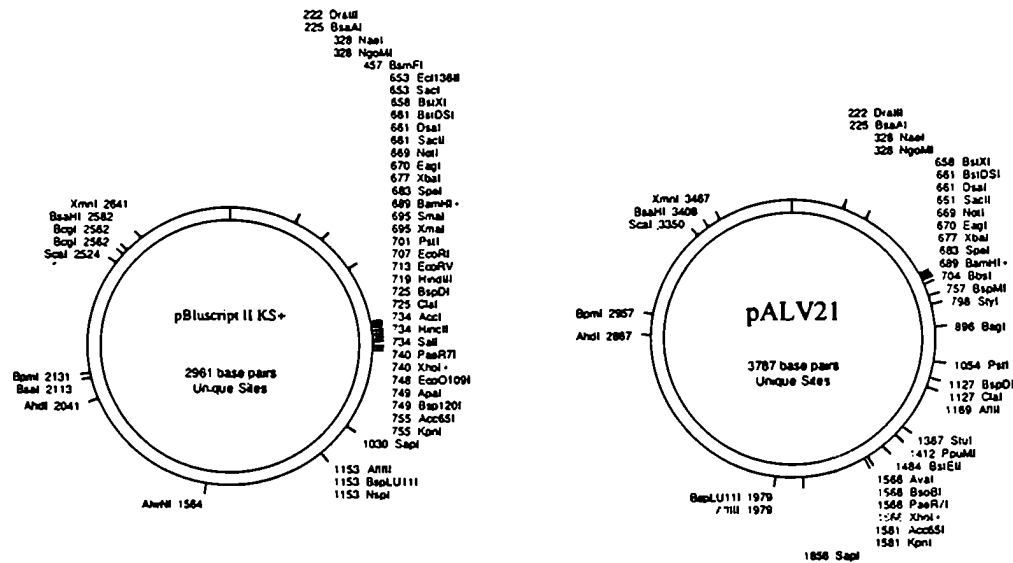


Figura M.1: Esquema de los plásmidos Bluescript II KS + y pALV21.

F) SUBCLONADO DEL PROMOTOR DE ALA-S EN pBLCAT6

Una vez obtenido el clon pALV21 que contiene fehacientemente el promotor de ALA-S clonado en los sitios Bam HI -Xho I del plásmido bluescript II KS+, dicho fragmento se subclonó en el plásmido pBLCAT6 (Boshart et al., 1992) que contiene el sitio de policlonado hacia el 5' del gen estructural de la enzima cloramfenicol acetiltransferasa (CAT). Los pasos realizados para cumplir con este objetivo fueron similares a los descritos anteriormente. Se realizaron preparaciones plasmídicas de pALV-21 y pBLCAT6, luego se digirieron con Bam HI y Xho I, se corrieron en gel de agarosa 1% y se extrajeron las bandas correspondientes a vector y fragmento con el kit de Gene Clean II. Una vez cuantificadas las muestras, se realizó la ligación y se transformaron bacterias competentes *E. coli* Nova blue. Las colonias obtenidas se repicaron, se crecieron cultivos en medio líquido a partir de los cuales se realizó minipreparación plasmídica las cuales se analizaron por mapeo de restricción. En la

Figura M.2 se muestra un esquema del pBLCAT6 y del plásmido recombinante obtenido pACAT.

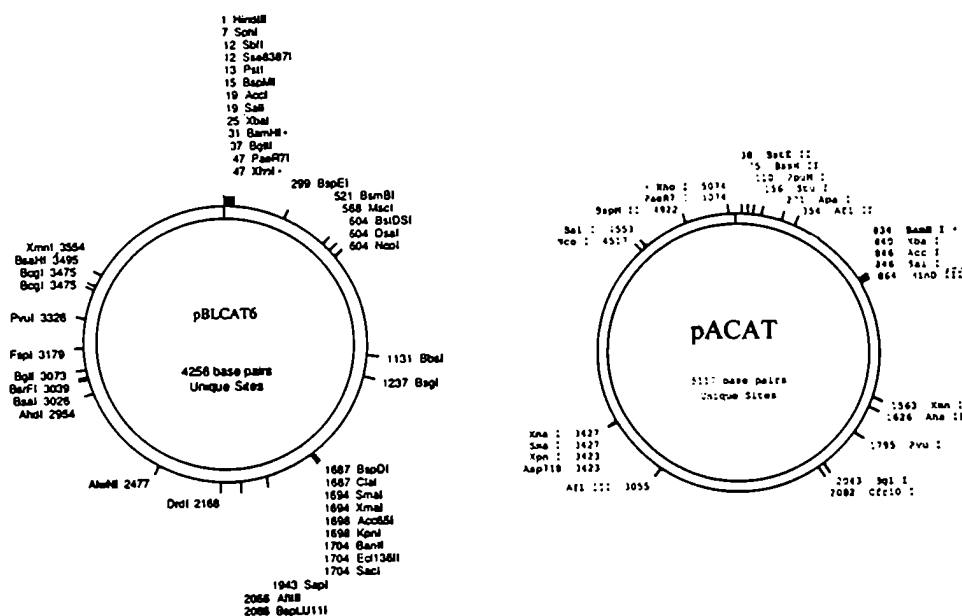


Figura M.2: Esquema representativo de los plásmidos pBLCAT6 y pACAT.

7. Medición de la actividad del promotor de ALA-S en células en cultivo.

A) CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR HepG2

Los cultivos de células de hepatoma humano HepG2 fueron mantenidos en medio MEM conteniendo Hepes 100 mM, mezcla de aminoácidos no esenciales 1%, anfotericina 1%, penicilina-estreptomicina 1% y suero fetal bovino 10%. El medio se preparó con agua bidestilada. Todas las manipulaciones de los cultivos se realizaron en estrictas condiciones de esterilidad dentro de una cámara de flujo laminar. Los cultivos se hicieron crecer en monocapa en placas de 9 cm de diámetro a 37°C y atmósfera de CO₂ 5%. Al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, los cultivos se pasaron a nuevas placas mediante el despegado de las células por tripsinización. Para ello, una vez

eliminado por aspiración el medio de cultivo, las células se lavaron con 2 ml de PBS y se las sometió a tratamiento con tripsina durante 10 minutos a 37°C. A continuación las células se resuspendieron aspirándolas y bajándolas repetidas veces a través de una pipeta de punta fina, y se diluyeron en medio MEM fresco. Luego de realizar el conteo y determinar la viabilidad celular por tinción con azul de tripán (método descripto anteriormente para la suspensión de hepatocitos), las células se plaquearon en cajas de 9 cm de diámetro con 8 ml de MEM fresco completo a una densidad de $2.5\text{-}3.5 \times 10^5$ células/ml. Para realizar los experimentos de transfección, las células fueron plaqueadas en cajas de 3.5 cm de diámetro con 3 ml de medio MEM fresco completo a una densidad de 2.5×10^5 células /ml.

Periódicamente, se prepararon suspensiones celulares de HepG₂ para conservar un stock de la línea. Para ello, una vez tripsinizadas, y cuantificadas, las células fueron centrifugadas y resuspendidas a una densidad de 5×10^6 células/ml en medio MEM completo conteniendo glicerol 10%. La suspensión se alicuotó en crioviales y se enfrió lentamente hasta una temperatura de -70°C final. A continuación se transfirieron a N₂ líquido para su preservación (Freshney, 1987).

B) PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN LAS TRANSFECCIONES

El plásmido pBLCAT6 fue utilizado como control de expresión de CAT en ausencia de la zona promotora del gen de ALA-S. El plásmido pACAT fue obtenido como se detalla anteriormente, y contiene la zona -833 a +42 del gen de ALA-S que dirige la expresión del gen reportero CAT. Este plásmido fue utilizado para estudiar la actividad promotora de dicha zona en los distintos experimentos. El plásmido RSVβgal, es un plásmido de expresión que contiene el gen de la βgalactosidasa bajo el control de un promotor fuerte del virus del sarcoma de Roux (RSV). La medición de la expresión constitutiva de βgalactosidasa, permite normalizar los valores obtenidos en la medición de CAT en cada experimento individual. El plásmido pMtCα, es un plásmido de expresión que contiene el gen de la subunidad catalítica de la quinasa de proteínas A bajo el control del promotor de la metalotioneína inducible por metales pesados (Uhler and Mc Knight, 1987). Este plásmido fue utilizado para medir la acción de la activación de la PKA en los distintos experimentos.

C) MAXIPREPARACIÓN PLASMÍDICA

Los plásmidos utilizados, en los experimentos de transfección fueron preparados mediante la utilización de un kit de maxipreparación plasmídica de Promega. Para cada preparación, se inoculó 1 l de LB conteniendo ampicilina 150 µg/ml, las bacterias se hicieron crecer a 37°C durante 16 horas. El cultivo se centrifugó a 5 000 x g durante 10 minutos y el pellet celular se resuspendió en 15 ml de la solución de resuspensión. Luego de agregarle 15 ml de solución de lisis, se mantuvo en hielo durante 15 minutos. A continuación se le adicionó 15 ml de solución neutralizante, se mantuvo en hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 10 000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante límpido se transvasó y el DNA plasmídico se precipitó con 1 volumen de isopropanol a -20°C durante 30 minutos. Luego de centrifugar a 10 000 x g durante 15 minutos el pellet se lavó con etanol 70% y luego se resuspendió en 2 ml de buffer TE. La preparación plasmídica así obtenida, se purificó en una columna conteniendo 10 ml de la resina provista por el kit. Luego de lavar con solución de lavado, y con etanol 80%, el DNA se eluyó con 1.5 ml de buffer TE, se esterilizó pasándolo a través de un filtro de poro 0.22µm. Un alícuota se cuantificó por lectura de absorbancia a 260 nm. Otra alícuota se corrió en un gel de agarosa 1% tal como se describió anteriormente, para determinar la calidad de la preparación, el resto se conservó a -20°C hasta el momento de la transfección.

D) TRANSFECCIÓN CELULAR

El cultivo celular de HepG2 que sería transfectado, se preparó de la siguiente manera. Las células fueron tripsinizadas y plaqueadas en cajas de 3.5 cm de diámetro, según se describió anteriormente, y se crecieron durante 24 horas a 37°C y atmósfera de CO₂ 5%. Al cabo de ese período, las células se adhieren a la placa y se encuentran en fase de crecimiento exponencial. Cada caja contenía aproximadamente 5 x 10⁵ células. Cuatro horas antes de realizarse la transfección se cambió el medio de cultivo por 3 ml de medio MEM fresco completo, y se continuó el crecimiento a 37°C y CO₂ 5%. La introducción de los plásmidos a las células se realizó por el método standard de precipitación con fosfato de calcio (Chen and Okayama, 1988). Para ello, se preparó en un tubo una solución de fosfato de sodio 130 mM en buffer HBS 2X (Hepes 1% pH 7,

NaCl 1.6%). Por otro lado se prepararon las distintas soluciones plasmídicas en CaCl_2 272 mM. En un experimento preliminar se determinó la cantidad de los distintos plásmidos que era necesario transfectar para obtener las actividades enzimáticas óptimas de CAT y βgal medibles en los rangos de los respectivos ensayos. En los experimentos posteriores se utilizaron las siguientes cantidades: para pBLCAT6 y pACAT 4 μg plásmido/placa, para RSV βgal 6.5 μg plásmido/placa. En los experimentos conteniendo pMtC α , los mismos se realizaron en presencia de distintas concentraciones del mismo. La cantidad de DNA se ajustó en todos los casos a 45 μg de DNA totales/placa, agregando la cantidad necesaria de DNA carrier (DNA genómico de hígado de rata 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). En cada experimento se realizaron transfecciones control, una conteniendo DNA carrier solamente, que serviría luego como blanco en la determinación de la actividad de βgal , y otra conteniendo pBLCAT6 y RSV βgal , que serviría luego como blanco en la determinación de la actividad de CAT.

Las distintas soluciones plasmídicas se agregaron por separado lentamente a la solución de fosfato de sodio, mientras se burbujeaba con un pipeteador automático. Las respectivas mezclas se mantuvieron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del precipitado. Una vez que se observó turbidez, se agregó el precipitado conteniendo los DNAs a cada caja en un volumen de 250 μl . Las cajas se rotaron 30 veces en cada dirección y las células se incubaron durante 16 horas a 37°C y CO_2 5%. Al día siguiente, se eliminó el medio de cultivo por aspiración, las células se lavaron con 2 ml de PBS, y se agregó a cada caja 3 ml de medio MEM sin suero. A continuación se adicionaron las drogas correspondientes a cada experimento y se continuó la incubación durante 24 horas en iguales condiciones. Cada experimento se realizó como mínimo tres veces independientes y por duplicado en cada una de ellas.

E) PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CELULARES

Para obtener los extractos celulares se procedió de la siguiente manera. Se descartó el medio de cultivo y se lavó cada caja 3 veces con 2 ml de PBS, descartando cada vez, y escurriendo sobre un papel de filtro. Luego se agregó 1 ml de buffer TEN (Tris 20 mM pH 8, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM) para favorecer el despegado de las células. La

capa celular se levantó utilizando un “rastrillo de células”, y se recogieron en un tubo. Luego de centrifugar a 1 000 x g durante 10 minutos a 4°C, el pellet celular se resuspendió en 200 µl de buffer Tris 250 mM pH 7.5 conteniendo glicerol 15%. Las células para ser lisadas, se sometieron a tres ciclos de 5 minutos de congelamiento en un baño etanol/hielo seco, alternados con tres ciclos de 5 minutos de descongelamiento en baño de 37°C, agitando vigorosamente cada vez. Luego de centrifugar a 1 000 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar el debris celular, el sobrenadante se dividió en dos fracciones de 100 µl cada una para la posterior determinación de proteínas y actividad de βgalactosidasa en una alícuota y determinación de actividad CAT en la otra.

F) DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de proteínas en los extractos celulares se realizó por el método colorimétrico de Bradford (1976). Se utilizaron 2 ml de reactivo de Bradford y 30 µl de extracto celular. La lectura se realizó a 595 nm.

G) DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA

La actividad de la enzima β-galactosidasa se determinó en una mezcla conteniendo 1 ml de buffer PM2 (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM y MgSO₄ 10 mM), 0.25 ml de sustrato ortonitrofenilgalactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml, 0.7 µl de βmercaptoetanol y entre 30 y 60 µl de extracto celular. La reacción se desarrolló a 37°C hasta el momento de aparición de color amarillo. En ese momento se detuvo la reacción por agregado de 0.5 ml de Na₂CO₃ 1M y se anotó el tiempo de reacción. Se leyó la absorbancia a 420 nm. La actividad específica de β-galactosidasa se calculó como (A₄₂₀ muestra - A₄₂₀ control)/minuto x mg proteína.

H) DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CLORAMFENICOL ACETILTRANSFERASA

La actividad de la enzima CAT se determinó por el método de Seed y Sheen (1988). El extracto celular, obtenido como se describió anteriormente, se sometió a 10 minutos de calentamiento a 65°C, de manera de inactivar las acetilasas endógenas, luego se

enfrió en hielo durante 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 1500 x g a 4°C para eliminar las proteínas precipitadas. La actividad de CAT se determinó en 20-30 µl del sobrenadante en una mezcla de reacción conteniendo butiril CoA 0.25 mg/ml, Tris 100 mM pH 8 y 200 nCi de cloramfenicol-³H (60 Ci/mmol, 0.01 µCi/µl). La reacción se incubó a 37°C durante 60 minutos y se detuvo con el agregado de 200 µl de xileno. Luego de agitar vigorosamente se separó la fase orgánica superior por centrifugación a 10 000 x g durante 15 minutos. Esta fase fue sometida a una extracción con 100 µl de agua. La fase orgánica resultante se colocó en viales con líquido centellante a base de tolueno, y se contó la radiactividad en un contador de centelleo líquido. La actividad específica de CAT se determinó como (dpm muestra - dpm control pBLCAT6)/ul x mg proteína. Posteriormente se calculó la relación UCAT/Uβgal que se grafica en cada caso relativa a la muestra control sin ningún agregado.

Resultados

Capítulo 1: Análisis de la expresión de ALA-S a nivel de la actividad del mRNA

A) OPTIMIZACIÓN DE LAS PREPARACIONES DE HEPATOCITOS Y RNA, Y DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL mRNA DE ALA-S.

A.1 Obtención de suspensiones de hepatocitos

Los hepatocitos obtenidos, según se detalla en Materiales y Métodos, se observaron bajo el microscopio óptico, presentando forma redondeada, de contornos bien definidos. Las suspensiones obtenidas mostraron una fracción poco significativa de células no parenquimales, eritrocitos y otros tipos celulares.

El método de aislamiento utilizado produjo un rendimiento de células hepáticas de $2.6 \pm 1.4 \times 10^6$ células/gramo de tejido hepático (promedio $\pm$ E.S. de 12 preparaciones diferentes).

La viabilidad de las suspensiones de hepatocitos, fue determinada por medición de la permeabilidad de las células al azul tripán. La viabilidad inicial, considerada como el porcentaje de células que excluyen el azul tripán, fue del $77 \pm 2\%$ (promedio $\pm$ E.S. de 12 preparaciones diferentes), y decayó entre 1 y 2% por hora y no más del 10% en las primeras ocho horas de incubación a 37°C. Por otra parte, ninguna de las sustancias agregadas afectaron significativamente el índice de viabilidad mencionado. Estos resultados nos permitieron utilizar el sistema de cultivos primarios de hepatocitos para el análisis de la expresión de ALA-S en incubaciones de hasta ocho horas.

A.2 Aislamiento de RNA total y poli (A⁺) RNA

El método de Chomczynsky y Sacchi (1987) descrito en Materiales y Métodos fue utilizado para la obtención de RNA total a partir de hígado y de suspensiones de hepatocitos. Los rendimientos (calculados a partir de la A_{260}), y el grado de pureza del RNA obtenido (determinado a partir de la relación A_{260}/A_{280}), se detallan en la Tabla 1. En la misma tabla, se observan los resultados correspondientes a la purificación del poli (A⁺) RNA a través de cromatografía de afinidad en batch, utilizando oligo dT celulosa.

Los RNAs obtenidos mostraron una relación A_{260}/A_{280} mayor a 1.7 en todos los casos indicando poseer alta pureza, y los rendimientos obtenidos fueron similares a los valores registrados para la técnica (Sambrook et al., 1989).

	HÍGADO		SUSPENSIÓN DE HEPATOCITOS	
	$\mu\text{g RNA/mg tejido}$	$\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$	$\mu\text{g RNA}/10^7 \text{ cel}$	$\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$
RNA total	2.08 ± 0.45 (n=12)	1.92 ± 0.03 (n=12)	ND	ND
poli (A+) RNA	0.054 ± 0.007 (n=12)	1.71 ± 0.19 (n=12)	2.65 ± 0.2 (n=16)	1.77 ± 0.05 (n=16)

Tabla 1: Rendimiento y pureza de RNA total y poli (A+) RNA en las preparaciones. Los RNA fueron obtenidos a partir de hígado de rata y de suspensiones de hepatocitos como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan el valor promedio $\pm$ E.S. El número de determinaciones se indica en cada caso. N.D. no se determinó.

Por otro lado, se estimó la integridad de los RNAs a través de electroforesis en gel de agarosa. Mediante esta técnica las especies de RNA se separan de acuerdo a su peso molecular, pudiéndose determinar el grado de degradación por la presencia de bandas de bajo peso molecular.

Como se muestra en la Figura 1, al correr RNA total, se observaron dos bandas mayoritarias correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S y una serie de bandas intermedias, mostrando un patrón característico de RNA no degradado (Sambrook et al., 1989). Al separar los poli (A⁺) RNA se obtuvo un patrón de bandas de distinto tamaño que comigraron con las presentes en el RNA total.

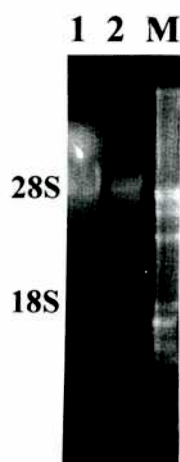


Figura 1: Integridad de RNA total y poli (A+) RNA. Corrida electroforética en gel de agarosa 1%. Calle 1: 20 µg RNA total; calle 2: 5 µg de poli (A+) RNA aislados de tejido hepático como se describe en Materiales y Métodos. M: marcadores de peso molecular

A.3 Especificidad del anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar ALA-S.

La proteína ALA-S sintetizada en el sistema libre de células de germen de trigo en presencia de leucina tritiada, fue separada de los demás productos de traducción por precipitación con un anticuerpo específico y cuantificada por incorporación de marca radiactiva. El complejo antígeno-anticuerpo fue desnaturalizado y analizado en electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. En un primer experimento fue necesario corroborar la especificidad del anticuerpo, de manera que precipitara la proteína ALA-S y solamente ella. Para ello, luego de realizar la inmunoprecipitación y corrida en PAGE SDS, el gel se cortó a lo largo en fragmentos de 2 mm de ancho, y se midió la radioactividad de cada uno de ellos. Los resultados de esta determinación se muestran en la Figura 2. Como se observa, obtuvimos un pico principal, tanto en el caso de hepatocitos tratados con fenobarbital 0.6 mM y en los no tratados, que corresponde a una proteína de 57.000 D de peso molecular que migra con el mismo Rf de ALA-S purificada de hígado de rata. También se evidencia que el tratamiento de los hepatocitos con fenobarbital 0.6 mM, produce un aumento de 4.46 veces la cantidad de ALA-S sintetizada con respecto al control sin agregados. Este aspecto se analizará extensamente más adelante. De esta manera se comprobó la especificidad del sistema y en los próximos experimentos sólo se analizó la radioactividad incluída en regiones

cercanas a la zona de migración de ALA-S purificada de hígado de rata, corrida en una calle paralela a las muestras y teñida con azul de Coomasie.

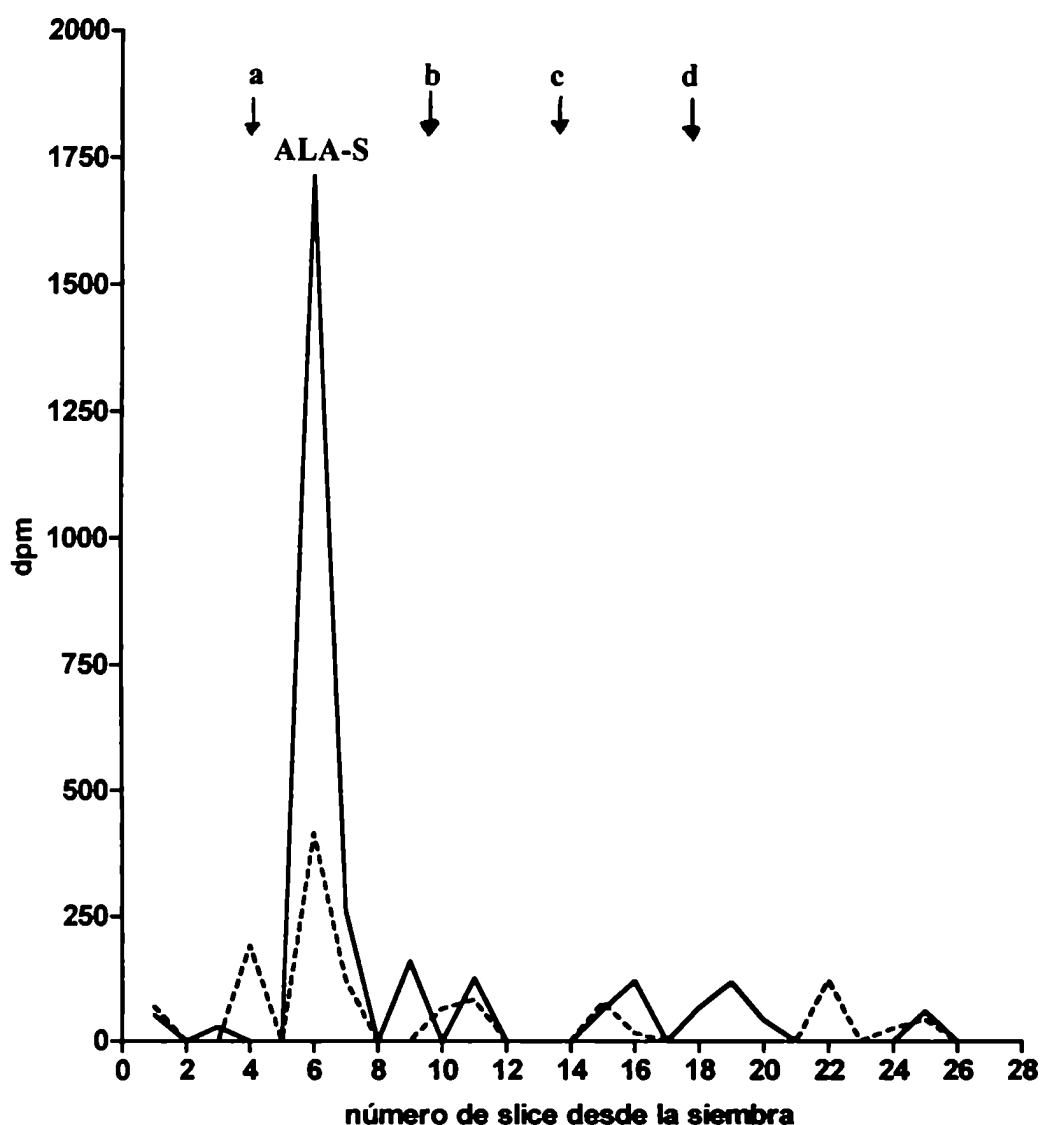


Figura 2: Localización electroforética de ALA-S sintetizada in vitro. La proteína ALA-S sintetizada in vitro a partir de mRNA aislado de hepatocitos de ratas normales incubados en presencia (—), o en ausencia (- - - -) de fenobarbital 0.6 mM durante 3 h, fue inmunoprecipitada y corrida en PAGE-SDS como se describe en Materiales y Métodos. Cada punto corresponde a la radiactividad contenida en cada trozo de gel (slice) de 2 mm de ancho. Paralelamente se corrieron proteínas marcadoras de peso molecular teñidas con azul de Coomasie: a) sero albúmina bovina (66.000), b) ovoalbúmina (45.000), c) gliceraldehído-3-fosfo-deshidrogenasa (36.000), d) anhidrasa carbónica (29.000), ALA-S: enzima purificada de hígado de rata.

A.4 Sistema de traducción in vitro

La actividad del mRNA de ALA-S se determinó mediante la evaluación de su capacidad de sintetizar proteína en un sistema de traducción in vitro de germen de trigo. Este sistema requirió ser estandarizado, considerando tres aspectos:

a) Respuesta del sistema de traducción in vitro a la cantidad de mRNA

Una de las maneras de evaluar la integridad del sistema, es verificar que el aumento en la cantidad de mRNA presente en la síntesis vaya acompañado de un aumento en la cantidad de proteína sintetizada. Para ello se realizó una curva de de proteínas totales y de ALA-S sintetizadas, en función de concentraciones crecientes de poli (A⁺) RNA presente en la reacción realizada durante 60 min a 30°C. Observamos que la radiactividad incorporada en las proteínas totales y en ALA-S fue directamente proporcional a la cantidad de mRNA agregado al sistema de traducción, según se observa en la Figura 3 A y B respectivamente.

El mRNA obtenido de hepatocitos tratados con fenobarbital 0.6 mM durante 3 h, generó un incremento de la cantidad de ALA-S sintetizada con respecto al control sin ningún tratamiento. Esto indicaría que, o bien hay más cantidad de mRNA de ALA-S, o bien el mRNA presente es traducido más eficientemente. La cantidad de proteínas totales sintetizadas a partir de RNA control es similar a la sintetizada a partir de mRNA proveniente de células tratadas con fenobarbital 0.6 mM durante 3 h, indicando que el efecto de fenobarbital es específico para la proteína ALA-S y no produce una inducción generalizada en el sistema de traducción de proteínas.

b) Tiempo de incubación

Hemos determinado también la velocidad de síntesis de proteínas en el sistema de traducción in vitro. Para ello realizamos una curva de cantidad de proteínas totales y cantidad de ALA-S sintetizadas, medidas como incorporación de leucina tritiada, en función del tiempo de reacción a partir de 40 µg/ml de poli (A⁺) RNA. Se observa en la Figura 4A que la radiactividad incorporada en las proteínas totales aumentó proporcionalmente con el tiempo de incubación del sistema de traducción in vitro, presentando una velocidad de reacción de 0.149 ± 0.0075 dpm/min para el control y 0.145 ± 0.007 dpm/min para el material proveniente de células tratadas con fenobarbital 0.6 mM. Como se observa en la Figura 4 B,

y se discutió anteriormente, el agregado de fenobarbital 0.6 mM aumenta la incorporación de ^3H leucina en ALA-S. En este caso la velocidad de síntesis de ALA-S es de 7.22 ± 1.01 dpm/min para el control, y de $24,78 \pm 3.03$ para el RNA proveniente de células tratadas con fenobarbital 0.6 mM. De esta manera se demuestra que el efecto del fenobarbital operaría específicamente sobre la expresión de ALA-S.

c) Concentración óptima de magnesio

Debido a la estricta dependencia de la actividad de traducción de los distintos mRNA con respecto a la concentración del ión magnesio, se realizaron experimentos para determinar la concentración óptima de dicho ión sobre la actividad del mRNA de ALA-S. En la Figura 5 se observa que, al analizar las proteínas totales sintetizadas, hubo una mayor actividad de síntesis cuando la reacción se realizó en presencia de concentraciones de magnesio cercanas a 2 mM. No se observaron variaciones significativas de actividad comparando la curva obtenida con mRNA proveniente de células control o de células tratadas con fenobarbital 0.6 mM. Sin embargo, cuando se determinó la actividad traduccional del mRNA de ALA-S, se observa que con mRNA proveniente de hepatocitos incubados con fenobarbital 0.6 mM ésta fue significativamente mayor que en el control. La máxima actividad se obtuvo utilizando una concentración de 3 mM Mg^{2+} .

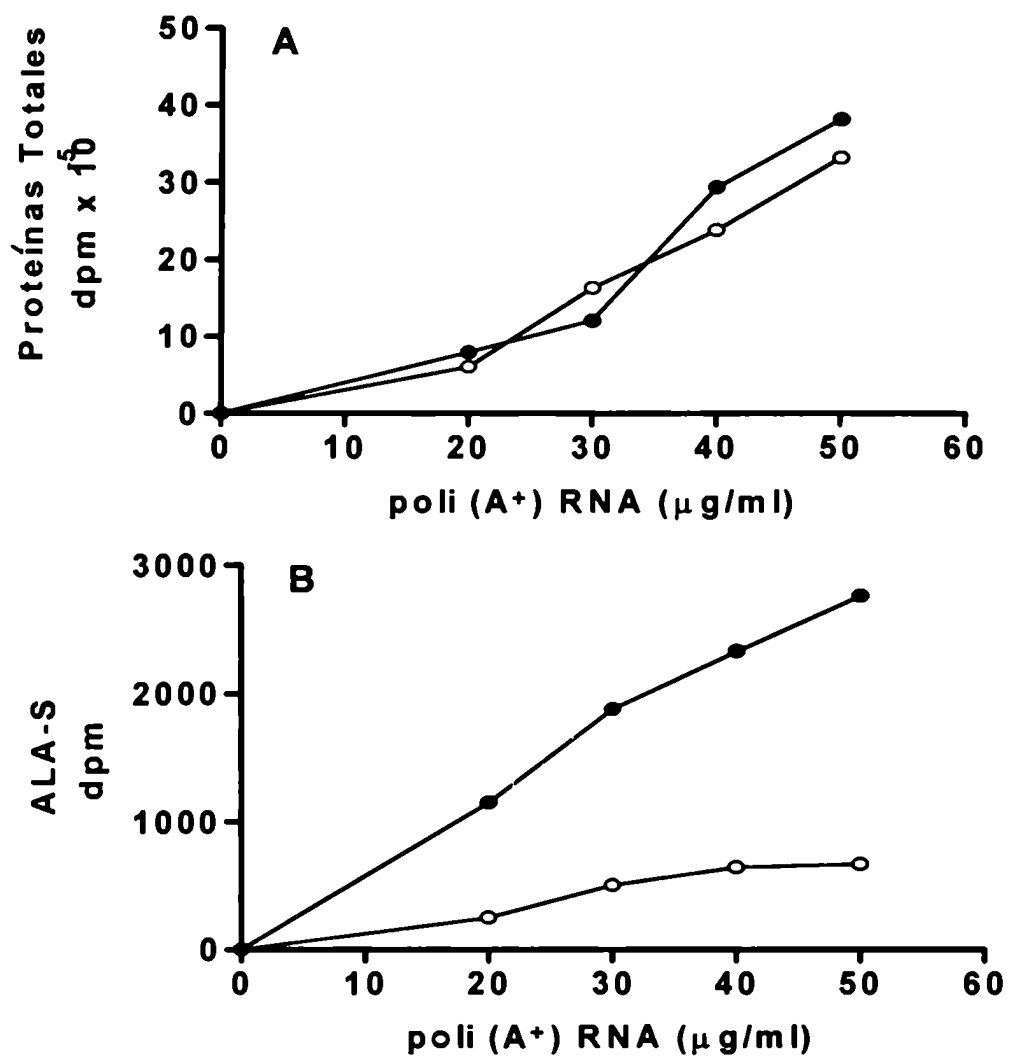


Figura 3: Respuesta del sistema de traducción *in vitro* al aumento de mRNA. El mRNA aislado de hepatocitos tratados en ausencia (O) o en presencia (●) de fenobarbital 0.6 mM fue traducido *in vitro* según se describe en Materiales y Métodos. Las dpm representan la incorporación de leucina tritiada en proteínas totales (A), y en ALA-S (B) sintetizadas *in vitro* durante 60 min a 30°C.

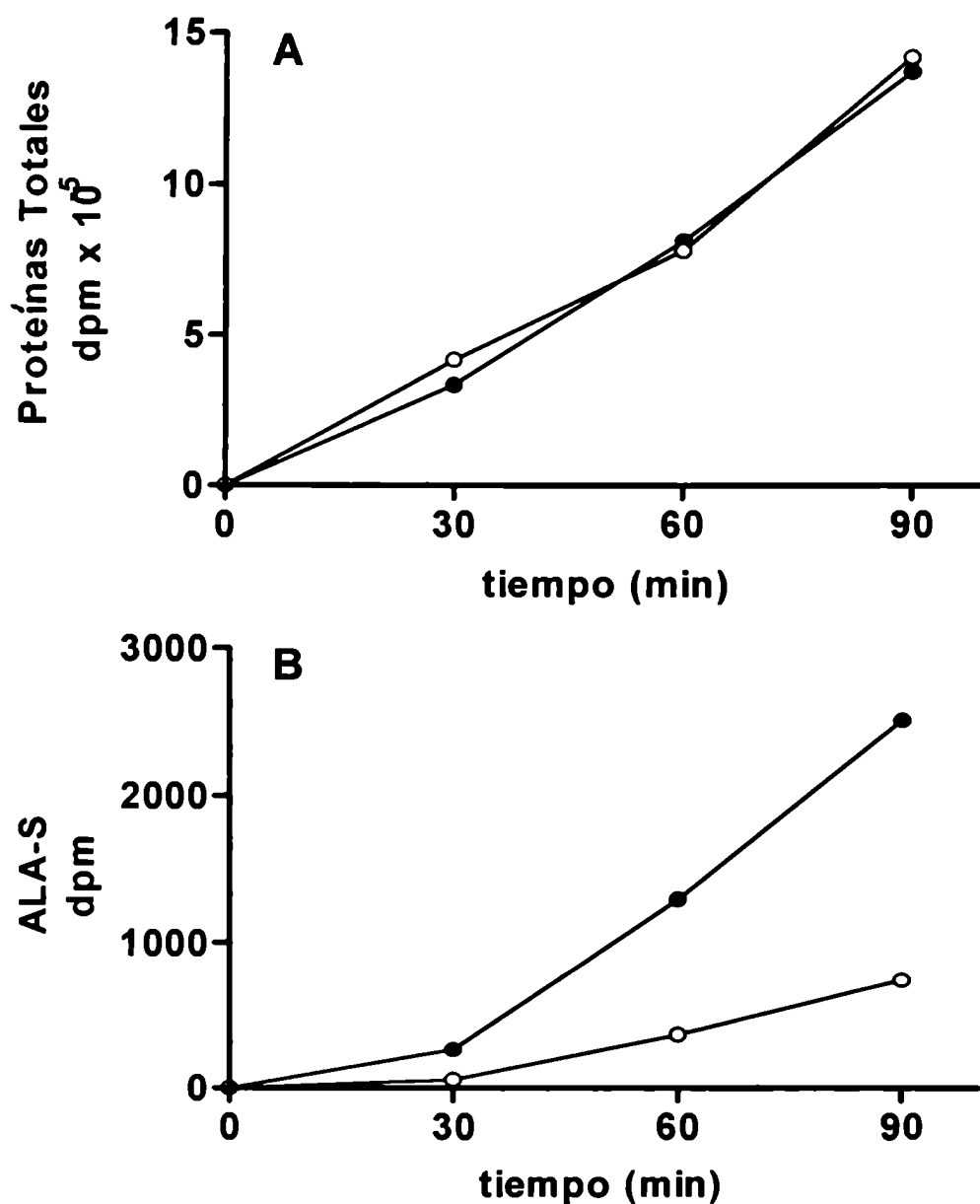


Figura 4: Dependencia del sistema de traducción *in vitro* con el tiempo de reacción. El mRNA aislado de hepatocitos tratados en ausencia (O) o en presencia (●) de fenobarbital 0.6 mM fue traducido *in vitro* según se describe en Materiales y Métodos. Las dpm representan la incorporación de leucina tritiada en proteínas totales (A), y en ALA-S (B) sintetizadas *in vitro* a 30°C con 40 µg/ml de mRNA.

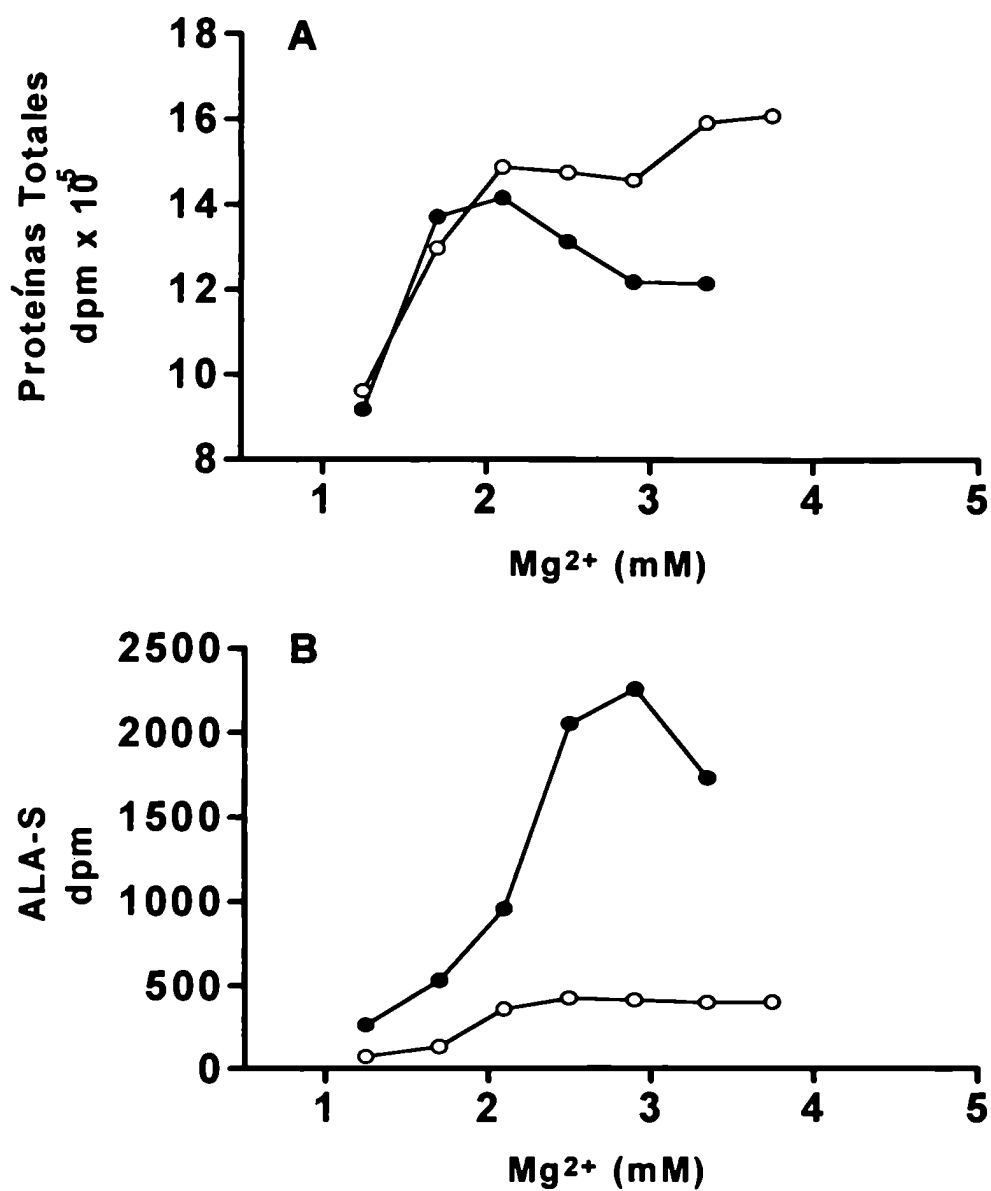


Figura 5: Respuesta del sistema de traducción *in vitro* al aumento de Mg²⁺. El mRNA aislado de hepatocitos tratados en ausencia (O) o en presencia (●) de fenobarbital 0.6 mM fue traducido *in vitro* según se describe en Materiales y Métodos. Las dpm representan la incorporación de leucina tritiada en proteínas totales (A), y en ALA-S (B) sintetizadas *in vitro* 60 min a 30°C con 40 µg/ml de mRNA.

Conclusiones

El sistema libre de células de germen de trigo, usado en varios laboratorios para estudios de traducción *in vitro* de proteínas fue inicialmente descrito por Roberts y Paterson (1973). Para su aplicación en el estudio de la actividad del mRNA de ALA-S fue necesario primero determinar las condiciones óptimas para ello.

Los resultados descriptos muestran que la proteína sintetizada *in vitro* con el sistema de germen de trigo utilizado es reconocida por anticuerpos anti ALA-S y migra exactamente igual que la enzima purificada de hígado de rata (Figura 2).

Por otra parte, se vio que el sistema de traducción responde en forma directamente proporcional al aumento en la concentración de poli (A⁺) RNA y al tiempo de incubación, encontrándose aumentos consecuentes en las proteínas totales y ALA-S sintetizadas *in vitro* (Figuras 3 y 4 respectivamente). La determinación de estas variables es importante, para asegurar la correlación entre aminoácido radioactivo incorporado en las proteínas sintetizadas y actividad del mRNA (Nickol et al., 1978).

También, del análisis de las cinéticas de síntesis de proteínas, surge que el fenobarbital carece de efecto alguno sobre la velocidad de síntesis de proteínas totales. Sin embargo, su presencia durante la incubación de los hepatocitos, produce un aumento en la incorporación de marca en la proteína ALA-S, indicando que su efecto es específico.

Otra variable estudiada fue la concentración de magnesio utilizada en la traducción *in vitro*. Se ha podido ver que la actividad de traducción de los mRNA es dependiente de dicho ión (Anderson et al., 1983). Realizando curvas de leucina tritiada incorporada en función de magnesio se ha determinado que la concentración óptima de este ión, necesaria para la máxima actividad traduccional del poli (A⁺) RNA de ALA-S, es de 3 mM.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta etapa de optimización de la determinación de la actividad de mRNA de ALA-S se utilizaron para los experimentos de traducción *in vitro* las siguientes condiciones: poli (A⁺) RNA 40 ug/ml, Mg²⁺ 3 mM (concentraciones finales en el sistema de traducción) y tiempo de incubación de 60 minutos.

B) EL FENOBARBITAL INDUCE Y EL cAMP POTENCIA LA ACTIVIDAD DEL mRNA DE ALA-S

B.1 Efecto de fenobarbital, dibutilil cAMP y 8-CPT-cAMP

En la siguiente etapa del trabajo, nos dedicamos a caracterizar el efecto del inductor fenobarbital y del segundo mensajero cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S hepática de rata.

Como se observa en la Tabla 2, la presencia de fenobarbital 0.6 mM en las suspensiones de hepatocitos produjo un aumento de la actividad del mRNA de ALA-S superior a 4 veces respecto al control. El agregado de dibutilil cAMP 100 μ M potenció casi al doble la inducción de la actividad mediada por fenobarbital. Sin embargo, el dibutilil cAMP solo no presentó efecto alguno sobre la actividad del mRNA de ALA-S. Se utilizó el derivado dibutililo con motivo de ser éste nucleótido más liposoluble. Experimentos similares fueron realizados con el derivado no metabolizable del nucleótido cíclico, el 8-CPT-cAMP. Este derivado produjo una potenciación aún mayor que el dibutilil cAMP sobre el aumento de actividad del mRNA de ALA-S mediado por fenobarbital. En ausencia del fenobarbital, el 8-CPT-cAMP tampoco presentó efecto alguno.

Los aumentos observados en la actividad del mRNA de ALA-S producidos por fenobarbital, dibutilil cAMP y 8-CPT-cAMP demostraron ser específicos para ALA-S, y no a un aumento generalizado de la síntesis de proteínas, dado que las diferencias en los valores de incorporación de marca en las proteínas totales no resultaron ser significativas.

B.2 Curva de tiempo del efecto de fenobarbital y dibutilil cAMP en la actividad del mRNA de ALA-S

El efecto de fenobarbital y dibutilil cAMP se estudió a lo largo de 4 horas de incubación. Se observa en la Figura 6 que la actividad del mRNA de ALA-S fue significativamente aumentada en suspensiones de hepatocitos incubados con fenobarbital 0.6 mM llegando a un máximo entre las 2 y 3 horas de incubación. El agregado de dibutilil cAMP 100 μ M produjo un mayor aumento de la actividad del mRNA de ALA-

S presentando una cinética similar a la obtenida en incubaciones con fenobarbital exclusivamente, con un máximo de inducción entre las 2 y 3 horas. Por otra parte se observa que el dibutiril cAMP 100 μ M solo, no modifica la actividad del mRNA hasta las 3 horas de incubación.

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD mRNA TOTAL (dpm)	ACTIVIDAD mRNA ALA-S (% del mRNA total)	ACTIVIDAD RELATIVA (% del control)
—	1 776 432 $\pm$ 113 373	0.034 $\pm$ 0.003	100
Fenobarbital 0.6 mM	1 628 714 $\pm$ 148 601	0.161 * $\pm$ 0.017	474
Dibutiril cAMP 100 μ M	1 775 780 $\pm$ 190 000	0.035 $\pm$ 0.005	103
8-CPT-cAMP 100 μ M	1 619 245 $\pm$ 280 887	0.043 $\pm$ 0.003	126
Fenobarbital 0.6 mM + dibutiril cAMP 100 μ M	1 601 779 $\pm$ 133 978	0.274 * # $\pm$ 0.026	806
Fenobarbital 0.6 mM + 8-CPT-cAMP 100 μ M	1 649 638 $\pm$ 259 337	0.338 * # $\pm$ 0.025	994

Tabla 2: Efecto de fenobarbital y derivados sintéticos del cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S. Hepatocitos de ratas normales fueron incubados durante 3 h con los tratamientos indicados. El porcentaje de actividad del mRNA total y de ALA-S se calculó según se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados representan el valor promedio $\pm$ E.S. de seis experimentos. Se utilizó el test de Student, con respecto al control sin agregados (*), y al incubado con fenobarbital 0.6 mM (#). * $p < 0.001$, # $p < 0.02$.

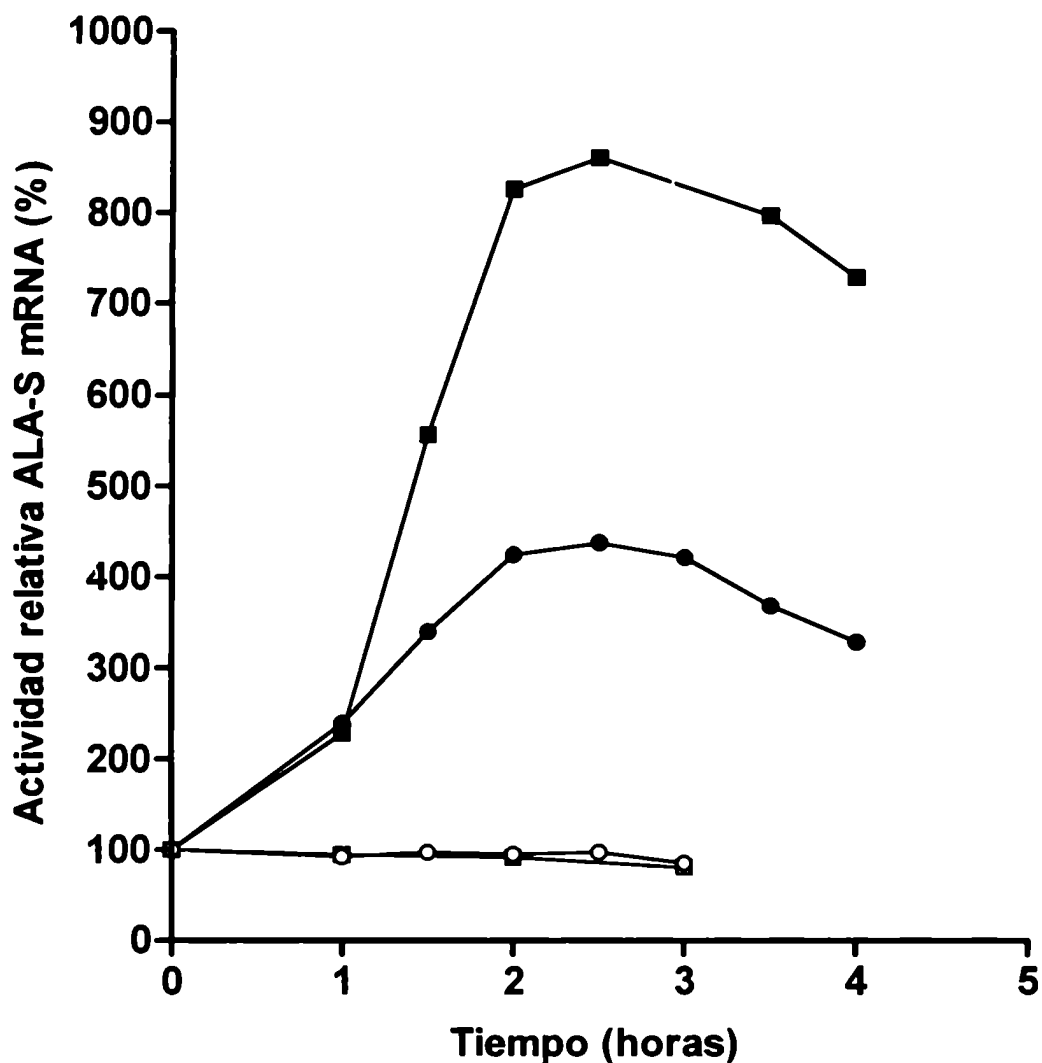


Figura 6: Curva de tiempo del efecto de fenobarbital y dibutiril cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas distintos tiempos con los agregados que siguen: (●) fenobarbital 0.6 mM, (□) dibutiril cAMP 100 μM, (■) fenobarbital 0.6 mM + dibutiril cAMP 100 μM y (O) control sin ningún agregado. Se obtuvo el mRNA y la actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad control sin agregados al tiempo cero de incubación ($0.034\% \pm 0.005$ promedio $\pm$ DS, $n=4$). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales difieren en menos del 10% del promedio.

B.3 Curva dosis respuesta de dibutilil cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S

Se analizó la respuesta del sistema a agregados crecientes de dibutilil cAMP. En la Figura 7, se observa que con una concentración 100 μ M o mayor, se obtiene el máximo efecto potenciador. La dosis necesaria para alcanzar el 50% del efecto (ID_{50}), corresponde aproximadamente a 50 μ M. Además, se observa que agregados de dibutilil cAMP hasta 1 mM no producen modificación de la actividad del mRNA de ALA-S en ausencia de fenobarbital.

B.4 Efecto del aumento intracelular de cAMP en la actividad del mRNA de ALA-S

Con el objetivo de analizar en profundidad el efecto de cAMP sobre la expresión del mRNA de ALA-S evaluamos si, en lugar de agregar cAMP exógenamente, el aumento de cAMP intracelular por tratamiento con diversos efectores, producía una respuesta similar. Para ello, se incubaron los hepatocitos con activadores de la enzima adenilil ciclasa: adrenalina, forskolina y glucagon, y con el inhibidor de la fosfodiesterasa IBMX. También se realizaron experimentos con la incubación combinada de ellos. Las concentraciones utilizadas fueron elegidas de acuerdo a estudios realizados anteriormente con mediciones de actividad enzimática de ALA-S (Cánepa et al, 1989). En todos los tratamientos se observa que, a la hora de incubación, ya se ha alcanzado el máximo nivel de cAMP endógeno. Este nivel de cAMP intracelular es aún mayor que el que se logra por incubación con dibutilil cAMP exógeno. (Figura 8). El agregado de fenobarbital 0.6 mM durante las tres horas de incubación, no modificó el contenido de cAMP celular.

Al analizar la actividad del mRNA de ALA-S, se observa que el agregado de adrenalina, forskolina, glucagon, IBMX o una mezcla de ellos remeda el efecto del agregado de dibutilil cAMP exógeno, obteniéndose una potenciación de la inducción mediada por fenobarbital cercana a 8 veces sobre el control (Tabla 3).

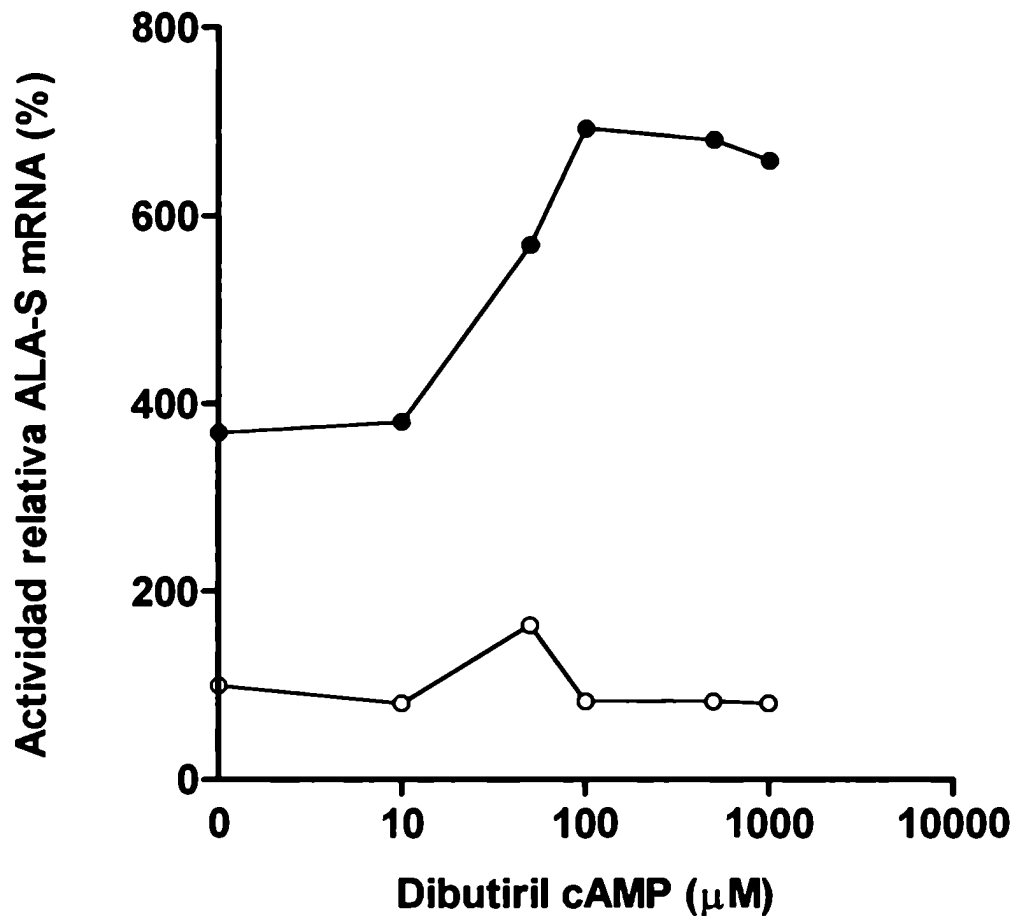


Figura 7: Curva dosis respuesta de dibutiril cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 3 h en ausencia (○), y en presencia de fenobarbital 0.6 mM (●) con distintas concentraciones de dibutiril cAMP. La actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad del control sin agregados (0.042%). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales difieren en menos del 8% del promedio

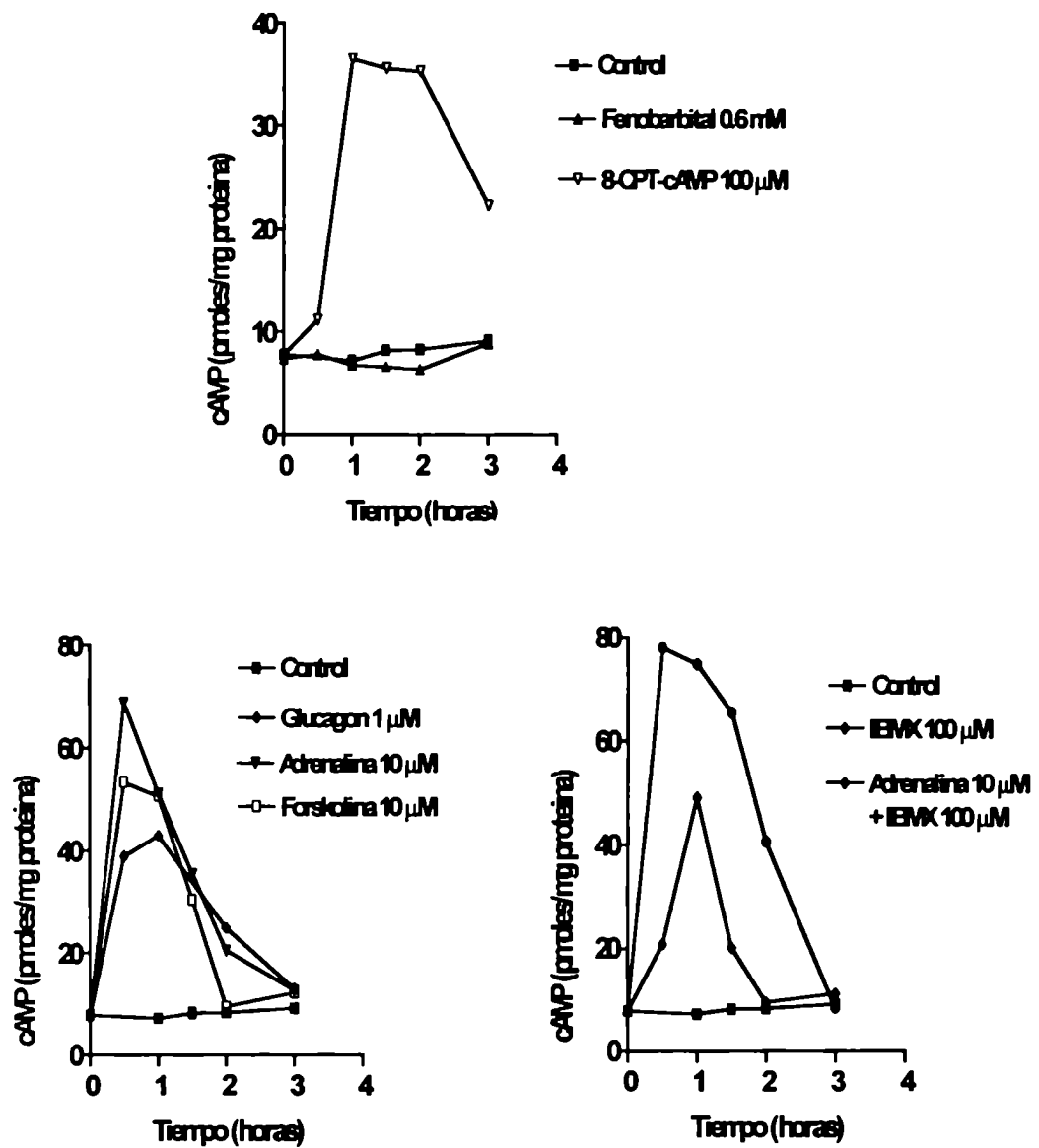


Figura 8: Determinación del contenido de cAMP endógeno. Células hepáticas fueron incubadas durante 3 h con los agregados indicados en la figura. El contenido de cAMP se determinó según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en pmoles de cAMP/mg de proteínas.

Tratamiento	Actividad mRNA ALA-S (%del mRNA total)		
	ninguno	fenobarbital 0.6 mM	n veces
—	0.036 - 0.039	0.157 - 0.164	4.0 - 4.6
Dibutiril cAMP 100 μ M	0.034 - 0.036	0.263 - 0.285	7.3 - 8.4
Glucagon 1 μ M	0.040 - 0.044	0.330 - 0.340	7.5 - 8.5
Adrenalina 10 μ M	0.043 - 0.049	0.377 - 0.405	7.7 - 9.4
Forskolina 10 μ M	0.043 - 0.045	0.350 - 0.372	7.8 - 8.6
IBMX 100 μ M	0.044 - 0.049	0.294 - 0.318	6.0 - 7.2
Adrenalina 10 μ M + IBMX 100 μ M	0.043 - 0.047	0.333 - 0.371	7.1 - 8.6

Tabla 3: Efecto del aumento intracelular de cAMP en la actividad del mRNA de ALA-S. Hepatocitos de ratas normales fueron incubados durante 3 h con los agregados indicados. Se obtuvo el mRNA total y la actividad del mRNA de ALA-S se determinó según se detalla en Materiales y Métodos. Se muestran los resultados de dos experimentos realizados por duplicado. n: indica el número de veces de inducción con respecto a la actividad control sin ningún agregado.

B.5 Efecto de hemo sobre el mRNA de ALA-S.

Como se analizó en la introducción, el hemo ejerce una acción inhibitoria sobre la ALA-S, en distintos niveles según los autores consultados: regulando la entrada de la proteína a la mitocondria, regulando la vida media del mRNA o regulando su transcripción.

En estos experimentos, se quiso analizar el efecto del hemo tanto sobre la inducción del mRNA de ALA-S ejercida por fenobarbital, como sobre la potenciación operada por dibutiril cAMP. Como se observa en la Figura 9A, la presencia de hemo 2 μ M produce un marcado descenso de la actividad del mRNA de ALA-S en presencia de fenobarbital y de éste más dibutiril cAMP.

B.6 Efecto de cicloheximida sobre el mRNA de ALA-S.

Con el objetivo de profundizar el mecanismo por el cual fenobarbital y dibutiril cAMP ejercen su acción sobre el mRNA de ALA-S, hemos analizado si dichos efectos son dependientes de la síntesis de proteínas. Para ello incubamos las suspensiones hepáticas con el inhibidor de la síntesis proteica, cicloheximida. En estos experimentos observamos que la presencia de cicloheximida 10 μ M produce un leve aumento del nivel basal del mRNA de ALA-S. Sin embargo, cuando analizamos la actividad del mRNA de ALA-S en células inhibidas con cicloheximida y en presencia de fenobarbital 0.6 mM y/o de dibutiril cAMP 100 μ M obtuvimos una significativa reducción de la actividad de dicho mensajero (Figura 9B). Estos resultados indicarían que los efectos ejercidos por fenobarbital y dibutiril cAMP requerirían de la síntesis de proteínas.

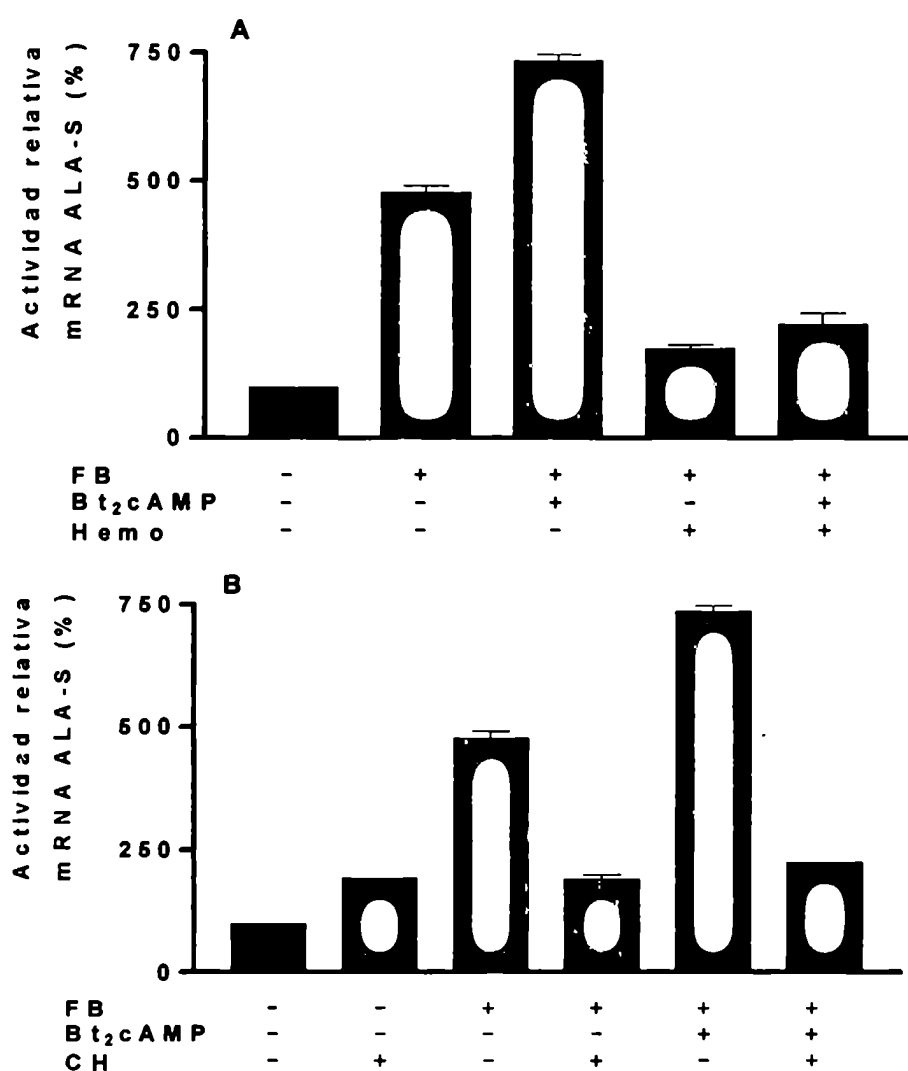


Figura 9: Efecto de hemo y cicloheximida sobre el mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 3 h con los agregados indicados en la figura. El agregado de CH se realizó media hora antes del tiempo cero. FB, fenobarbital 0.6 mM; Bt₂cAMP, dibutilil cAMP 100 μ M; Hemo, hemo 2 μ M; CH, cicloheximida 10 μ M. La actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad del control sin agregados (0.038%). Cada punto representa el promedio $\pm$ ES de tres experimentos independientes.

C) LA GLUCOSA INHIBE LA ACTIVIDAD DEL mRNA DE ALA-S INDUCIDA POR FENOBARBITAL

C.1 Efecto de la glucosa en la actividad del mRNA de ALA-S.

En los siguientes experimentos, nos hemos abocado al estudio de los mecanismos moleculares que conllevan a la manifestación del llamado efecto glucosa que opera sobre ALA-S. Trabajos previos demostraron que la presencia de glucosa inhibe la actividad enzimática de ALA-S en hepatocitos de ratas normales (Cánepa et al., 1984, 1985a), así es que decidimos profundizar el análisis a nivel de la actividad del mRNA de ALA-S.

En la Tabla 4 se observa, como ya se describió anteriormente, que la incubación de los hepatocitos con fenobarbital 0.6 mM produce una inducción de la actividad del mRNA de ALA-S de más de cuatro veces. El agregado de glucosa 80 mM en presencia de fenobarbital produce un decremento en dicha actividad de aproximadamente el 75%.

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD mRNA TOTAL (dpm x 10 ⁶)	ACTIVIDAD mRNA ALA-S (% del mRNA total)	ACTIVIDAD RELATIVA (% del control)
—————	1.83 ± 0.23	0.033 ± 0.006	100
Fenobarbital 0.6 mM	1.96 ± 0.30	0.140 ± 0.039*	424
Glucosa 80 mM	1.95 ± 0.17	0.029 ± 0.005	88
Fenobarbital 0.6 mM + Glucosa 80 mM	1.87 ± 0.35	0.049 ± 0.011	148

Tabla 4: Efecto de fenobarbital y glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S. Hepatocitos de ratas normales fueron incubados durante 3 h con los tratamientos indicados. El porcentaje de actividad de mRNA total y de ALA-S se calculó según se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados representan el valor promedio ± el E.S. de seis experimentos. Se utilizó el test de Student, con respecto al control sin agregados * p < 0.01.

Sin embargo la glucosa no produce alteraciones significativas de la actividad de este mensajero en condiciones basales. En cuanto a la incorporación de leucina tritiada en proteínas totales, es decir la medición de actividad del mRNA total, no se observa alteración alguna en presencia de glucosa con o sin fenobarbital, indicando de este modo que el efecto producido es específico para el mRNA de ALA-S.

C.2 Curva de tiempo del efecto de fenobarbital y glucosa en la actividad del mRNA de ALA-S.

El efecto inhibitorio de la glucosa fue analizado a lo largo de 3 horas de incubación. En la Figura 10, se observa que durante un período lag de 30 minutos la pendiente de la curva obtenida en ausencia o en presencia de glucosa es la misma. Luego, la presencia de glucosa 80 mM produce una significativa inhibición del 75% de la inducción en la actividad del mRNA de ALA-S mediada por fenobarbital, que permanece hasta las 3 horas de incubación. La presencia de glucosa 80 mM no presentó efecto alguno, durante los tiempos ensayados, sobre la actividad del mRNA de ALA-S basal.

C.3 Efecto de la preincubación con glucosa sobre el mRNA de ALA-S inducido con fenobarbital.

Como se ha analizado en la introducción, hay numerosos reportes que avalan la hipótesis que una vez que la glucosa ingresa a la célula, es inmediatamente transformada por diversos caminos metabólicos en intermediarios que actúan sobre las vías de regulación celular y modulan la expresión de distintos genes (Mitancher, et al. 1997).

Dado que en la curva de tiempo de la Figura 10 pudimos observar una fase lag de 30 min en la acción de la glucosa, en el siguiente experimento, quisimos evaluar si la acción de la glucosa sobre el mRNA de ALA-S requiere de la síntesis previa de un metabolito intermediario, o si ésta actúa directamente. Para ello, preincubamos las suspensiones hepáticas durante 1 hora en presencia de glucosa 80 mM. Las muestras control fueron preincubadas en ausencia de glucosa. Al tiempo cero, se adicionó glucosa más fenobarbital y se midió a distintos tiempos la actividad del mensajero de

ALA-S. Como se observa en la Figura 11, en ambos casos se obtiene una reducción en la actividad del mRNA de ALA-S (comparar con la curva de tiempo obtenida con fenobarbital de la Figura 10). Sin embargo, la pendiente de la curva de inhibición ejercida por la glucosa en las muestras preincubadas con glucosa, es marcadamente mayor que en el control donde la preincubación se desarrolló en ausencia de glucosa. Estos resultados refuerzan la idea que se requiere de la síntesis de un metabolito intermediario en la acción de la glucosa sobre el mRNA de ALA-S.

C.4 Curva dosis respuesta de glucosa en la actividad del mRNA de ALA-S.

Se evaluó el efecto inhibitorio causado por la presencia de glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S inducida por fenobarbital, en concentraciones crecientes del monosacárido. El efecto inhibitorio es dosis dependiente presentando un rango de acción entre 20-160 mM (Figura 12). El efecto inhibitorio máximo se obtiene con concentraciones de 80 mM o mayores, siendo 35 mM la concentración necesaria para obtener la mitad del efecto inhibitorio máximo.

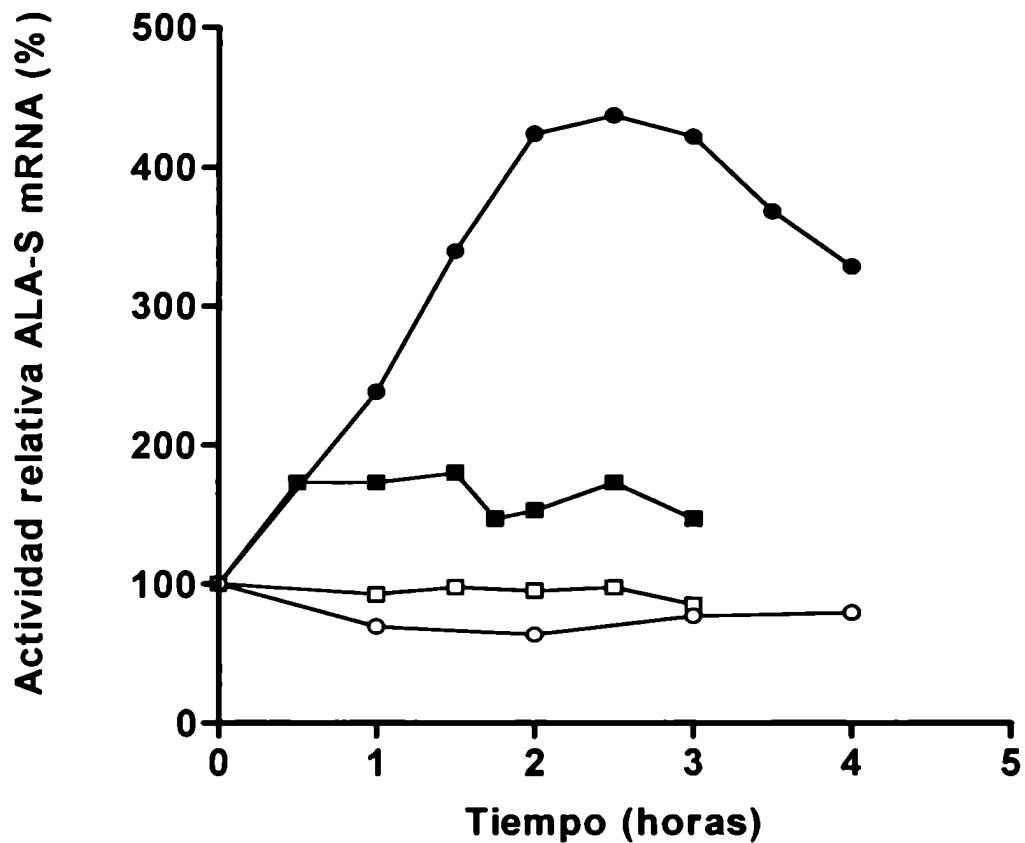


Figura 10: Curva de tiempo del efecto de fenobarbital y glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas distintos tiempos con los agregados que siguen: (●) fenobarbital 0.6 mM, (□) glucosa 80 mM, (■) fenobarbital 0.6 mM + glucosa 80 mM y (○) control sin ningún agregado. Se obtuvo el mRNA y la actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad control sin agregados al tiempo cero de incubación (0.041%). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales difieren en menos del 8% del promedio.

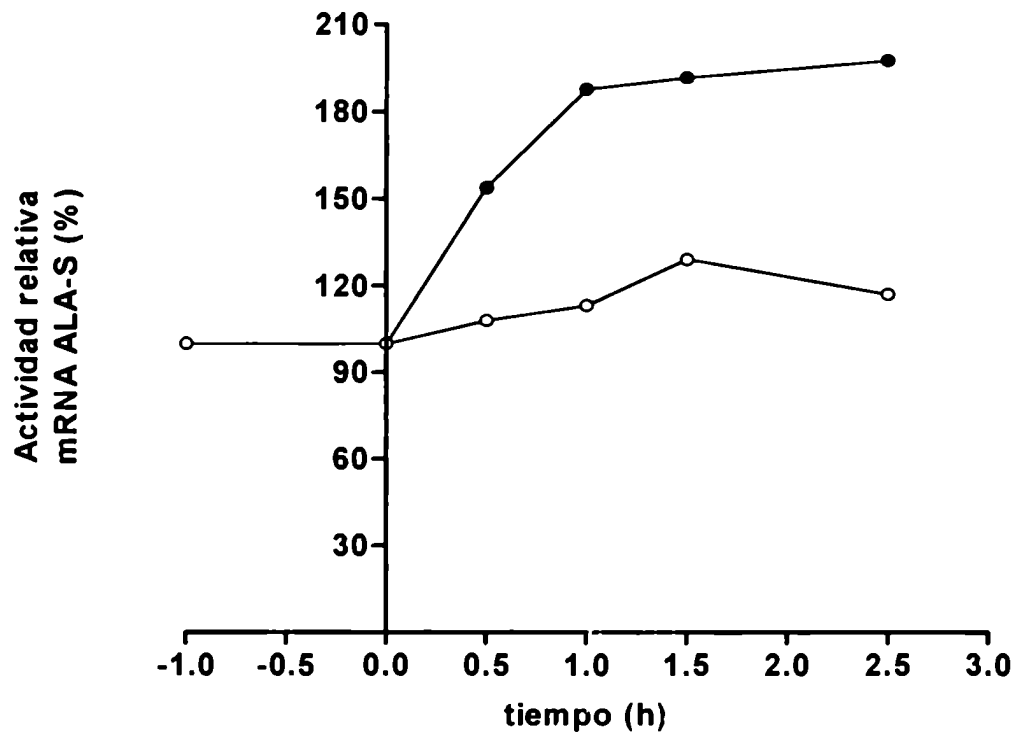


Figura 11: Efecto de la preincubación con glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos fueron preincubadas en presencia (○), o en ausencia (●) de glucosa 80 mM durante 1 h. Luego las muestras fueron incubadas distintos tiempos con el agregado de fenobarbital 0.6 mM y glucosa 80 mM. Se obtuvo el mRNA y la actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad control sin agregados al tiempo cero de incubación (0.026%). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales difieren en menos del 12% del promedio

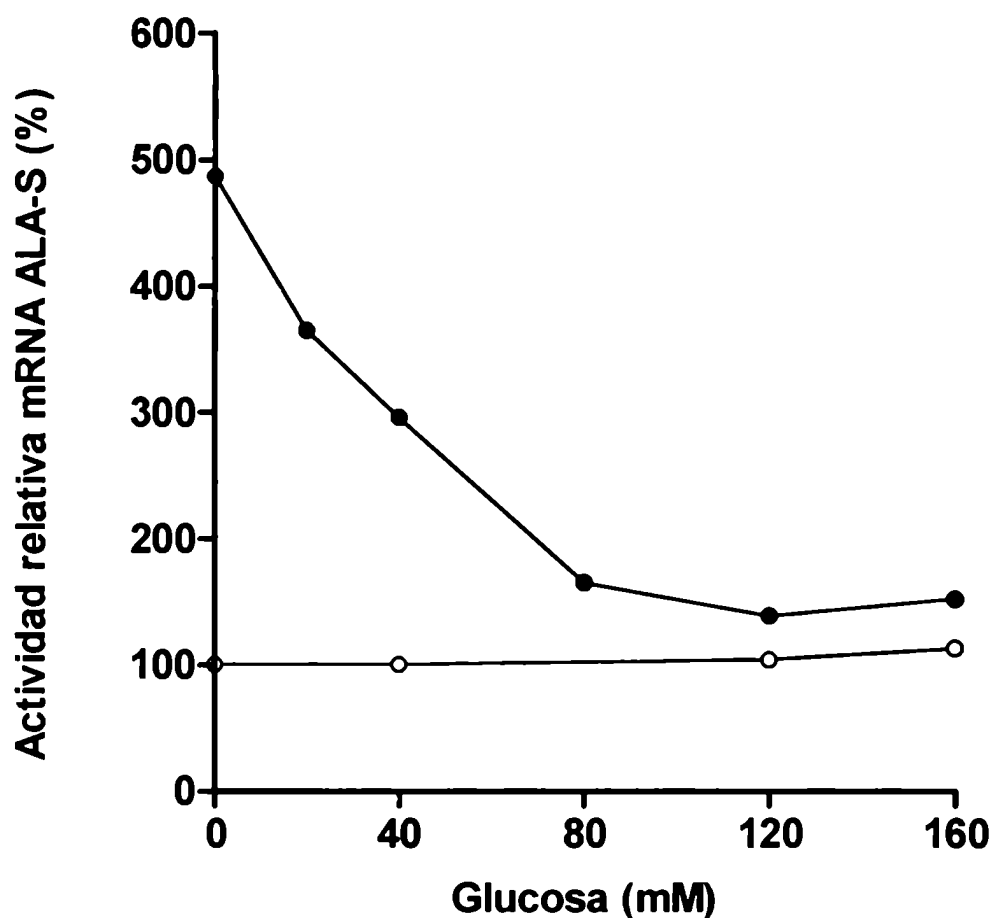


Figura 12: Curva dosis respuesta de glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S. Suspensiones hepáticas fueron incubadas durante 3 h en presencia (●), y en ausencia (○) de fenobarbital 0.6 mM, con distintas concentraciones de glucosa. La actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad control sin agregados (promedio $\pm$ E.S.) 0.040 ± 0.005 ($n=4$). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales difieren en menos del 10% del promedio.

D) LA INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL mRNA DE ALA-S POR FENOBARBITAL ES MAYOR EN HEPATOCITOS DIABÉTICOS QUE EN NORMALES.

D.1 Efecto de fenobarbital y cAMP en la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas.

El efecto de la droga porfirinogénica fenobarbital y del cAMP fue analizada en hepatocitos provenientes de ratas diabéticas por tratamiento con estreptozotocina. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de mediciones de actividad del mRNA de ALA-S.

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD mRNA TOTAL (dpm)	ACTIVIDAD mRNA ALA-S (% del mRNA total)	ACTIVIDAD RELATIVA (% del control)
—	1 737 650 ± 170 676	0.039 ± 0.003	100
Fenobarbital 0.6 mM	1 737 650 ± 127 629	0.294 * ± 0.033	753
Dibutiril cAMP 100 µM	1 696 115 ± 126.941	0.0356 ± 0.005	91
Fenobarbital 0.6 mM + dibutiril cAMP 100 µM	1 641 462 ± 136 550	0.274 * ± 0.006	703

Tabla 5: Efecto de fenobarbital y dibutiril cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas. Hepatocitos de ratas diabéticas por tratamiento con estreptozotocina fueron incubados durante 3 h con los tratamientos indicados. El porcentaje de actividad del mRNA total y de ALA-S se calculó según se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados representan el valor promedio ± el E.S. de seis experimentos. Se utilizó el test de Student, con respecto al control sin agregados (* $p < 0.001$).

Sorprendentemente, la presencia de fenobarbital 0.6 mM induce la actividad del mRNA de ALA-S más de siete veces, alcanzando niveles comparables de inducción al que, según se mostró anteriormente, observamos en los hepatocitos de ratas normales incubados con fenobarbital y dibutiril cAMP. La presencia de dibutiril cAMP 100 μ M en los incubados de hepatocitos diabéticos no muestran efecto alguno sobre el nivel basal, ni sobre el nivel inducido por fenobarbital 0.6 mM. Por lo tanto, se observa que la adición de fenobarbital desencadenaría el máximo de inducción alcanzado en la actividad del mRNA, no respondiendo el sistema al agregado de dibutiril cAMP. Nuevamente, la actividad del mRNA total determinada no difiere con los distintos tratamientos.

D.2 Curva de tiempo del efecto de fenobarbital y dibutiril cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas.

Se realizaron ensayos de medición de actividad de mRNA total y de ALA-S en presencia de fenobarbital y dibutiril cAMP a distintos tiempos, hasta cuatro horas de incubación, con hepatocitos de ratas diabéticas. Como se muestra en la Figura 13, la presencia de fenobarbital 0.6 mM produce un incremento marcado de la actividad del mRNA de ALA-S con un máximo entre las 2.5-3 horas. El agregado de dibutiril cAMP no potencia dicha inducción en los tiempos analizados, presentando una curva de inducción similar a la obtenida cuando los hepatocitos son incubados con fenobarbital solamente. La presencia de dibutiril cAMP, no modifica el nivel de actividad basal.

D.3 Curva dosis respuesta de dibutiril cAMP en la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas.

Se analizó la respuesta del sistema a agregados crecientes de dibutiril cAMP. En la Figura 14, se observa que la presencia de dibutiril cAMP en las incubaciones de hepatocitos de ratas diabéticas, no produce alteración en el nivel de actividad del mRNA de ALA-S basal o inducido con fenobarbital 0.6 mM en ninguna de las concentraciones analizadas. En este sistema se observa que la presencia de fenobarbital 0.6 mM es suficiente para desarrollar el efecto inductor máximo sobre la actividad del mRNA de ALA-S.

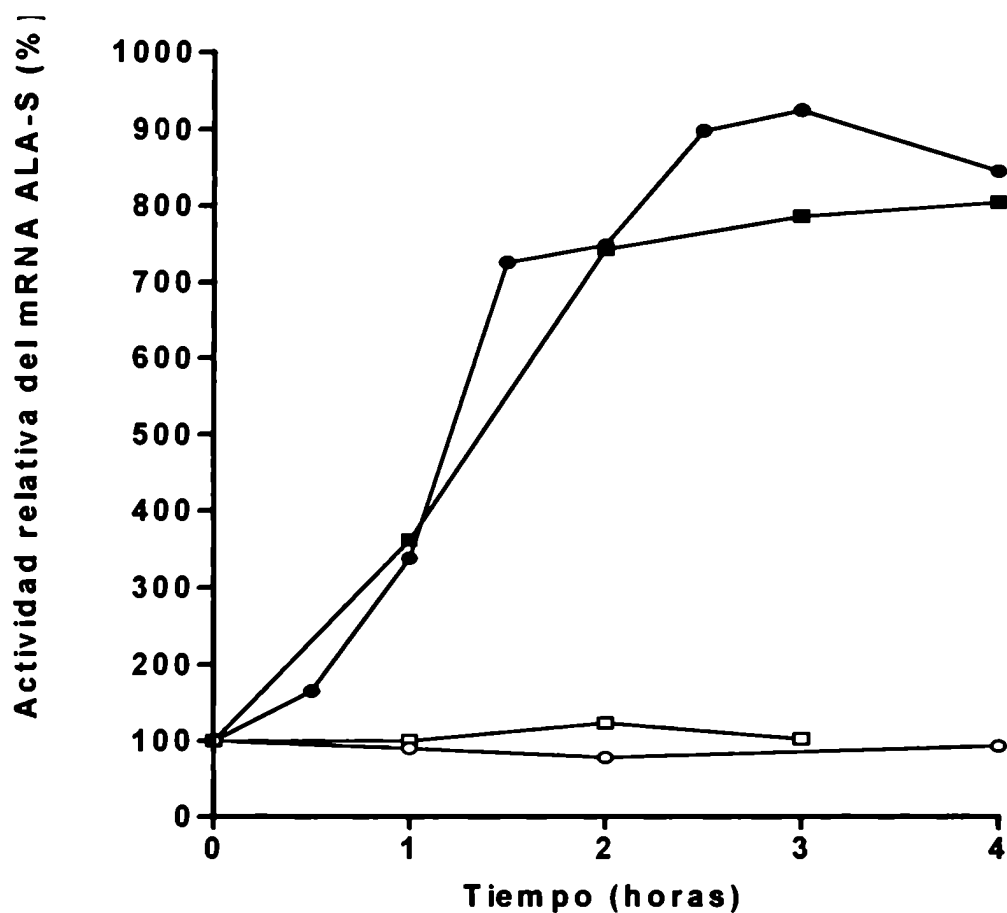


Figura 13: Curva de tiempo del efecto de fenobarbital y dibutiril cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas distintos tiempos con los agregados que siguen: (●) fenobarbital 0.6 mM, (□) dibutiril cAMP 100 μ M, (■) fenobarbital 0.6 mM + dibutiril cAMP 100 μ M y (○) control sin ningún agregado. Se obtuvo el mRNA y la actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad control sin agregados al tiempo cero de incubación (0.044%). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales difieren en menos del 8% del promedio.

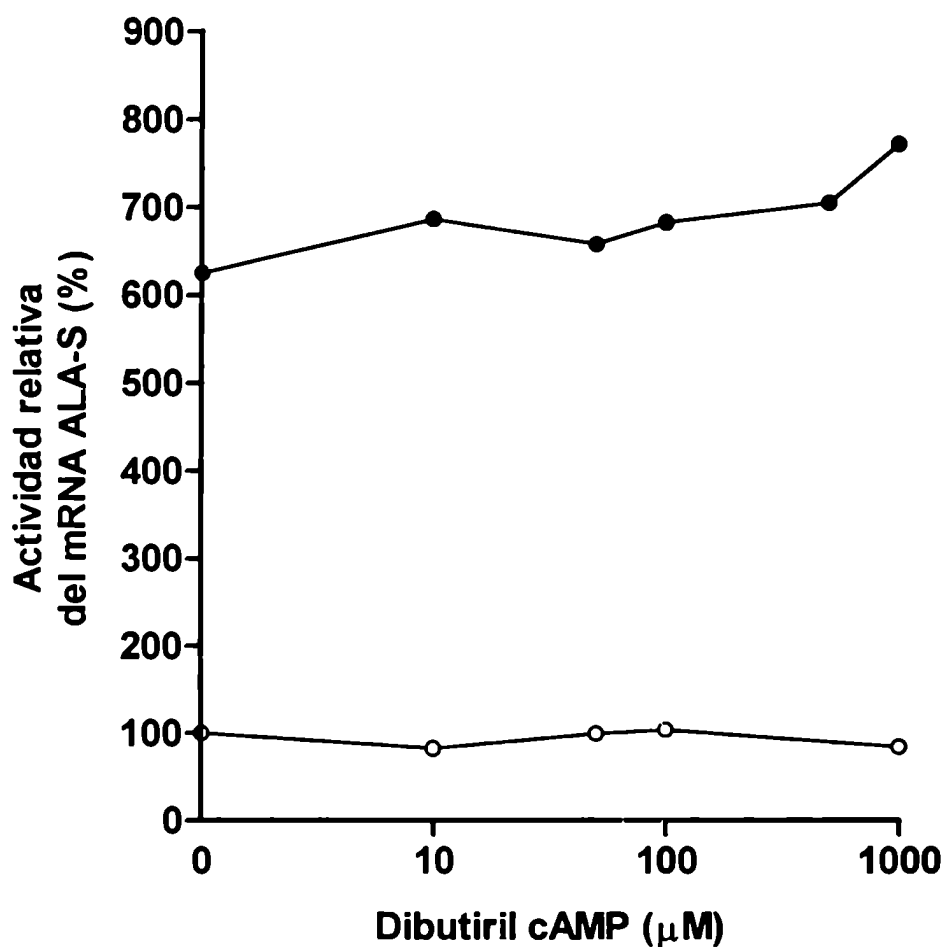


Figura 14: Curva dosis respuesta de dibutiril cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas. Suspensiones de hepatocitos de ratas diabéticas fueron incubadas durante 3 h en ausencia (○), y en presencia de fenobarbital 0.6 mM (●), con distintas concentraciones de dibutiril cAMP. La actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad control sin agregados (0.0375%). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales difieren en menos del 10% del promedio.

E) LA GLUCOSA NO INHIBE LA ACTIVIDAD DEL mRNA DE ALA-S EN HEPATOCITOS DE RATAS DIABÉTICAS.

Efecto de glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas.

El estado diabético produce alteraciones en la regulación del metabolismo de hidratos de carbono en células hepáticas. En esta etapa del trabajo, nos dedicamos a investigar si el aumento de la concentración de glucosa en hepatocitos provenientes de ratas con diabetes experimental afecta la actividad del mRNA de ALA-S. Hemos analizado el efecto del agregado de glucosa 80 mM a suspensiones de hepatocitos diabéticos en presencia y en ausencia de la droga porfirinogénica fenobarbital en concentración 0.6 mM. Observamos, como se discutió anteriormente, que el agregado de fenobarbital produce una inducción de la actividad del mensajero de ALA-S mayor a siete veces. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en hepatocitos de ratas normales, la presencia de glucosa 80 mM en el medio de incubación, no modificó el nivel de inducción operado por el fenobarbital. El agregado de glucosa tampoco altera el nivel de actividad del mRNA de ALA-S incubado en ausencia de fenobarbital (Tabla 6).

Por otro lado se realizó una curva de tiempo. Se analizó si la glucosa presenta algún efecto sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas a lo largo de 3 horas de incubación. En la Figura 15, se observa que la presencia de glucosa no modificó significativamente la cinética de inducción sobre la actividad del mRNA de ALA-S mediada por fenobarbital hasta las tres horas de incubación. Además la presencia de glucosa no presentó efecto alguno, en los tiempos ensayados, sobre la actividad del mRNA de ALA-S basal.

También se evaluó la actividad del mRNA de ALA-S basal e inducida por fenobarbital en hepatocitos provenientes de ratas diabéticas, en presencia de concentraciones crecientes de glucosa. Como se observa en la Figura 16, la presencia de fenobarbital 0.6 mM induce la actividad del mRNA de ALA-S más de seis veces, no afectándose este nivel de inducción por la presencia de glucosa hasta 320 mM.

De esta manera en hepatocitos de ratas diabéticas no se manifiesta el efecto inhibitorio de la glucosa descripto para células provenientes de ratas normales.

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD mRNA TOTAL (dpm x 10 ⁶)	ACTIVIDAD mRNA ALA-S (% del mRNA total)	ACTIVIDAD RELATIVA (% del control)
—	1.76 ± 0.20	0.037 ± 0.005	100
Fenobarbital 0.6 mM	1.80 ± 0.20	0.284 ± 0.064*	768
Glucosa 80 mM	1.70 ± 0.30	0.045 ± 0.007	122
Fenobarbital 0.6 mM + Glucosa 80 mM	1.78 ± 0.34	0.264 ± 0.021*	714

Tabla 6: Efecto de fenobarbital y glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas. Suspensiones de hepatocitos de ratas diabéticas fueron incubados durante 3 h con los tratamientos indicados. El porcentaje de actividad de mRNA total y de ALA-S se calculó según se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados representan el valor promedio ± E.S. de seis experimentos. Se utilizó el test de Student, con respecto al control sin agregados * p< 0.01.

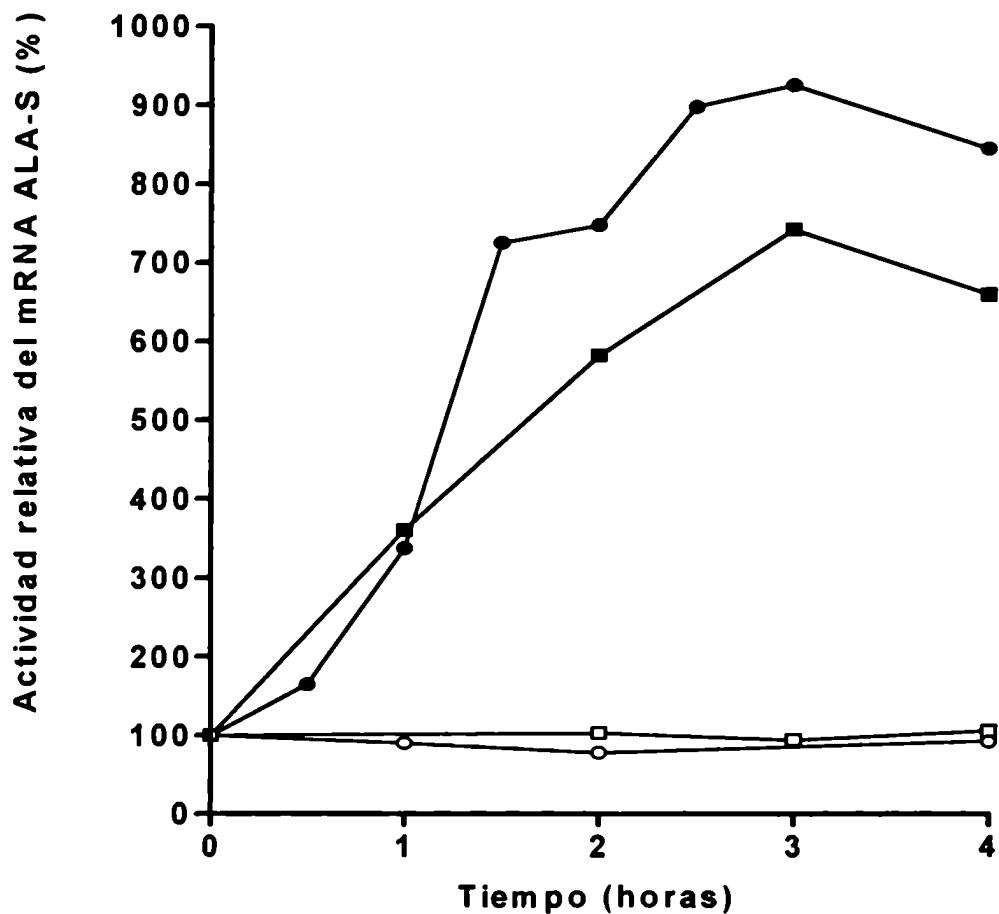


Figura 15: Curva de tiempo del efecto de fenobarbital y glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante distintos tiempos con los agregados que siguen: (●) fenobarbital 0.6 mM, (□) glucosa 80 mM, (■) fenobarbital 0.6 mM + glucosa 80 mM y (○) control sin ningún agregado. La actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad control sin agregados al tiempo cero de incubación (0.036%). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales difieren en menos del 10% del promedio.

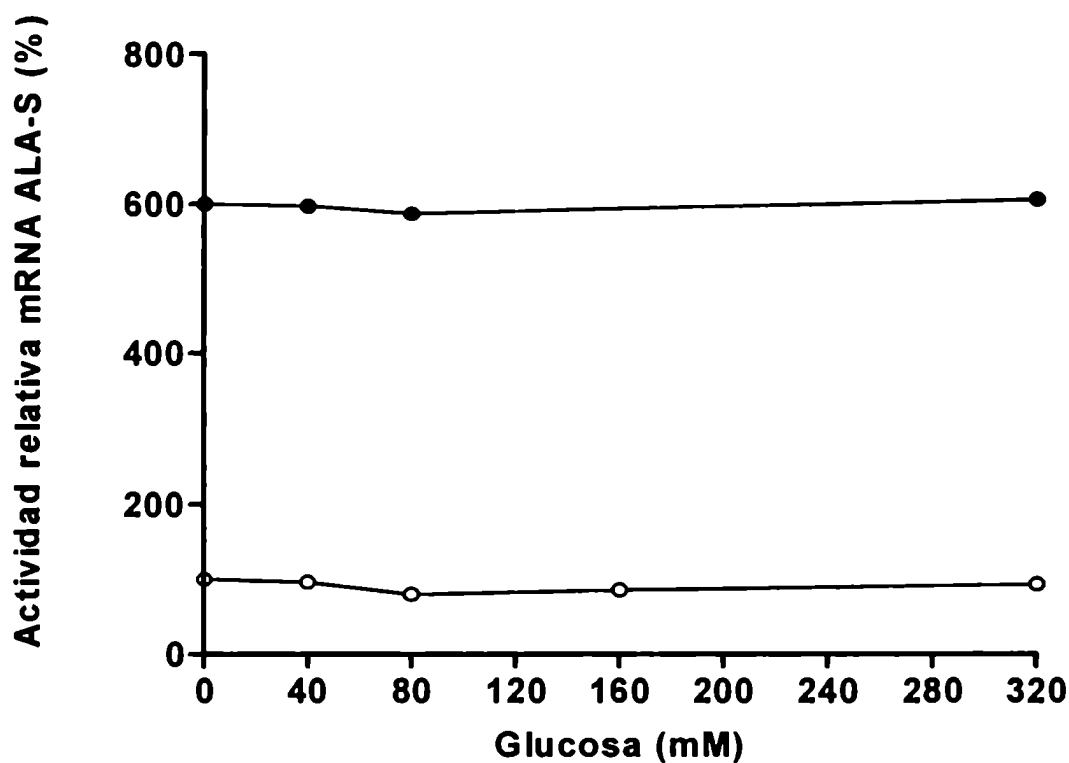


Figura 16: Curva dosis respuesta de glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas. Suspensiones de hepatocitos de ratas diabéticas fueron incubadas durante 3 h en presencia (●), y en ausencia (○) de fenobarbital 0.6 mM con distintas concentraciones de glucosa. La actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad control sin agregados (0.049%). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales difieren en menos del 15% del promedio.

F) EL AUMENTO INTRACELULAR DE cAMP REVIERTE EL EFECTO INHIBITORIO DE LA GLUCOSA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL mRNA DE ALA-S

F.1 Efecto de dibutilil cAMP, activadores de adenilil ciclasa y de un inhibidor de la fosfodiesterasa sobre el efecto glucosa en la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas normales.

Hasta el momento, recapitulando los resultados obtenidos, hemos encontrado que la presencia de la droga porfirinogénica fenobarbital induce cerca de cuatro veces la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas normales. La presencia de dibutilil cAMP, o de drogas que aumentan el contenido de cAMP intracelular, potencian al doble la inducción operada por el fenobarbital sobre dicho mRNA, mientras que el agregado al medio de incubación de glucosa produce una inhibición de la inducción mediada por fenobarbital. El siguiente paso consistió en tratar de establecer si existe una relación entre los efectos de cAMP y glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S. Para ello realizamos una serie de experimentos incubando los hepatocitos de ratas normales en presencia de dibutilil cAMP, o drogas que aumentan el contenido de cAMP intracelular, y glucosa. En la Figura 17 se puede observar que el agregado de dibutilil cAMP 100 μ M revierte totalmente el efecto inhibitorio producido por la presencia de glucosa 80 mM, y, además, potencia la inducción mediada por fenobarbital al doble sobre la actividad del mRNA de ALA-S. Más aún, el agregado de activadores de la adenilil ciclasa, glucagon, adrenalina y forskolina, y del inhibidor de la fosfodiesterasa, IBMX, que incrementan el contenido de cAMP intracelular, también revierten el efecto inhibitorio de la glucosa de manera completa.

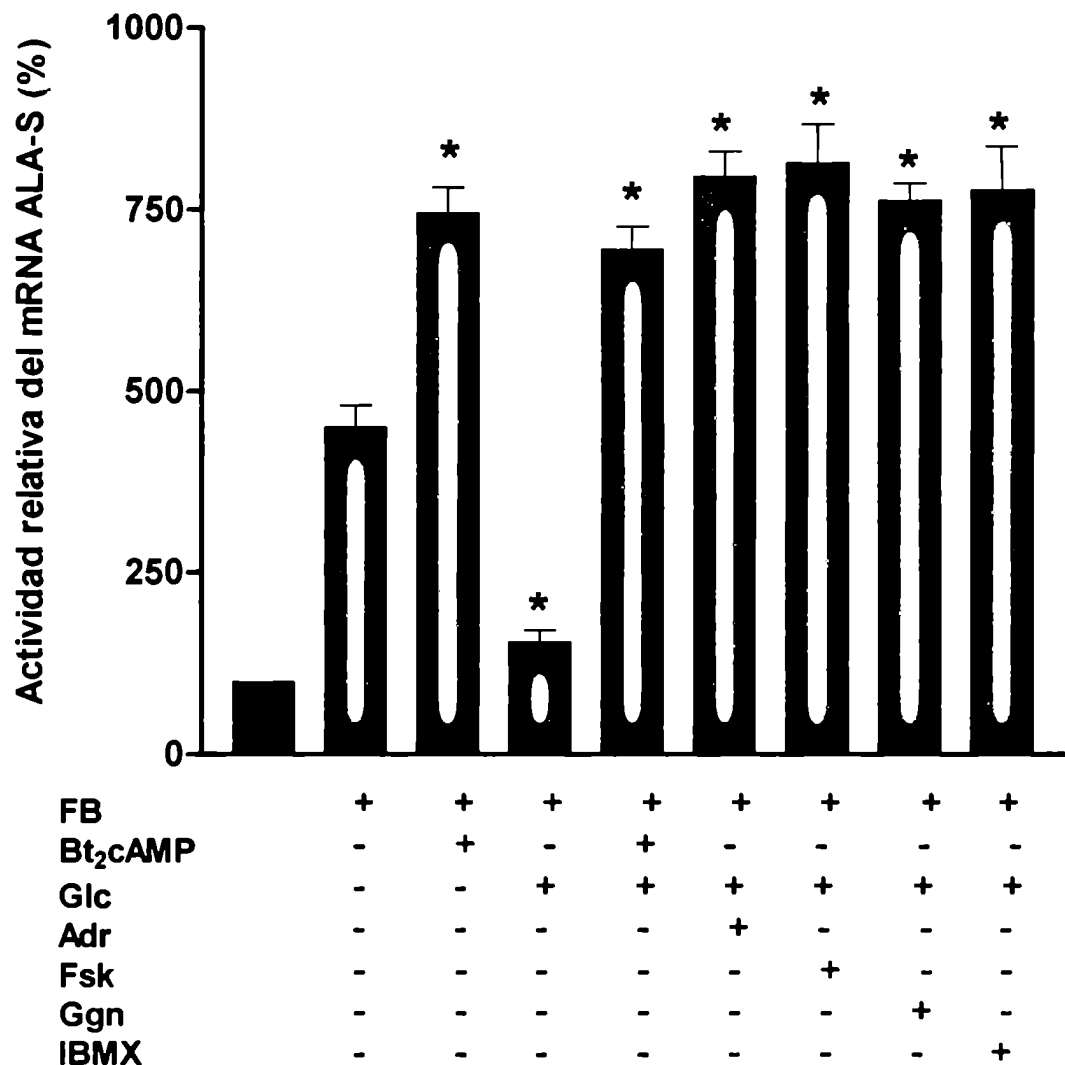


Figura 17: Efecto de dibutilil cAMP, activadores de adenilil ciclasa y un inhibidor de la fosfodiesterasa sobre la inhibición que ejerce la glucosa sobre la actividad inducida por fenobarbital, del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas normales. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 3 h con los agregados que se indican en la figura. FB, 0.6 mM fenobarbital; Bt₂cAMP, dibutilil cAMP 100 μ M; Glc, glucosa 80 mM; Adr, adrenalina 10 μ M; Fsk, forskolina 10 μ M; Ggn, glucagon 1 μ M; IBMX, IBMX 100 mM. La actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como porcentajes respecto al control sin agregados (0.035 ± 0.005 , $n=4$), y representan el promedio $\pm$ ES de cuatro experimentos separados. Se utilizó el test de ANOVA para comparar los distintos tratamientos con respecto a la muestra conteniendo FB solamente (* $p < 0.01$).

F.2 Efecto del fenobarbital y la glucosa sobre el mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas con el contenido de cAMP disminuido a niveles normales.

Como ya se ha mostrado en las secciones anteriores, el tratamiento con glucosa de los hepatocitos provenientes de ratas diabéticas, no demuestra poseer efecto alguno sobre el mRNA de ALA-S inducido con fenobarbital 0.6 mM. Por otro lado el agregado exógeno o el aumento intracelular de cAMP en hepatocitos de ratas normales produce una reversión completa del efecto glucosa (Figura 17). Dado que los hepatocitos diabéticos poseen un alto contenido endógeno de cAMP nuestra hipótesis fue entonces asumir que la falta de efecto glucosa, en este estado metabólico, se debería a la presencia de cAMP en concentración elevada de manera que ya no operaría la inhibición mediada por glucosa. Para analizar esta hipótesis, realizamos experimentos en los cuales el contenido de cAMP endógeno en las células hepáticas provenientes de ratas diabéticas se disminuyó a los niveles observados en hepatocitos normales. Para ello las células fueron preincubadas durante 2 horas con 100 μ M de aloxano, inhibidor de la adenilil ciclase, y 100 μ M imidazol, activador de la fosfodiesterasa. La concentración de cAMP inicial de 39.5 ± 3.2 pmol/mg de proteína (n=3), fue disminuida a 11.2 ± 1.1 pmol/mg de proteína (n=3). Los hepatocitos fueron luego tratados con fenobarbital 0.6 mM sólo o en combinación con glucosa 80 mM. También, se incubaron los hepatocitos con dibutilil cAMP de manera que, en caso de observarse efecto glucosa en células con contenido de cAMP bajo, supiéramos si este efecto podía ser revertido por el agregado exógeno de cAMP. Como se observa en la Figura 18, en estas condiciones experimentales, no se observó efecto inhibitorio de glucosa. Por otro lado, la inducción de la actividad del mRNA de ALA-S ejercida por el fenobarbital en hepatocitos de ratas diabéticas con el contenido de cAMP disminuido a niveles normales, fue similar a la obtenida en hepatocitos de ratas normales. Más aún, esta inducción fue todavía susceptible de ser potenciada por cAMP, como ya se observó anteriormente en células normales. Se observa que el tratamiento con aloxano e imidazol exclusivamente, no alteró el nivel basal de actividad del mRNA de ALA-S.

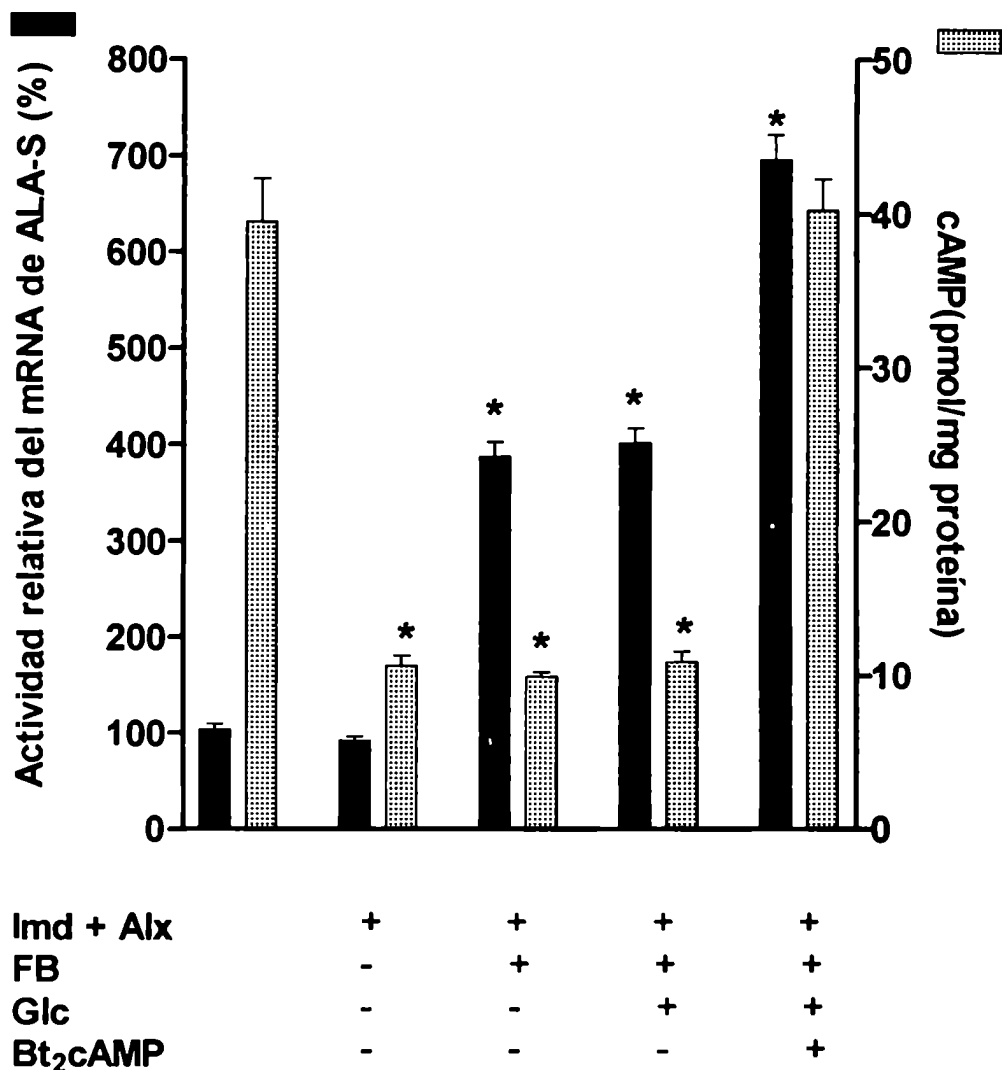


Figura 18: Efecto de fenobarbital, glucosa y dibutilil cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas con el contenido de cAMP disminuido a nivel normal. Suspensiones de hepatocitos fueron preincubadas durante 2 h con imidazol 100 μ M (Imd) y aloxano 100 μ M (Alx) y luego incubadas durante 3 h con fenobarbital 0.6 mM (FB), y/o con glucosa 80 mM (Glc) y/o con dibutilil cAMP 100 μ M (Bt₂cAMP), según se indica en la figura. La actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos, y se presenta como barras llenas. El contenido de cAMP se determinó en cada muestra como se describe en Materiales y Métodos y se presenta como barras punteadas. Los resultados están expresados como porcentajes respecto al control sin agregados al tiempo 0 (0.037 ± 0.004 , $n=4$), y representan el promedio $\pm$ ES de cuatro experimentos separados. Se utilizó el test de ANOVA para comparar los distintos tratamientos con respecto al control sin agregados (* $p < 0.01$).

Capítulo 2: Análisis de la expresión de ALA-S a nivel transcripcional.

A) FENOBARBITAL, DIBUTIRIL cAMP Y GLUCOSA MODIFICAN EL NIVEL DEL mRNA DE ALA-S

En esta segunda etapa del trabajo nos dedicamos a analizar si las variaciones observadas en la actividad del mRNA de ALA-S con los distintos tratamientos, son ocasionadas por una variación en la cantidad del mRNA, o si esta permanece constante. En el primer caso, es lógico suponer que al variar la cantidad de un mRNA por ejemplo aumentándolo, se incrementará la actividad del mismo. En el segundo caso, si los niveles de mRNA permanecen constantes, las variaciones en actividad se deberán a un proceso particular que altere o bien la accesibilidad del mRNA a la maquinaria de traducción, (por ejemplo una variación en la velocidad de transporte a citoplasma), o bien la capacidad del mRNA de ser traducido (por ejemplo que fuera modificada su estructura secundaria). Para dilucidar esta cuestión, se determinaron los niveles del mRNA de ALA-S. Para ello, se utilizó la técnica de Northern y slot blot, hibridizando con un oligonucleótido específico complementario a una porción de la hebra codificante del gen de ALA-S de rata.

A.1 La sonda utilizada reconoce un único mRNA y del tamaño predicho

Previo a la utilización de la sonda descripta para analizar el mRNA de ALA-S fue necesario determinar que ésta fuera específica, de esta manera nos aseguramos que la sonda no hibridizara con otros RNAs. Para determinar el tamaño molecular del mRNA de la banda obtenida por Northern blot, se incluyeron marcadores de peso molecular en la corrida electroforética. Graficando la curva del log del PM, en función de la migración de las bandas en el gel, se pudo estimar el tamaño de la banda observada por hibridización y autorradiografía. Los resultados se muestran en la Figura 19. La sonda utilizada reconoce un único mRNA que corresponde al tamaño molecular de 2,3 kb del

mRNA de ALA-S. Este valor es el mismo que el determinado por Srivastava y col. (1988). Se observa también que la cantidad de este mRNA se incrementó significativamente en los hepatocitos tratados con fenobarbital 0.6 mM. Se volverá sobre esto más adelante.

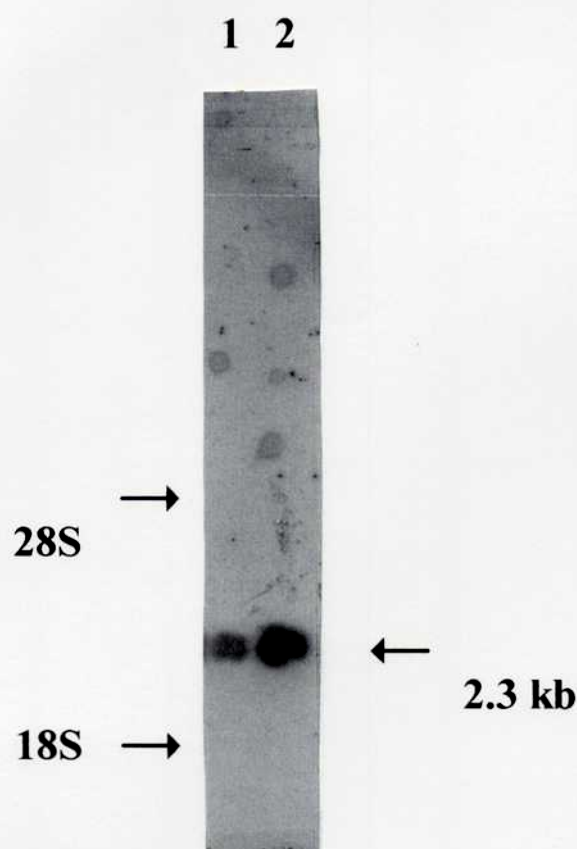


Figura 19: Análisis por Northern blot del mRNA aislado de hepatocitos de ratas normales. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 3 h en ausencia (línea 1), o en presencia (línea 2) de fenobarbital 0.6 mM. El mRNA se purificó de cada incubado, se corrió en gel de agarosa (5 μ g/calle), se transfirió a filtro de nitrocelulosa y se hibridizó como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra la posición de migración de los rRNA.

A.2 Efecto de fenobarbital y dibutilil cAMP sobre los niveles de mRNA de ALA-S en hepatocitos provenientes de ratas normales y diabéticas.

Con el objetivo de estudiar la acción de fenobarbital y cAMP sobre los niveles del mensajero de ALA-S en hepatocitos normales y en hepatocitos provenientes de ratas con diabetes experimental por tratamiento con estreptozotocina, se realizaron análisis de Northern blot.

En hepatocitos normales (Figura 20A), la presencia de fenobarbital 0.6 mM produce un incremento de cuatro veces del nivel del mRNA de ALA-S (línea 3). La presencia de dibutilil cAMP 100 μ M en el medio de incubación (línea 4), potenció esta inducción significativamente ($p < 0.05$).

En hepatocitos de ratas diabéticas (Figura 20B), el tratamiento con fenobarbital causa una inducción significativa sobre el mensajero de ALA-S (línea 3, $p < 0.05$). A diferencia de lo que ocurre en hepatocitos normales, esta inducción no es potenciada por la presencia de dibutilil cAMP 100 μ M en el medio de incubación (línea 4).

La adición de dibutilil cAMP 100 μ M no produce cambio alguno sobre el nivel basal del mensajero de ALA-S tanto en hepatocitos normales como en diabéticos (línea 2).

Se realizó la detección del mRNA de la gliceraldehido 3-fosfo-deshidrogenasa (G3PD). Este gen se expresa constitutivamente en los hepatocitos, no estando sometido a regulación alguna por los efectores estudiados. Esta hibridización se utiliza como control de siembra en los ensayos de Northern blot, y la cuantificación de las bandas obtenidas para el mRNA de ALA-S, se relativizan de acuerdo a la intensidad de banda obtenida para G3PD.

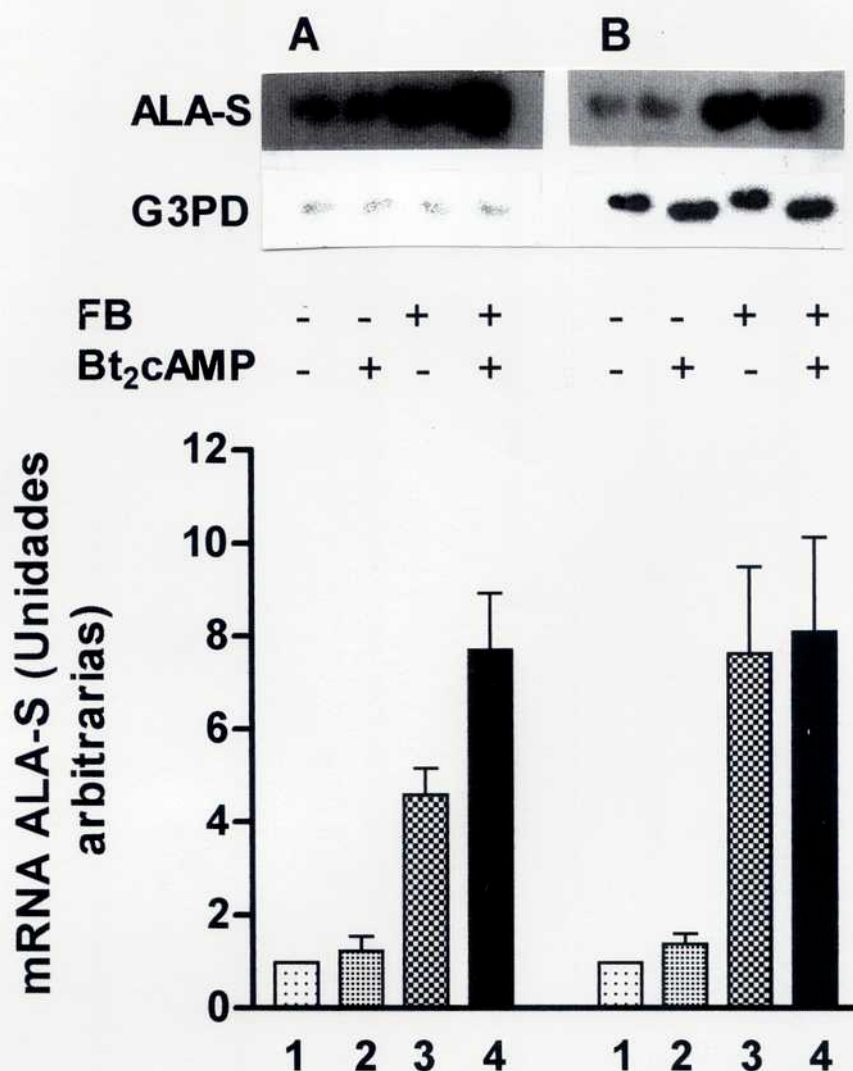


Figura 20: Efecto de fenobarbital, y dibutiril cAMP sobre el nivel del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas normales y diabéticas. Suspensiones de hepatocitos provenientes de ratas normales (A) y diabéticas (B), fueron incubadas durante 3 h con fenobarbital 0.6 mM (FB), y/o con con dibutiril cAMP 100 μ M (Bt₂cAMP), según se indica en la figura. El RNA total se purificó de cada incubado, se corrió en gel de agarosa (20 μ g/calle), se transfirió a filtro de nitrocelulosa y se hibridizó como se describe en Materiales y Métodos. Las señales autorradiográficas se cuantificaron por densitometría y se presentan como gráfico de barras debajo de cada calle (1-4), relativas a G3PD. Los resultados están expresados relativos al control sin agregados y representan el promedio $\pm$ DS de cuatro experimentos independientes. El test de ANOVA se utilizó para comparar las muestras conteniendo fenobarbital y dibutiril cAMP con fenobarbital solo en hepatocitos normales ($p < 0.05$) y muestras conteniendo fenobarbital solo en células diabéticas con células normales ($p < 0.05$).

A.3 Efecto de la glucosa sobre los niveles de mRNA de ALA-S en hepatocitos provenientes de ratas normales y diabéticas.

El estudio del efecto glucosa, observado sobre la actividad del mRNA de ALA-S, se extendió al análisis de la cantidad del mismo mRNA determinado por ensayo de Northern blot.

El agregado de glucosa 80 mM a hepatocitos conteniendo fenobarbital, produce una disminución significativa del nivel del mRNA (Figura 21A, línea 4). Sin embargo, la incubación conjunta de fenobarbital, glucosa, y dibutilil cAMP 100 μ M, produce un bloqueo total del efecto inhibitorio causado por la glucosa. En esta condición se observa que el nivel del mRNA de ALA-S se incrementa al doble del nivel obtenido con fenobarbital, como fue observado anteriormente.

El análisis de la cantidad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas diabéticas (Figura 21B), reveló que el tratamiento con fenobarbital 0.6 mM (línea 3) produce un incremento en el mensajero de ALA-S significativamente mayor, comparado con los niveles observados en hepatocitos normales ($p < 0.02$). En estas condiciones la presencia de glucosa (línea 4), o de glucosa y dibutilil cAMP (línea 5) no producen variación alguna sobre el nivel basal del mensajero en estudio. Al igual que en el apartado anterior, los resultados están expresados relativos a la señal obtenida por hibridización de G3PD.

La adición de glucosa 80 mM, al medio de incubación, no produce cambio alguno sobre el nivel del mensajero de ALA-S tanto en hepatocitos normales como en diabéticos (línea 2).

Todas estas observaciones obtenidas a partir del análisis de los niveles de mRNA de ALA-S, confirmaron los resultados obtenidos en el estudio de la actividad del mensajero, lo que nos indicaría que las variaciones observadas en la actividad del mRNA medida por su capacidad de ser traducido, son reflejo de variaciones en la cantidad del mRNA de ALA-S presente en la célula luego de los distintos tratamientos.

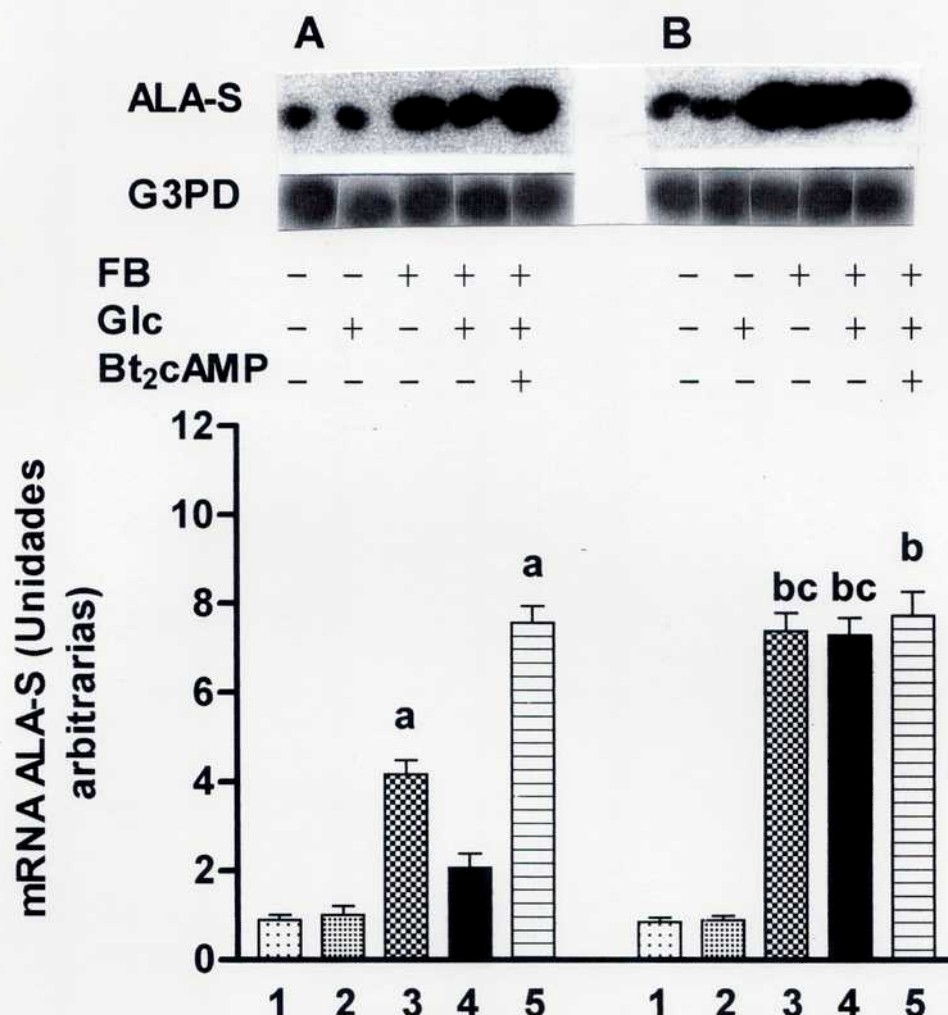


Figura 21: Efecto de fenobarbital, glucosa y dibutiril cAMP sobre el nivel del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas normales y diabéticas. Suspensiones de hepatocitos provenientes de ratas normales (A) y diabéticas (B), fueron incubadas durante 3 h con fenobarbital 0.6 mM (FB), y/o con glucosa 80 mM (Glc) y/o con con dibutiril cAMP 100 μ M (Bt₂cAMP), según se indica en la figura. El RNA total se purificó de cada incubado, se corrió en gel de agarosa (20 μ g/calle), se transfirió a filtro de nitrocelulosa y se hibridizó como se describe en Materiales y Métodos. Las señales autorradiográficas se cuantificaron por densitometría y se presentan como gráfico de barras debajo de cada calle (1-5), relativas a G3PD. Los resultados están expresados relativos al control sin agregados y representan el promedio $\pm$ DS de cuatro experimentos independientes. El test de ANOVA se utilizó para comparar las muestras conteniendo fenobarbital, fenobarbital y glucosa y fenobarbital, glucosa y dibutiril cAMP con respecto al control en hepatocitos normales y diabéticos (normal: $a, p < 0.01$; diabéticas: $b, p < 0.01$). Se compararon las muestras conteniendo fenobarbital y glucosa en células diabéticas con células normales ($c, p < 0.02$).

B) FENOBARBITAL, DIBUTIRIL cAMP, Y GLUCOSA NO MODIFICAN LA VIDA MEDIA DEL mRNA DE ALA-S

Hasta el apartado anterior, hemos estudiado la regulación de ALA-S de hígado de rata, a distintos niveles. Por un lado analizamos los efectos operados por fenobarbital, dibutiril cAMP y glucosa en cultivos primarios de hepatocitos de ratas normales y diabéticas, observando variaciones en la actividad del mRNA de ALA-S. Además, determinamos que estas variaciones en la actividad, son un reflejo de variaciones en el nivel de mRNA presente en las células luego de los tratamientos respectivos. Ahora bien, una modificación en el nivel de un mRNA puede deberse a cambios en la velocidad de síntesis o procesamiento o también a variaciones en la velocidad de degradación. Por ello, para profundizar en el mecanismo de acción de estos metabolitos sobre el gen de ALA-S, nos fue necesario discriminar cuál de éstos eventos que modifican el nivel de mRNA en la célula, se hallan involucrados. Con este objetivo general, determinamos la vida media del mensajero de ALA-S con los distintos tratamientos.

Para determinar la vida media del mRNA de ALA-S utilizamos dos métodos distintos. Por un lado, realizamos mediciones del nivel del mRNA a distintos tiempos luego del agregado del inhibidor de la transcripción actinomicina D. De esta manera, se obtiene una curva de decaimiento, a partir de la cual se puede determinar la vida media y calcular la constante de degradación. Sin embargo, existen reportes que previenen acerca del uso de inhibidores de transcripción para la determinación de la vida media, dado que éstos pueden poseer un efecto estabilizador sobre los mensajeros (Tilghman et al., 1974; Goldberg et al., 1994). Por ello, utilizamos además un método de cálculo de la vida media a partir de los parámetros cinéticos de las curvas de tiempo mostradas con anterioridad (Nickol et al., 1978). Este método se basa en el modelo matemático de “un solo compartimento” (Hargrove and Schmidt, 1989). Dado que el nivel de mRNA presente en la célula en determinado momento, representa la diferencia entre la cantidad sintetizada y la cantidad degradada, este modelo considera que la síntesis es una reacción de orden cero, mientras que la degradación es de orden uno, dependiente de la concentración de mRNA presente en un determinado tiempo t . Los resultados graficados

en las curvas de tiempo, se recalculan en la forma integrada. De esta manera los cambios en la actividad del mRNA de ALA-S se miden entre dos diferentes estados de equilibrio: el que corresponde al no inducido y el que corresponde al nivel inducido. En este tipo de gráfico, los cambios exponenciales resultan en una recta cuya pendiente negativa representa la constante de degradación k del mRNA. La vida media $t_{1/2}$ se calcula luego de la relación $t_{1/2} = (\ln 2)/k$.

B.1 Determinación de la vida media del mRNA de ALA-S luego del tratamiento con fenobarbital y dibutiril cAMP.

Los resultados obtenidos sobre la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas normales, con los distintos tratamientos, y luego del agregado del inhibidor de la transcripción actinomicina D, se muestran en la Figura 22. Como puede observarse, las curvas no difieren significativamente. El valor de vida media, se calculó de acuerdo al tiempo necesario para obtener el 50% de actividad del mensajero. Para el mRNA de ALA-S obtenido de hepatocitos control sin ningún tratamiento, se obtuvo un valor de vida media de 33.5 min, el mismo resultó ser de 28 min para el caso de los hepatocitos incubados con fenobarbital 0.6 mM, y 24.2 min para los tratados con fenobarbital más dibutiril cAMP 100 μ M.

También, se calculó la constante de degradación del mRNA de ALA-S proveniente de células incubadas con los distintos efectores por el método del análisis cinético descrito anteriormente. En este caso, se regraficaron en la forma integrada los valores de actividad del mRNA de ALA-S obtenidos en las curvas de tiempo de hepatocitos normales y diabéticos (Figura 23). Para los tratamientos con fenobarbital 0.6 mM y fenobarbital 0.6 mM más dibutiril cAMP 100 μ M, el nivel no inducido corresponde al nivel de mRNA obtenido en ausencia de la/s drogas, el nivel inducido se refiere en cambio al obtenido en presencia de las mismas. Para determinar la constante de degradación del mRNA de ALA-S en el control, es decir sin ningún tratamiento, fue necesario primero inducir dicho mRNA con fenobarbital, considerando este punto como valor a tiempo cero.

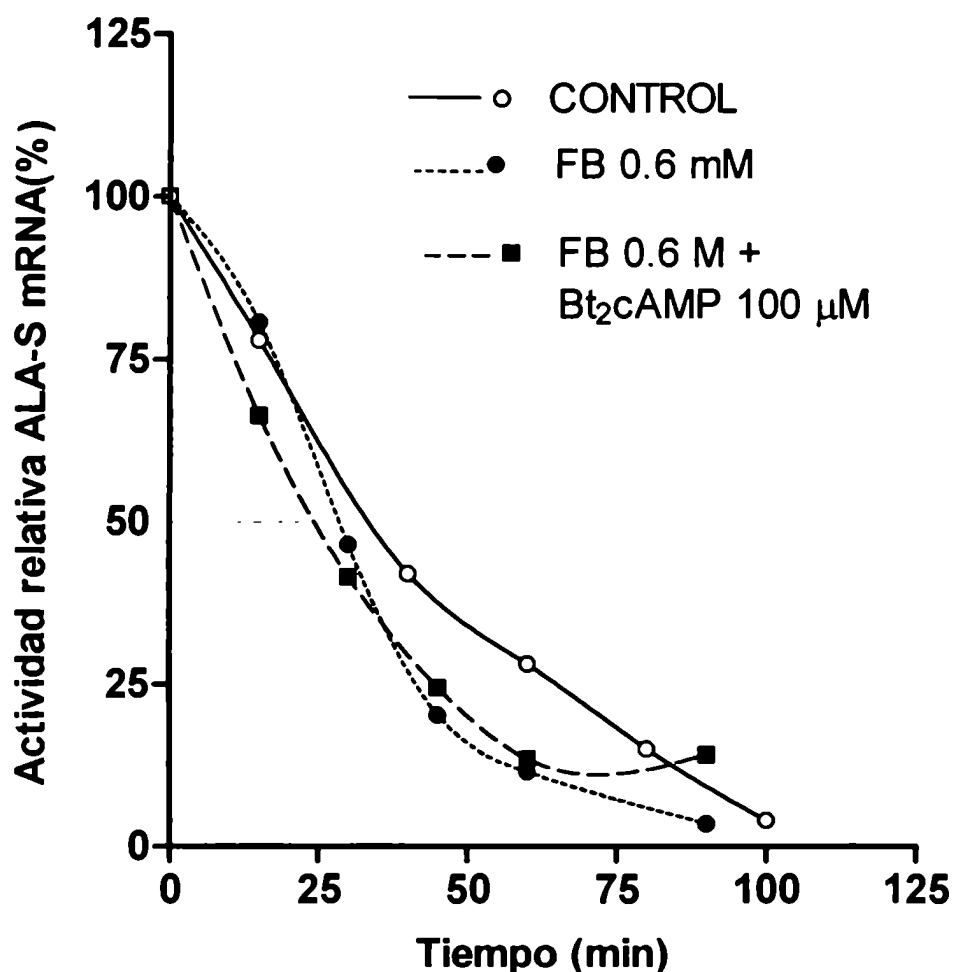


Figura 22: Cinética de la degradación del mRNA de ALA-S en hepatocitos normales luego del agregado de actinomicina D. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 3 horas con los agregados que se indican en la figura. Las células se cosecharon, se lavaron y se incubaron durante distintos tiempos en medio fresco conteniendo actinomicina D 0.5 μM. Se obtuvo el mRNA y la actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad al tiempo cero de agregado de actinomicina D. Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales difieren en menos del 10% del promedio.

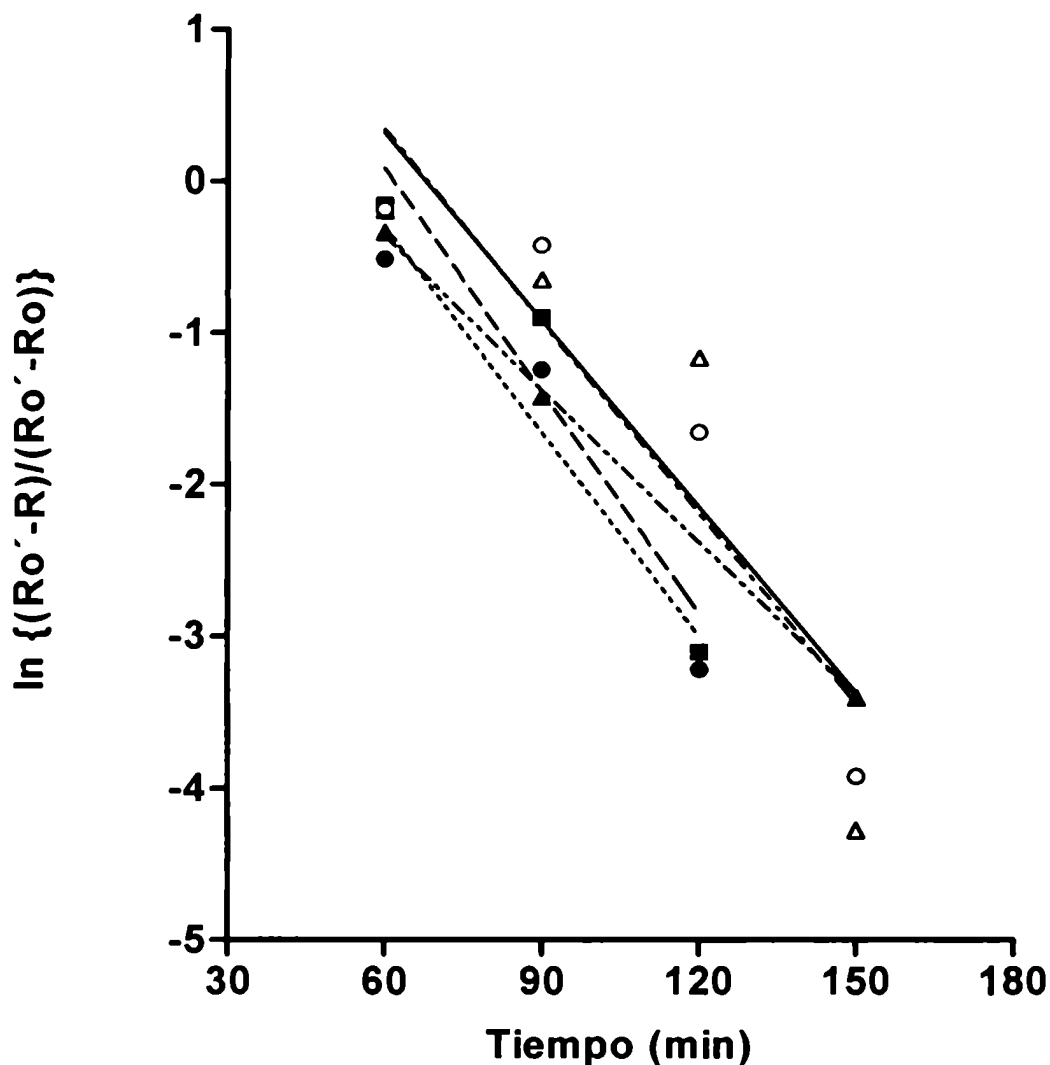


Figura 23: Determinación cinética de la vida media del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas normales y diabéticas sin utilizar inhibidor de transcripción. Los resultados de las curvas de tiempo se regraficaron en la forma integrada. R es el nivel de actividad del mRNA de ALA-S a cada tiempo; Ro y Ro' son los niveles de actividad del mRNA de ALA-S inicial y final respectivamente, en cada tratamiento. Para determinar la vida media del control, las células fueron incubadas durante 3 h en presencia de fenobarbital 0.6 mM, luego el medio de incubación se reemplazó por medio fresco sin el barbiturato. Cada punto representa el promedio de dos experimentos separados cuyos valores individuales difieren en menos del 15% del promedio. Las rectas fueron calculadas por regresión lineal y todas poseen un coeficiente de correlación >0.99 . Hepatocitos normales: control (O), fenobarbital 0.6 mM, (●), fenobarbital 0.6 mM + dibutilil cAMP 100 μ M (■). Hepatocitos diabéticos: control (Δ), fenobarbital 0.6 mM ($\blacktriangle$).

Luego se removió el medio de cultivo, se reemplazó por uno fresco, continuando la incubación durante 2.5 horas más. Las constantes de degradación obtenidas en cada caso, y los valores de vida media calculados a partir de ellas, se resumen en la Tabla 7. La constante de degradación del mRNA de ALA-S es la misma en hepatocitos normales y en diabéticos. Más aún, no se observan variaciones en los valores de esta constante en presencia de fenobarbital 0.6 mM o de fenobarbital 0.6 mM más dibutiril cAMP 100 μ M en ambos tipos celulares.

Cabe señalar que los valores de vida media de este mRNA obtenidos en presencia de actinomicina D son mayores que los calculados en ausencia del inhibidor, con lo cual es necesario tomar precaución con la interpretación de los resultados obtenidos con actinomicina D, debido a efectos no específicos de la misma.

TRATAMIENTO	CONSTANTE DE DEGRADACIÓN (k , min ⁻¹)		VIDA MEDIA ($t_{1/2}$, min)	
	Normal	Diabético	Normal	Diabético
→	0.041	0.041	17	17
FENOBARBITAL 0.6 Mm	0.045	0.034	15	20
FENOBARBITAL 0.6 mM + DIBUTIRIL cAMP 100 μ M	0.049	N.D.	14	N.D.

Tabla 7: Constantes de degradación y vida media del mRNA de ALA-S de hepatocitos de ratas normales y diabéticas en los distintos tratamientos. N.D.: no determinado

B.2 Determinación de la vida media del mRNA de ALA-S luego del tratamiento con glucosa

La vida media del mRNA de ALA-S proveniente de células tratadas con glucosa se determinó por tres caminos deferentes, debido a que se han reportado ejemplos donde la

glucosa tendría un efecto desestabilizador del mRNA. Meyer y col. (1991) han demostrado que la glucosa puede incrementar la degradación del mRNA de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

1) Análisis cinético: se regraficaron en la forma integrada los valores de actividad del mRNA de ALA-S obtenidos de las curvas de tiempo en hepatocitos normales (Figura 24). Para los tratamientos con fenobarbital 0.6 mM, el nivel no inducido corresponde al nivel de mRNA obtenido en ausencia del barbiturato y el nivel inducido se refiere al obtenido en presencia del mismo. Para determinar la constante de degradación del mRNA de ALA-S en el control, y en el tratamiento con glucosa 80 mM, se indujo dicho mRNA con fenobarbital 0.6 mM, considerando este punto como valor a tiempo cero, y luego se cambió el medio de cultivo por otro fresco sin ningún agregado y conteniendo glucosa 80 mM respectivamente. Las pendientes obtenidas a partir de este análisis no difieren significativamente. La constante de degradación del mRNA de ALA-S en hepatocitos normales sin ningún agregado es de 0.041 min^{-1} , y su vida media de 17 min, en presencia de fenobarbital los valores obtenidos son de $k = 0.045 \text{ min}^{-1}$, y $t_{1/2} = 15 \text{ min}$ y en presencia de glucosa $k = 0.036 \text{ min}^{-1}$ y $t_{1/2} = 19 \text{ min}$. Estos valores no difieren entre ellos y tampoco con los obtenidos anteriormente para el tratamiento con fenobarbital 0.6 mM y dibutilil cAMP 100 μM .

2) En segundo lugar, se determinó la vida media del mRNA de ALA-S proveniente de células normales y diabéticas tratadas con glucosa 80 mM por la utilización del inhibidor de la transcripción actinomicina D. En la Figura 25, se muestran los resultados de actividad del mRNA de ALA-S obtenidos en hepatocitos de ratas normales tratadas con actinomicina D. Como puede observarse, las curvas obtenidas en los distintos tratamientos no difieren significativamente. El tiempo necesario para obtener un 50% de disminución es de 33 min para el control y 28 min y 37 min para los tratados con fenobarbital y glucosa respectivamente.

3) En último lugar, se determinó la vida media del mRNA de ALA-S analizando los valores de niveles de mensajero obtenidos de hepatocitos normales y diabéticos, luego del tratamiento con actinomicina D (Figura 26). Nuestros resultados indican que la velocidad de degradación de este mRNA es la misma en hepatocitos normales que en

diabéticos. Más aún, no se observan cambios en la tasa de degradación en presencia de fenobarbital 0.6 mM o glucosa 80 mM en ambos tipos celulares.

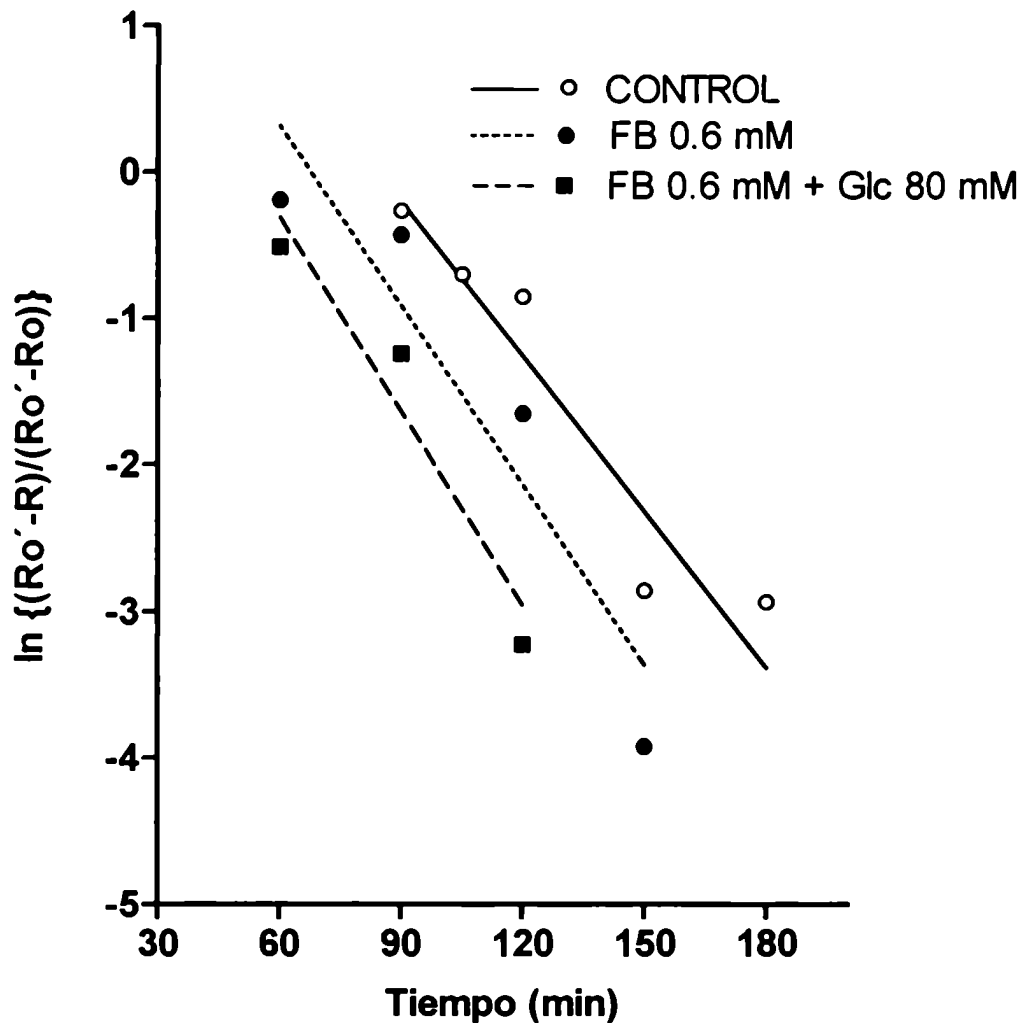


Figura 24: Determinación cinética de la vida media del mRNA de ALA-S con glucosa en hepatocitos de ratas normales sin utilizar inhibidor de transcripción. Los resultados de las curvas de tiempo se regraficaron en la forma integrada. R es el nivel de actividad del mRNA de ALA-S a cada tiempo; Ro y Ro' son los niveles de actividad del mRNA de ALA-S inicial y final respectivamente, en cada tratamiento. Para determinar la vida media de los tratamientos control y con glucosa 80 mM, las células fueron incubadas durante 3 h en presencia de fenobarbital 0.6 mM, luego el medio de incubación se reemplazó por medio fresco sin ningún agregado o con glucosa 80 mM respectivamente. Cada punto representa el promedio de dos experimentos separados cuyos valores individuales difieren en menos del 15% del promedio. Las rectas fueron calculadas por regresión lineal y todas poseen un coeficiente de correlación >0.99. FB: fenobarbital, Glc: glucosa.

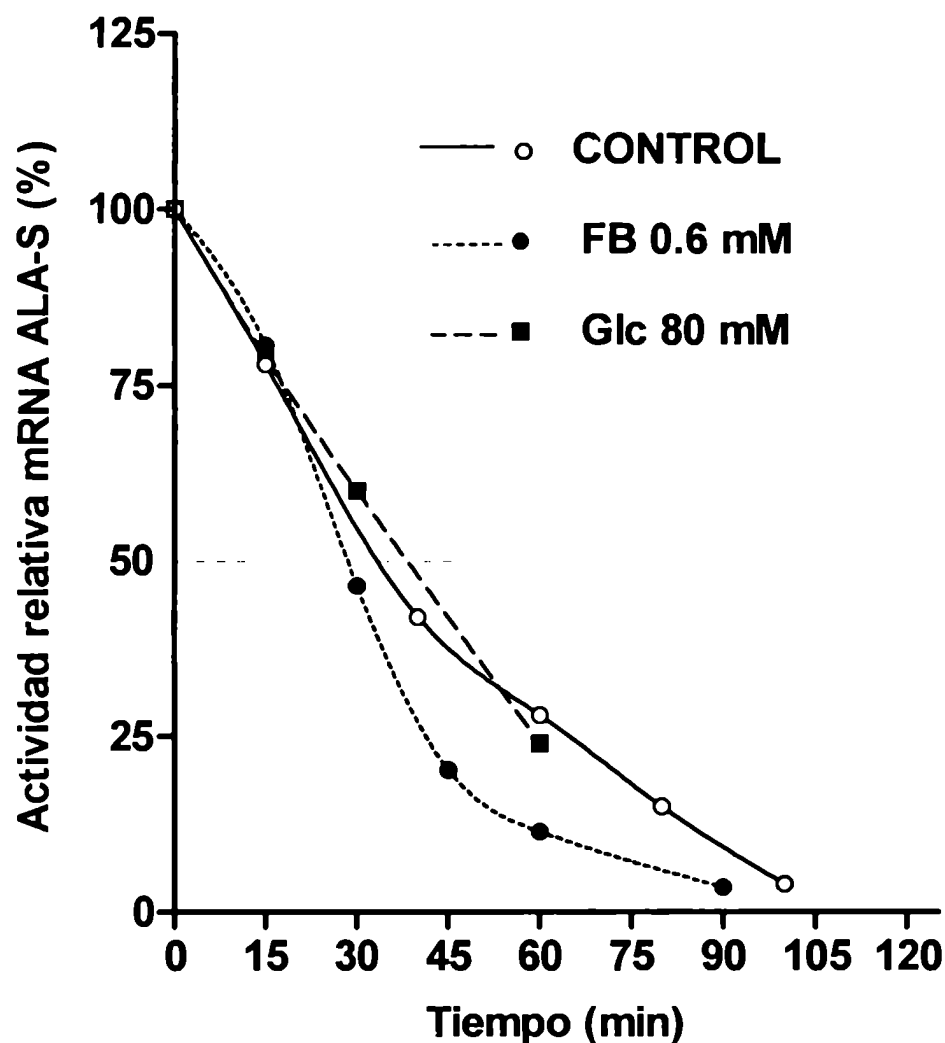


Figura 25: Determinación de la vida media del mRNA de ALA-S en hepatocitos normales luego del agregado de actinomicina D (actividad del mRNA). Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 3 horas con los agregados que se indican en la figura. Las células se cosecharon, se lavaron y se incubaron durante distintos tiempos en medio fresco conteniendo actinomicina D 0.5 μ M. Desde este momento las muestras se precesaron a los tiempos indicados en la figura. Se obtuvo el mRNA y la actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad al tiempo cero de agregado de actinomicina D. Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales difieren en menos del 10% del promedio. FB: fenobarbital, Glc: glucosa.

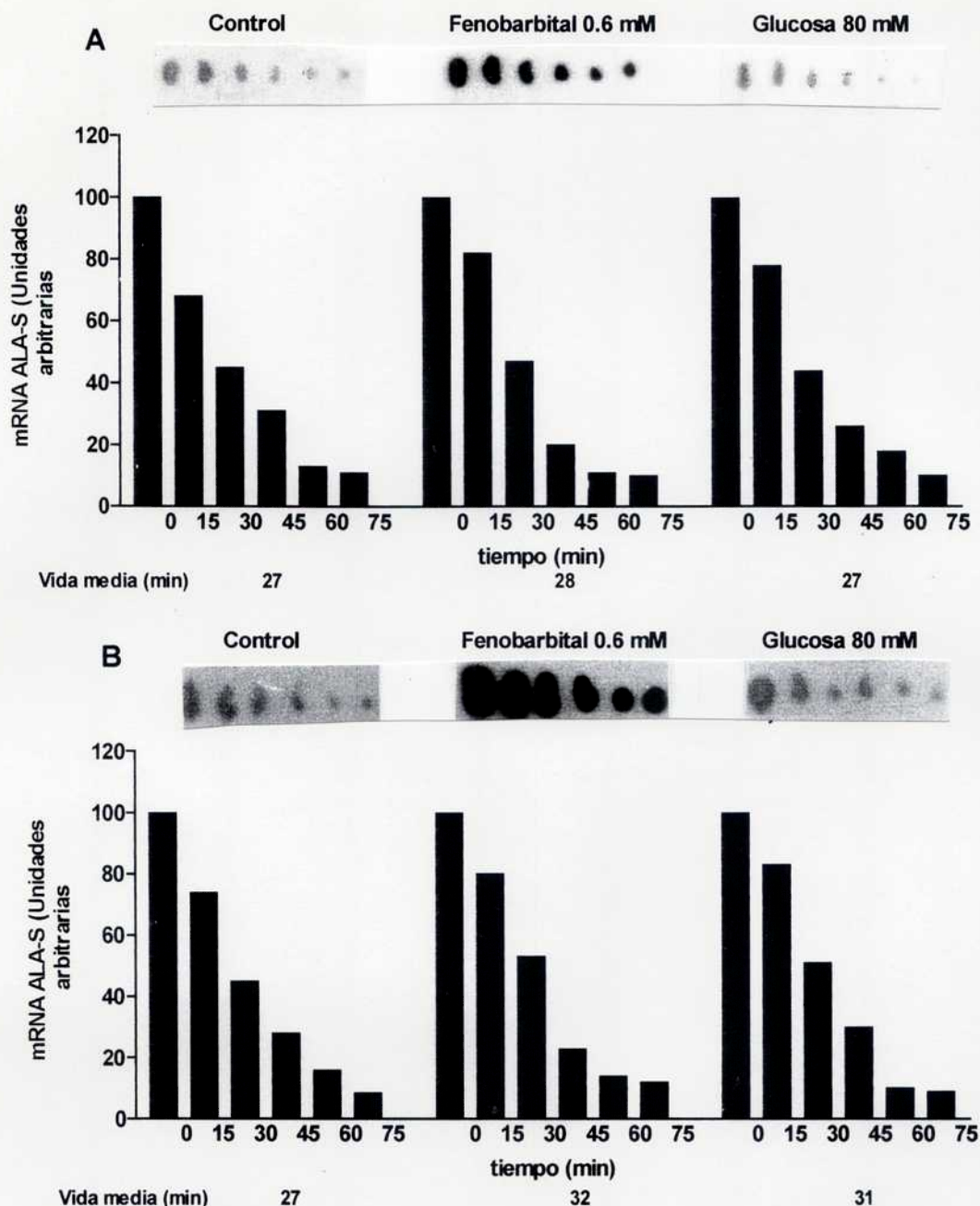


Figura 26: Determinación de la vida media del mRNA de ALA-S en hepatocitos normales y diabéticos luego del agregado de actinomicina D (cantidad de mRNA). Suspensiones de hepatocitos normales (A) y diabéticos (B), fueron incubadas durante 3 horas sin ningún agregado o con fenobarbital 0.6 mM o glucosa 80 mM. Las células se cosecharon, se lavaron y se incubaron durante distintos tiempos en medio fresco conteniendo actinomicina D 0.5 μ M. Desde este momento las muestras se precesaron a los tiempos indicados en la figura. 20 μ g de RNA total se sembraron en filtros de nitrocelulosa y se hibridizaron según se describe en Materiales y Métodos. Las autorradiografías muestran un slot blot representativo de dos experimentos independientes. Las señales fueron cuantificadas y se presentan como barras debajo de cada slot. Los resultados se expresan relativos al tiempo cero de cada tratamiento.

C) CLONADO DE LA ZONA PROMOTORA DEL GEN ALA-S DE HÍGADO DE RATA

Con el objetivo de analizar en mayor profundidad la regulación de la expresión génica de ALA-S, se proyectó realizar estudios funcionales de la zona promotora del gen en ensayos de transfección de células.

En nuestro sistema hemos elegido utilizar el plásmido pBLCAT6 que contiene el gen estructural de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), una enzima bacteriana cuya actividad enzimática se dosa por acetilación de cloramfenicol-³H a partir de butiril CoA. Este vector presenta baja actividad CAT basal (Boshart et al., 1992). Fue necesario entonces clonar la zona promotora del gen de ALA-S en dicho vector. Para ello hemos analizado su secuencia y diseñado, utilizando el programa Oligo 4, oligonucleótidos específicos conteniendo además las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción BamH I y Xho I, como se detalla en Materiales y Métodos. Con dichos primers, y utilizando como templado DNA genómico de rata, se realizaron varias reacciones de amplificación (PCR), de manera de obtener un fragmento específico. Dado que es posible que se introduzcan errores durante el copiado por la Taq polimerasa, en primera instancia se realizó un subclonado en pBS SK+ de manera de realizar un rápido screening y secuenciar con facilidad los clones positivos, para luego elegir uno que mostrara completa fidelidad a la secuencia original y subclonarlo en el pBLCAT6. De esta manera, se obtuvo el clon pALV21 (en pBS SK+), y los clones pACAT74 y pACAT114 (en pBLCAT6). La estrategia del clonado se muestra sintéticamente en el diagrama de la Figura 27. En la Figura 28 se resumen algunos de los resultados del clonado y en la Figura 29 se muestra la secuencia del clon pALV21 que coincide con la reportada anteriormente (Braidotti et al., 1993; Yomogida et al., 1993).

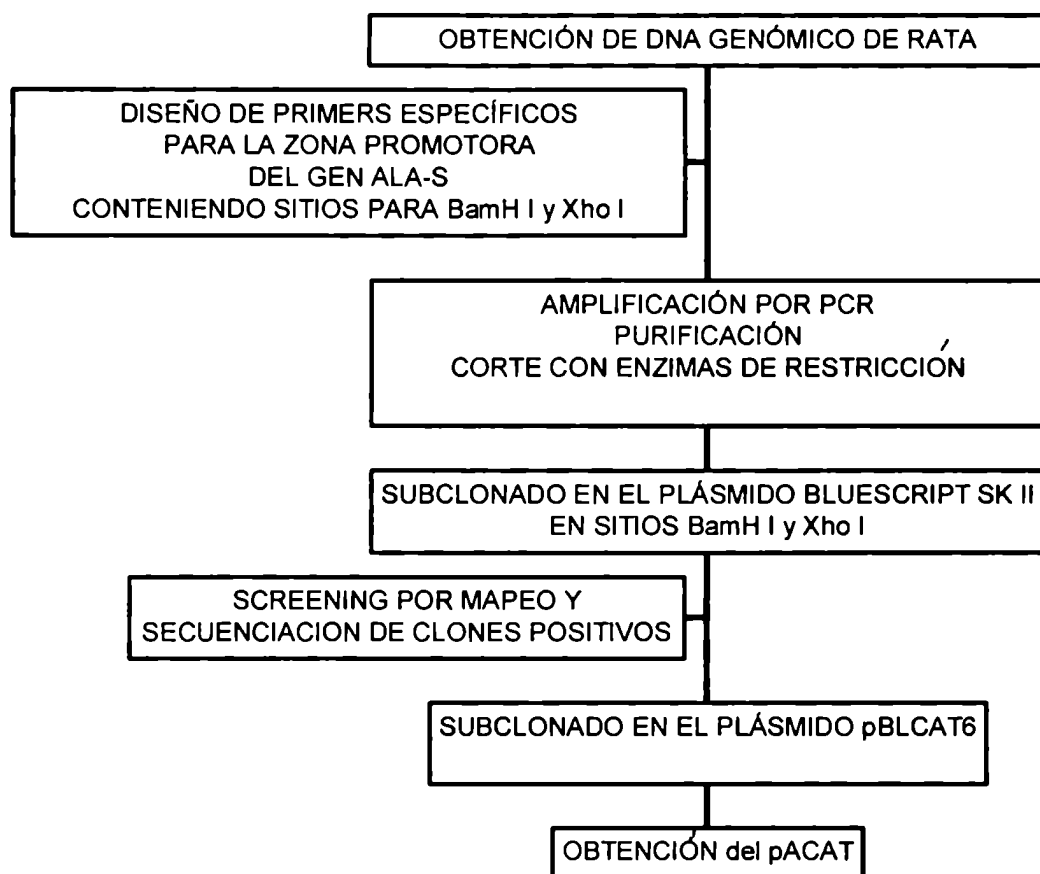


Figura27: Diseño de la estrategia de clonado del promotor de ALA-S

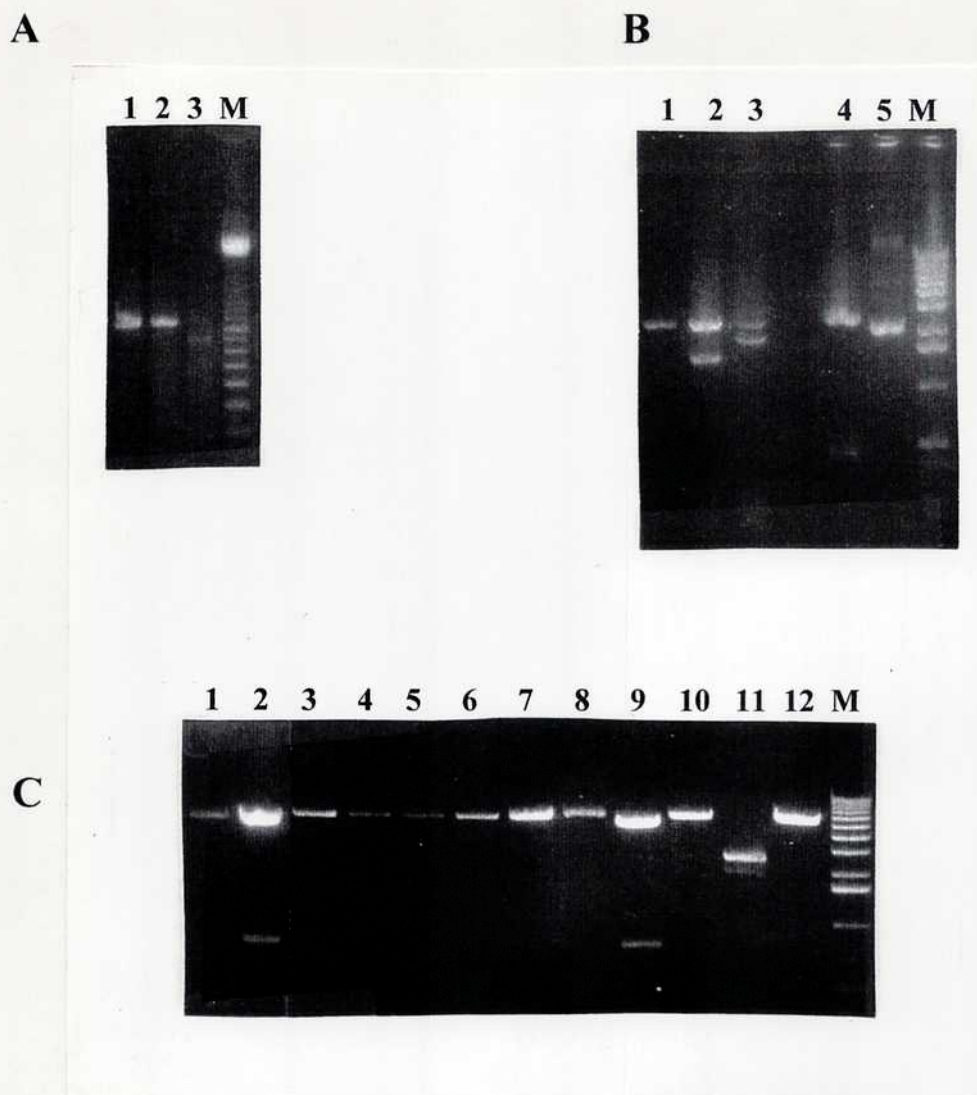


Figura 28: Resultados de las distintas etapas del clonado de la zona -833 a +42 del gen de ALA-S.

A) Corrida electroforética en gel de agarosa 1.5% del fragmento amplificado por PCR según se describe en Materiales y Métodos. Se sembró el 10% de la reacción. 1: MgCl_2 20 mM, 2: MgCl_2 25 mM, 3: MgCl_2 30 mM, M: marcadores de peso molecular. B) Screening de colonias blancas obtenidas luego de la transformación con el producto de ligación del fragmento de PCR con pBS SK+. Se realizaron minipreparaciones plasmídicas y los productos se digirieron con Pvu II y se separaron en gel de agarosa 1% según se describe en Materiales y Métodos. 1-3: DNA de colonias blancas, 4: pBS SK+ digerido con Pvu II, 5: pBS SK+ sin digerir, M: marcadores de peso molecular. C) Screening de colonias obtenidas luego del subclonado en pBLCAT6. Se realizaron minipreparaciones plasmídicas y los productos se digirieron con Sph I y se separaron en gel de agarosa 1% según se describe en Materiales y Métodos. 1-10: DNA de colonias, 11: pBLCAT6 sin digerir, 12: pBLCAT6 digerido con Sph I. En todos los casos se muestran resultados representativos de los ensayos realizados.

-850	<u>CTCTAGAACT</u>	AGTGGATCCA	AGCATGCAGA	AGACCCTAGA	TTCCATCCTC
-800	AGTGCTGCAT	CCTGTAGGCA	TGGCGGCTCC	TACCTGCAAT	CCCAGCACTG
-750	GGGAGGTAGA	GACAGGATGC	CTCCAAGGTT	GGCTACATAG	CAACTTTGAG
-700	GACAGTATGG	TGTGACTACA	TGAGACCTTG	TCTCAAATTA	AAAAACAAGA
-650	TAATTTAGCT	GTTCAATCCT	GTGCAGGCC	TGTGCTGTCA	TGACACCCTC
-600	ACCATCTGGG	TGACTAGACT	GTGGAGCTAT	GAGCTCCATC	TAGTCAGTCC
-550	TCTGTTCCCT	GCTCTCTCTT	TTCTTCAATT	CGGATCAGAA	CGTATCACCC
-500	TTCTGCGGCT	GCTTCTTCAA	TCCCGTGTCT	GCAGCCCCTT	AGCATCTCTT
-450	CACCAGGACC	ATTCTATTCT	TGGGCCATTC	ATCAAGTAAA	GAATCCCTGT
-400	CATCGATGCA	AACAAAACCA	AGCAAGCCCC	TCGTTGATCT	GATCTTAAGA
-350	CCCTGGCGTG	AAACCCCTTC	CTGTGCGCCC	AATAAACCTT	TTTACCAGGG
-300	TGGGTTTGGT	TTACGACCTA	CGCCGGGGGC	CCAGGAGTCT	GACGCACAGG
-250	GCTGTCGTGG	AAGGTGAAAG	AGGGACGAAG	GGTAGAGATC	CAAAAAGGGA
-200	CTTGCCCGTC	CACTGCCCTG	CTCTCCTGGC	TCAGGCAGCG	TAGGCCTAAG
-150	ACATAGTCAC	AAGAGTTGGA	GCAGAGCCCA	CACAGAGGGA	CCTGGCACCC
-100	TGCCGGGCCG	ACTCGGTGCC	GTGCGCGCGG	CAGGCCGCAC	CCACAGCGCA
-50	TGCGCAGCGG	TCACCCCGG	CTCTATATTA	GGCCAACAGC	GGCCCTAGCC
1	GAGGCTGTTC	GTGAAGAAGG	GCACTGGTCG	GTTTAGCGTC	<u>CTCGAGGGGG</u>

Figura 29: Secuencia del clon pALV21. Se purificó DNA plasmídico del clon pALV21 y se secuenció según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra la secuencia desde el nucleótido -833 hasta el +42. Las secuencias en negrita corresponden a los sitios de restricción Bam HI y Xho I, ubicados en 5' y 3' respectivamente, que fueron utilizados en el clonado. Las secuencias subrayadas corresponden al vector BS SK+.

D) FENOBARBITAL, cAMP Y GLUCOSA REGULAN LA TRANSCRIPCIÓN A PARTIR DEL PROMOTOR DE ALA-S EN CÉLULAS HepG2

D.1 Experimentos de transfección en células HepG2.

En esta etapa de trabajo, nos propusimos investigar la actividad del promotor de ALA-S de hígado de rata. Para ello se utilizó la construcción pACAT, obtenida de acuerdo a la descripción del apartado anterior, en experimentos de transfección en células hepáticas en cultivo de la línea HepG2. De esta manera se analizó la actividad transcripcional de la secuencia 5'upstream del gen de ALA-S hasta -833pb sobre el gen reporter de la cloramfenicol acetiltransferasa. El sistema de transfección en células eucariontes se calibró para esta construcción, realizando un experimento de transfección de las células con cantidades crecientes de DNA plasmídico. El objetivo de este experimento es determinar la capacidad de aceptar DNA por parte de las células, y también la respuesta del sistema, esperando que mayores cantidades de plásmido, presente en la mezcla de transfección, se refleje en una mayor actividad enzimática de CAT en el extracto celular. Además, elegir la concentración óptima de plásmido a transfectar, de manera de obtener una actividad CAT intermedia tal que la medición resultase sensible, pero además que permitiera al sistema responder a los efectos inductores o inhibitorios ejercidos por los metabolitos en estudio.

En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos de la actividad CAT, normalizada por la actividad β -galactosidasa, en función de la concentración de pACAT. Se obtuvo una respuesta lineal entre la cantidad de plásmido transfectado y la medición de actividad CAT del extracto celular. Por otro lado, se observa que la presencia de fenobarbital 0.6 mM en el medio de cultivo durante la incubación, produce un aumento entre 3-4 veces de la actividad promotora. Esta respuesta también es lineal en todas las concentraciones ensayadas. En los siguientes experimentos se utilizaron 4 μ g de pACAT por cada placa conteniendo aproximadamente 5×10^5 células.

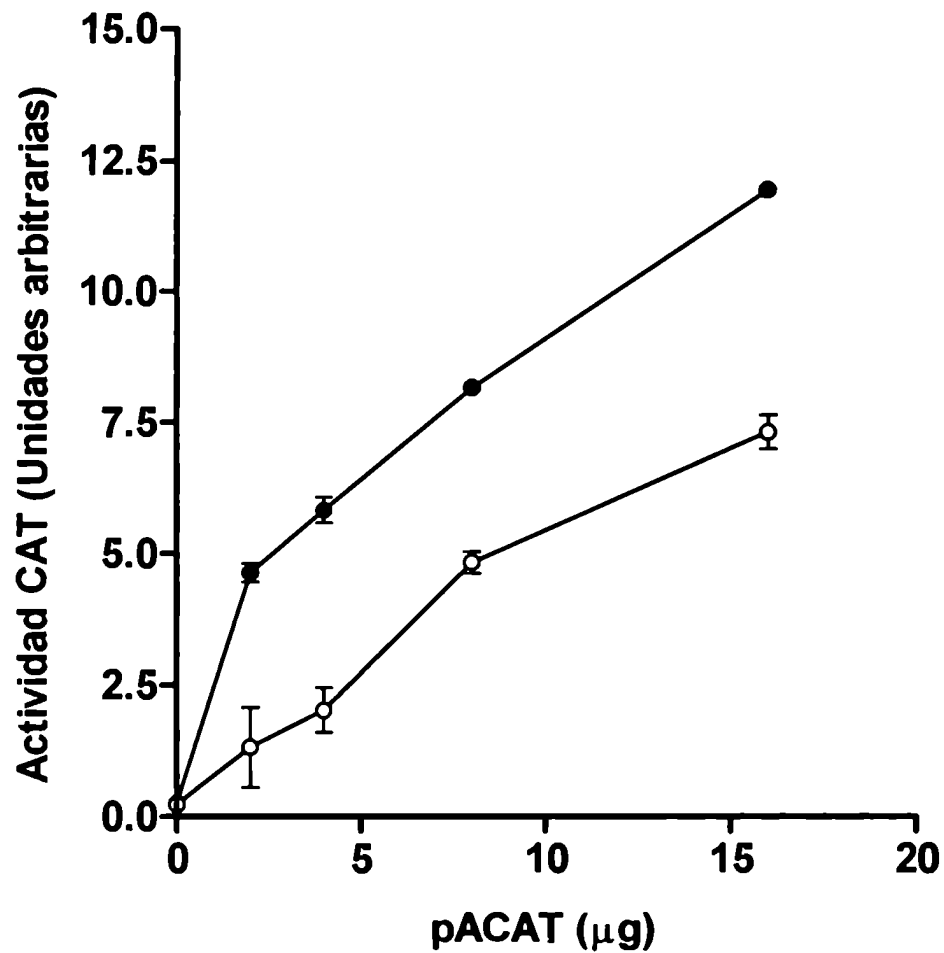


Figura 30: Determinación de la actividad del promotor de ALA-S en células HepG2 transfectadas con cantidades crecientes del plásmido pACAT. Células HepG2 fueron transfectadas con distintas cantidades del plásmido pACAT y con 6.5 μg el plásmido control RSVβgal, según se detalla en Materiales y Métodos. Las células fueron incubadas en presencia (●) y en ausencia (○) de fenobarbital 0.6 mM durante 24 h en medio carente de suero. La actividad específica de CAT ($\text{U} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), medida en los extractos celulares, se expresa relativa a la actividad específica de β-galactosidasa ($\text{U} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Los resultados representan el promedio $\pm$ el ES de cuatro determinaciones independientes.

D.2 El fenobarbital y el 8-CPT-cAMP aumentan la transcripción a partir del promotor de ALA-S en células HepG2

Se analizó la actividad promotora de las secuencias hasta -833 del gen de ALA-S en experimentos de transfección de células HepG2. La presencia de fenobarbital 0.6 mM produce un aumento en la transcripción del gen reporter CAT cercana a 4 veces (Figura 31).

Por otro lado, el análogo de cAMP, 8-CPT-cAMP 100 μ M, produce un aumento de 3-4 veces la expresión génica de CAT, en ausencia de fenobarbital. Resultados similares se obtuvieron en la incubación con 10 μ M forskolina. Este resultado difiere con las determinaciones del nivel de mRNA de ALA-S por Northern o slot blot mostradas anteriormente, en las cuales no se evidencian variaciones significativas del nivel de dicho mensajero en presencia o ausencia del nucleótido cíclico o de forskolina.

Al estudiar el efecto de la combinación de fenobarbital y 8-CPT-cAMP o forskolina, se observó que la inducción de la expresión CAT refleja aproximadamente la acción aditiva de ambos efectos.

D.3 La glucosa disminuye la transcripción a partir del promotor de ALA-S en células HepG2

Al analizar la actividad promotora de las secuencias hasta -833 del gen de ALA-S en experimentos de transfección de células HepG2 en presencia de glucosa 80 mM, se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 32.

La inducción de la transcripción de CAT producida por fenobarbital, es significativamente inhibida por la glucosa ($p < 0.05$). Sin embargo, la inhibición en la actividad promotora de ALA-S es menor que la disminución de la cantidad del mRNA de ALA-S obtenida por Northern blot (Figura 21). Por otro lado, este hidrato de carbono no presenta efecto alguno sobre la actividad promotora del control.

El análogo de cAMP, 8-CPT-cAMP y la forskolina, revierten el efecto inhibitorio ejercido por la glucosa. Estos resultados se correlacionan estrechamente con las determinaciones de actividad y cantidad del mRNA de ALA-S mostradas anteriormente (Figuras 17 y 21 respectivamente).

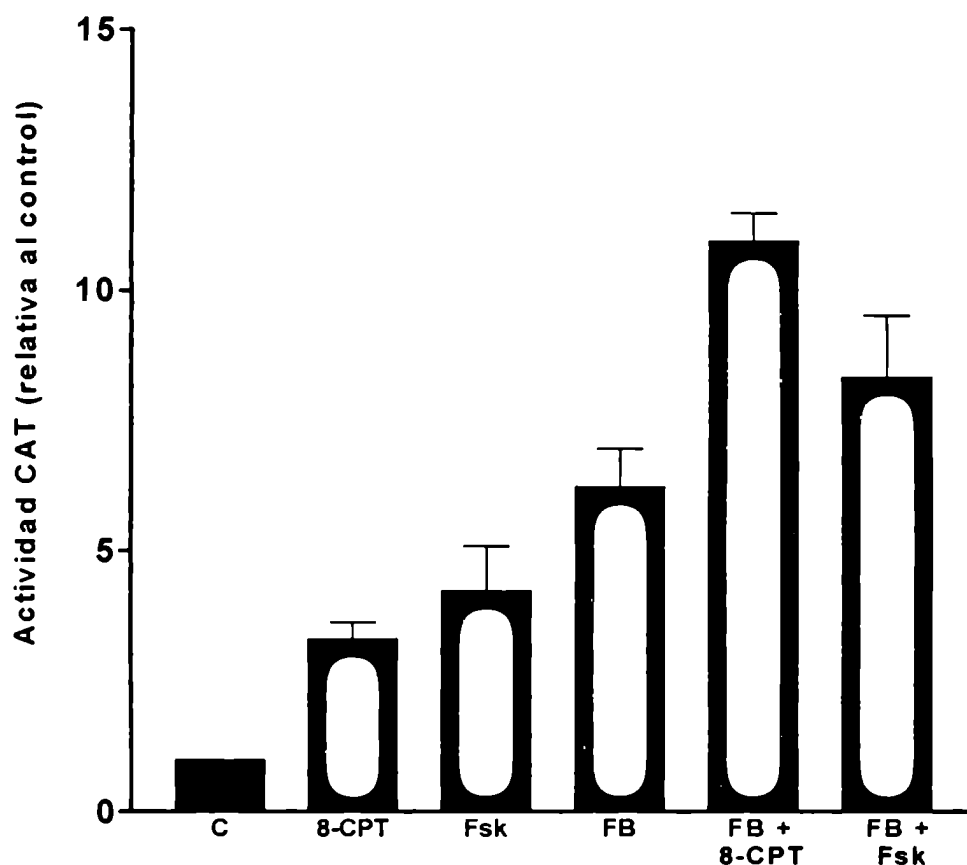


Figura 31: Efecto de fenobarbital, 8-CPT-cAMP y forskolina sobre la actividad del promotor de ALA-S en células HepG2. Células HepG2 fueron transfectadas con 4 μ g del plásmido pACAT y con 6.5 μ g del plásmido control RSV β gal, según se detalla en Materiales y Métodos. Las células fueron incubadas en presencia de los agregados indicados en la figura: 8-CPT: 100 μ M 8-CPT-cAMP, Fsk: 10 μ M forskolina, FB: 0.6 mM fenobarbital; C: control sin ningún agregado, durante 24 h en medio carente de suero. La actividad específica de CAT ($\text{U} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), medida en los extractos celulares se normalizó respecto a la actividad específica de β -galactosidasa ($\text{U} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), y se expresan relativos al control sin agregados. Los resultados representan el promedio $\pm$ el ES de seis determinaciones independientes.

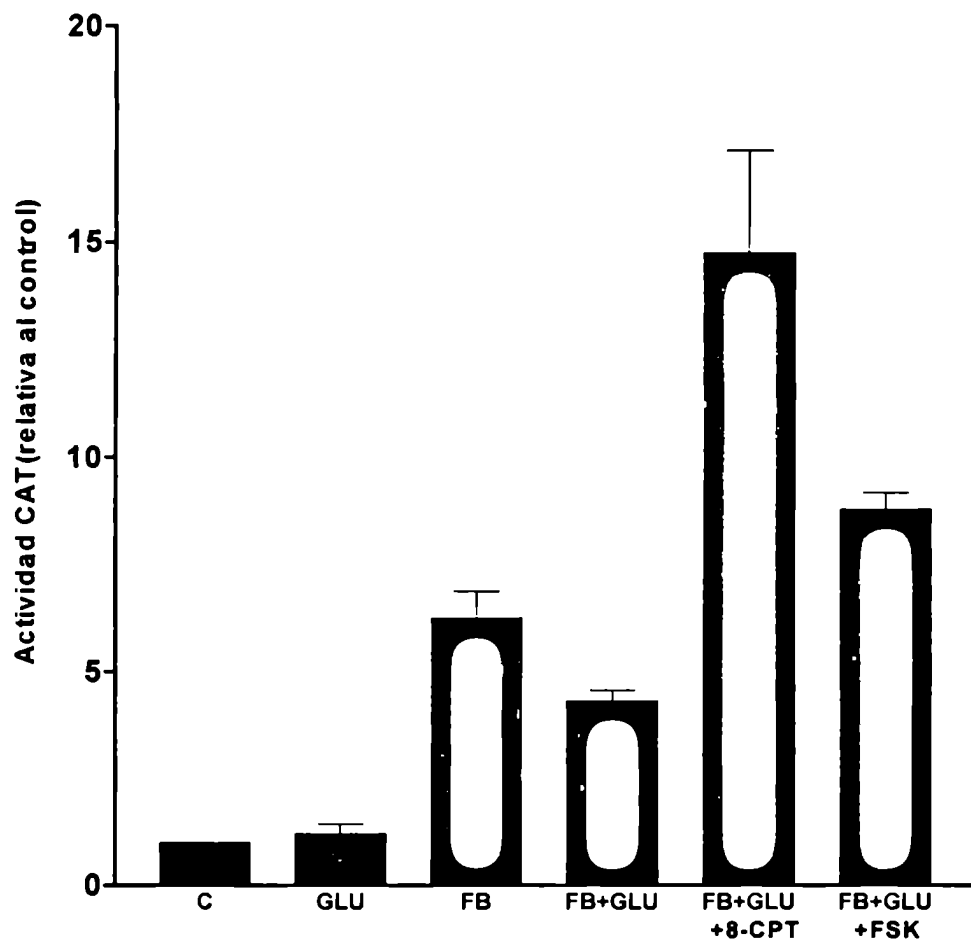


Figura 32: Efecto de glucosa sobre la actividad del promotor de ALA-S en células HepG2. Células HepG2 fueron transfectadas con 4 μ g del plásmido pACAT y con 6.5 μ g del plásmido control RSV β gal, según se detalla en Materiales y Métodos. Las células fueron incubadas en presencia de los agregados indicados en la figura: GLU: 80 mM glucosa, 8-CPT: 100 μ M 8-CPT-cAMP, Fsk: 10 μ M forskolina, FB: 0.6 mM fenobarbital; C: control sin ningún agregado, durante 24 h en medio carente de suero. La actividad específica de CAT (U x mg proteína⁻¹ x min⁻¹), medida en los extractos celulares, se normalizó respecto a la actividad específica de β -galactosidasa (U x mg proteína⁻¹ x min⁻¹), y se expresan relativos al control sin agregados. Los resultados representan el promedio $\pm$ el ES de seis determinaciones independientes.

Capítulo 3: Modulación de la expresión génica de ALA-S por las quinasas de proteínas A y C.

A) LA ACTIVACION DE LA QUINASA DE PROTEÍNAS A INDUCE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE ALA-S

Dado que se determinó que el cAMP cumple un rol regulatorio importante en la expresión del gen de ALA-S, y que el efecto de este segundo mensajero en las células es mediado por la activación de una quinasa de proteínas dependiente de cAMP o quinasa de proteínas A, se estudió en esta etapa del trabajo, la participación de esta enzima en la regulación de la expresión génica de ALA-S.

Para ello se desarrollaron dos estrategias diferentes. Una de ellas se basó en determinar si existe efecto sinérgico entre pares de análogos de cAMP sitio selectivos de la PKA, sobre la expresión del mRNA de ALA-S. La segunda estrategia consistió en determinar el efecto de la sobreexpresión de la subunidad catalítica de la PKA en experimentos de transfección con el plásmido pACAT descrito anteriormente.

A.1 Análisis del efecto de pares de análogos de cAMP sitio selectivos para la PKA.

Esta estrategia se basa en las siguientes consideraciones. Existen dos isoenzimas principales de la PKA denominadas de tipo I y tipo II, por diferencias en las subunidades regulatorias (R), las cuales se unen al cAMP y regulan la actividad catalítica. Cada subunidad R contiene dos sitios diferentes de unión a cAMP denominados sitio 1 (o B) y 2 (o A). En el estudio y caracterización de las propiedades de unión del cAMP a las subunidades regulatorias, se han utilizado distintos análogos del nucleótido cíclico. De esta manera, se observó que ciertos análogos se unen selectivamente a uno u otro de estos sitios de unión de la R, y además que la unión de un nucleótido cíclico a uno de los sitios estimula la unión al segundo sitio. Cuando dos análogos, cada uno selectivo por un sitio de unión diferente, son agregados, la enzima es activada en una manera sinérgica. Dada la especificidad de la acción de los análogos,

la demostración del efecto sinérgico en células intactas, indica claramente que la PKA media una respuesta particular (Beebe et al., 1988). Generalmente para ambas isoenzimas, análogos modificados en la posición 8 del anillo de adenina (C-8) son selectivos por el sitio 1 mientras que los análogos modificados en la posición 6 (C-6), son selectivos por el sitio 2. Pero además, existe una diferencia de selectividad entre las dos isoenzimas, resultando la de tipo I más selectivos por los análogos con grupos amino en la posición 8 y la de tipo II por los análogos modificados en la posición 8 con un grupo tiol.

En nuestro estudio, hemos utilizado los análogos de cAMP 8-(6-aminohexil)amino-cAMP (8-AHA-cAMP), selectivo para el sitio 1 y el N⁶-benzoil-cAMP (benzoil cAMP), selectivo para el sitio 2 de la PKA tipo I. Para la de tipo II hemos utilizado el 8-(4-clorofeniltio)-cAMP (8-CPT-cAMP) para el sitio 1 y el benzoil cAMP para el sitio 2.

Cabe señalar que, si bien dichos análogos son selectivos para los distintos sitios, no necesariamente son específicos, es decir que a altas concentraciones dichos análogos podrán unirse a ambos sitios. Por esta razón, el efecto sinérgico debe observarse a niveles de estimulación por cAMP relativamente bajos. Por ese motivo, en nuestro sistema, fue necesario primero realizar una curva de efecto a distintas concentraciones de los análogos para determinar el rango de estimulación necesario para poder evidenciar el efecto pero, a la vez, la concentración mínima de análogo que luego utilizado de a pares produjera la acción sinérgica. En la Figura 33, se pueden observar las curvas de dosis respuesta de los distintos análogos, medidas sobre la actividad del mRNA de ALA-S. De este experimento se determinó que las dosis necesarias para obtener entre el 25 y 30% de efecto es 10 μ M para benzoil cAMP y 8-CPT-cAMP y 50 μ M para 8-AHA-cAMP.

El estudio de la acción combinada de pares de análogos de cAMP sobre el nivel del mensajero de ALA-S se muestra en la Figura 34. Las tres primeras barras representan el nivel de mRNA en el control sin agregados y con los tratamientos con fenobarbital 0.6 mM y con dibutilil cAMP 100 μ M. En este último caso se observa una potenciación de la inducción ejercida por fenobarbital como ya se mostró en secciones anteriores.

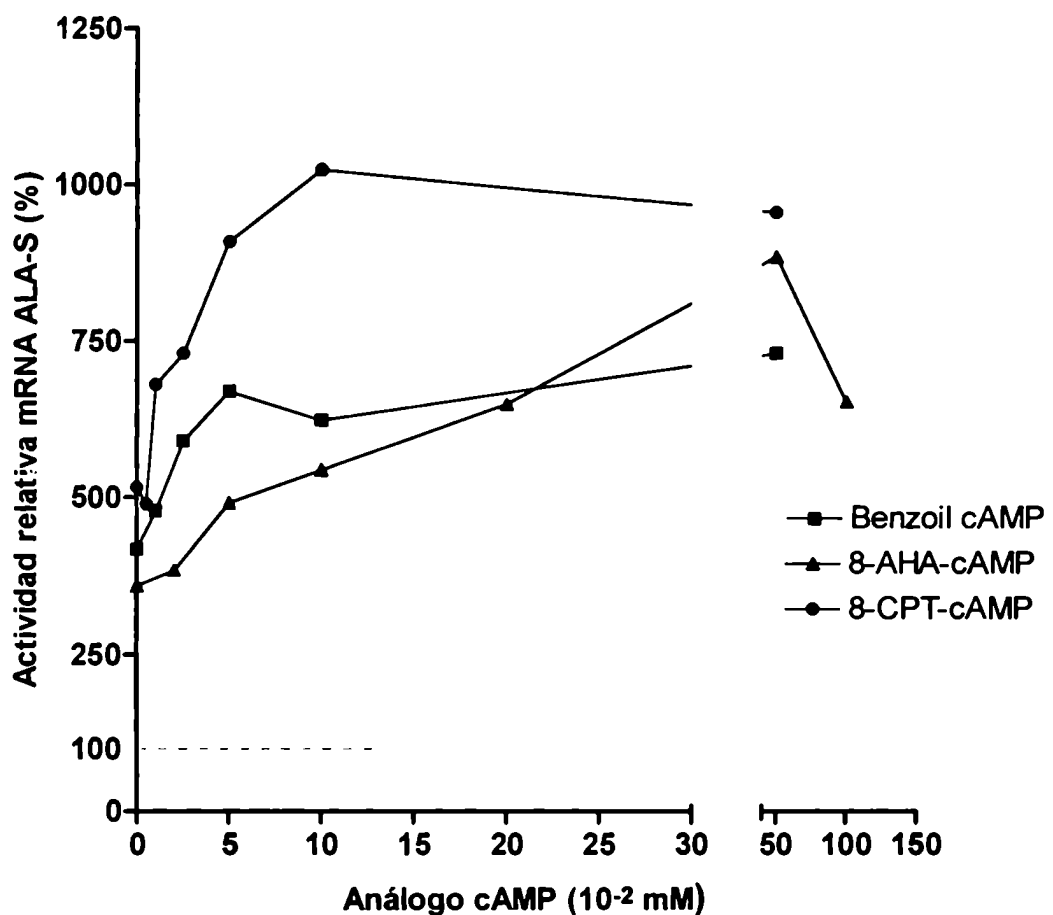


Figura 33: Curva dosis respuesta de los distintos análogos de cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 3 h en presencia de fenobarbital 0.6 mM y distintas concentraciones de los análogos de cAMP que se indican en la figura. La actividad del mRNA de ALA-S se determinó como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de actividad relativa se calculó considerando 100% al porcentaje de actividad del control sin agregados (0.042%). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales difieren en menos del 8% del promedio

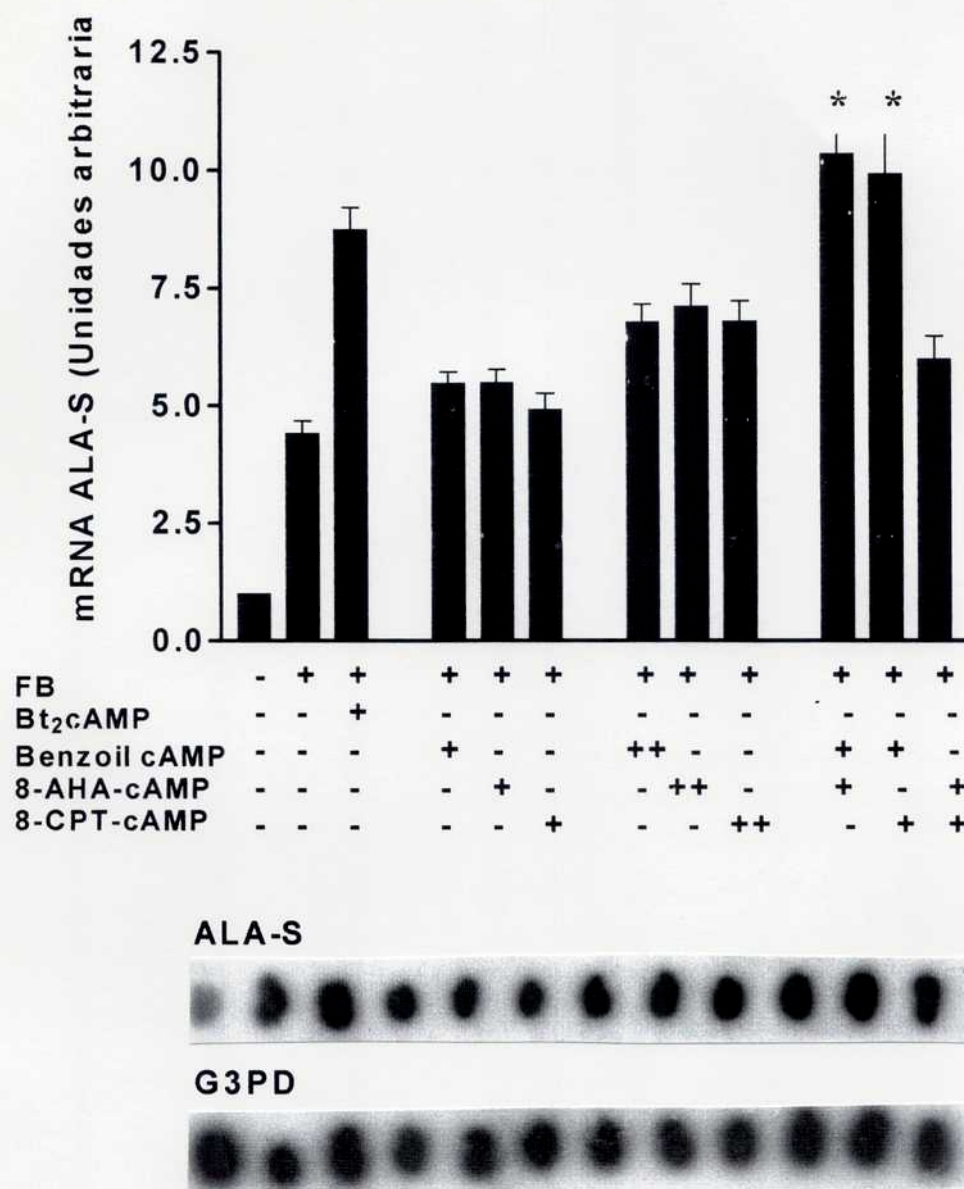


Figura 34: Efecto de análogos de cAMP sitio selectivos sobre el nivel del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas normales. Suspensiones de hepatocitos provenientes de ratas normales fueron incubadas durante 3 h con los agregados indicados en la figura (+): fenobarbital 0.6 mM (FB), dibutiril cAMP 100 μ M (Bt₂cAMP), Benzoil cAMP 10 μ M (Benzoil cAMP), 8-AHA-cAMP 50 μ M (8-AHA-cAMP), 8-CPT-cAMP 10 μ M (8-CPT-cAMP). El símbolo ++ indica que en esas muestras se incubado en presencia de doble concentración del análogo indicado. El RNA total se purificó de cada incubado, se sembró en filtro de nitrocelulosa (20 μ g/slot), y se hibridizó como se describe en Materiales y Métodos. Para estandarizar los resultados se determinó el mRNA de G3PD por hibridización. Las señales autorradiográficas se cuantificaron por densitometría y se presentan como gráfico de barras. Se muestra la autorradiografía de un experimento representativo donde los sucesivos slot blots corresponden a cada barra. Los resultados están expresados relativos al control sin agregados y representan el promedio $\pm$ DS de cuatro experimentos independientes.

El segundo grupo de barras muestra los resultados de niveles de mRNA de ALA-S en presencia de dosis de cada análogo suficientes para obtener aproximadamente el 30% del efecto total. Luego, se muestran los resultados con el agregado de doble concentración de cada uno de los análogos. En el último grupos de barras se observa la acción conjunta de los pares selectivos, en concentración simple de cada uno de ellos, para la isoenzima tipo I y para la tipo II. En ambos casos se obtuvo un efecto sinérgico con respecto a los resultados obtenidos con cada análogo en doble concentración. La última barra de este grupo representa el control negativo donde no se observa efecto sinérgico con el agregado de dos análogos selectivos para los sitios 1.

A.2 Efecto de la sobreexpresión de la subunidad C de PKA sobre la actividad del promotor de ALA-S en ensayos de transfección de células HepG2.

La segunda estrategia utilizada consistió en sobreexpresar la subunidad catalítica de la PKA en células HepG2 transfectadas con el plásmido pACAT descrito anteriormente y medir el efecto de la presencia de ésta sobre la transcripción del gen reportero CAT. Para ello se cotransfectaron las células con el plásmido pMTC α que contiene el gen estructural de la subunidad C de PKA bajo el promotor inducible de la metalotioneína.

En la Figura 35 se observan los resultados obtenidos en este experimento. Por un lado, el agregado de cantidades crecientes del plásmido pMTC α produce un aumento en la transcripción del gen CAT, tanto en el control como en las incubaciones con fenobarbital 0.6 mM y con fenobarbital mas 8-CPT-cAMP 100 μ M. Este incremento se acentúa si se agrega al medio Zn²⁺ que es el inductor del promotor que dirige la transcripción de la subunidad C de PKA. En el caso de mayor cantidad de pMTC α (6 μ g/caja) en presencia de Zn²⁺ se llega a obtener una inducción cercana a las 20 veces respecto al control sin agregados. Estos resultados confirman que la actividad quinasa de la PKA juega un papel preponderante en la regulación de la actividad transcripcional del promotor de ALA-S de hígado de rata.

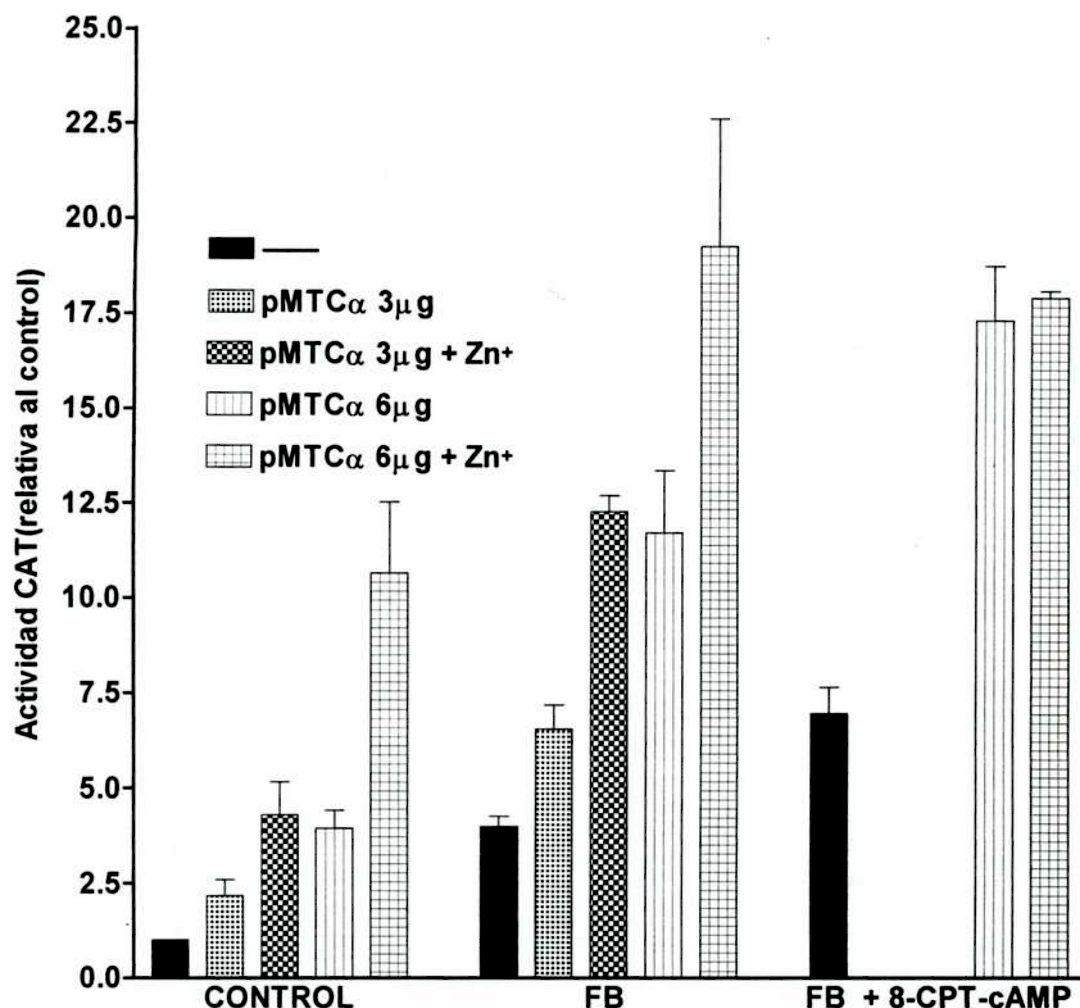


Figura 35: Efecto de la sobreexpresión de la subunidad C de la PKA sobre la actividad del promotor de ALA-S en células HepG2. Células de la línea fueron transfectadas con 4μg del plásmido pACAT, 6.5 μg del plásmido control RSVβgal, y 3 o 6 μg de plásmido pMTCα según se detalla en Materiales y Métodos. Las células fueron incubadas en presencia de los agregados indicados en la figura: 8-CPT: 100 μM 8-CPT-cAMP, FB: 0.6 mM fenobarbital, Zn²⁺: 10 μM sulfato de zinc; C: control sin ningún agregado, durante 24 h en medio carente de suero. La actividad específica de CAT (U x mg proteína⁻¹ x min⁻¹) medida en los extractos celulares se normalizó respecto a la actividad específica de β-galactosidasa (U x mg proteína⁻¹ x min⁻¹), y se expresan relativos al control sin agregados. Los resultados representan el promedio ± el ES de seis determinaciones independientes.

B) LA ACTIVACIÓN DE LA QUINASA DE PROTEÍNAS C INHIBE LA EXPRESIÓN DE ALA-S

Existen diversos factores que regulan de una manera concertada la síntesis de ALA-S hepática. Ya hemos analizado en secciones anteriores el efecto de fenobarbital, glucosa, y cAMP a través de la activación de la PKA. Como se presentó en la introducción, la PKA modula la función de diversos factores nucleares de unión a secuencias presentes en los genes regulados por cAMP. La secuencia consenso CRE presenta alta homología con la secuencia de unión de AP-1, factor que media la respuesta a ésteres de forbol. También se debe considerar el factor AP-2 que media la respuesta de ambas señales: cAMP y ésteres de forbol, una a través de PKA y la otra a través de PKC respectivamente.

Por otro lado, la expresión de ALA-S es regulada también por la insulina. Si bien no analizaremos su mecanismo de acción en el presente trabajo, es sabido que varios de sus efectos en la célula se deben a la habilidad que presenta esta hormona de incrementar los niveles de fosfolípidos y diacilglicerol, con la concomitante activación de la PKC. Basados en estos antecedentes, nuestro siguiente objetivo consistió en investigar si la PKC está involucrada en la regulación de la expresión de la ALA-S.

B.1 El TPA disminuye el nivel del mRNA de ALA-S en hepatocitos de rata.

Suspensiones de hepatocitos fueron tratadas con TPA 1 μ M, potente activador de PKC, durante 3 horas en presencia y ausencia de fenobarbital. Por determinaciones del mRNA de ALA-S por Northern blot se demostró que el tratamiento con TPA produce una inhibición del 75% del mensajero de ALA-S tanto en la condición basal como en la inducida con fenobarbital 0.6 mM (Figura 36).

Este efecto inhibitorio es específico dado que, al determinar el mRNA de G3PD, no observamos variación alguna en los niveles de este mensajero. Por otro lado, se analizó el efecto de un análogo de TPA que no activa la PKC, el 4 α PDA. de esta manera analizamos si el efecto observado se debe a un efecto generalizado de los ésteres de forbol: Esta posibilidad fue descartada al obtener como resultado que la administración de 1 μ M 4 α PDA, no es capaz de modificar los niveles del mRNA de ALA-S, tanto en la

condición basal como en la inducida con fenobarbital. Estos resultados se confirmaron incubando con concentraciones de 0.1 y 10 μ M obteniendo similares resultados (datos no mostrados).

La adición de dimetilsulfóxido, el solvente en el cual se administra el TPA, tampoco produce modificación alguna sobre los niveles del mRNA de ALA-S.

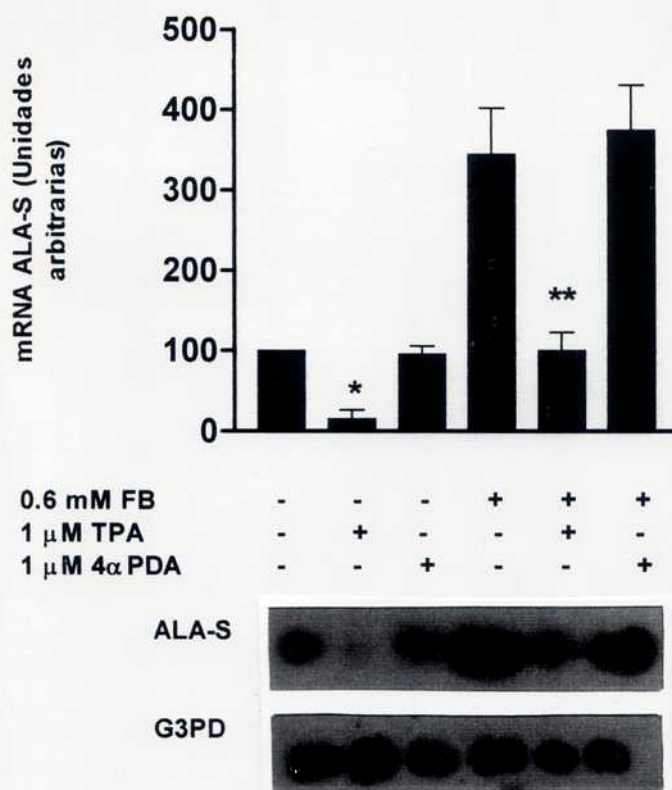


Figura 36: Efecto de TPA y 4 α PDA sobre el nivel del mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas. Suspensiones de hepatocitos provenientes de ratas normales fueron incubadas durante 3 h con los agregados indicados en la figura: FB: fenobarbital, TPA: 12-*O*-tetradecanoilforbol 13-acetato, 4 α PDA: 4 α -forbol 12,13-diacetato. La determinación del mRNA de ALA-S se realizó por Northern blot (20 μ g/calle) como se describe en Materiales y Métodos. Para estandarizar los resultados se determinó el mRNA de G3PD por hibridización. Las señales autorradiográficas se cuantificaron por densitometría y se presentan como gráfico de barras. Los resultados están expresados relativos al control sin agregados y representan el promedio $\pm$ DS de cuatro experimentos independientes. El test de Student se usó para comparar las muestras conteniendo TPA o 4 α PDA con el control (* p <0.01) y las muestras conteniendo FB+TPA o FB+4 α PDA con la que contiene FB solamente (** p <0.01).

B.2 Curva dosis respuesta del efecto inhibitorio ejercido por TPA

Se determinaron los niveles de mRNA de ALA-S a distintas concentraciones de TPA en condiciones basales y de inducción por fenobarbital. Los resultados se muestran en la Figura 37. Estos experimentos muestran un claro efecto inhibitorio dosis dependiente. El TPA es efectivo entre las concentraciones 10^{-8} M y 10^{-5} M, mientras que el efecto inhibitorio máximo se alcanzó con concentraciones de 10^{-6} M o mayores. La concentración necesaria para alcanzar la mitad del efecto inhibitorio máximo es de alrededor de 10 nM, tanto en las células sin tratar como en las estimuladas con fenobarbital.

B.3 Curva de tiempo del efecto de TPA sobre el mRNA de ALA-S

Los experimentos para obtener la curva del efecto de TPA sobre el mRNA de ALA-S a lo largo del tiempo se realizaron utilizando una concentración de $1\mu\text{M}$ del éster de forbol, con la que se obtiene el máximo efecto inhibitorio según se discutió en el apartado anterior. Como se observa en la Figura 38 el mRNA de ALA-S incrementa más de tres veces en las células incubadas durante 2.5 horas con fenobarbital 0.6 mM, y se mantiene en este nivel por aproximadamente 2 horas. El agregado de TPA luego de la preincubación con el barbiturato produce una marcada inhibición del mensajero de ALA-S. El $t_{1/2}$ de esta inhibición es de 20-25 minutos (Figura 38B). Resultados similares fueron obtenidos con el control sin agregados (Figura 38A).

B.4 Efecto del agonista de PKC, DOG sobre el mRNA de ALA-S

El efecto inhibitorio del éster de forbol TPA, sugirió que el diacilglicerol, en su acción activadora de la PKC, podría estar involucrado en la inhibición del mRNA de ALA-S. Para poder correlacionar el efecto inhibitorio de TPA con activadores fisiológicos de PKC, realizamos experimentos similares a los descritos utilizando el derivado sintético DOG, que es más estable y penetra las células con mayor facilidad que el diacilglicerol.

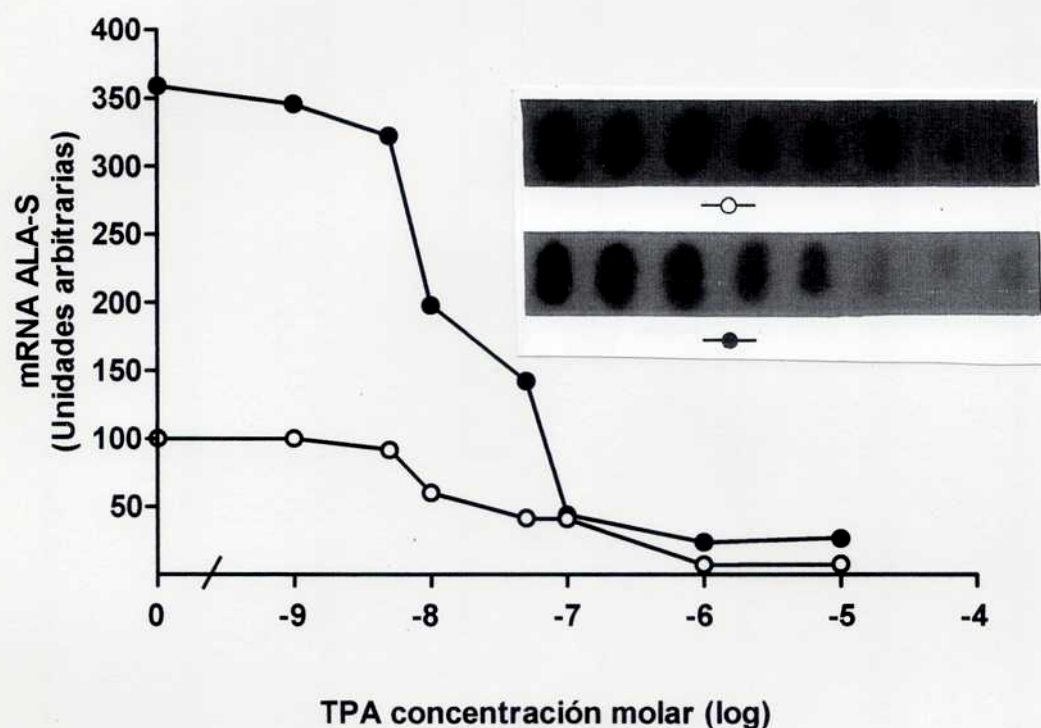


Figura 37: Curva dosis respuesta del efecto de TPA sobre el mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos provenientes de ratas normales, fueron preincubadas durante 2.5 h en ausencia (○) o en presencia (●) de fenobarbital 0.6 mM, luego se incubaron durante 1.5 h con distintas concentraciones de TPA según se indica en la figura. La determinación del mRNA de ALA-S se realizó por slot blot (20 μ g/calle) como se describe en Materiales y Métodos. Las señales autorradiográficas se cuantificaron por densitometría, se muestra un experimento representativo donde los sucesivos slot blots corresponden a cada concentración de TPA (de izquierda a derecha). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales no difieren en mas del 10% del promedio.

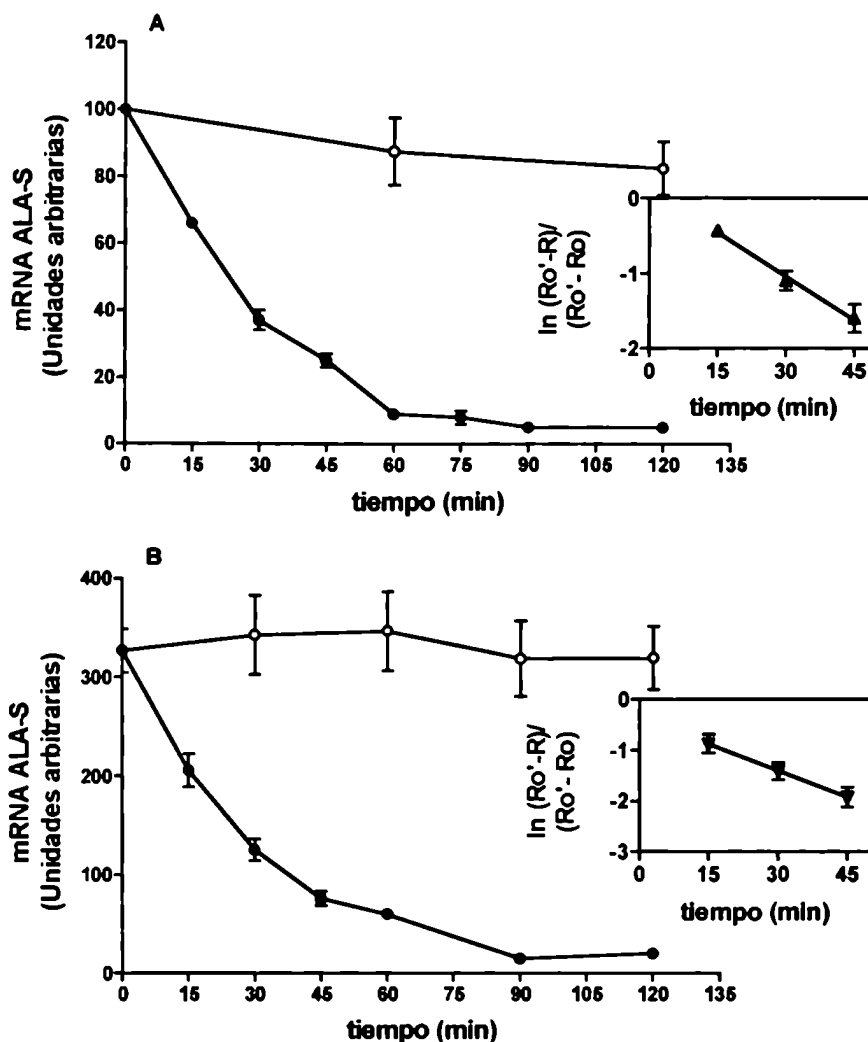


Figura 38: Curva de tiempo del efecto de TPA sobre el mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos provenientes de ratas normales, fueron preincubadas durante 2.5 h en ausencia (A) o en presencia (B) de fenobarbital 0.6 mM, luego se incubaron sin (○) o con (●) el agregado de TPA 1 mM durante distintos tiempos. El mRNA de ALA-S se determinó por slot blot. La determinación del mRNA de ALA-S se realizó por slot blot (20 µg/calle) como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados relativos al control a tiempo cero y representan el promedio ± ES de cuatro experimentos independientes. Inset: Determinación cinética de la vida media del mRNA de ALA-S con TPA 1 µM en ausencia (A) o en presencia (B) de fenobarbital 0.6 mM. Los resultados de las curvas de tiempo se regraficaron en la forma integrada. R es el nivel de actividad del mRNA de ALA-S a cada tiempo; Ro y Ro' son los niveles de actividad del mRNA de ALA-S inicial y final respectivamente, en cada tratamiento. Cada punto representa el promedio ± ES de cuatro experimentos independientes. Las rectas fueron calculadas por regresión lineal y todas poseen un coeficiente de correlación > 0.99.

Se determinaron los niveles de mRNA de ALA-S a distintas concentraciones de DOG, tanto para el control sin agregados como para los tratados con fenobarbital. Los resultados se muestran en la Figura 39. Estos experimentos muestran un efecto inhibitorio dependiente de la dosis de DOG utilizada. El DOG es efectivo entre las concentraciones de 10^{-8} M y 10^{-5} M, mientras que el efecto inhibitorio máximo se alcanzó con concentraciones de 10^{-6} M o mayores. La concentración necesaria para alcanzar la mitad del efecto inhibitorio máximo es de alrededor de 100 μ M, tanto en las células sin tratar como en las estimuladas con fenobarbital.

Los experimentos para obtener la curva de tiempo del efecto de DOG sobre el mRNA de ALA-S se realizaron utilizando una concentración de 500 μ M para obtener el máximo efecto inhibitorio. Como se observa en la Figura 40 el agregado de DOG luego de una preincubación de 2.5 horas en presencia o en ausencia de fenobarbital produce una marcada inhibición del mRNA de ALA-S. El $t_{1/2}$ de esta inhibición es de 25-30 minutos (Figura 40B). Con respecto al control sin agregados, se obtuvieron resultados similares (Figura 40A).

B.5 Determinación de la vida media del mRNA de ALA-S en presencia de activadores de PKC

Para determinar si el efecto inhibitorio ejercido tanto por el TPA como por DOG es debido a un cambio en la estabilidad del mRNA de ALA-S, se calcularon las constantes de degradación y los valores de vida media para dicho mensajero en los distintos tratamientos. Las curvas de tiempo de las Figuras 38 y 40, se graficaron en la forma integrada (Insets de las Figs: 38 y 40). Como se explicó en secciones anteriores en este tipo de gráfico, la pendiente negativa de esta curva es equivalente a la constante de degradación k , calculando la vida media de la relación $t_{1/2} = \ln 2/k$. En la Tabla 8 se observa que la vida media del mensajero de ALA-S tanto en condiciones basales como inducido por fenobarbital 0.6 mM, no se ve modificada por el tratamiento con TPA o DOG. Estas observaciones indican que la velocidad de degradación del mRNA de ALA-S no estaría modificada por la acción de TPA o DOG, por lo tanto la disminución de los niveles de mRNA de ALA-S causada por estos efectores no se debería a una menor estabilidad de dicho mensajero.

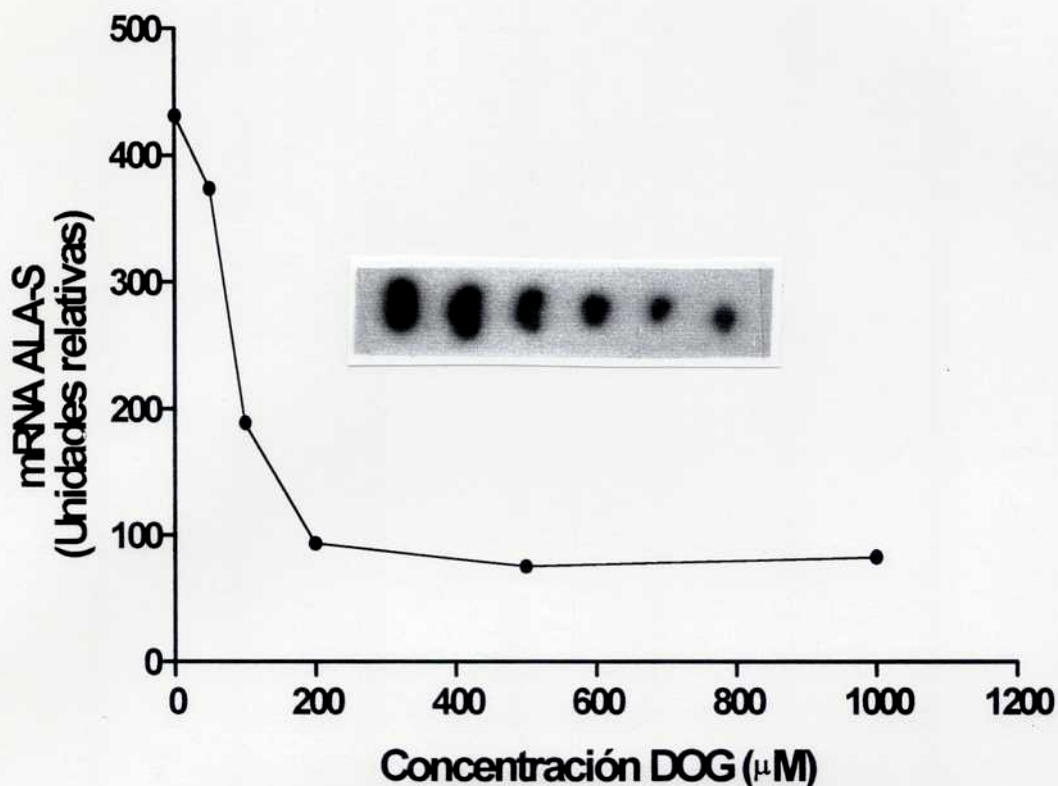


Figura 39: Curva dosis respuesta del efecto de DOG sobre el mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos provenientes de ratas normales fueron preincubadas durante 2.5 h en presencia de fenobarbital 0.6 mM; luego se incubaron durante 1.5 h con distintas concentraciones de DOG según se indica en la figura. La determinación del mRNA de ALA-S se realizó por slot blot (20 $\mu\text{g}/\text{calle}$) como se describe en Materiales y Métodos. Las señales autorradiográficas se cuantificaron por densitometría, se muestra un experimento representativo donde los sucesivos slot blots corresponden a cada concentración de DOG (de izquierda a derecha). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes cuyos valores individuales no difieren en más del 10% del promedio.

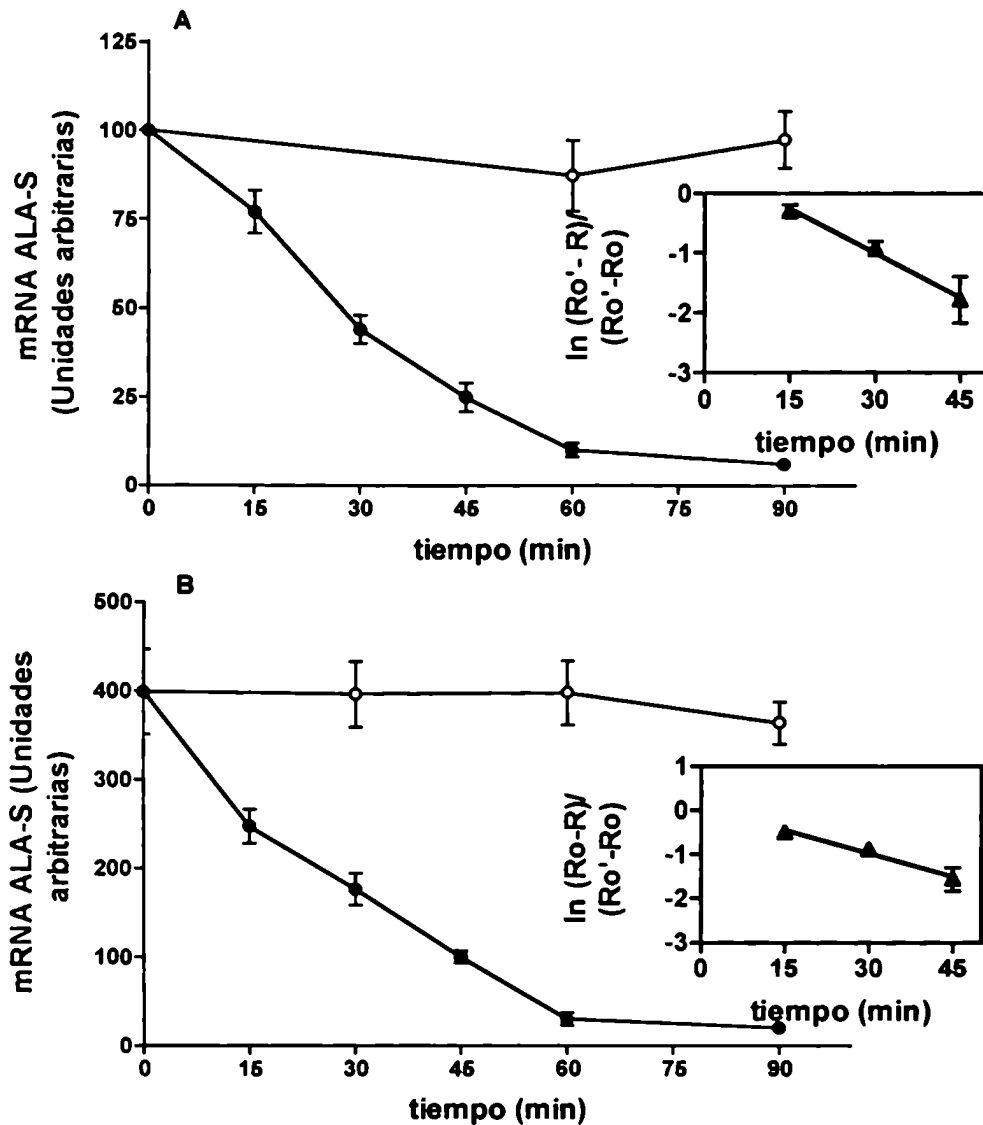


Figura 40: Curva de tiempo del efecto de DOG sobre el mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos provenientes de ratas normales, fueron preincubadas durante 2.5 h en ausencia (A) o en presencia (B) de fenobarbital 0.6 mM, luego se incubaron sin (○) o con (●) el agregado de DOG 500 μ M durante distintos tiempos. La determinación del mRNA de ALA-S se realizó por slot blot (20 μ g/calle) como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados relativos al control a tiempo cero y representan el promedio $\pm$ ES de cuatro experimentos independientes. Inset: Determinación cinética de la vida media del mRNA de ALA-S con DOG 500 μ M en ausencia (A) o en presencia (B) de fenobarbital 0.6 mM. Los resultados de las curvas de tiempo se regraficaron en la forma integrada. R es el nivel de actividad del mRNA de ALA-S a cada tiempo; Ro y Ro' son los niveles de actividad del mRNA de ALA-S inicial y final respectivamente, en cada tratamiento. Cada punto representa el promedio $\pm$ ES de cuatro experimentos independientes. Las rectas fueron calculadas por regresión lineal y todas poseen un coeficiente de correlación > 0.99 .

TRATAMIENTO	CONSTANTE DE DEGRADACION (k , min ⁻¹)		VIDA MEDIA ($t_{1/2}$, min)	
	Control	Fenobarbital 0.6 mM	Control	Fenobarbital 0.6 mM
—	0.035 ± 0.003	0.041 ± 0.002	20 ± 3	17 ± 4
TPA 1 µM	0.039 ± 0.003	0.035 ± 0.001	18 ± 2	20 ± 1
DOG 500 µM	0.049 ± 0.004	0.036 ± 0.005	14 ± 1	19 ± 3

Tabla 8: Constantes de degradación y vida media del mRNA de ALA-S de hepatocitos de ratas tratados con TPA o DOG

B.6 Efecto de TPA y DOG sobre el promotor de ALA-S

Los resultados anteriores sugieren que el efecto de TPA y DOG se ejercería sobre la transcripción. Los siguientes experimentos consistieron en estudiar el efecto de estos activadores sobre la actividad promotora de la región -833 +42 del gen de ALA-S en experimentos de transfección de células HepG2 (Figura 41). Observamos que TPA 1 µM ó DOG 500 µM producen una significativa disminución de la expresión del gen reportero CAT, tanto del nivel basal como del nivel inducido por 0.6 mM fenobarbital.

De este modo, la activación de la PKC produciría una marcada inhibición de la expresión del gen ALA-S; las secuencias responsables de dicho efecto residirían en la zona promotora hasta -833 pb upstream del sitio de iniciación de la transcripción.

B.7 Activación prolongada de PKC

Es sabido, que en muchos tipos celulares, el tratamiento prolongado con ésteres de forbol resulta en una casi depleción de la PKC celular, este fenómeno se lo conoce con el término de “downregulation”. Dado que, de acuerdo a lo mostrado anteriormente, la activación de PKC conduce a una marcada inhibición del mRNA de ALA-S, quisimos evaluar si la disminución de la PKC celular previene la inhibición ejercida sobre dicho

mensajero. Para ello, realizamos una preincubación con TPA 1 μ M durante 1.5 horas, tiempo en el cual se produce la máxima inhibición del mRNA de ALA-S. Luego las células fueron incubadas durante 2.5 horas adicionales con los tratamientos respectivos.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 42. La estimulación prolongada de PKC resulta en una restauración de la sensibilidad de ALA-S al tratamiento con fenobarbital 0.6 mM. En este caso se observa un incremento en los niveles de mRNA cercano a 12 veces comparado con el obtenido en presencia de fenobarbital y TPA sin ningún agregado durante el pretratamiento (comparar línea 6 con línea 5).

También se muestran los niveles de mensajero en el control sin ningún agregado (línea 1), con fenobarbital 0.6 mM (línea 2) o con 1 μ M TPA durante el pretratamiento (línea 3), obteniéndose similares resultados a los ya discutidos anteriormente. La presencia de TPA 1 μ M produce una marcada inhibición a la 1.5 horas y este efecto se mantiene durante las siguientes 2.5 horas (líneas 3 y 4).

B.8 Efecto de inhibidores de PKC sobre el mRNA de ALA-S

Con el objetivo de estudiar en profundidad la acción de la PKC sobre el mRNA de ALA-S hemos analizado cuales serían las consecuencias de inhibir dicha quinasa utilizando dos inhibidores, estaurosporina y calfostín C.

En la Figura 43 se observa que el tratamiento de los hepatocitos con 1 μ M estaurosporina o 1 μ M calfostín C da como resultado el bloqueo total del efecto inhibitorio ejercido por la acción del TPA 1 μ M sobre el mRNA de ALA-S. Este bloqueo se observa tanto sobre el nivel basal de mRNA como sobre el nivel inducido con fenobarbital 0.6 mM. Por otro lado, como puede observarse en la misma figura, los niveles de mRNA de ALA-S no varían significativamente cuando las células se trataron con estaurosporina (entre 10^{-6} y 10^{-10} M) o calfostín C (10^{-6} M) solamente, tanto en el nivel basal como en el inducido con fenobarbital 0.6 mM.

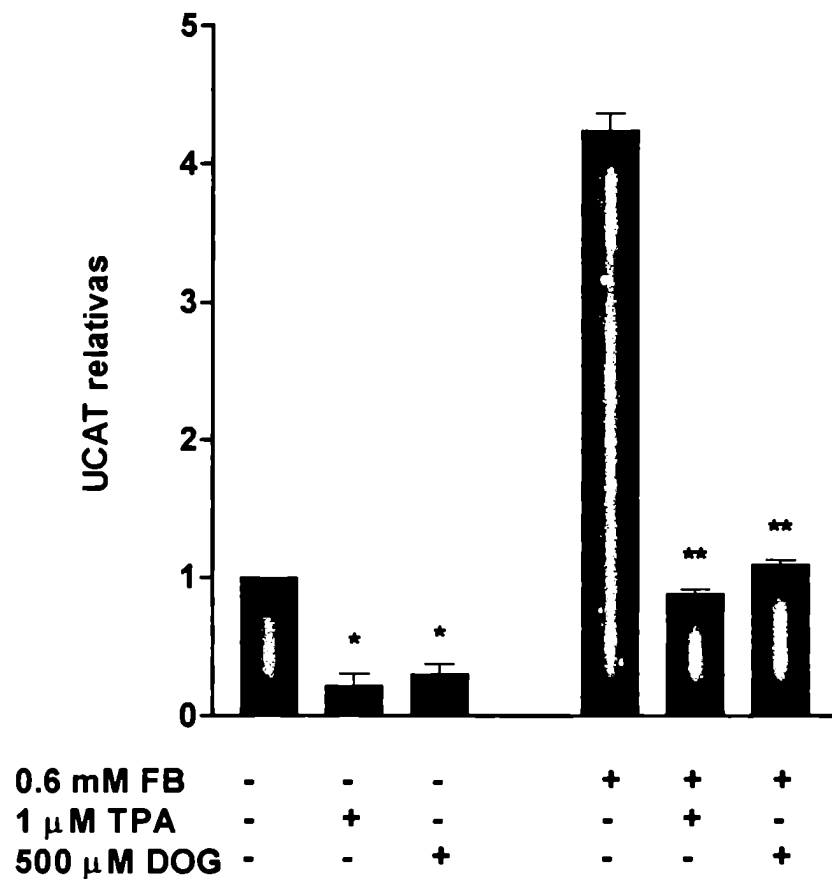


Figura 41: Efecto de TPA y DOG sobre la actividad del promotor de ALA-S en células HepG2. Células HepG2 fueron transfectadas con 4μg del plásmido pACAT y con 6.5 μg del plásmido control RSVβgal, según se detalla en Materiales y Métodos. Las células fueron incubadas en presencia de los agregados indicados en la figura durante 24 h en medio carente de suero. La actividad específica de CAT ($\text{U} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) medida en los extractos celulares se normalizó respecto a la actividad específica de β-galactosidasa ($\text{U} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), y se expresa relativa al control sin agregados. Los resultados representan el promedio $\pm$ el ES de seis determinaciones independientes. El test de Student se usó para comparar las muestras incubadas con TPA o DOG con respecto al control (* $p < 0.001$), y las muestras incubadas con FB+TPA o FB+DOG con respecto a FB solo (** $p < 0.001$).

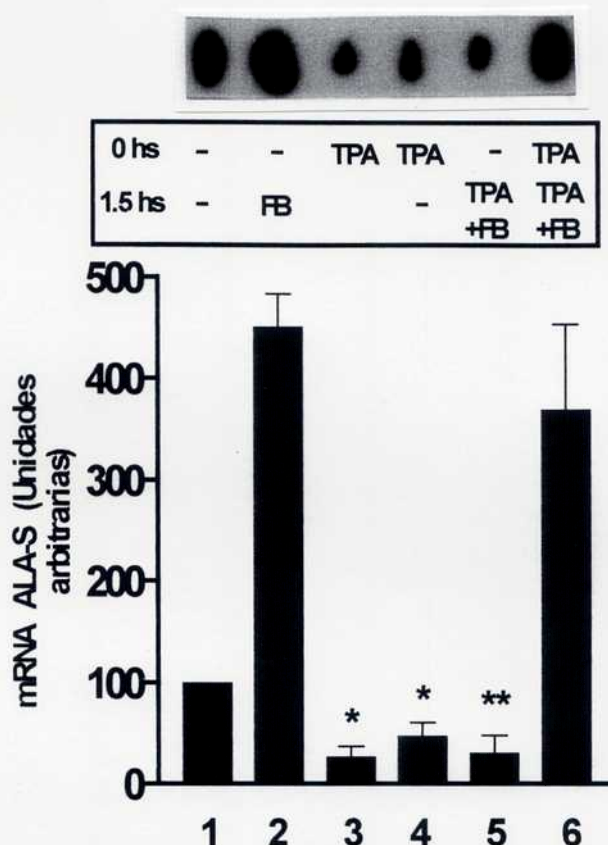


Figura 42: Efecto de la activación prolongada de la PKC sobre el mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 1.5 h en ausencia o en presencia de TPA como se muestra en la figura. En este momento la muestra 3 fue cosechada y las otras muestras se incubaron durante 2.5 h adicionales con los agregados indicados. La determinación del mRNA de ALA-S se realizó por slot blot (20 μ g/calle) como se describe en Materiales y Métodos. Las señales autorradiográficas se cuantificaron por densitometría y se presentan como barras debajo de cada slot. Los resultados están expresados relativos al control sin agregados y representan el promedio $\pm$ DS de cuatro experimentos independientes. La autoradiografía muestra un experimento representativo. El test de Student se usó para comparar las muestras incubadas con TPA con respecto al control (* $p < 0.001$), y las muestras incubadas con FB+TPA con respecto a FB solo (** $p < 0.001$). Tratamientos: TPA 1 μ M TPA; FB, 0.6 mM fenobarbital.

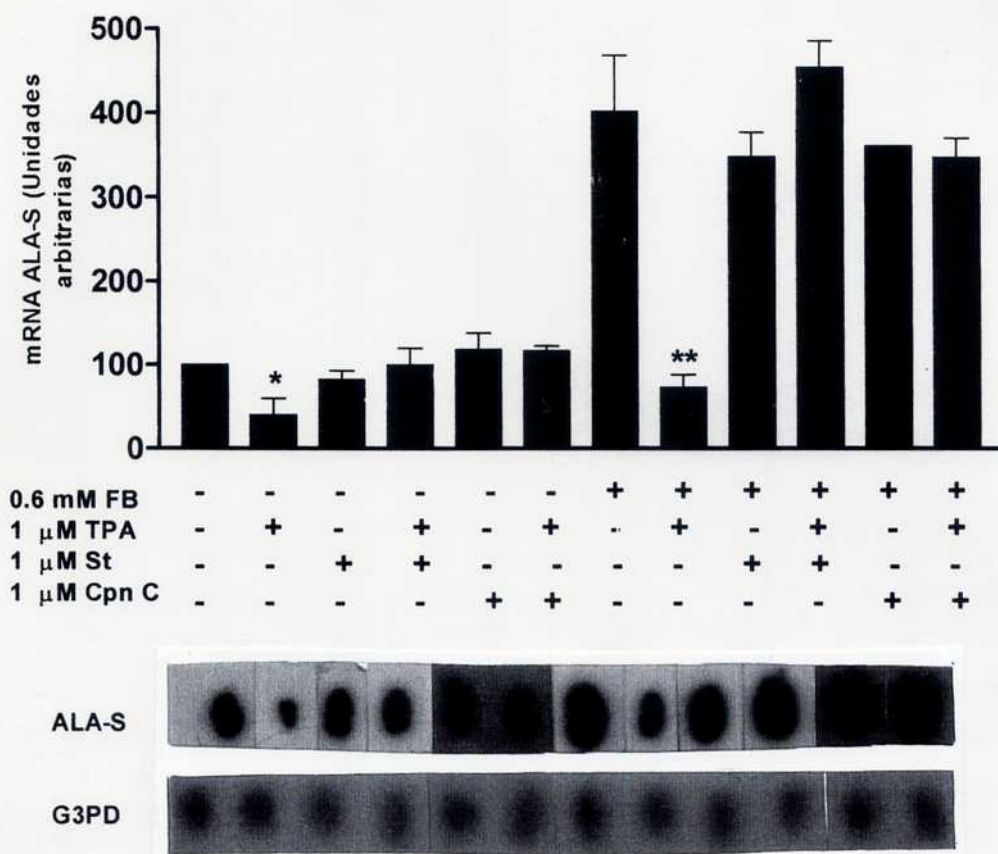


Figura 43: Efecto de estaurosporina y calfofín C sobre el mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 3 h con los agregados indicados en la figura. La determinación del mRNA de ALA-S se realizó por slot blot (20 μ g/calle) como se describe en Materiales y Métodos. Se determinó por igual modo el mRNA de G3PD (bandas inferiores) para estandarizar los resultados. Las señales autorradiográficas se cuantificaron por densitometría y se presentan como barras sobre de cada slot. Los resultados están expresados relativos al control sin agregados y representan el promedio $\pm$ DS de cuatro experimentos independientes. Las autorradiografías muestran un experimento representativo. El test de Student se usó para comparar las muestras incubadas con las distintas adiciones en ausencia de fenobarbital con respecto al control (* p < 0.01), y las muestras incubadas en presencia de FB con respecto a FB solo (** p < 0.001). FB, fenobarbital; St, estaurosporina; Cpn C, calfofín C.

B.9 Efecto de calfofostín C sobre el promotor de ALA-S

Cuando analizamos el efecto de calfofostín C en ensayos de transfección de células HepG2 sobre la actividad promotora del gen de ALA-S en transfecciones transientes en células HepG2, observamos similares resultados (Figura 44). La inhibición ejercida por el tratamiento con TPA 1 μ M tanto en la expresión basal como en la inducida con fenobarbital 0.6 mM, es totalmente abolida cuando las células se incuban conjuntamente con calfofostín C 1 μ M. Estos resultados reafirman el concepto que la PKC activa produce una inhibición a nivel transcripcional del gen de ALA-S.

B.10 Estudios sobre el efecto combinado de cAMP y TPA sobre el mRNA de ALA-S

En estos experimentos quisimos evaluar la interrelación entre los caminos mediados por PKA y PKC a nivel del mRNA de ALA-S. Como se ha mostrado anteriormente, el cAMP potencia la inducción mediada por fenobarbital del mRNA de ALA-S en hepatocitos de rata. Esta acción está mediada por PKA, de acuerdo a los resultados anteriores. Por otro lado, el éster de forbol TPA, activando a la PKC muestra un marcado efecto inhibitorio sobre dicho mRNA. Por lo tanto estudiamos la acción combinada de cAMP y TPA sobre el mRNA de ALA-S.

Los resultados demostraron que, mientras que el tratamiento con dibutilil cAMP 100 μ M produce un incremento cercano a dos veces en el mRNA de ALA-S, la adición conjunta de TPA 1 μ M produce una clara inhibición del 80% del nivel de dicho mensajero. De esta manera parecería que la inhibición operada por la activación de la PKC tiene un efecto dominante sobre el efecto producido por el cAMP, dado que es capaz de revertir su acción potenciadora (Figura 45).

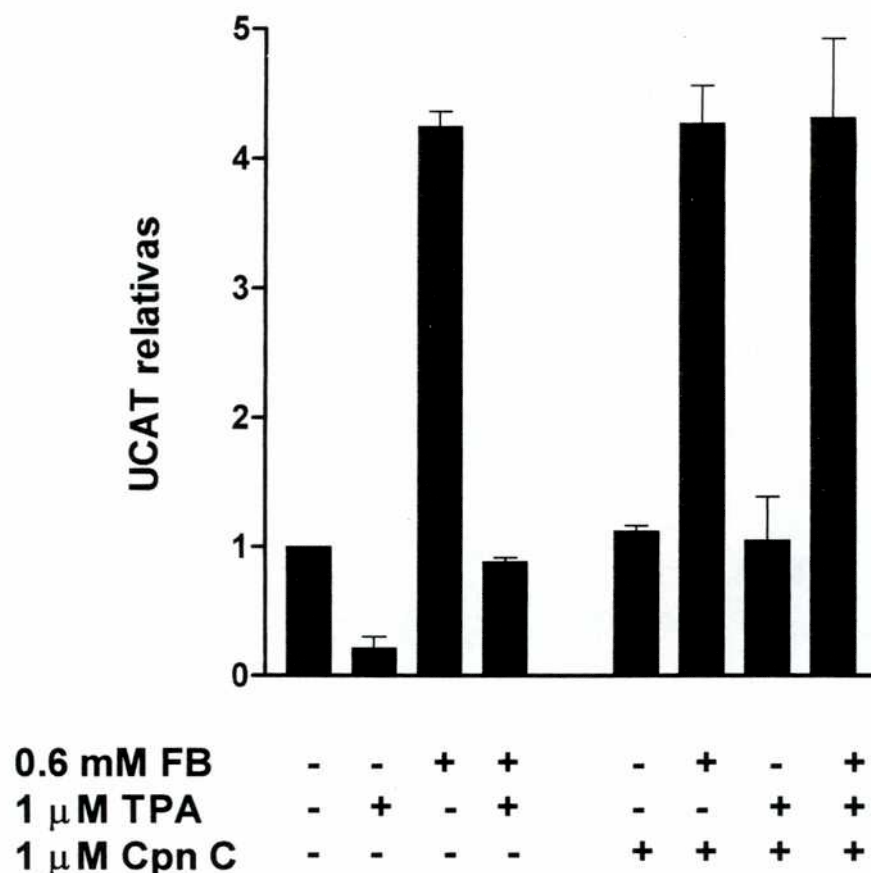


Figura 44: Efecto de calfofostín C sobre la actividad del promotor de ALA-S en células HepG2. Células HepG2 fueron transfectadas con 4 μg del plásmido pACAT y con 6.5 μg del plásmido control RSVβgal, según se detalla en Materiales y Métodos. Las células fueron incubadas en presencia de los agregados indicados en la figura durante 24 h en medio carente de suero. La actividad específica de CAT ($\text{U} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) medida en los extractos celulares se normalizó respecto a la actividad específica de β-galactosidasa ($\text{U} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), y se expresan relativos al control sin agregados. Los resultados representan el promedio $\pm$ el ES de seis determinaciones independientes.

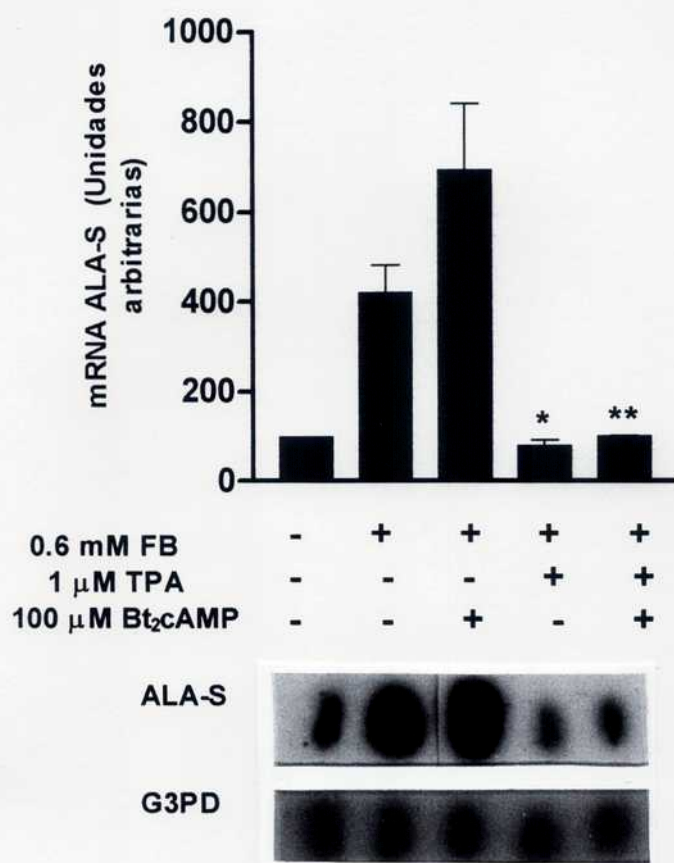


Figura 45: Efecto de Bt₂cAMP y TPA sobre el mRNA de ALA-S. Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 3 h con los agregados indicados en la figura. La determinación del mRNA de ALA-S se realizó por slot blot (20 μg/calle) como se describe en Materiales y Métodos. Se determinó por igual modo el mRNA de G3PD (bandas inferiores) para estandarizar los resultados. Las señales autorradiográficas se cuantificaron por densitometría y se presentan como barras sobre cada slot. Los resultados están expresados relativos al control sin agregados y representan el promedio ± DS de cuatro experimentos independientes. Las autorradiografías muestran un experimento representativo. El test de Student se usó para comparar las muestras incubadas con FB+TPA con respecto a FB solo (*p< 0.001), y las muestras incubadas con FB+TPA+Bt₂cAMP con respecto a FB+Bt₂cAMP (**p< 0.01). FB, fenobarbital.

0

La ALA-S es una enzima clave en la síntesis del hemo en todas las células, con fundamental importancia en eritrocitos y en hígado debido a los requerimientos elevados de hemo para la síntesis de hemoglobina y citocromos P-450, respectivamente. El gen de la forma constitutiva es rigurosamente regulado por una gran variedad de señales. El factor principal que regula la expresión de esta enzima es el producto final del camino, hemo. Las drogas porfirinogénicas como el fenobarbital y alilisopropilacetamida incrementan la expresión de ALA-S. Otros componentes no menos importantes en la regulación de la expresión de este gen lo constituyen el cAMP, la glucosa y la acción de hormonas como la insulina.

En este trabajo hemos analizado, con especial énfasis, la regulación ejercida por el inductor fenobarbital y por cAMP y glucosa. En este estudio hemos profundizado en el mecanismo de acción del cAMP a través de la PKA. También hemos investigado la participación de la vía de transducción de la señal generada por la activación de la PKC.

Se ha utilizado como estrategia general de trabajo el análisis de las distintas etapas involucradas en la transmisión de la información génica, a nivel de actividad y de cantidad de mensajero, analizando luego la vida media del mismo, para finalizar en el estudio de la actividad promotora del gen de ALA-S en experimentos de transfección transiente de células en cultivo. Como modelo experimental se utilizaron cultivos primarios de hepatocitos de rata y cultivos celulares de la línea HepG2.

El gen de ALA-S, creemos, puede constituirse en un excelente modelo para el estudio del control metabólico de la expresión génica.

El fenobarbital aumenta la transcripción del gen de ALA-S.

El primer punto de interés en el estudio de la regulación de la expresión de ALA-S consistió en evaluar la acción del fenobarbital, potente compuesto porfirinogénico, en nuestro sistema experimental.

Trabajos previos del laboratorio presentan evidencias que el fenobarbital aumenta la actividad enzimática de ALA-S de manera dependiente de la síntesis de proteínas (Cánepa et al., 1989). En el presente trabajo hemos analizado el efecto de fenobarbital en distintas etapas de la expresión génica de ALA-S.

En la primera parte del trabajo utilizamos hepatocitos provenientes de ratas normales. Este sistema de cultivo primario celular en suspensión ha sido ampliamente utilizado dada sus múltiples ventajas respecto del estudio en hígado perfundido, como es la obtención de una población homogénea de células, la accesibilidad de los diversos tratamientos a las células y la posibilidad de llevar a cabo una gran cantidad de experimentos simultáneamente (Morais and Wagner, 1985). A partir de estos cultivos hepáticos se aisló RNA total, luego se purificó el mRNA y se midió la actividad del mensajero de ALA-S en ensayos de traducción *in vitro* e inmunoprecipitación, y cuantificación de la ALA-S sintetizada.

De esta manera demostramos que la presencia de fenobarbital 0.6 mM en el medio de cultivo produce un aumento de la actividad del mensajero de ALA-S cercano a cuatro veces (Tabla 2, Figura 3). Este efecto sobre ALA-S es específico, dado que la actividad del RNA total no varía con el agregado del barbiturato, descartándose de esta manera un efecto generalizado sobre la síntesis de proteínas. También determinamos que la acción del barbiturato es máxima entre las 2 y 3 horas de incubación (Figura 6).

Ahora bien, un aumento en la actividad del mensajero puede ser reflejo de la presencia de una mayor cantidad del mismo, de los que se han descrito en la introducción diversos casos que ejemplifican esta opción. También puede suceder que el mensajero resultara más capacitado para ser traducido. Ejemplo de este mecanismo son los mRNA de ferritina y transferrina que modifican su tasa de traducción por la interacción, a través de la secuencia IRE (elemento de respuesta al hierro), con una

proteína de unión (IREBP) capaz de censar la concentración de hierro en la célula (Kim et al., 1995).

Para discernir entre estas posibilidades, se encararon ensayos de detección de niveles del mensajero de ALA-S por hibridización con una sonda. El análisis de Northern blot (Figura 19) demostró que la sonda utilizada es específica ya que se obtiene una única banda y del tamaño molecular del mRNA de ALA-S de 2.3 kb, consistente con los datos aportados en la bibliografía (Srivastava et al., 1988). También la cantidad de mRNA de ALA-S es significativamente mayor cuando las células fueron tratadas con fenobarbital 0.6 mM (Figuras 19, 20 y 21).

Por otro lado al obtener un aumento en la cantidad del mRNA de ALA-S se puede pensar que se debe o bien a una aumentada tasa de síntesis, en este caso estaría involucrado el proceso de transcripción-procesamiento, o a una estabilización del mRNA, en este último estaría actuando sobre la vida media de dicho mensajero. Analizando estas alternativas, se determinó la vida media del mRNA de ALA-S en presencia y en ausencia del tratamiento con fenobarbital.

La determinación de la vida media se realizó utilizando dos metodologías diferentes. Una de ellas hace uso de inhibidores de transcripción, como la actinomicina D, de manera que al inhibir la síntesis del RNA se determina la velocidad de desaparición de la molécula, calculando la vida media en el punto en que la cantidad de mensajero ha disminuido al 50%. En estos experimentos (Figura 22 y Tabla 7), hemos determinado que la vida media del mensajero de ALA-S es de 33 min y que luego del tratamiento con fenobarbital la misma no se modifica (28 min). Sin embargo, existen reportes que exigen cautela en el análisis de estos resultados, ya que se ha demostrado que la actinomicina D aparentemente posee por ella misma un efecto estabilizante de los mensajeros, ejemplos de este evento son los mRNA de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa en hígado de rata (Tilghman et al., 1974), y de la eritropoyetina en células de hepatoma (Goldberg et al., 1991). Debido a estas consideraciones, se ha determinado la vida media del mRNA de ALA-S también por el método cinético sin la utilización de inhibidores de la transcripción, siendo de 17 minutos. El tratamiento con fenobarbital no produce modificaciones en este valor, obteniéndose una vida media de 15 minutos (Figuras 23 y 24). Como se aprecia, el valor de vida media determinado en presencia de actinomicina

D es cercano al doble del determinado en ausencia del inhibidor, de manera que en el caso de ALA-S se evidenciaría como en los ejemplos citados antes, un efecto estabilizador de la actinomicina D. Podría postularse que factores proteicos de corta vida media estarían involucrados en la degradación de dicho mensajero (Cleveland and Yen, 1989).

Dado que la vida media del mRNA de ALA-S no cambia con el tratamiento con fenobarbital es factible entonces que el aumento en la cantidad del mensajero se deba a un aumento en su síntesis. Esta alternativa se analizó por estudios directos sobre la zona promotora del gen.

La estructura de la región 5' "upstream" del gen de ALA-S constitutivo de rata, fue descrita en 1993, durante el desarrollo de este trabajo, simultáneamente por dos grupos de investigación diferentes (Braidotti et al., 1993; Yomogida et al., 1993). A partir de la secuencia publicada se encaró el clonado de dicha región, abarcando hasta -833 pb, mediante la estrategia de amplificación con primers específicos, a partir de DNA genómico de rata.

El estudio del promotor del gen de ALA-S se realizó por experimentos de transfección transiente en cultivo de células HepG2, con una construcción conteniendo entonces la región -833 a +42 del gen de ALA-S clonada 5' "upstream" de la secuencia codificante del gen reportero CAT.

En una primera etapa se analizó la respuesta del sistema al aumento de la concentración de plásmido transfectado (Figura 30), obteniendo una respuesta lineal entre la cantidad de plásmido y el nivel de expresión de CAT determinado por medición de la actividad enzimática. Este experimento otorga validez a las determinaciones posteriores.

Utilizando esta metodología hemos demostrado (Figura 30 y 31) que el fenobarbital ejerce su efecto sobre ALA-S actuando a nivel transcripcional, dado que es capaz de inducir la expresión del gen CAT. Los resultados se correlacionan además fielmente con los obtenidos de mediciones de actividad y cantidad de mensajero de ALA-S, dado que en todos los casos se obtuvo una inducción cercana a cuatro veces. Este dato nos confirma que la regulación ejercida por el fenobarbital es a nivel transcripcional, y sugiere que es de esta manera, exclusivamente, que actuaría el barbitúrico, ya que

probablemente si existiera otro efecto desencadenado por fenobarbital posterior a la transcripción, hubiéramos obtenido diferencias en los valores de inducción entre las distintas etapas analizadas.

Actualmente se está estudiando en nuestro laboratorio la región mínima responsable de dicho efecto por ensayos con delecciones de la región regulatoria (Giono et al., manuscrito en preparación).

Se han descrito en la introducción las hipótesis acerca de la acción del fenobarbital sobre la expresión de ALA-S. Básicamente, se postula una teoría denominada “clásica”, que fundamenta el efecto inductor de fenobarbital sobre ALA-S como un evento indirecto provocado por el incremento de los citocromos P-450. Esto llevaría a un mayor requerimiento de hemo y la concomitante disminución del mismo del pool regulatorio y finalmente en la desregulación negativa de la ALA-S (Yamamoto et al., 1988; Srivastava et al., 1990). La teoría “moderna” postula que el fenobarbital ejerce su efecto inductor directamente sobre la expresión de ALA-S (Hamilton et al., 1991; Dogra et al., 1993).

De acuerdo a nuestros resultados el fenobarbital actuaría sobre la inducción de la transcripción de ALA-S. Por un lado se ha visto, en hígado de embriones de pollo, que el hemo regula a la ALA-S principalmente inhibiendo la entrada de la enzima a la mitocondria y disminuyendo la estabilidad del mensajero, más que reprimiendo su síntesis. Si sucediera lo mismo en nuestro sistema de cultivo de células HepG2, sería muy poco probable que dichos efectos hémicos se ejercieran sobre la expresión de CAT. En este caso sería difícil que el hemo se halle intercediendo el efecto inductor del fenobarbital. Sin embargo, no se puede descartar que el efecto mediado por hemo sobre ALA-S se deba a una represión a nivel transcripcional, como fue descrito en hígado de rata. En este caso la inducción por fenobarbital de la síntesis de citocromos P-450, podría llevar a una desrepresión del gen de ALA-S por consumo de hemo del pool regulatorio.

En otra línea de investigación, se han reportado en levaduras evidencias de la existencia de un factor de transcripción que presenta un dominio de unión a hemo ubicado cerca del dominio de unión al DNA. Esta proteína activa la expresión de genes citocromales en respuesta a oxígeno/hemo (Zhang and Guarente, 1995).

Para iluminar esta cuestión, en el presente trabajo se ha estudiado además, la acción del hemo sobre el mRNA de ALA-S, resultando en una disminución de la inducción ejercida por fenobarbital (Figura 9). Además, se analizaron las consecuencias de inhibir la síntesis proteica con cicloheximida, resultados que se muestran en la misma figura. En este caso la presencia del inhibidor produce un incremento de la actividad del mRNA de ALA-S. Esto podría deberse a la inhibición de la síntesis de RNAsas de vida media corta que actuarían sobre el mRNA de ALA-S. Aún así, en presencia de fenobarbital la actividad del mRNA disminuye significativamente por lo que se puede concluir que la acción mediada por fenobarbital requeriría de la síntesis de proteínas.

En una rápida lectura, estos resultados podrían interpretarse en apoyo a la teoría clásica. Sin embargo, aún si el fenobarbital actuara directamente sobre la expresión de ALA-S a nivel de la transcripción (teoría moderna), podría también requerir de la biosíntesis de proteínas accesorias que medien su efecto al nivel de la síntesis de RNA.

Por los datos aportados hasta el momento podemos concluir que el fenobarbital actúa a nivel transcripcional induciendo el gen de ALA-S pero no podemos descartar ninguna de las teorías vigentes sobre su acción regulatoria en el metabolismo del hemo.

El cAMP regula la expresión del gen de ALA-S a través de la activación de la quinasa de proteínas A.

Uno de los puntos más importantes de nuestro trabajo fue determinar si el cAMP interviene en la regulación de la ALA-S y su mecanismo de acción. Los resultados presentados en la literatura al respecto son bastante divergentes. En su gran mayoría estos trabajos fueron realizados utilizando animales intactos, por lo que se puede considerar la posibilidad de que los datos experimentales informados sean el resultado indirecto de la acción del cAMP en otros tejidos. Esta consideración no se aplica a nuestros trabajos en los cuales estudiamos el efecto directo del cAMP sobre las células hepáticas ya sea en cultivos primarios de hepatocitos de rata como en la línea celular hepática HepG2.

Por otra parte, a pesar que el cAMP es un compuesto intracelular de interés fisiológico, su limitada entrada a la célula lo hace de relativa eficacia en estudios realizados en cultivos de células. Por esta razón en los experimentos hemos utilizado análogos de cAMP que ingresan a las células más fácilmente como el dibutilil cAMP, y el 8-CPT-cAMP.

Trabajos previos realizados en el laboratorio demostraron que la presencia de dibutilil cAMP en el medio de incubación de suspensiones de hepatocitos de ratas normales, producen un marcado incremento de la inducción ejercida por fenobarbital en la actividad enzimática de la ALA-S (Cánepa et al., 1984).

En el presente trabajo nos planteamos como objetivo discernir en qué paso de la transferencia de la información genética de ALA-S se encuentra involucrado el cAMP. En primer lugar, se determinó la actividad del mRNA de ALA-S en cultivos primarios de hepatocitos de ratas normales. En estos experimentos se demostró que la presencia de 100 μ M de dibutilil cAMP produce un incremento de aproximadamente el doble en la inducción ejercida por fenobarbital (Tabla 2). La actividad basal de dicho mRNA no se vio modificada en presencia de cualquiera de los nucleótidos cíclicos ensayados. Similares resultados se obtuvieron con otro derivado no metabolizable, el 8-CPT-cAMP, descartándose entonces que el efecto estuviera mediado por el butírico liberado de la hidrólisis del butiril cAMP u otro metabolito secundario como ha sido descrito sucede en otras enzimas (McKnight et al., 1980).

Por otro lado se demuestra que ambos nucleótidos cíclicos ensayados poseen un efecto específico sobre ALA-S y no sobre la síntesis de proteínas totales, ya que la actividad del mRNA total no varía con ninguno de los tratamientos.

En hepatocitos de rata la acción potenciadora del cAMP es dosis dependiente (Figura 7), alcanzándose el máximo efecto con concentraciones de 100 μ M entre las 2 y 3 horas de incubación (Figura 6).

Para estudiar por un método distinto la acción potenciadora del cAMP sobre la actividad del mRNA de ALA-S mediada por fenobarbital, se utilizó la estrategia de aumentar el nivel de cAMP endógeno. Se usaron distintos tipos de activadores de la adenilil ciclase (adrenalina, forskolina y glucagon) y un inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX). En esta serie de experimentos, se determinó el contenido de cAMP endógeno a lo largo del ensayo (Figura

8), y en todos los casos se observó un considerable aumento en los niveles del nucleótido cíclico, asegurándonos de la efectividad del tratamiento.

Un dato interesante fue demostrar que la presencia de fenobarbital no produce un incremento de cAMP endógeno, lo cual hace presuponer que ambos efectos ocurren de manera independiente. Recientemente se ha publicado que el tratamiento de cultivos primarios de hepatocitos murinos con inhibidores de fosfatasas de serina y treonina producen una supresión de la inducción por fenobarbital de la transcripción del gen del citocromo *CYP2B10*. De esta manera, se sugiere que el efecto inductor del fenobarbital sobre este gen involucraría la acción de mecanismos específicos de fosforilación/defosforilación (Honkakoski and Negishi, 1998). Podríamos deducir que si la activación mediada por fenobarbital del citocromo opera de manera similar a la del gen de ALA-S, en nuestro caso no estaría mediado por fosforilación dependiente de cAMP.

Al determinar la actividad del mRNA de ALA-S en hepatocitos cuyos niveles de cAMP endógeno fueron elevados, obtuvimos también un incremento en la actividad inducida del mRNA de ALA-S mediada por fenobarbital, siendo similares los resultados que con el agregado exógeno de dibutilil cAMP (Tabla 3). Estos resultados estarían indicando que los efectos observados son específicamente debidos al cAMP y están de acuerdo con lo discutido anteriormente.

En las determinaciones de niveles de cAMP endógeno, obtuvimos mayores incrementos en los tratamientos con activadores de adenilil ciclase y con IBMX que con el agregado directo de dibutilil cAMP, dado que los niveles de inducción de ALA-S alcanzados son similares en todos los tratamientos, esto nos estaría indicando que se ha llegado al máximo efecto.

Posteriormente se estudiaron los niveles de mRNA de ALA-S en hepatocitos de ratas normales por Northern y slot blot (Figura 20). Existe una estrecha correlación temporal con las mediciones de actividad de mensajero (aproximadamente ocho veces respecto al control). Por lo tanto un aumento en la actividad en este caso es reflejo de un incremento en la biosíntesis del mismo, y no a un efecto en el procesamiento.

La constante de degradación del mRNA de ALA-S proveniente de hepatocitos normales tratados con fenobarbital más dibutilil cAMP no difiere de la del control. El valor obtenido en la determinación cinética es de 14 minutos respecto a 17 minutos del control (Figura 23 y

Tabla 7). En la determinación utilizando actinomicina D los valores son 24.2 y 33.5 minutos, respectivamente (Figura 22). Nuevamente la determinación del valor de vida media del mRNA de ALA-S es mayor en presencia de un inhibidor de transcripción sugiriendo que factores proteicos de corta vida media podrían estar involucrados en la degradación de dicho mensajero.

Hod y Hanson (1988) han descripto para el caso de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa que la adición de cAMP a células de hepatoma extiende la vida media del mensajero de 30 minutos a 150-240 minutos. En este gen, el cAMP, además de estimular la transcripción, estabiliza el mRNA, posiblemente por inducción de una proteína presente en los hepatocitos que, al unirse al extremo 3' del RNA, impide su degradación (Hanson and Reshef, 1997). Por lo tanto, la demostración de que el cAMP no modifica la vida media del mRNA de ALA-S, es un dato importante en el estudio de la acción de este segundo mensajero.

Como ya se discutió anteriormente para el caso del fenobarbital, hasta estos resultados, el cAMP también actuaría regulando su transcripción y/o procesamiento, pero su acción en los hepatocitos de rata dependería de un primer evento, aún desconocido, ejercido por el fenobarbital. De esta manera el cAMP no ejercería variaciones en la expresión basal de ALA-S, pero sí en el estado inducido.

Existen numerosos reportes donde las respuestas a nivel transcripcional se realizan de manera concertada entre distintos factores proteicos. En estos casos pueden observarse efectos cooperativos, sinérgicos tanto activadores como inhibitorios (Ptashne and Gann, 1997). En nuestro caso, podría pensarse o bien que el fenobarbital libera de la acción de un represor que impide que el efecto de cAMP se evidencie, o bien que el cAMP favorece la acción de activadores proteicos que median la respuesta a fenobarbital.

Para analizar en mayor profundidad el efecto ejercido por el cAMP, se realizaron ensayos de transfección transiente de células hepáticas HepG2 con el plásmido pACAT descripto anteriormente.

En estos ensayos, para nuestra sorpresa, observamos que el cAMP ejerce un efecto inductor de la transcripción del gen CAT independiente de la presencia de fenobarbital (Figura 31). El agregado de 8-CPT-cAMP solo produce un aumento en la expresión de CAT cercana a 3 veces, mientras que con fenobarbital esta inducción asciende a alrededor de 11 veces (aproximadamente aditivo). Obtuvimos resultados similares con la presencia de

forskolina en combinación con fenobarbital. De esta manera podemos concluir que el cAMP, en este sistema, incrementa la transcripción del gen CAT tanto a nivel basal como en el nivel inducido por fenobarbital.

De acuerdo a las hipótesis propuestas, el efecto transcripcional ejercido por el cAMP en los hepatocitos de rata podría ser impedido por la interacción de algún factor, cuya acción sería anulada por el fenobarbital. En la construcción que se transfecta que abarca desde los nucleótidos -833 a +42, la región de unión de dicho factor estaría ausente, de manera que al no existir la acción inhibitoria de este posible factor el cAMP estaría desregulado, incrementando aún el nivel basal de transcripción. No puede descartarse que las diferencias encontradas se deban a que en las transfecciones transientes el DNA plasmídico presenta una cromatinización diferente a la del genoma celular (Smith and Hager, 1997). Se han publicado recientemente resultados que muestran que la respuesta del promotor del virus mamario murino a la activación por el camino del cAMP, es dependiente de la cromatinización del DNA (Pennie et al., 1997).

Numerosos trabajos asignan al cAMP un papel activo en la inducción de la transcripción de distintos genes como el de la somatostatina de rata, el de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de rata y otros, de acuerdo a lo analizado en la introducción (Foulkes and Sassone Corsi, 1996). En estos casos, el efecto está mediado por la PKA, cuya subunidad catalítica actúa, por medio de fosforilaciones, principalmente sobre la proteína denominada CREB que se une a la secuencia CRE (Montminy, 1997). Distintas evidencias han demostrado que se requiere la activación de la PKA para estimular la transcripción dependiente de cAMP. Por un lado la utilización de líneas celulares deficientes en PKA, o la expresión de PKI, un potente inhibidor de PKA, suprimen la respuesta a cAMP, y finalmente la expresión de la subunidad C de la PKA es suficiente para inducir respuesta de genes que responden a cAMP en su ausencia (Riabowol et al., 1988; Montminy 1997). En trabajos previos del laboratorio se ha visto que inhibidores de quinasas de proteínas, disminuyen la activación enzimática mediada por fenobarbital (Cánepa et al., 1989). Por ello, nuestro siguiente objetivo fue analizar la regulación ejercida por cAMP estudiando el efecto de la inducción de la PKA sobre la expresión de ALA-S. Para ello hemos utilizado dos estrategias diferentes.

La primera se basa en el ensayo de sinergismo entre pares de análogos de cAMP sitio selectivos. A concentraciones de análogos con las que se obtiene el 25% aproximadamente de efecto potenciador (Figura 33), los pares de análogos, uno sustituido en la posición 6 y el otro sustituido en la posición 8 del anillo purínico muestran efecto sinérgico (Figura 34). Para poder asegurar que existe efecto sinérgico se aplicó el siguiente cálculo:

Siendo A la diferencia del valor de actividad de mRNA de ALA-S obtenida entre la incubación con doble concentración menos la obtenida con simple concentración de cada análogo, y B representa la diferencia del valor de actividad de mRNA de ALA-S obtenida entre la incubación con los pares de análogos analizados menos la obtenida con simple concentración de cada uno de ellos. Si la relación A/B resulta un número mayor que la unidad, indicará la presencia de efecto sinérgico.

En nuestro caso, al utilizar los pares de análogos N⁶ benzoil cAMP y 8-(6-aminohexil)amino-cAMP se obtuvo una relación superior a 2 en dicho cálculo. Con el par N⁶ benzoil cAMP y 8-(4-clorofeniltio)-cAMP se obtuvo una relación cercana a 3 veces de sinergismo. Por otro lado el control realizado con un par de análogos ambos sustituidos en la posición 8 (8-(6-aminohexil)amino-cAMP y 8-(4-clorofeniltio)-cAMP) se calculó una relación de 0.9.

Estos experimentos han aportado evidencias que la quinasa dependiente de cAMP se halla involucrada en la regulación de ALA-S.

Por otro lado, dado que la especificidad de los análogos utilizados es distinta para las dos isoenzimas de PKA, la activación sinérgica de la PKA de tipo I puede ser diferenciada de la de tipo II. Nuestros resultados evidenciaron que el par utilizado selectivo para la PKA tipo I (N⁶ benzoil cAMP y 8-(6-aminohexil)amino-cAMP) dio similar nivel de sinergismo que el par utilizado para la PKA tipo II (N⁶ benzoil cAMP y 8-(4-clorofeniltio)-cAMP), de manera que en este sistema ambas isoenzimas estarían involucradas en la regulación de ALA-S.

La segunda estrategia utilizada consistió en cotransfectar, de forma transiente, las células HepG2 con la construcción pACAT, que contiene el promotor de ALA-S y el gen CAT, más un vector de expresión de la subunidad C de la PKA. Dado que el promotor en el vector, que rige la expresión de esta proteína, es inducible por metales

pesados, hemos logrado expresar la proteína en distintas cantidades, y esto nos ha aportado mayor información respecto a su acción sobre ALA-S.

Estos experimentos han mostrado que la sobreexpresión de la subunidad C de la PKA produce un incremento acentuado de la expresión del gen reportero CAT, es decir modula positivamente el promotor de ALA-S (Figura 35). El sistema responde cuantitativamente al aumento de la expresión de la subunidad C lograda por una transfección plasmídica mayor o por la inducción de su promotor con zinc. El nivel de aumento de la expresión de CAT cuando se sobreexpresa la subunidad C de PKA, es cercano a 18 veces respecto al control sin transfectar y sin agregados. Esta inducción es muy superior a la obtenida por incubación con análogos de cAMP, tanto solo como en presencia de fenobarbital (Figuras 31 y 35). De esta manera podemos concluir que el paso limitante en el efecto ejercido por el cAMP estaría a un nivel anterior de la activación de la PKA.

Pall (1981) ha propuesto criterios indicativos para considerar que un efecto dado es mediado por cAMP. Estos criterios contemplan que el efecto debe ser precedido por un aumento en el nivel de cAMP, debe correlacionar con la activación de la PKA, debe potenciarse con inhibidores de fosfodiesterasa y con estimuladores de adenilil ciclase, también debe manifestarse por el agregado exógeno de cAMP o análogos, debe cambiar su función en mutantes con niveles alterados de cAMP y debe ser reproducible en un sistema de estudio *in vitro*. Los resultados presentados hasta el momento cumplen con la mayoría de dichos postulados mostrando sólidas evidencias sobre la participación del cAMP en los mecanismos de regulación de ALA-S, a través de la PKA.

La glucosa inhibe la expresión del gen de ALA-S.

El hígado cumple una función fundamental en la regulación del metabolismo de hidratos de carbono del organismo. Una ingesta excesiva de estos compuestos lleva, principalmente, al aumento de la glicólisis y de la síntesis de triglicéridos por activación e inducción de la síntesis de varias enzimas involucradas (Towle, 1995). Sin embargo, es lógico suponer que

una respuesta adaptativa del organismo que lleve a una mejor utilización de los hidratos de carbono del medio, involucre la regulación general de los caminos metabólicos realizados en el hígado.

Se demostró que la ingestión elevada de glucosa previene la inducción de la ALA-S en hígado de mamíferos (Tschudy et al., 1964). También se ha reportado que la administración de glucosa a pacientes con porfiria hepática precipitada por compuestos químicos, produce una marcada mejoría clínica de la patología.

En resultados publicados anteriormente por el laboratorio también se determinó que la glucosa inhibe la actividad enzimática de ALA-S (Cánepa et al., 1985a).

En el presente trabajo, hemos estudiado la acción de la glucosa sobre la expresión de ALA-S en hepatocitos de ratas normales y, hemos observado, que el agregado de glucosa inhibe aproximadamente el 75% de la actividad del mRNA de ALA-S inducido con fenobarbital (Tabla 4). Sin embargo no modifica la actividad del RNA total, por lo que concluimos que se trataría de un efecto específico. También se observó una disminución marcada en los niveles de mRNA de ALA-S cuantificada por Northern blot (Figura 21). El agregado de glucosa sola no produce modificaciones ni en la actividad ni en la cantidad de dicho mensajero (Tabla 4 y Figura 21).

Al analizar la respuesta temporal de la actividad del mRNA de ALA-S a glucosa, se demostró que el efecto presenta un período lag de 30 minutos para evidenciarse (Figura 10), tiempo durante el cual la actividad del mRNA de ALA-S aumenta con una pendiente similar al tratamiento en ausencia de glucosa, y luego el efecto inhibitorio se mantiene hasta al menos las tres horas de incubación. Estos resultados nos llevaron a estudiar, más en detalle, si la fase lag sería reflejo del tiempo en que la célula demora en incorporar la glucosa o si es necesario que se sintetice un metabolito derivado de glucosa que actúe como efector. Para ello realizamos experimentos de preincubación de los hepatocitos con glucosa durante una hora, en este caso el efecto desempeñado por la glucosa mostró una velocidad de acción (actividad del mRNA/tiempo) considerablemente menor que en los no preincubados (Figura 11). De esta manera se demuestra que si las células están en contacto con la glucosa previamente, son capaces de evidenciar antes el efecto inhibitorio sobre la inducción ejercida por fenobarbital. Podría suceder que un metabolito derivado de la glucosa sea el efector, siendo necesario un lapso tal que permita su síntesis frente a la inducción rápida del

fenobarbital. Ya se ha demostrado para la inducción del gen de la piruvato quinasa que el efecto regulador de glucosa es mediado por la rama no oxidativa del camino de las pentosas fosfato a través probablemente de la xilulosa 5-fosfato (Doiron et al., 1996).

No debe descartarse la entrada de glucosa en los hepatocitos. Esta se realiza mediante difusión facilitada a través del transportador Glut2 cuya expresión es regulada por glucosa a nivel transcripcional (Rencurel et al., 1996). Sin embargo, dado el corto tiempo necesario para que el efecto glucosa se evidencie sobre el mRNA de ALA-S, sería poco probable que el período lag observado se deba a que sea necesario un evento previo de inducción de Glut2.

El efecto glucosa es dosis dependiente (Figura 12), se obtiene un valor máximo de inhibición con concentraciones de 80 mM o más, lo que está de acuerdo con datos anteriores del laboratorio sobre mediciones de actividad enzimática de ALA-S (Cánepa et al. 1985a).

El efecto inhibitorio ejercido por la glucosa comienza a manifestarse a partir de la concentración menor ensayada de 20 mM, presentando una dosis inhibitoria media de 35 mM. Siendo el rango fisiológico, en tejidos normales, alrededor de 10 mM, es altamente probable que este mecanismo sea de relevancia en la regulación de ALA-S.

Meyer y col. (1991) han reportado que la glucosa posee un efecto de desestabilización del mRNA de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, aumentando su velocidad de degradación. En nuestro sistema determinamos la vida media del mRNA de ALA-S por distintas estrategias, tanto sobre la actividad como sobre la cantidad de mensajero (Figuras 24-26). La vida media del mRNA de ALA-S no se modifica en presencia de glucosa, descartándose, entonces, que el papel de ésta sea el de disminuir su estabilidad. Sin embargo, los valores obtenidos en presencia de actinomicina D duplicaron casi a los obtenidos en ausencia del inhibidor. Esta característica ya se discutió anteriormente respecto a las posibles características de los mensajeros que presentan dicho comportamiento.

De la suma de estas observaciones, dado que la glucosa no modifica la vida media del mRNA de ALA-S y que produce una marcada disminución en su concentración celular, sugerimos que dicho metabolito causa una inhibición de la transcripción de dicho mensajero.

Para confirmar esta hipótesis, estudiamos la actividad promotora del gen de ALA-S en transfecciones transientes de células HepG2 (Figura 32). La presencia de glucosa produce una disminución significativa de la inducción de la expresión de CAT por fenobarbital. Sin

embargo, esta disminución de la actividad promotora es menor que la inhibición casi completa observada sobre la actividad y cantidad del mRNA de ALA-S (Tabla 4 y Figura 21 respectivamente). Esta diferencia podría deberse a que la zona promotora estudiada no abarque la región necesaria para ejercer completamente su efecto inhibitorio. Es sabido que los factores de transcripción pueden actuar sobre la expresión génica concertadamente de manera cooperativa (Ptashne and Gann, 1997). En nuestro sistema podrían estar faltando las secuencias de reconocimiento a alguno de éstos. Otra alternativa factible la constituye el hecho de que, al transfectar, coexistan en la célula múltiples copias del promotor en estudio y que el/los factores que intervienen en la regulación por glucosa resulten insuficientes para producir el máximo efecto. Este factor se tornaría importante si la represión es ejercida por competencia de factores represores.

Por otro lado, el efecto glucosa requiere para evidenciarse que las células estén inducidas con fenobarbital, ya que al agregarse sola, no se producen modificaciones en la actividad y cantidad del mRNA de ALA-S, y tampoco en la actividad promotora del gen. Podemos concluir entonces, que el efecto producido por la glucosa estaría actuando sobre la biosíntesis del mRNA de ALA-S de manera secundaria a la inducción por fenobarbital.

El mecanismo por el cual la glucosa disminuye la expresión de ALA-S no se conoce totalmente, sin embargo se puede especular que la glucosa, o algún metabolito derivado, modifique la actividad transcripcional de factores que se unirían a secuencias específicas del promotor de ALA-S disminuyendo su transcripción como sucede con el gen de la alcohol deshidrogenasa (Cherry et al., 1989).

Es importante señalar además que el efecto “glucosa” ha sido observado en ausencia de factores extrahepáticos, demostrando entonces que no se debe a una acción indirecta ejercida por la relación hormonal insulina-glucagon, sino a un efecto directo de la glucosa sobre los hepatocitos.

Los efectos sobre ALA-S del cAMP y la glucosa no se manifiestan en hepatocitos con diabetes experimental.

Desde los trabajos de Sterling en 1949, varios autores han puntualizado la relativa frecuencia de coexistencia entre diabetes mellitus y algún tipo de porfiria hepática. Trabajos previos en el laboratorio han demostrado alteraciones en la regulación de las actividades enzimáticas de ALA-S y de la ferroquelatasa en ratas con diabetes experimental (Cánepa et al., 1989, 1992). Se ha planteado la posibilidad que la asociación entre diabetes y porfiria hepática sea el resultado de la presencia, en pacientes diabéticos, de ciertos factores que, o bien actúen directamente sobre el metabolismo del hemo o faciliten la expresión de defectos genéticos preexistentes. Los estudios realizados en este trabajo fueron diseñados con el objeto de explorar la naturaleza de estos factores si los hubiera.

La diabetes experimental fue provocada por una inyección de estreptozotocina, controlándose la severidad del estado diabético por la determinación de glucosa en sangre. Los experimentos realizados en hepatocitos con diabetes experimental revelaron que las células control sin tratar no poseen diferencias, con respecto a las células normales, en la actividad y cantidad del mRNA de ALA-S. Sin embargo, el tratamiento con fenobarbital 0.6 mM produce, en las células diabéticas, un incremento de ambas determinaciones cercano al doble, con respecto a los hepatocitos normales tratados en iguales condiciones (Tablas 5 y 6, Figuras 20 y 21). Por otro lado, fue determinada la constante de degradación del mRNA de ALA-S proveniente de hepatocitos diabéticos por el método cinético ya descrito. Se evidencia que el efecto del fenobarbital no produce una alteración en la vida media de este mensajero, siendo de 20 minutos respecto de 17 minutos correspondientes al control (Figura 23 y Tabla 7)

Es importante señalar que según se ha reportado, el estado diabético no afecta la cantidad de proteínas, ni su síntesis en los hepatocitos, ni la viabilidad de los mismos. Sin embargo la cantidad del cAMP se incrementa en este caso 5-6 veces (Cánepa et al., 1985a).

Por un lado hemos demostrado que en hepatocitos normales el cAMP produce una potenciación de la inducción mediada por fenobarbital. Además, el nivel de cAMP en hepatocitos diabéticos es mayor. Reuniendo estas observaciones, postulamos que la causa por la cual, en el estado diabético, el fenobarbital *per se* produce un incremento equivalente al ejercido por fenobarbital y cAMP en las células normales, es debido al nivel incrementado de cAMP que presentan estas células.

Esta hipótesis se confirma por el hecho que, en hepatocitos diabéticos, el tratamiento con dibutiril cAMP solo, no ejerce ninguna variación sobre la actividad y cantidad del mRNA de ALA-S y, en presencia de fenobarbital, no logra aumentar el nivel de inducción alcanzado por el barbiturato (Tabla 5 y Figura 20). Experimentos de determinación de actividad de mensajero a distintos tiempos de incubación (Figura 13) y con distintas concentraciones del nucleótido cíclico (Figura 14) refuerzan el concepto que el fenobarbital solo produce el máximo efecto observado sobre ALA-S en los hepatocitos provenientes de ratas con diabetes.

Se ha determinado previamente que el cAMP potencia la síntesis de citocromo P-450 y se observó que el contenido de estas hemoproteínas es 32% mayor en los hepatocitos diabéticos (Cánepa et al., 1985a). Este incremento, de acuerdo al modelo clásico de regulación de la biosíntesis del hemo, podría provocar la desrepresión de la ALA-S y, de esta manera, obtenerse niveles de inducción por fenobarbital mayores a los logrados en hepatocitos normales. Puede sugerirse que la célula hepática de animales diabéticos, es más susceptible a la acción del fenobarbital debido en parte al alto contenido en cAMP.

Con referencia al “efecto glucosa” descrito en hepatocitos de ratas normales, nuestros resultados indican que la glucosa no ejerce efecto inhibitorio alguno sobre la inducción tanto de la actividad como de la cantidad de ALA-S mediada por fenobarbital en hepatocitos diabéticos (Tabla 6 y Figura 21).

Estos resultados fueron confirmados en los experimentos realizados de determinación de la actividad del mRNA de ALA-S a distintos tiempos (Figura 15) y con distintas concentraciones de glucosa (Figura 16).

Surge el interrogante si la concentración elevada de cAMP observada en los hepatocitos diabéticos sería también un factor desencadenante en la no manifestación del efecto glucosa. Por ello se encararon una serie de experimentos que se discuten a continuación.

El cAMP revierte el efecto inhibitorio ejercido por glucosa

En la bibliografía se encuentran numerosos ejemplos de genes que son regulados de manera opuesta por el cAMP y la glucosa, tal es el caso de la piruvato quinasa (Yamada et al., 1997). Este gen posee en su promotor una secuencia GIRE responsable de la inducibilidad por glucosa, y además necesaria para que se evidencie el efecto negativo del glucagon y cAMP. Así el GIRE es a la vez un elemento de respuesta positiva para glucosa y de respuesta negativa para cAMP (CRE negativo). En este caso, el GIRE puede ser también considerado un silenciador cuya acción negativa es estimulada en ausencia de glucosa o en presencia de cAMP o glucagon (Diaz Guerra et al., 1993; Cuif et al., 1993).

En estudios previos, se había observado en el laboratorio que la adición conjunta de dibutilil cAMP produce una reversión del efecto inhibitorio ejercido por la glucosa sobre la actividad enzimática de ALA-S (Cánepa et al. 1985a).

De esta manera nos propusimos estudiar de qué manera se relacionan glucosa y cAMP. El agregado exógeno de dibutilil cAMP a hepatocitos de ratas normales, revierte totalmente la acción inhibitoria ejercida por la glucosa sobre la actividad del mRNA de ALA-S inducido por fenobarbital (Figura 17). Más aún, esta reversión también se observa sobre la cantidad de dicho mensajero (Figura 21).

Al analizar la relación de ambos efectos sobre la actividad del promotor de ALA-S en transfecciones transientes de células HepG2 se demostró que el agregado exógeno de 8-CPT-cAMP revierte el efecto inhibitorio de la glucosa en la etapa transcripcional (Figura 32).

Se realizaron otros experimentos donde se aumentó la concentración de cAMP intracelular agregando en la mezcla de incubación, activadores de la adenilil ciclase (glucagon, forskolina y adrenalina), y un inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX). En todos los casos no solo se bloquea el efecto inhibitorio ejercido por la glucosa sobre la inducción mediada por fenobarbital sino que, al igual que con el agregado de cAMP exógeno, se restablece el nivel de potenciación de dicha inducción para las mediciones de actividad del mRNA de ALA-S (Figura 17). Para el caso del activador de la adenilil ciclase, forskolina, también se analizó su efecto en ensayos de determinación de actividad promotora en células

HepG2 (Figura 32), demostrándose que el aumento intracelular de cAMP bloquea la inhibición ejercida por glucosa a nivel transcripcional. No podemos determinar con estos resultados, si el bloqueo que realiza el cAMP sobre la inhibición de glucosa se debe a que ambas respuestas comparten en el promotor el mismo sitio de acción, como se mencionó es el caso de la piruvato quinasa. De acuerdo a este modelo existiría una competencia de unión de factores al elemento del DNA responsable de ambas acciones. Podría suceder también que la interrelación entre ambos efectores se realice a nivel de la cascada de transducción de señales. Villar-Palasi, (1994) ha demostrado que, en músculo esquelético, la glucosa 6-fosfato, a bajas concentraciones de cAMP, es capaz de disminuir la fosforilación de la glicógeno sintetasa por la PKA.

Ahora bien, el cAMP bloquea el efecto de glucosa en los hepatocitos normales y en las transfecciones de células HepG2, y por otro lado los hepatocitos de ratas diabéticas presentan una elevada concentración de cAMP. Reuniendo estos conceptos sugerimos que, en los hepatocitos diabéticos, no se evidencia el efecto inhibitorio de la glucosa debido a la concentración aumentada de cAMP.

Para investigar esta hipótesis, diseñamos el siguiente experimento: células hepáticas diabéticas fueron tratadas con drogas que, por estimulación de la fosfodiesterasa (imidazol) y por inhibición de la adenilil ciclasa (aloxano), provocan una disminución del nivel de cAMP endógeno. En esta condición se estudió el efecto de la glucosa. Si la causa de la ausencia del efecto glucosa en las células diabéticas fuera el alto contenido de cAMP, en este caso deberíamos restaurar la actividad inhibitoria de la glucosa sobre ALA-S. Sin embargo con concentraciones de cAMP análogas a las células normales, no se obtuvo efecto glucosa (Figura 18), descartándose entonces que al menos ésta sea la única causa de dicho evento.

Podemos concluir de esta manera que en las células hepáticas diabéticas estarían ocurriendo eventos diferentes a los que suceden en células normales, que regulan la expresión de ALA-S por fenobarbital más allá del balance entre las concentraciones de cAMP y glucosa.

La quinasa de proteínas C participa de la regulación de la expresión de ALA-S.

La quinasa de proteínas C pertenece a la familia de las quinasas que fosforilan en residuos serina y treonina y está involucrada en la señalización intracelular en distintos tipos celulares (Hug and Sarre, 1993). La activación de estas enzimas cumple un papel fundamental en la transducción de señales mediadas por segundos mensajeros, necesaria para numerosas funciones celulares. La activación fisiológica de la mayor parte de las isoformas de la PKC se realiza por el diacilglicerol, pero también pueden ser activadas por ésteres de forbol los cuales comparten una similitud estructural con el activador natural. Al igual que DAG, los ésteres de forbol aumentan la afinidad de la PKC por el Ca^{2+} , resultando en potentes activadores a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} . Además se metabolizan lentamente y permanecen en los tejidos, provocando una activación prolongada de la PKC (Newton, 1997). Distintas líneas de evidencias indican que la activación de las PKC desencadena eventos tales como la inducción de la síntesis de DNA y la división celular. Además pueden alterar la expresión específica de genes en células hepáticas de rata, tal es el caso de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, cuya síntesis es inhibida en células de hepatoma H4IIE tratadas con TPA (Chu and Granner, 1986). Por otro lado, se ha reportado de genes cuya expresión se ha visto incrementada por acción de los ésteres de forbol, como la β -actina (Messina and Weinstock, 1992).

Ya se ha analizado en la introducción, la estrecha relación entre la transducción de señales mediada por PKA y por PKC, por estas razones fue sumamente interesante estudiar la posible participación de la PKC en la regulación de la expresión de ALA-S. Para ello determinamos los efectos del éster de forbol TPA y de un análogo de DAG, conocidos como activadores directos de PKC, sobre la expresión de ALA-S.

En el presente trabajo se muestran resultados que indican que el TPA reduce rápidamente la cantidad del mRNA de ALA-S, determinada por Northern blot, tanto en el control como en las células tratadas con fenobarbital 0.6 mM (Figura 36). Esto nos estaría indicando que la acción del éster de forbol sería independiente de la estimulación por fenobarbital. La acción inhibitoria del TPA depende de la concentración (Figura 37),

y del tiempo de incubación (Figura 38) obteniéndose el máximo efecto tratando a las células con 1 μ M TPA o más durante al menos una hora y media.

Similares efectos fueron observados con el análogo de diacilglicerol 1,2-dioctanoil-sn-glicerol (DOG) (Figuras 39 y 40), aunque fueron necesarias concentraciones mayores para obtener el máximo efecto inhibitorio (Figura 39). Esta diferencia de actividad se debe probablemente a la baja lipofiliidad que presenta este análogo.

En cuanto al análisis de la vida media del mRNA de ALA-S por el método cinético, hemos mostrado evidencias de que este valor no se ve alterado por el tratamiento con TPA o con DOG (Tabla 8). De esta manera se sugiere que el efecto inhibitorio ejercido por estos activadores de la PKC se ejercería a nivel transcripcional.

Para dilucidar este aspecto, se realizaron experimentos de determinación de la actividad promotora de ALA-S en ensayos de transfección transiente de células HepG2. En estos estudios se ha demostrado que la presencia de TPA y DOG en el medio de cultivo producen una significativa disminución de la expresión del gen reportero CAT, tanto del nivel basal como del nivel inducido por fenobarbital (Figura 41). Esto nos indicaría que en la zona promotora estudiada, hasta -833 pb, reside/n la/s secuencia/s apropiada/s para evidenciar la inhibición de la transcripción. Esta inhibición se ejerce también sobre el control. En cuanto a especular qué tipos de elementos en el DNA sean los responsables del efecto inhibitorio ejercido por el éster de forbol, es de importancia aclarar que el tipo celular de hepatoblastoma HepG2 carece del factor de transcripción AP-2 (Xie and Jaiswal, 1996). Este factor como se ha descrito en la introducción responde a señales mediadas por PKA y por PKC (Buchner, 1995). Dado que aún careciendo de AP-2, las células HepG2 mantienen la respuesta a ésteres de forbol, se podría sugerir que este efecto estaría mediado por un tipo de factor distinto.

La interacción entre los ésteres de forbol y diacilglicerol con la PKC sugiere fuertemente que el mecanismo de fosforilación dependiente de la activación de la PKC estaría mediando la inhibición de la transcripción de ALA-S. Además, la concentración de TPA requerida para inhibir la síntesis del mRNA de ALA-S es similar a la necesaria para inducir la fosforilación de diversas proteínas celulares (Nishizuka, 1995; Xie and Rothstein, 1995).

Tres líneas de evidencias apoyan el concepto de que la activación de la PKC es la mediadora de la inhibición del mRNA de ALA-S ejercida por TPA y DOG en hepatocitos de ratas.

En primer lugar el efecto del TPA es específico, dado que el tratamiento de las células con el derivado 4 α -forbol 12,13-diacetato no produce ninguna modificación sobre los niveles del mensajero de ALA-S (Figura 36). Este éster de forbol fue utilizado como un control negativo para poder distinguir entre la actividad específica del éster de forbol sobre la activación de PKC y los posibles efectos inespecíficos debidos a su estructura.

En segundo término, los experimentos realizados utilizando inhibidores de la actividad de la PKC, estaurosporina y calfofistín C (Azzi et al., 1992), demostraron que estos compuestos producen un completo bloqueo del efecto inhibitorio del TPA sobre el mRNA de ALA-S. Este efecto se observó tanto sobre la determinación de la cantidad del mRNA por slot blot, como sobre la determinación de la actividad promotora del gen de ALA-S en ensayos de transfección transiente en células HepG2 (Figuras 43 y 44 respectivamente). Sin embargo, el uso de estos inhibidores puede ser problemático. Se ha cuestionado la especificidad de la estaurosporina sobre la inhibición de la PKC (Wolf and Baggiolini, 1988). En cuanto a los efectos de calfofistín C, éstos no han sido estudiados en profundidad pero se lo considera un inhibidor altamente específico de PKC (Bruns et al., 1991). Igualmente, los resultados obtenidos refuerzan el concepto que la inhibición ejercida por TPA sobre ALA-S sería mediada por la activación de PKC. Sin embargo, en vista de los antecedentes de estos inhibidores, no descartamos la posibilidad de que otras quinasas de proteínas involucradas en la regulación de la expresión de ALA-S sean inhibidas por estos compuestos.

En tercer lugar, hemos presentado en este trabajo evidencias de que tanto el TPA como el análogo de diacilglicerol DOG, producen una rápida disminución de la cantidad del mRNA de ALA-S. Pero, sin embargo, cuando las células fueron pretratadas con TPA, desapareció la capacidad de este éster de forbol de disminuir la expresión del mRNA de ALA-S. Además, en esta condición se restauró la inducibilidad por fenobarbital del mensajero de ALA-S aún con la presencia de TPA (Figura 42).

Es sabido que, en diversos tipos celulares, el tratamiento prolongado con ésteres de forbol produce una disminución de la PKC citoplasmática (llamada down-regulation) que llevaría al clivaje proteolítico de la enzima y constituiría un proceso necesario para evitar una activación continuada (Liu, 1996). De esta manera, la desensibilización por el tratamiento prolongado con TPA, tendría como consecuencia que las células recuperen la inducibilidad por fenobarbital.

En conclusión, todas estas evidencias sugieren fuertemente que la activación de la PKC se encontraría mediando la regulación de la expresión de ALA-S desencadenada por la acción de TPA ó DOG.

Hemos tratado además, de analizar la relación existente entre las vías de transducción de señales mediadas por PKA y PKC sobre la expresión de ALA-S.

Se han reportado en la bibliografía numerosos casos de genes regulados en conjunto por la actividad concertada de las PKA y PKC. Tales son los casos de la expresión de la proteína básica de la mielina (Anderson and Miskimins, 1994); del activador de plasminógeno (Costa and Medcalf, 1996); de la activina A (Tanimoto et al., 1994); de la molécula de adhesión celular MUC18/MCAM, asociada a los melanomas (Rummel et al., 1996), etc.

Con este objetivo, se estudió la acción conjunta de cAMP y el éster de forbol TPA. La acción inhibitoria ejercida por la activación de PKC es dominante sobre el efecto inductor desencadenado por el segundo mensajero cAMP en combinación con fenobarbital (Figura 45). Esto sugiere que el TPA actuaría de manera independiente a la acción del cAMP.

Es importante señalar que la estimulación de la PKC puede ser desencadenada por distintos caminos de transducción de señales. Por ejemplo, se ha reportado que la insulina incrementa la concentración de DAG y la actividad de PKC en músculo esquelético (Farese et al., 1992). En otro caso, se ha demostrado que el tratamiento de células H4 con insulina produce una disminución de la actividad de PKC citosólica, probablemente por una translocación de la enzima a la membrana (Messina and Weinstock, 1992).

En recientes trabajos realizados en el laboratorio se ha demostrado que la insulina produce una inhibición de la transcripción del mRNA de ALA-S (Scassa et al., 1998).

Por lo tanto sería posible que la activación de la PKC tuviera importancia en la acción de la insulina sobre la expresión génica tal como sucede en los casos de c-fos (Messina et al., 1992), albúmina y tirosina aminotransferasa (Messina and Weinstock, 1994).

Integración de la regulación de la expresión de ALA-S.

Análisis de la secuencia del promotor.

En el presente trabajo se han analizado la acción de distintos moduladores de la expresión del gen de ALA-S. La acción de estos efectores regularían la transcripción del gen de manera concertada en algunos casos. Hemos discutido extensamente en la introducción que la actividad de los factores de transcripción involucrados en la respuesta a fenobarbital, cAMP, glucosa y ésteres de forbol reconocen secuencias específicas de DNA donde pueden unirse y activar o inhibir el acercamiento de proteínas que dirigen la síntesis del RNA.

La secuencia promotora de ALA-S estudiada comprende la región desde -833 a +42 del gen hepático de rata. Hemos estudiado la presencia de elementos o secuencias consenso para la unión de dichos factores de transcripción tomando como modelo los reportados en la regulación de otros genes. Para ello, hemos utilizado como herramienta la utilización de programas de computación capaces de analizar la secuencia de ALA-S e informarnos acerca de los posibles elementos contenidos en ella.

En primer lugar, por predicción del sitio de iniciación de la transcripción se ubicó la G número 1, coincidiendo esta ubicación con la reportada por May y col. (Braidotti et al., 1993). La secuencia TATA, típica de los genes transcritos por la RNA polimerasa II, está ubicada desde la posición -27 del gen de ALA-S.

El análisis de los elementos de unión de factores se realizó utilizando los programas "TESS-String Based Search" (Schug and Overton, 1997) y "MatInspector V2.2" (Quandt et al., 1995), basados en el TRANSFAC v3.2. En el primer caso, ha dado como resultado la presencia de una secuencia con identidad total al elemento CRE (TGACG-CA) en la posición -261. Esta secuencia de unión es compartida por los factores de

respuesta a cAMP ATF, ATF-3 y también por el factor AP-1 de respuesta a ésteres de forbol, por el c-Jun y por el factor USF (USF2) de la familia de proteínas que responden a glucosa. Esta región podría ser de fundamental importancia en la regulación de la expresión de ALA-S.

A este respecto, se ha encontrado recientemente en células mesengliales que el tratamiento con glucosa y TPA activa la expresión del gen de la fibronectina mediada por un elemento CRE. En este caso dichos efectores son capaces de estimular la fosforilación de CREB y de ATF-1 por acción de la PKC, independientemente de PKA (Kreisberg et al., 1996). Se aprecia de esta manera que la interrelación entre cAMP, glucosa y TPA sobre la expresión de ALA-S es un interrogante que apenas comenzamos a desentrañar.

Se han encontrado además otros elementos con identidad total como es el de unión a GATA-1 y GATA-2 (AGATAA) en la posición - 653. Este elemento probablemente tenga incidencia en la expresión de la ALA-S constitutiva en las células eritroides, al igual que regula la expresión de la ALA-S eritrocitaria. En cuanto a similitud con esta otra isoforma, el gen de ALA-S constitutiva comparte con la eritrocitaria, secuencias para Sp-1 (GGGGCC), en este caso ubicadas en la posición -275. También, el gen de eritrocitos posee un elemento similar a AP-1, aunque este elemento fue encontrado por análisis *in vitro*, desconociéndose su funcionalidad fisiológica (Lim et al., 1994).

El promotor de ALA-S hepática también posee elementos altamente conservados para el receptor a glucocorticoides (GR) (AGAAGA) en la posición -824, c-Myb (TTCAAC) en las posiciones -486, -528 y en -639.

Se evidenció la presencia de un elemento de unión a AP-2 (TGGGGA) en la posición -752, sin embargo esta secuencia probablemente no sea de relevancia en la regulación de ALA-S mediada por cAMP o ésteres de forbol, dado que como se ha discutido, las células HepG2 que carecen de este factor mantienen la regulación de estos efectores sobre el promotor de ALA-S en ensayos de transfección transiente (Figuras 31, 32 y 41).

Se han encontrado en el promotor de ALA-S otros elementos de unión a AP-1 con menor "score" de similitud, pero que aún presentando menor afinidad por el factor, podrían participar en efectos cooperativos.

En cuanto a elementos de respuesta a fenobarbital, se han descrito en promotores de los citocromos, secuencias llamadas BARBIE (barbiturate inducible element) (Liang et al., 1995). En el promotor de ALA-S hay presencia de varias de ellas, por ejemplo una ubicada en la posición -715 de la cadena complementaria (CCTCAAAGTTGCTAT) y otra en la posición -540 (AAGAAAGAGAGAGC).

Actualmente en nuestro laboratorio, se está estudiando funcional y estructuralmente el promotor de ALA-S. Estos ensayos incluyen el análisis por transfección transiente en células HepG2 de vectores que contienen el gen CAT y distintos fragmentos del promotor de ALA-S, obtenidos por deleciones de la región -833 a +42 pb. También se analiza cuáles podrían ser las posibles proteínas que intervienen en la regulación de la expresión génica de ALA-S por ensayos de retardo de la movilidad electroforética en gel de poliacrilamida no desnaturizante y por ensayos de DNAsa footprinting, de la zona promotora de ALA-S.

Representación esquemática de los mecanismos que regulan la expresión de ALA-S

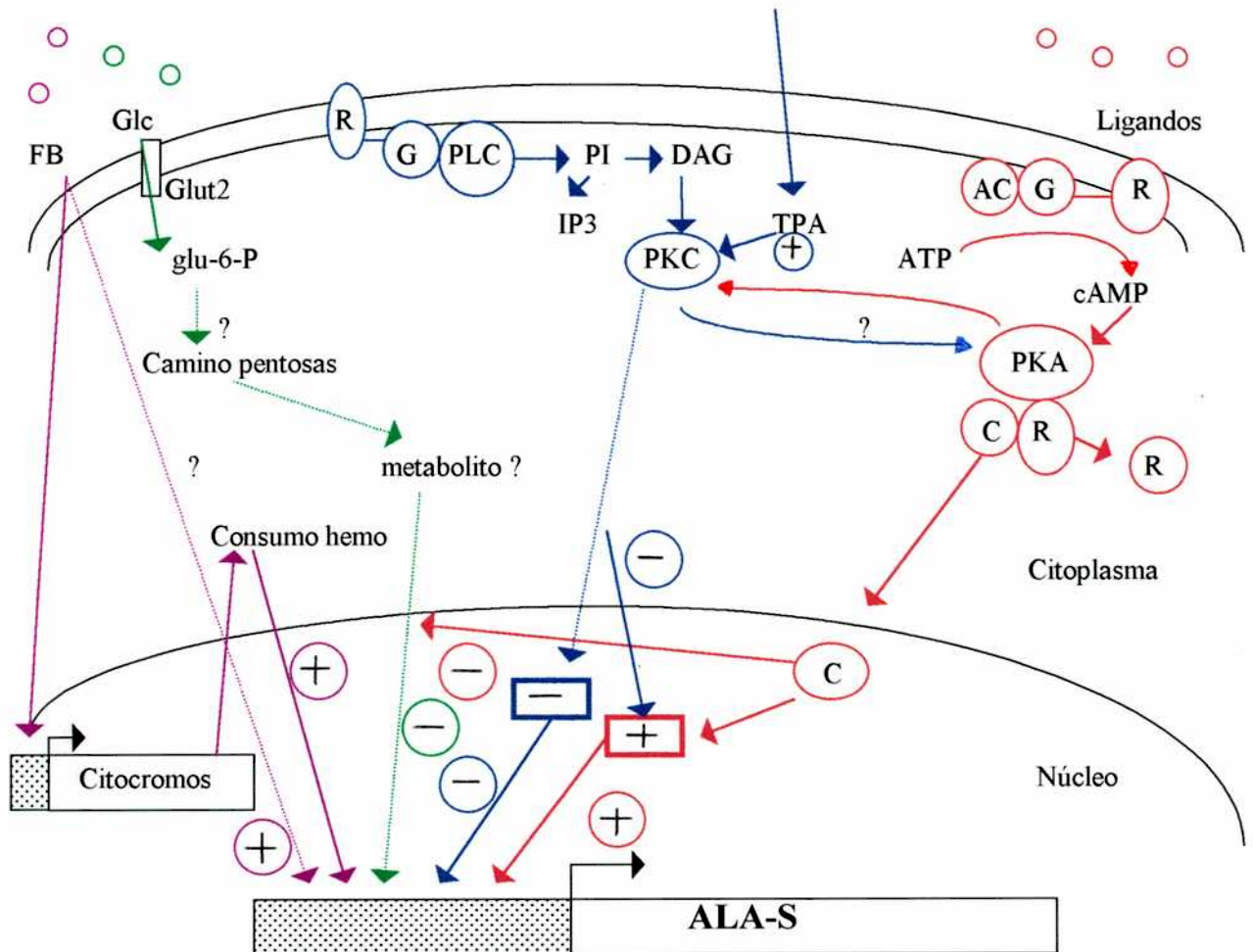


Figura D.1: Se muestra un esquema de los mecanismos propuestos que regulan la expresión de ALA-S de hígado de rata. En rojo se representa la vía de transducción de la señal dependiente de cAMP, en azul la vía que involucra la activación de PKC, en verde la señal originada por la glucosa y en púrpura por el fenobarbital.

Bibliografía

- Adams, J.A. and Taylor, S.S. (1992). The energetic limits of phosphotransfer in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase as measured by viscosity experiments. *Biochem.* **31**: 8516.
- Anderson C. W., Straus J. W. and Dudock, B. S. (1983). Preparation of a cell free protein-synthesizing system from wheat germ. *Methods Enzymol.* **101**: 635-644.
- Anderson, S. and Miskiminns, R. (1994). Involvement of protein kinase C in cAMP regulation of myelin basic protein expression. *J. Neurosci. Res.* **37**: 604-611.
- Arany, Z., Newsome, D., Oldread, E., Livingstone, D.M. and Eckner, R. (1995). A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature* **374**: 81-84.
- Arias, J., Alberts, A.S., Brindle, P., Claret, F.X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J. And Montminy, M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* **370**: 226-228.
- Ashcroft, S.J., Bunce, J. Lowry, M., Hansen, S.E. and Hedeskov, C.J. (1978). The effect of sugars on (pro)insulin biosynthesis. *Biochem. J.* **174**:517-526.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhe, K. (1992). *Current Protocols in Molecular Biology*. 2° De. Harvard Medical School.
- Aviv, H. and Leder, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 1408-1412.
- Azzi, A., Boscoboinik, D. and Hensey, C. (1992). The protein kinase C family. *Eur. J. Biochem.* **208**: 547-557.
- Bass N.M. (1988). The cellular fatty acid binding proteins: aspects of structure, regulation and functions. *Int. Rev. Cytol.* **111**: 143-184.
- Batlle A.M. (1993). Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy-a model for carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. Biol.* **20**: 5-22.
- Baxevanis, A.D. and Vinson, C.R. (1993). Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity?. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**: 278-285.

- Beebe, S.J., Blackmore, P.F., Chrisman, T.D. and Corbin J.D. (1988). Use of synergistic pairs of site-selective cAMP analogs in intact cells. *Methods in enzymology* **159**: 118-139.
- Billi de Catabbi, S., Sterin-Speziale, N., Fernández, M.C., Minutolo, C., Aldonatti, C., San Martín de Viale, L. (1997). Time course of hexachlorobenzene-induced alterations of lipid metabolism and their relation to porphyria. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**: 335-344.
- Birnbaumer, L. and Birnbaumer, M. (1995). Signal transduction by G proteins. *Rec. Signal. Transduct. Res.* **15**: 213-252.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for scavenging recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **1**: 1513-1523.
- Bishop, D.F., Henderson, A.S. and Astrin, K.H. (1990). Human delta-aminolevulinate synthase: assignment of the house keeping gene to 3p21 and the erythroid specific gene to the X chromosome. *Genomics* **7**: 207-214.
- Bitar M. and Weiner M. 1983. Heme and hemoproteins in streptozotocin-diabetic female rats. *Biochem. Pharmacol.* **32**: 1921-1928.
- Bonkovsky, H.L., Collins, A., Doherty, J.M. and Tschudy, D.P. (1973). The glucose effect in rat liver: studies of δ -aminolevulinate synthase and tyrosine aminotransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* **320**: 561-576.
- Borelli, E., Montmayeur, J.P., Foulkes, N.S. and Sassone-Corsi, P. (1992). Signal transduction and gene control: the cAMP pathway. *Crit. Rev. Oncog.* **3**: 321-338.
- Boshart, M., Kuppel, M., Schmidt, A., Schutz, G. and Luckow, B. (1992). Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene* **110** 129-130.
- Bottomley S.S. (1993). The sideroblastic anemias. *Wintrobe's clinical haematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, pags. 852-871. Editores: Lee R.G., Bithell T.C., Foester J., Athens J.W. y Lufkens J.N.
- Boyer T.D. (1989). The glutathione-S-transferases: an update. *Hepatology* **9**: 486-496

- Boyle, W.J., Smeal, T., Defize, L.H.K., Angel, P., Woodgett, J.R., Karin, M. and Hunter, T. (1991). Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA binding activity. *Cell* **64**: 573-584.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Braidotti G, Borthwick I.A. and May B.K. (1993). Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinate synthase from rat. *J. Biol. Chem.* **268**: 1109-1117.
- Bruns, R.F., Miller, F.D., Merriman, R.L., Howbert, J.J., Heath, W.F., Kobayashi, E., Takahashi, Y., Tamaoki, T. and Nakano, H. (1991). Inhibition of protein C by calphostin C is light dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**: 288-293.
- Buchner, K.B. (1995). Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus. *Eur. J. Biochem.* **228**: 211-221.
- Buechler, Y.J., Herberg, F.W. and Taylor, S.S. (1993). Regulation defective mutants of type I cAMP-dependent protein kinase: consequence of replacing Arg94 and Arg95. *J. Biol. Chem.* **268**: 16495.
- Burnham, B.F. (1968). The chemistry of porphyrins. *Semin. Haematol.* **5**: 296-322.
- Cable, E.E., Gildemeister, O.S., Pepe, J.A., Donohue, S.E., Lambrecht, R.W. and Bonkovsky, H.L. (1996). Hepatic 5-aminolevulinic acid synthase mRNA stability is modulated by inhibitors of heme biosynthesis and by metalloporphyrins. *Eur. J. Biochem.* **240**: 112-117.
- Cánepa, E.T., Galvagno, M.A., Llambías, E.B.C., Passerón, S. and Grinstein, M. (1985a). Studies on regulatory mechanism of heme biosynthesis in hepatocytes from experimental-diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta* **847**: 191-197.
- Cánepa, E.T., Llambías, E.B.C. and Grinstein, M. (1984). Effect of glucose on the induction of δ -aminolevulinic acid synthase and ferrochelatase in isolated rat hepatocytes by allilisopropylacetamide. *Biochim. Biophys. Acta.* **804**: 8-15.
- Cánepa, E.T., Llambías, E.B.C. and Grinstein, M. (1985b). Effect of glucose on induction of δ -aminolevulinic acid synthase, ferrochelatase and cytochrome P-450

- hemoproteins in isolated rat hepatocytes by phenobarbital and lead. *Biochim. Biophys. Acta.* **841**: 186-194.
- Cánepa, E.T., Llambías, E.B.C. and Grinstein, M. (1989). Studies on regulatory mechanisms of heme biosynthesis in hepatocytes from normal and experimental diabetic rats. Role of cAMP. *Biochem. Cell Biol.* **67**: 751-759.
 - Cánepa, E.T., Páez Pereda, M., Llambías, E.B.C. and Grinstein, M. (1992). Regulation of phenobarbital-induced ferrochelatase mRNA activity by dibutyl cAMP and glucose in normal and diabetic rat hepatocytes. *Biochem. Cell Biol.* **70**: 26-33.
 - Chang, M. and Jaehning, A. (1997). A multiplicity of mediators: alternative forms of transcription complexes communicate with transcriptional regulators. *Nucl. Acids Res.* **25**: 4861-4865.
 - Chau, C.M., A., Evans, M.J. and Scarpulla, R.C. (1992). Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes. *J. Biol. Chem.* **267**: 6999-7008.
 - Chen, C. and Okayama, H. (1988). Calcium phosphate mediate gene transfer: a highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* **6**: 632-638.
 - Cherry, J.R., Johnson, T.R., Dollard, C., Shuster, J.R. and Denis, C.L. (1989). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates the yeast transcriptional activator ADR1. *Cell* **56** :409-419.
 - Chomczynsky, P. and Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
 - Choou, S., Baichwal, V., Ferrell, J.E. (1992). Inhibition of c-Jun DNA binding by mitogen activated protein kinase. *Mol. Biol. Cell.* **3**: 1117-1130.
 - Chrivia, J.C., Kwok, R.P.S., Lamb, N., Haniwawa, M. and Montminy, M.R. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**: 855-859.

- Chu, D.T. and Granner, D.K. (1986). The effect of phorbol esters and diacylglycerol on expression of the phosphoenolpyruvate carboxylase (GTP) gene in rat hepatoma H4IIE cells. *J. Biol. Chem.* **261**: 16848-16853.
- Clapham, D.E. and Neer, E.J. (1993). New roles for G protein $\beta\gamma$ dimers in transmembrane signaling. *Nature* **365** 403-406.
- Cleveland, D.W. and Yen, T.J. (1989). Multiple determinants of eukaryotic mRNA stability. *New. Biol.* **1**: 121-124.
- Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1994). Structures of active conformations of $G_{i\alpha 1}$ and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* **265**: 1405-1412.
- Conboy, J.G., Cox, T.C., Bottomley, S.S., Bawden, M.J. and May, B.K. (1992). Human erythroid 5-aminolevulinate synthase. *J. Biol. Chem.* **267**: 18753-18758.
- Costa, M. and Medcalf, R.L. (1996). Differential binding of cAMP-responsive-element (CRE)-binding protein 1 and activating transcription factor-2 to a CRE-like element in the human tissue-type plasminogen activator (t-PA) gene promoter correlates with opposite regulation of t-PA by phorbol ester in HT-1080 and HeLa cells. *Eur. J. Biochem.* **237**: 532-538.
- Cotter, P.D., Baumann, M. and Bishop, D.F. (1992). Enzymatic defect in "X-linked" sideroblastic anaemia: molecular evidence for erythroid δ -aminolevulinate synthase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **259**: 4028-4032.
- Cotter, P.D., Drabkin, H.A., Varkony, T., Smith, D.I. and Bishop, D.F. (1995). Assignment of the human housekeeping delta-aminolevulinate synthase gene (ALAS1) to chromosome band 3p21.1 by PCR analysis of somatic cell hybrids. *Cytogenet. Cell. Genet.* **69**: 207-208.
- Cuif, M.H., Cognet, M., Bouquet, D., Tremp, G., Kahn, A. and Vaulont, S. (1992). Elements responsible for hormonal control and tissue specificity of L-type pyruvate kinase gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4852-4861.
- Cuif, M.H., Porteu, A., Kahn, A. and Vaulont S. (1993). Exploration of a liver-specific, glucose/insuline-responsive promoter in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **268**: 13769-13772.

- Daniel, S and Kim, K.H. (1996). Sp1 mediates glucose activation of the acetyl-CoA carboxylase promoter. *J. Biol. Chem.* **271**: 1385-1392.
- de Groot, R.P., Ballou, L.M., and Sassone-Corsi, P. (1994). Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternative route to mitogen-induced gene expression. *Cell* **79**: 81-91.
- de Groot, R.P., den Hertog, J., Vandenheede, J.R., Goris, J. And Sassone-Corsi, P. (1993). Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *EMBO J.* **12**:3903-3911.
- De Matteis, F. and Marks, G.S. (1996). Cytochrome P450 and its interactions with the heme biosynthetic pathway. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **74**: 1-8.
- Dell'Acqua, M.L., Faux, M.C., Thorburn, J, Thorburn, A. and Scott, J.D (1998). Membrane-targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *EMBO J.* **17**: 2246-2260.
- Della Fazia, M.A., Servillo, G and Sassone-Corsi, P. (1997). Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. *FEBS Letters* **410**: 22-24.
- Dérjard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell.* **76**: 1025-1037.
- Deybach, J.C., Da Silva, V., Grandchamp, B. and Nordman, Y. (1985). The mitochondrial location of protoporphyrinogen oxidase. *Eur. J. Biochem.* **149**: 431-435.
- Diaz Guerra, M.J., Bergot, M.O., Martínez, A., Cuif, M.H., Kahn, A. and Raymondjean M. (1993). Functional characterization of the L-type pyruvate kinase gene glucose response complex. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7725-7733.
- Diesterhaft M., Noguchi T. and Granner D.(1980). Regulation of rat liver tyrosine aminotransferase mRNA by hydrocortisone and by N6,O2'-dibutyryl adenosine 3',5'-phosphate. *Eur. J. Biochem* **108** : 357-365
- Dogra, S.C., Hahn, C.N. and May, B.K. (1993). Superinduction by cycloheximide of cytochrome P450_{2H1} and 5-aminolevulinate synthase gene transcription in chick embryo liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 531-534.

- Doiron, B., Cuif, M., Chen, R. and Kahn A. (1996). Transcriptional glucose signaling through the glucose response element is mediated by the pentose phosphate pathway. *J. Biol. Chem* **271**: 5321-5324.
- Drew, P.D. and Ades, I.Z. (1989). Regulation of the stability of chicken embryo liver δ -aminolevulinate synthase mRNA by hemin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**: 102-107.
- Dubowski, K.M. (1962). An *o*-toluidine method for body-fluid glucose determination. *Clin. Chem.* **8**: 592-598.
- Eckner, R., Ewen, M.E., Newsome, D., Gerdes, M., De Caprio, J.A., Lawrence, J.B. and Livingston, D.M. (1994). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300 KD (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev.* **8**: 869-884.
- Edwards, A.M. and Elliot, W.H. (1974) Induction of delta-aminolevulinic acid synthetase in isolated rat liver cell suspensions. Adenosine 3',5'-monophosphate dependence of induction by drugs. *J. Biol. Chem.* **249**: 851-855.
- Eldar, H., Ben Av, P., Schmidt, U.S., Livneh, E. and Liscovitch, M. (1993). Up regulation of phospholipase D activity induced by overexpression of protein kinase C- α . Studies in intact Swiss/3T3 cells and in detergent solubilized membranes in vitro. *J. Biol. Chem.* **268**: 12560-12564.
- Elder, G.H. (1993). Molecular genetics of disorders of haem biosynthesis. *J. Clin. Pathol.* **46**: 977-981.
- Elder, G.H. and Evans, J.O. (1978). Evidence that the coproporphyrinogen oxidase activity of rat liver is situated in the intermembrane space of mitochondria. *Biochem. J.* **172**: 345-357.
- Farese, R.V., Standaert, M., Arnold, T., Yu, B., Ishizuka, T., Hoffman, J., Vila, M. and Cooper, D.R. (1992). The role of protein kinase C in insulin action. *Cell Signal.* **4**: 133-143.
- Faux, M.C. and Scott, J.D. (1996). More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *TIBS* **21**: 312-315.

- Ferreira, G.C. (1995). Ferrochelatase binds the iron-responsive element present in the erythroid 5-aminolevulinate synthase mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**: 875-878.
- Ferreira, G.C. and Gong, J. (1995). 5-aminolevulinate synthase and the first step of heme biosynthesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**: 151-159.
- Ferreira, G.C., Neame, P.J. and Dailey, H.A. (1993). Heme biosynthesis in mammalian systems: evidence of a Schiff base linkage between the pyridoxal 5'-phosphate cofactor and a lysine residue in 5-aminolevulinate synthase. *Protein Sci.* **2**: 1959-1965.
- Ferrer, J, Gomis, R., Fernández Alvarez, J., Casamitjana, R and Vilardell, E. (1993). Signals derived from glucose metabolism are required for glucose regulation of pancreatic islet GLUT2 mRNA and protein. *Diabetes* **42**: 1273-1280.
- Ferreri, K., Gill, G. and Montminy, M. (1994). The cAMP regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1210-1213.
- Fisher, J.M., Wu, L., Denison, M.S. and Whitlock, J.P. Jr. (1990). Organization and function of a dioxin-responsive enhancer. *J. Biol. Chem.* **265**: 9676-9681.
- Foufelle, F., Gouhot, B., Pegorier, J.P. Perdereau, D., Girard, J. and Ferre, P. (1992). Glucose stimulation of lipogenic enzyme gene expression in cultured white adipose tissue. A role for glucose 6-phosphate. *J. Biol. Chem.* **267**: 20543-20546.
- Foulkes, N.S. and Sassone-Corsi, P. (1992). More is better: activators and repressors from the same gene. *Cell* **68**: 411-414.
- Foulkes, N.S. and Sassone-Corsi, P. (1996). Transcription factors coupled to the cAMP-signalling pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* **1288**: 101-121.
- Freshney, R. (1987). *Culture of animal cells: A manual of basic technique* pág. 220. Alan R. Liss Inc., New York.
- Fry, J.R., Jones, C.A., Webkin, P. and Bridges J.W. (1976). The enzymic isolation of adult rat hepatocytes in a functional and viable state. *Anal. Biochem.* **71**: 341-350.

- García, M.A., Vázquez, J., Giménez, C., Valdivieso, F. and Zafra, F. (1996). Transcription factor AP-2 regulates human apolipoprotein E gene expression in astrocytoma cells. *J. Neurosci.* **16**: 7550-7556.
- German, M., Ashcroft, S., Docherty, K., Edlund, T., Goodison, S., Imura, H., Kennedy, G., Madsen, O., Melloul, D., et al. (1995). The insulin gene promoter. A simplified nomenclature. *Diabetes* **44**: 1002-1004.
- German, M.S. and Wang, J. (1994). The insulin gene contains multiple transcriptional elements that responds to glucose. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4067-4075.
- Gibbs, C.S., Knighton, D.R., Sowadski, J.M., Taylor, S.S. and Zoller, M.J. (1992). Systematic mutational analysis of cAMP-dependent protein kinase identifies unregulated catalytic subunits and defines regions important for the recognition of the regulatory subunit. *J. Biol. Chem.* **267**: 4806.
- Giger, U. and Meyer, U.A. (1981). Induction of δ -aminolevulinic synthase and cytochrome P-450 hemoproteins in hepatocyte culture. *J. Biol. Chem.* **256**: 11182-11190.
- Ginty, D.D., Bonni, A and Greenberg, M.E. (1994). Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* **77** : 713-725.
- Goerz, G. and Korda, S. (1977). Porphyria cutanea tarda (PCT) and diabetes mellitus. *Z. Haut.* **52**: 1165-1174.
- Goldberg, E.M. and Zidovetzki, R. (1998). Synergistic effects of diacylglycerols and fatty acids on membrane and protein kinase C activity. *Biochem.* **37**: 5623-5632.
- Goldberg, M.A., Gaut, C.C., and Bunn, H.F. (1991). Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and post transcriptional events. *Blood*, **77**: 271-277.
- Gong, J., Hunter, G.A. and Ferreira, G.C. (1998). Aspartate-279 in aminolevulinic synthase affects enzyme catalysis through enhancing the function of the pyridoxal 5'-phosphate cofactor. *Biochem.* **37**: 3509-3515.

- Gong, J., Kay, C.J., Barber, M.J. and Ferreira, G.C. (1996). Mutations at a glycine loop in aminolevulinate synthase affect pyridoxal phosphate cofactor binding and catalysis. *Biochem.* **35**: 14109-14117.
- González, A., Katz, J.D, Mattei, M.G., Kikutani, H., Benoist, C. and Mathis, D. (1997). Genetic control of diabetes progression. *Immunity*, **7**: 873-883.
- González, G.A., Menzel, P., Leonard, J., Fischer, W.H. and Montminy, M.R. (1991). Characterization of motifs which are critical for activity of the cyclic AMP-responsive transcription factor CREB. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1306-1312.
- Granick, S. (1966). The induction *in vitro* of the synthesis of δ -aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals. *J. Biol. Chem.* **241**: 1359-1375.
- Granick, S. and Beale, S.I. (1978). Hemes, chllorophylls, and related compounds: biosynthesis and metabolic regulation. *Adv. Enzymol.* **46**: 33-203.
- Granick, S. and Sassa, S. (1971). Delta-aminolevulinic acid synthase and the control of heme and chlorophyll synthesis. En *Metabolic Pathways*, pp 77-141. Academic. Press, New York.
- Granick, S., Sinclair, P., Sassa, S. and Grieninger, G. (1975). Effects by heme, insulin, and serum albumin on heme protein synthesis in chick embryo liver cells cultured in a chemically defined medium, and a spectrofluorometric assay for porphyrin composition. *J. Biol. Chem.* **250**: 9215-9225.
- Gross, M., Olin, A., Hessefort, S. and Bender, S. (1994). Control of protein synthesis by hemin. Purification of a rabbit reticulocyte hsp70 and characterization of its regulation of the activation of the hemin-controlled eIF-2(alpha) kinase. *J. Biol. Chem.* **269**: 22738-22748.
- Grove, J.R., Price, D.J., Goodman, H.M. and Avruch, J. (1987). Recombinant fragment of protein kinase inhibitor blocks cyclic AMP-dependent gene transcription. *Science* **238**: 530-533.
- Gudermann, T., Schoneberg, T. and Schultz, G. (1997). Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**: 399-427.

- Hagiwara, M., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Deng, T., Karin, M., Shenolikar, S. and Montminy, M.R. (1992). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1 mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* **70**: 105-113.
- Hagiwara, M., Brindle, P., Harootunian, A., Armstrong, R. and Rivier, J. (1993). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1 mediated dephosphorylation of CREB. *Mol. Cell Biol.* **13**:4852-4859.
- Hahn C.N., Hansen A.J. and May B.K. (1991). Transcriptional regulation of the chicken *CYP2H1* gene. *J. Biol. Chem* **266**: 17031-17039.
- Hai, T.Y. and Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3720-3724.
- Hamilton J.H., Bement W.J., Sinclair P.R., Sinclair J.F., Alcedo J.A. and Wetterhahn K.E. (1992). Inhibition of protein synthesis increases the transcription of the phenobarbital inducible *CYP2H1* and *CYP2H2* genes in chick embryo hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**: 96-104.
- Hamilton, J.W., Bement, W.J., Sinclair, P.R., Sinclair, J.F. and Wetterhahn, K.E. (1988). Expression of 5-aminolaevulinate synthase and cytochrome P-450 mRNAs in chicken embryo hepatocytes *in vivo* and in culture. *Biochem. J.* **255**: 267-275.
- Hamilton, J.W., Bement, W.J., Sinclair, P.R., Sinclair, J.F., Alcedo, J.A. and Watterhahn, K.E. (1991). Heme regulates hepatic 5-aminolevulinate synthase mRNA expression by decreasing mRNA half-life and not by altering its rate of transcription. *Arch. Biochem. Biophys.* **289**: 387-392.
- Hanson, R.W. and Reshef, L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxikinase (GTP) gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 581-611.
- Hargrove, J.L., and Schmidt, F.H. (1989). The role of mRNA and protein stability in gene expression. *FASEB J* **3**: 2360-2370.
- Hayashi, N., Kurashima, Y. and Kikuchi, G. (1972). Mechanism of allylisopropylacetamide-induced increase of 5-aminolevulinate synthetase in liver

mitochondria. V. Mechanism of regulation by hemin of the level of 5-aminolevulinate synthetase in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **148**: 10-21.

- Hayashi, N., Teresawa, M., Yamauchi, K. and Kikuchi, G. (1980). Effects of hemin on the synthesis and intracellular translocation of delta aminolevulinate synthase in the liver of rats treated with 3,5-dicarbethoxy-1.4 dihydrocollidine. *J. Biochem.* **88**: 1537-1543.
- Hayashi, N., Watanabe, N. and Kikuchi, G. (1983). Inhibition by hemin of in vitro translocation of chicken liver delta aminolevulinate synthase into mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**: 700-706.
- Henequin, J.C., Gembal, M., Detimary, P., Gao, Z.Y., Warnotte, C. and Gilon, P. (1994). Multisite control of insulin release by glucose. *Diabete Metab* **20**: 132-137.
- Hod, Y. And Hanson, R.W. (1988). Cyclic AMP stabilizes the mRNA for phosphoenolpyruvate carboxikinase (GTP) against degradation. *J. Biol. Chem.* **263**: 7747-7752.
- Hoeffler, J.P., Lustbader, J.W. and Che, C.Y. (1991). Identification of multiple nuclear factors that interact with cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein and activating transcription factor-2 by protein interactions. *Mol Endocrinol.* **5**: 256-266.
- Honkakoski, P. and Negishi, M. (1998). Protein serine-threonine phosphatase inhibitors suppress phenobarbital-induced Cyp2b10 gene transcription in mouse primary hepatocytes. *Biochem. J.* **330**: 889-895.
- Honkakoski, P. and Negishi, M. (1998). Protein serine/threonine phosphatase inhibitors suppress phenobarbital-induced Cyp2b10 gene transcription in mouse primary hepatocytes. *Biochem. J.* **330**: 889-895.
- Hug, H. and Sarre, T.F. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?. *Biochem. J.* **291**: 329-343.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**: 225-236.
- Hunter, T. and Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**: 375-387

- Jaken, S. (1996). Protein kinase C isoenzymes and substrates. *Curr. Op. Cell. Biol.* **8**: 168-173.
- James, G. and Olson, E.N. (1992). Deletion of the regulatory domain of protein kinase C α exposes regions in the hinge and catalytic domains that mediate nuclear targeting. *J. Cell Biol.* **116**: 863-874.
- Janknecht, R. and Hunter, T. (1996). A growing coactivator network. *Nature* **383**: 22-23
- Jenkins, A.B., Furler, S.M. and Kraegen, E.W. (1986). 2-deoxy-D-glucose metabolism in individual tissues of the rat *in vivo*. *Int. J. Biochem* **18**: 311-318.
- Jordan, P.M. and Shemin, D. (1972). Delta-aminolevulinic acid synthase. En *The enzymes*, 3^o De., vol 7 pág. 339-356. Academic Press, New York
- Jover, R., Lindberg, R.L.P. and Meyer, U.A. (1996). Role of heme in cytochrome P450 transcription and function in mice treated with lead acetate. *Mol. Pharmacol.* **50**: 474-481.
- Kahn, C.R., Vicent, D., and Doria, A. (1996). Genetics of non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.* **47**: 509-531.
- Kappas, A., Sassa, S., Galbraith, R.A. and Nordmann, Y. (1995). En *Metabolic and molecular basis of inherited disease*. 7^o ed., págs. 2103-2159. Editores Sriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. Mc Graw-Hill Inc. New York.
- Karin, M. (1994). Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr. Op. Cell Biol.* **6**: 415-424.
- Kaytor, E.N., Shih, H.N. and Towle, H.C. (1997). Carbohydrate regulation of hepatic gene expression. Evidence against a role for the upstream stimulatory factor. *J. Biol. Chem.* **272**: 7525-7531.
- Keranen, L.M., Dutil, E.M. and Newton, A. (1995). Protein kinase C is regulated *in vivo* by three functionally distinct phosphorylations. *Curr. Biol.* **5**: 1394-1403.
- Kikuchi, G. and Toshida, T (1983). Function and induction of the microsomal heme oxygenase. *Mol. Cell. Biochem.* **53**: 163-183.
- Kim, H.J. and Kikuchi, G. (1972). Possible participation of cyclic AMP in the regulation of 5-aminolevulinic acid synthase in rat liver. *J. Biochem.* **71**: 932-926.

- Kim, H.J. and Kikuchi, G. (1974). Mechanism of allylisopropylacetamide-induced increase of δ -aminolevulinate synthase in liver mitochondria. Effects of administration of glucose, cyclic AMP and some hormones related to glucose metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **164**: 293-304.
- Kim, H.Y., Klausner, R.D. and Rouault, T.A. (1995). Translational repressor activity is equivalent and is quantitatively predicted by in vitro RNA binding for two iron-responsive element-binding proteins IRP1 and IRP2. *J. Biol. Chem.* **270**: 4983-4986.
- Kim, Y.T. and Steinberg, C. (1984). Immunologic studies on the induction of diabetes in experimental animals. Cellular basis for the induction of diabetes by streptozotocin. *Diabetes* **33**: 771-777.
- Kioussis, D., Reshef, L., Cohen, H., Tilghman, S.M., Iynedjian, P.B., Ballard, F.J. and Hanson, R.W. (1978). Alterations in translatable messenger RNA coding for phosphoenolpyruvate carboxikinase (GTP) in rat liver cytosol during deinduction. *J. Biol. Chem.* **253**: 4327-4332.
- Kiss, Z. (1996). Regulation of phospholipase D by protein kinase C. *Chem. Phys. Lipids* **80**: 81-102.
- Koh, W.S., Jeon, Y.J., Herring, A.C. and Kaminsky, N.E. (1997). Transient CRE- and kappa B site-binding is cross regulated by cAMP-dependent protein kinase and a protein phosphatase in mouse splenocytes. *Life Sci.* **60**: 425-432.
- Kreisberg, J.I., Radnik, R.A. and Kreisberg, S.H. (1996). Phosphorylation of cAMP responsive element binding protein after treatment of mesangial cells with high glucose plus TGF beta or PMA. *Kidney Int.* **50**: 805-810.
- Lodomery, M. (1997). Multifunctional proteins suggest connections between transcriptional and post-transcriptional processes. *BioEssays* **19**: 903-909.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
- Lalli, E., and Sassone-Corsi, P. (1994). Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J. Biol. Chem.* **269**: 17359-17362.
- Lamas, M. and Sassone-Corsi, P. (1996). CREM and the transcriptional response to cyclic AMP. *Curr. Opin. Endocrinol. Diab.* **3**: 403-407.

- Lamas, M. and Sassone-Corsi, P. (1997). The dynamics of the transcriptional response to cyclic adenosine 3',5'-monophosphate: recurrent inducibility and refractory phase. *Mol. Endocrinol.* **11**: 1415-1424.
- Lathrop, J.P. and Timko, M.P. (1993). Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science* **259**: 522-525.
- Lee, J.S. and Anvret, M. (1991). Identification of the most common mutation within the porphobilinogen deaminase gene in Swedish patients with acute intermittent porphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 10912-10915.
- Lefrancois-Martínez, A.M., Martínez, A. Antoine, B., Raymondjean, M. and Kahn, A. (1995). Upstream stimulatory factor proteins are major components of the glucose response complex of the L-type pyruvate kinase gene promoter. *J. Bio. Chem.* **270**: 2640-2643.
- Lemaigre, F.P. and Rousseau, G.G. (1994). Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem. J.* **303**: 1-14.
- Leonardsson, G. (1997). Characterisation of the rat tissue-type plasminogen activator gene promoter. Identification of a TAAT containing promoter element. *Eur. J. Biochem.* **248**: 676-683.
- Liang, Q., He, J.S. and Fulco, A.J. (1995). The role of Barbie box sequences as cis-acting elements involved in the barbiturate-mediated induction of cytochrome P450BM-1 and P450BM-3 in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **270**: 4438-4450.
- Lim, K.C., Ishihara, H., Riddle, R.D., Yang, Z., Andrews, N., Yamamoto, M. and Engel, J.D. (1994). Structure and regulation of the chicken erythroid δ -aminolevulinate synthase gene. *Nucleic Acids Res.* **22**: 1226-1233.
- Lin, A., Frost, J., Deng, T., Al Alawi, N., Smeal, T., Kikkawa, U., Hunter, T., Brenner, D. and Karin, M. (1992). Casein kinase II is a negative regulator of cJun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* **70**: 777-789.
- Liou, H.C., Boothby, M.R. and Glimcher, L.H. (1988). Distinct cloned class II MHC DNA-binding proteins recognize X-box transcription element. *Science* **242**: 69-71.
- Liu, J.P. (1996). Protein kinase C and its substrates. *Mol. Cell. Endocrinol.* **116**: 1-29.

- Llewellyn, D.H., Whatley, S. and Elder, G.H. (1993). Acute intermittent porphyria caused by an arginine to histidine substitution (R26H) in the co-factor binding cleft of porphobilinogen deaminase gene. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 1315-1316.
- Lu, P.J., Hsu, A.L., Wang, D.S., Yan, H.Y., Him, H.I. and Chen, C.S. (1998). Phosphoinositide 3-kinase in rat liver nuclei. *Biochem.* **37**: 5738-5745.
- MacFarlane, W.M., Read, M.L., Gilligan, M., Bujalska, I. and Docherty, K. (1994). Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner. *Biochem. J* **303**: 625-631.
- Mackie, J.E., Back, D.W., Hamilton, J.W. and Marks, G.S. (1991). Elevation of δ -aminolevulinic acid synthase and cytochrome P450 messenger RNA levels by dihydropyridines, dihydroquinolines, sydrones, and N-ethylprotoporphyrin IX. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 475-483.
- Maguire, D.J., Day, A.R., Borthwick, I.A., Srivastava, G., Wigley, P.L., May, B.K. and Elliott, W.H. (1986). Nucleotide sequence of the chicken 5-aminolevulinate synthase gene. *Nucleic Acids Res.* **14**: 1379-1391.
- Marks, G.S., Stephens, J.K., Fischer, P.W.F. and Morgan, R.O. (1979). Hormonal effects on the regulation of hepatic heme biosynthesis. *Mol. Cell. Biochem.* **25**: 111-123.
- Martin, B.C. and Soeldner, S. (1993). Familial clustering of first phase insulin secretion following intravenous glucose in nondiabetic offspring of NIDDM parents. *Diabetes* **42**: 62^a
- May, B.K. and Bawden, M.J. (1989). Control of heme biosynthesis in animals. *Semin. Haematol.* **26**: 150-156.
- May, B.K., Borthwick, I.A., Srivastava, G., Pirola, B.A. and Elliott, W.H. (1986). Control of 5-aminolevulinate synthase in animals. *Curr. Top. Cell. Reg.* **28**: 233-262.
- May, B.K., Dogra, S.C., Sadlon, T.J., Bhasker, C.R., Cox, T.C. and Bottomley, S.S. (1995). Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **51**: 1-51.

- McKnight, G., Hager, L. and Palmiter, R. (1980). Butyrate and related inhibitors of histone deacetylation block the induction of egg white genes by steroid hormones. *Cell* **22**: 469-477.
- McMaster G. K. and Carmichael G.G. (1977). Analysis of single and double stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 4835-4838.
- Messina, J.L. and Weinstock, R.S. (1992). Regulation of beta-actin gene transcription by insulin and phorbol esters. *Exp. Cell Res.* **200**: 532-535.
- Messina, J.L. and Weinstock, R.S. (1994). Evidence for diverse roles of protein kinase C in the inhibition of gene expression by insulin: the tyrosine aminotransferase, albumin, and phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *Endocrinol.* **135**: 2327-2334.
- Messina, J.L., Standaert, M.L., Ishizuka, T., Weinstock, R.S. and Farese, R.V. (1992). Role of protein kinase C in insulin's regulation of c-fos transcription. *J. Biol. Chem.* **267**: 9223-9228.
- Meyer, S., Hoppner, W. and Seitz, H.J. (1991). Transcriptional and post-transcriptional effects of glucose on liver phosphoenolpyruvate-carboxylase gene expression. *Eur. J. Biochem.* **202**: 985-991.
- Meyer, T.E. and Habener, J.F. (1993). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription activating deoxyribonucleic acid binding proteins. *Endocrinol. Rev.* **14**: 269-290.
- Miquerol, L., Cluzeaud, F., Porteu, A. Alexandre, Y., Vandewalle, A. and Kahn A. (1996). Tissue specificity of L-pyruvate kinase transgenes results from the combinatorial effect of proximal promoter and distal activator regions. *Gene Expr.* **5**: 315-330.
- Mitanhez, D., Doiron, B., Chen, R. and Kahn, A. (1997). Glucose-stimulated genes and prospects of gene therapy for type I diabetes. *Endocrine Reviews* **18**: 520-540.
- Mochly-Rosen, D. (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* **268**: 247-251.

- Molina, C.A., Foulkes, N.S., Lalli, E., and Sassone-Corsi, P. (1993). Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* **75**: 875-886.
- Montminy, M. (1997). Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem* **66**: 807-822.
- Montminy, M.R. and Bilezikjian, L.M. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* **328**: 175-178.
- Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G. and Goodman, H.R. (1986). Identification of a cyclic-AMP response element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **83**: 6682-6686.
- Moore, M.R. (1993). Biochemistry of porphyria. *Int.J. Biochem.* **25**: 1353-1368.
- Moore, M.R. and Hift, R.J. (1997). Drugs in the acute porphyrias toxicogenetic diseases. *Cell. Mol. Biol.* **43**: 89-94.
- Morais, J.A. and Wagner, J.G. (1985). Steroid metabolism in isolated hepatocytes. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **10**: 295-307.
- Mustajoki, P., Himberg, J.J., Tokola, O. and Tenhunen, H. (1992). Rapid normalization of antipyrine oxidation by heme in variegata porphyria. *Clin. Pharmacol. Ther.* **51**: 320-324.
- Nakahashi, Y., Fujita, H. and Taketani, N. (1992). The molecular defect of ferrochelatase in a patient with erythropoietic protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 281-285.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., González, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K. and Nebert, D.W. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biol.* **12**: 1-51.
- Neugebauer, K.M. and Roth, M.B. (1997). Transcription units as RNA processing units. *Genes Develop.* **11**: 3279-3285.
- Newton, A.C. (1995). Protein kinase C: structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.* **270**. 28495-28498.

- Newton, A.C. (1996). Protein kinase C: ports of anchor in the cell. *Curr. Biol.* **6**: 806-809.
- Newton, A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr Op. Cell. Biol.* **9**: 161-167.
- Nickol, J.M., Lee, K.L. and Kenney, F.T. (1978). Changes in hepatic level of tyrosine aminotransferase messenger RNA during induction with hydrocortisone. *J. Biol. Chem.* **253**: 4009-4015.
- Nishimura, M. and Uyeda, K. (1995). Purification and characterization of a novel xylosa 5-phosphate-activated protein phosphatase and activation by a sugar phosphate. *J. Biol. Chem.* **270**: 26341-26346.
- Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**: 484-496.
- Nordmann, Y, de Verneuil, H., Deybach, J.C., Delfau, M.H. and Grandchamp, B. (1990). Molecular genetics of porphyrias. *Trends in Mol. Med.* **22**: 387-391.
- Odagiri, H., Wang, J. and German, M.S. (1996). Function of the human insulin promoter in primary cultured islet cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 1909-1915.
- Olah, G.A., Mitchell, R.D., Sosnick, T.R., Walsh, D.A. and Trewthella, J. (1993). Solution structure of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit and its contraction upon binding the protein kinase inhibitor peptide. *Biochem.* **32**: 3649.
- Olson, E.N., Burgess, R. and Staudinger, J. (1993). Protein kinase C a transducer of nuclear signals. *Cell Growth Differen.* **4**: 699-705.
- Orkin, S.H. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J. Biol. Chem.* **270**: 4955-4958.
- Orr, J.W. and Newton, A.C. (1994). Intrapeptide regulation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **269**: 8383-8387.
- Pall, M.L. (1981). Adenosine 3',5'-phosphate in fungi. *Microbiol. Rev.* **45**: 462-480.
- Parker, P.J. (1994). Protein kinase C and its relatives. En *Protein kinases*. Editado por Woodgett, J.R. IRL press. Oxford university press. Pág. 67-84.
- Paul, J. (1970). En *Cell and Tissue Culture*, 4th ed. Livingstone, Edinburgh.

- Pennie, W.D., Hager, G.L. and Smith, C.L. (1995). Nucleoprotein structure influences the response of the mouse mammary tumor virus promoter to activation of the cyclic AMP signalling pathway. *Mol. Cell Biol.* **15**: 2125-2134.
- Pennisi, E. (1997). Opening the way to gene activity. *Science* **275**: 155-157.
- Podolin, P.L., Denny, P., Lord, C.J., Hill, N.J., Todd, J.A., Peterson, L.B., Wicker, L.S. and Lyons, P.A. (1997). Congenic mapping of the insulin-dependent diabetes (Idd) gene, Idd10, localizes two genes mediating the Idd10 effect and eliminates de candidate Fcgr1. *J. Immunol.* **159**: 1835-1843.
- Ptashne, M. and Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* **386**: 569-577.
- Ptashne, M. (1997). Control of gene transcription: an outline. *Nature Med.* **3**: 1069-1072.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, H. and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector- New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acid Res.* **23**: 4878-4884.
- Rencurel, F., Waeber, G., Antoine, B., Rocchiccioli, F., Maulard, P., Girard, J., and Leturque, A. (1996). Requirement of glucose metabolism for regulation of glucose transporter type 2 (GLUT2) gene expression in liver. *Biochem. J.* **314**: 903-909.
- Renouf, S., Beullens, M., Wera, S., Van Eynde, A., Sikela, J., Stalmans, W. And Bollen, M. (1995). Molecular cloning of a human polypeptide related to yeast sds 22, a regulator of protein phosphatase-1. *FEBS Lett.* **375**: 75-78.
- Rhoads, R.E. (1993). Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors. *J. Biol. Chem.* **268**: 3017-3020.
- Riabowol, K.T., Fink, J.S., Gilman, M.Z., Walsh, D.A., Goodman, R.H. and Feramisco, J.R. (1988). The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase induces expression of genes containing cAMP responsive enhancer elements. *Nature* **336**: 83-86.

- Roberts, B.E. and Paterson, B.M. (1973). Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* **70**: 2330-2334.
- Ruchaud, S., Seit , P., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P. and Lanotte M. (1997). The transcriptional repressor ICER and cAMP programmed cell death. *Oncogene* **15**: 827-836.
- Rummel, M.M., Sers, C. and Johnson, J.P. (1996). Phorbol ester and cyclic AMP-mediated regulation of the melanoma-associated cell adhesion molecule MUC18/MCAM. *Cancer Res.* **56**: 2218-2223.
- Ryan, G. and Ades, I.Z. (1989). Coordinate elevations of liver δ -aminolevulinate synthase and cytochrome P-450 RNA by phenobarbital in chicken embryos: the effect of heme. *Int. J. Biochem.* **21**: 1025-1031.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning* 2^{da} ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San Martín de Viale, L.C. and Grinstein, M. (1968). Porphyrins biosynthesis IV. 5-and 6-COOH porphyrinogens (type III) as normal intermediates in haem biosynthesis. *Biochem. Biophys. Acta.* **158**: 79-91.
- Sarkany, R.P.E., Whitcombe, D.M. and Cox, T.M. (1992). Erythropoietic protoporphyria: cloning, sequencing and chromosomal localization of the ferrochelatase gene. Abnormal RNA splicing in an affected family. *Br. J. Dermatol.* **127**: 19.
- Sassa, S., and Kappas, A. (1977). Induction of aminolevulinate synthase and porphyrins in cultured liver cells maintained in chemically defined medium. Permissive effects of hormones on induction process. *J. Biol. Chem.* **252**: 2428-2436.
- Sassone-Corsi, P. (1994). Goals for signal transduction pathways: linking up with transcriptional regulation. *EMBO J.* **13**: 4717-4728.

- Sassone-Corsi, P. (1995). Transcription factors responsive to cAMP. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **11**: 355-377.
- Scarpetta, M.A. and Uhler, M.D. (1993). Evidence for two additional isoforms of the endogenous kinase inhibitor of cAMP-dependent protein kinase in mouse. *J. Biol. Chem.* **268**: 10927.
- Chung, J. And Overton, C. (1997). TESS: transcription element search software on the WWW. Technical report CBIL-TR-1997-1001-v0.0, of the computational biology and informatics laboratory, School of Medicine, University of Pennsylvania.
- Scott, C.D., Kemp, B.E. and Edwards, A.M. (1985). Effects of hemin on rat liver cyclic AMP-dependent protein kinases in cell extracts and intact hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **847**: 301-308.
- Seed, B. and Sheen, J.Y. (1988). A simple phase extraction assay for chloramphenicol acetyltransferase activity. *Gene* **67**: 271-277.
- Sharma, A. and Stein, R. (1994). Glucose induced transcription of the insulin gene is mediated by factors required for beta cell type specific expression. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 871-879.
- Shih, H.M. and Towle, H.C. (1992). Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene. Evidence for a common factor required for carbohydrate regulation of hepatic genes. *J. Biol. Chem.* **267**: 13222-13228.
- Sinclair, P.R. and Granick, S. (1975). Heme control on the synthesis of δ -aminolevulinic acid synthetase in cultured chick embryo liver cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **244**: 509-520.
- Singer, W.D., Brown, H.A. and Sternweis, P.C. (1997). Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol specific phospholipase C and D. *Ann. Rev. Biochem.* **66**: 475-510.
- Slater, S.J., Kelly, M.B., Taddeo, F.J., Larkin, J.D. Yeager, M.D., McLane, J.A., Ho, C. and Stubb, C.D. (1995). Direct activation of protein kinase C by α ,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Biol. Chem.* **270**: 6639-6643.
- Smith, C.L. and Hager, G.L. (1997). Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. A tale of two templates. *J. Biol. Chem.* **272**: 27493-27496.

- Smith, K.M. editor. (1981). Heme cleavage: biological systems and chemical analogs in porphyrins and metalloporphyrins pág 123-153. Elsevier Amsterdam.
- Smith, S.J. and Cox, T.M. (1997). Translational control of erythroid δ -aminolevulinate synthase in immature human erythroid cells by heme. *Cell. Mol. Biol.* **43**: 103-114.
- Spiegel, S., Foster, D and Kolesnick, R. (1996). Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Op. Cell. Biol.* **8**: 159-167.
- Srivastava, G., Borthwick, I.A., Maguire, D.J., Elferink, C.J., Banden, M.S., Mercer, J.F.B. and May, B.K. (1988). Regulation of 5-aminolevulinate synthase mRNA in different rat tissues. *J. Biol. Chem.* **263**: 5202-5209.
- Srivastava, G., Hansen, A.J., Bawden, M.J. and May, B.K. (1990). Hemin administration to rats reduces levels of hepatic mRNAs for phenobarbitone-inducible enzymes. *Mol. Pharmacol.* **38**: 486-493.
- Srivastava, G., May, B.K. and Elliott, W.H. (1979). CAMP-dependent induction of delta-aminolevulinate synthase in isolated embryonic liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**: 42-49.
- Srivastava, K.K., Cable, E.E., Donohue, S.E. and Bonkovsky, H.L. (1993). Molecular basis for heme-dependent induction of heme oxygenase in primary cultures of chick embryo hepatocytes. Demonstration of acquired refractoriness to heme. *Eur. J. Biochem.* **213**: 909-917.
- Stark W.M., Baker M.G., Raithby P.R., Leeper F.J. and Battersby A.R. (1985). The spiro intermediate proposed for biosynthesis of the natural porphyrins-synthesis and properties of its macrocycle. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **000**: 1294-1296.
- Stephens, J.K., Fischer, P.N.F. and Marks, G.S. (1978). Drug induced porphyrin biosynthesis XVIII. Effect of modulation of intracellular cyclic AMP levels on drug-induced porphyrin biosynthesis in chick embryo liver cells maintained in serum free medium. *Biochem. Pharmacol.* **27**: 2439-2445.
- Sterling, K, Silver, M. and Ricketts, H.T. (1949). Development of porphyria in diabetes mellitus. Report of three cases. *Arch. Int. Med.* **84**: 965-975.

- Stoltz, C., Vachon, M.H., Trottier, E., Dubois, S., Paquet, Y. and Anderson, Alan. (1998). The CYPB2 phenobarbital response unit contains an accessory factor element and a putative glucocorticoid response element essential for conferring maximal phenobarbital responsiveness. *J. Biol. Chem.* **273**: 8528-8536.
- Surinya, K.H., Cox, T.C. and May, B.K. (1997). Transcriptional regulation of the human erythroid 5-aminolevulinic acid synthase gene. *J. Biol. Chem.* **272**: 26585-26594.
- Tan, D., Harrison, T., Hunter, G.A. and Ferreira, G.C. (1998). Role of arginine 439 in substrate binding of 5-aminolevulinic acid synthase. *Biochem.* **37**: 1478-1484.
- Tanimoto, K., Murakami, K. and Fukamizu, A. (1994). Combinatorial action of cAMP and phorbol ester on synergistic expression of the human activin A gene. *Exp. Cell Res.* **211**: 408-414.
- Taylor, I.C., and Kingston, R.E. (1990). Factor substitution in a human HSP70 gene promoter: TATA-dependent and TATA-independent interactions. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 165-175.
- Taylor, S. and Radzio-Andzelm, E. (1994). Cyclic AMP-dependent protein kinase. In *Protein Kinases*. Edited by Woodgett, J.R. IRL Press. Oxford University Press. Pages 1-29.
- Taylor, S.S., Knighton, D.R., Zheng, J., Sowadsky, J.M., Gibbs, C.S. and Zoller, M.J. (1993). A template for the protein kinase family. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 84.
- Tenhunen, R. (1976). The enzymatic conversion of heme to bilirubin in vivo. *Ann. Clin. Res.* **8**: 2-9.
- Tenhunen, R. and Mustajoki, P. (1998). Acute porphiria: treatment with heme. *Semin. Liver Dis.* **18**: 53-55.
- Tilghman, S., Hanson, R., Reshef, L., Hopgood, M. and Ballard, F. (1974). Rapid synthesis of translatable messenger RNA of phosphoenolpyruvate carboxykinase during glucose repression in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**: 1304-1308.
- Tisch, R. and McDevitt, H. (1996). Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* **85**: 291-297.
- Tjian, R. and Maniatis, T. (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* **77**: 5-8.

- Toker, A. and Cantley, L.C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**: 673-676.
- Tovey, K.C., Oldham, K.G. and Whelan, J.A.M. (1974). A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique. *Clinica Chim. Acta* **56**: 221-234.
- Towle, H. (1995). Metabolic regulation of gene transcription in mammals. *J. Biol. Chem.* **270**: 23235-23238.
- Uhler, M.D. and Mc Knight, G.S. (1987). Expression of cDNAs for two isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **262**: 15202-15207.
- Uhler, M.D., Carmichael, D.F., Lee, D.C., Chrivia, J.C., Krebs, E.G. and McKnight, G.S. (1986). Isolation of cDNA clones for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 1300.
- Upadhyay, P., Venkateswara, R.M., Venkateswar, V., Rangarajan, P.N. and Padmanaban, G (1992). Identification and functional characterization of a cis-acting positive DNA element regulating CYP 2B1/B2 gene transcription in rat liver. *Nucleic Acid Res.* **20**: 557-562.
- Van Eynde, A., Wera, S., Beullens, M., Torrekens, S., Van Leuven, F., Stalmans, W. And Bollen, M. (1995). Molecular cloning of Nipp-1, a nuclear inhibitor of protein phosphatase-1, reveals homology with polypeptides involved in RNA processing. *J. Biol. Chem.* **270**: 28068-28074.
- Van Patten, S.M., Ng, D.C., Thong, J.P., Angelos, K.L., Smith, A.J. and Walsh, D.A. (1991). Molecular cloning of a rat testis form of the inhibitor protein of cAMP dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5383.
- Vaulont, S. and Kahn, A. (1994). Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J.* **8**: 28-35.
- Venkateswar, V. and Padmanaban, G. (1991). Involvement of heme in the transcriptional activation of CYP1B1/B2 gene by phenobarbitone in rat liver: studies with succinylacetone. *Arch. Biochem. Biophys.* **290**: 167-172.

- Verma, A, Nye, J.S. and Stander, S.H. (1987). Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:2256-2260.
- Viollet, B., Lefrancois-Martínez, A.M., Henrion, A, Kahn, A., Raymondjean, M. and Martínez, A. (1996). Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms. *J. Biol. Chem.* **271**: 1405-1415.
- Wadzinski, B.E., Wheat, W.H., Jaspers, S., Peruski, Jr., L.F., Lickteig, R.L., Johnson, G.L. and Klemm, D.J. (1993). Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 2822-2834.
- Wagner, S. and Green, M.R. (1993). HTLV-I tax protein stimulation of DNA-binding of bZIP proteins by enhancing dimerization. *Science* **262**: 395-399.
- Wainstok de Calmanovici, R., Ríos de Molina, M.C., Taira de Yamasato, M.C., Tomio, J.M. and San Martín de Viale, L.C. (1984). Mechanism of hexachlorobenzene-induced porphyria in rats. Effect of phenobarbitone pretreatment. *Biochem. J.* **218**: 753-763.
- Walsh, D.A., Glass, D.B. and Mitchell, R.D. (1992). Substrate diversity of the cAMP-dependent protein kinase: regulation based upon multiple binding interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**: 241.
- Watanabe, T., Ono, Y., Taniyama, Y., Hazama, K., Igarashi, K., Ogita, K., Kikkawa, U. and Nishiauka, Y. (1992). Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C- δ subspecies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10159-10163.
- Waxman, D.J. and Azaroff, L. (1992). Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J.* **281**: 577-592.
- Williams, T. and Tjian, R. (1991). Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev.* **5**: 670-682.
- Wolf, M. and Baggiolini, M. (1988). The protein kinase inhibitor staurosporine, like phorbol esters induces the association of protein kinase C with membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 1273-1279.

- Xie, H. and Rothstein, T.L. (1995). Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element-binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig. *J. Immunol.* **154**: 1717-1723.
- Xie, T. and Jaiswal, A.K. (1996). AP-2 mediated regulation of human NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) gene expression. *Biochem. Pharmacol.* **51**: 771-778.
- Yamada, K., Tanaka, T. and Nogushi T. (1997) Members of the nuclear factor 1 family and hepatocyte nuclear factor 4 bind to overlapping sequences of the L-II element on the rat pyruvate kinase L gene promoter and regulate its expression. *Biochem. J.* **324**: 917-925.
- Yamamoto, M., Hayashi, N. and Kikuchi (1983). Translational inhibition by heme of the synthesis of hepatic delta-aminolevulinate synthase in a cell free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**: 225-231.
- Yamamoto, M., Hayashi, N. and Kikuchi, G. (1982). Evidence for the transcriptional inhibition by heme of the synthesis of delta-aminolevulinate synthase in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**: 985-990.
- Yamamoto, M., Kure, S., Engel, J.D. and Higara, K. (1988). Structure, turnover and heme-mediated suppression of the level of mRNA encoding rat liver δ -aminolevulinate synthase. *J. Biol. Chem.* **263**:15973-15979.
- Yomogida K, Yamamoto M., Yamagami T., Fujita H. and Hayashi N. (1993). Structure and expression of the gene encoding rat nonspecific form δ -aminolevulinate synthase. *J. Biochem.* **113**: 364-371.
- Zhang, G., Kazanietz, M.G. Blumberg, P.M. and Hurley, J.H. (1995). Crystal structure of the Cys2 activator binding domain of protein kinase C δ in complex with phorbol ester. *Cell* **81**: 917-924.
- Zhang, L. and Guarente, L. (1994). HAP1 is nuclear but is bound to a cellular factor in the absence of heme. *J. Biol. Chem.* **269**: 14643-14647.
- Zhang, L. and Guarente, L. (1995). Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.* **14**: 313-320.

- Zhou, J., Wright, P.S., Wong, E., Jessen, K., Morand, J.N. and Carlson, D.M. (1997). Cyclic AMP regulation of mouse proline-rich protein gene expression: isoproterenol induction of AP-1 transcription factors in parotid glands. Arch. Biochem. Biophys. **338**: 97-103.
- Zidovetzki, R. and Lester, D.S. (1992). The mechanism of activation of protein kinase C: a biophysical perspective Biochem. Biophys. Acta **1134**: 261-272.



Cecilia L. Varone



Eduardo T. Cánepa