

Tesis de Posgrado

Mecanismos de acción de la insulina en la represión de la transcripción : el gen de la 5-aminolevulinato sintetasa como modelo experimental

Scassa, María Elida

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

Scassa, María Elida. (2002). Mecanismos de acción de la insulina en la represión de la transcripción : el gen de la 5-aminolevulinato sintetasa como modelo experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3449_Scassa.pdf

Cita tipo Chicago:

Scassa, María Elida. "Mecanismos de acción de la insulina en la represión de la transcripción : el gen de la 5-aminolevulinato sintetasa como modelo experimental". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3449_Scassa.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

***Mecanismos de acción de la insulina en la represión de
la transcripción: el gen de la 5-aminolevulinato
sintetasa como modelo experimental***

Autor
María Élide Scassa

Director
Eduardo Tomás Cánepa

Lugar de trabajo
Laboratorio de Biología Molecular

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

2002

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento

a Fernando, Martín, Mariana y Carolina por apoyarme desde el principio en este proyecto, por su colaboración, su paciencia infinita y su buen humor,

a Eduardo por depositar su confianza en mi y permitirme formar parte de su laboratorio. Por su calidez, su paciencia y por enseñarme a trabajar siempre con entusiasmo y rigurosidad,

a Silvia Moreno por incentivarme a reencontrarme con la ciencia, por su entusiasmo para transmitirla y por su disponibilidad,

a Ale y Pedro por solucionarme todos mis pedidos, por su compañerismo y solidaridad,

a Ceci por su paciencia para enseñarme todas las técnicas y secretos del trabajo experimental, a Luciana por sacarme de apuros con su increíble prolijidad, a Juli por su solidaridad y buen humor, a todas por los días compartidos y su ayuda sin la cual este trabajo no se hubiera podido realizar,

a Silvita Rossi y a Vanina por responder a mis infinitas dudas en el laboratorio de Biología Molecular, por estar siempre disponibles para colaborar,

a Elba por sus sabios consejos,

a Pauli, Silargi, Virgi y Pía por su amabilidad, su alegría, sus “frases célebres”, su empuje y sus ganas para ayudar,

a Omar Coso por su generosidad al cedernos gran parte de los plásmidos empleados en este trabajo,

a Silvio Gutkind por ofrecerme la posibilidad de realizar una pasantía en su laboratorio y poner a nuestra disposición una serie de plásmidos y reactivos para concluir el trabajo experimental,

a Mauricio, Alejandro, Marina, Sandra, a los compañeros de Análisis Biológicos y del laboratorio de Esteroides por facilitarme los materiales e instrumental todas las veces que los necesité,

al Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular por su generosidad al permitirme el uso de sus instalaciones,

a la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

TRABAJOS PUBLICADOS

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

- “Insulin inhibits δ -aminolevulinate synthase gene expression in rat hepatocytes and human hepatoma cells.”

María E. Scassa, Cecilia L. Varone, Lilian Montero, and Eduardo T. Cánepa 1998
Experimental Cell Research 244: 460-469.

- “Phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for the regulation of 5- aminolevulinate synthase gene expression by insulin.”

María E. Scassa, Alejandra S. Guberman, Cecilia L. Varone, and Eduardo T. Cánepa
2001 Experimental Cell Research 271: 201-213.

- Delineation of the insulin–responsive sequence in the rat 5-aminolevulinate synthase gene.

María E. Scassa, Alejandra S. Guberman, Luciana E. Giono and Eduardo T. Cánepa
(manuscrito en preparación).

RESUMEN

La insulina desempeña un papel clave en la regulación de múltiples procesos celulares. La unión de la hormona a su receptor en la superficie celular activa la actividad intrínseca de quinasa de tirosinas del mismo, ocasionando la autofosforilación del receptor y la fosforilación de sustratos intracelulares denominados IRSs. Los IRSs actúan como moléculas adaptadoras en la transducción de señales, reclutando a una gran variedad de proteínas que contienen dominios de homología Src (SH2), entre ellas: la subunidad reguladora (p85) de la PI3K a la “growth factor receptor binding protein 2”(Grb2). Este evento conduce a la activación de las cascadas de la PI3K y de Ras/MAPK, respectivamente.

En el presente trabajo hemos examinado la acción de la hormona peptídica sobre la expresión del gen de la 5-aminolevulinato sintetasa (ALAS) en hepatocitos de rata y en células de hepatoma humano HepG2. La ALAS es la primera enzima y reguladora de la biosíntesis del hemo, su nivel es normalmente bajo en el hígado pero se incrementa marcadamente en respuesta a drogas porfirinogénicas como el fenobarbital. El tratamiento con insulina 5nM produjo una notable disminución en los niveles del mRNA de ALAS tanto en condiciones basales como de estimulación con fenobarbital. Este efecto fue dosis dependiente como pudo observarse mediante ensayos de Northern y slot blot. Por otra parte la vida media del mRNA de ALAS no fue modificada por la presencia de la hormona lo que sugiere que la acción ejercida por la insulina sería relevante a nivel transcripcional. Con la finalidad de determinar la actividad transcripcional del promotor, realizamos una construcción (pACAT) que contiene 876 pb de la región 5' flanqueante del gen de ALAS dirigiendo la expresión de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT). En cotransfecciones transientes de células HepG2 observamos una significativa disminución de la actividad CAT cuando se incubaron las células con la hormona.

Considerando estos resultados, utilizamos dos metodologías diferentes para caracterizar las vías de transducción de señales involucradas en la represión hormonal de ALAS. En un primer abordaje empleamos agentes químicos, permeables a la membrana plásmica, que inhiben específicamente a proteínas intermediarias de la señalización de insulina, para evaluar la contribución de estos efectores a la respuesta final. Los inhibidores de la PI3K (wortmanina y LY294002), de la farnesilación de Ras (lovastatina y PD152440) y de MEK (PD98059) abolieron la acción de la insulina, mientras que el inhibidor de mTOR/p70RSK (rapamicina) no tuvo efecto alguno sobre la represión hormonal.

Por otra parte, analizamos el efecto de la sobreexpresión de formas dominantes negativas o constitutivamente activas de intermediarios de las vías de Ras/MAPK y de la PI3K para evaluar el papel de estas cascadas en la inhibición transcripcional de ALAS. La cotransfección de células HepG2 con versiones dominantes negativas de SOS, Ras, Raf, MEK y MAPK interfirió la acción de la insulina, mientras que la cotransfección con formas constitutivamente activas de Ras, MEK y p90RSK mimetizó la inhibición hormonal *per se*, independientemente del estímulo en el receptor. Un comportamiento similar se obtuvo cuando empleamos versiones dominantes negativas de PI3K y PKB o a la PKB miristoilada, respectivamente. Estos resultados nos permiten proponer que la señalización a través de ambas vías es requerida para obtener la totalidad del efecto final.

Por último, la regulación hormonal fue mediada por un fragmento de 117 pb (-469/-354) del gen de ALAS, capaz de conferir sensibilidad a insulina cuando fue subclonado río

arriba del promotor heterólogo de la quinasa de timidina (pALIRE). Esta región presenta la secuencia GTTTTG, muy similar al IRE canónico reportado para genes reprimidos por la insulina, que resultó crucial para la inhibición. En EMSAs pudo observarse la formación de complejos por unión a secuencias con alta homología a las de HNF3 y NF1 presentes en esta región.

Todos estos hallazgos sugieren que la insulina requiere la acción orquestada de efectores celulares (intermediarios de las cascadas Ras/MAPK/p90RSK y PI3K/PKB) y de factores de transcripción que reconocen secuencias específicas y abre la posibilidad de considerar que miembros de las familias HNF3 y NF1 podrían intervenir en la respuesta.

ABSTRACT

Insulin plays a key role in regulating a wide range of cellular processes. The binding of insulin to its cell surface receptors activates their intrinsic tyrosine kinase activity leading to receptor autophosphorylation and phosphorylation of cytosolic proteins known as IRSs, which serve as adapters in intracellular signaling. IRS binds a variety of Src homology 2 (SH2) domain containing proteins, when specific tyrosines are phosphorylated, including the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and the growth factor receptor binding protein 2 (Grb2). This gives rise to the activation of PI3K and Ras, and hence to the activation of serine/threonine protein kinases.

We have explored the action of the peptidic hormone on 5-aminolevulinate synthase (ALAS) gene expression in rat hepatocytes and HepG2 cells. The ALAS is the first enzyme in the heme biosynthetic pathway and in liver at least is rate limiting, its level is normally very low in hepatocytes but is greatly increased in response to the addition of certain porphyrinogenic drugs such as phenobarbital. Treatment with 5 nM insulin led to a significant decrease of both basal and phenobarbital induced ALAS mRNA, in a dose dependent manner as measured by Northern and slot blot. Moreover ALAS mRNA half life was not modified by the presence of the hormone, suggesting that insulin plays an important role in regulating ALAS gene transcription. In a different approach, we fused a 876 bp fragment corresponding to the 5' flanking region of the hepatic rat ALAS gene to the bacterial reporter gene for CAT, to determine promoter activity. CAT activity was highly impaired in HepG2 cells transiently transfected with this fusion gene (pACAT plasmid) when treated with insulin as measured by CAT assay.

In view of the preceding findings we undertook the present work to characterize the signal transduction pathways involved in insulin inhibition of ALAS gene expression. We used small cell permeant molecules that are specific inhibitors of particular proteins involved in insulin signaling to assess the contribution of these effectors to the hormonal regulation. Inhibitors of PI3K (wortmannin and LY 294002), Ras farnesylation (lovastatin and PD 152440) and MEK (PD 98059) abolished insulin inhibition, however, inhibitor of mTOR/p70RSK (rapamycin) had no effect upon insulin action.

To examine the role of the Ras/MAPK and PI3K pathways in insulin signaling relevant to ALAS inhibition we determined the effects of dominant negative and dominant active forms of regulatory enzymes involved in these cascades. Cotransfection of HepG2 cells with dominant negative forms of SOS, Ras, Raf, MEK and MAPK interfered inhibition by insulin, while cotransfection with dominant active forms of Ras, MEK and p90RSK mimicked the hormone action *per se*, independently of signaling input. A similar behaviour was observed with dominant negative versions of PI3K and PKB and myristoylated PKB, respectively. With the present results we propose that signaling through the PI3K and the Ras/MAPK cascades are required for insulin inhibition of ALAS gene expression.

Finally, the regulation by insulin was mediated by a 117 bp fragment (-469/-354), which conferred hormonal sensitivity to the heterologous thymidine kinase promoter in transient transfection assays in HepG2 cells. EMSAs showed that multiple nuclear proteins bind to this region at conserved HNF3 and NF1 sequences.

Taken together, these results suggest that the effect of insulin is due to a complex interplay of effectors (PI3K/PKB and Ras/MAPK/p90RSK cascade intermediaries) and of transcription factors, and underline the contribution of HNF3 and NF1 like proteins.

OBJETIVOS

La acción de la insulina se caracteriza por la diversidad de sus efectos, siendo la activación o la represión de la transcripción una de la más relevante. Los mecanismos empleados para propagar la señal desde el receptor hasta el núcleo, los factores de transcripción intervinientes y los elementos presentes en el DNA que confieren respuesta a la hormona aún no han sido dilucidados totalmente.

El objetivo general de este trabajo fue estudiar los mecanismos por los cuales la insulina regula la transcripción de genes, tomando como modelo experimental el gen de la 5-aminolevulinato sintetasa (ALAS)

Los objetivos particulares del trabajo fueron:

1. Estudiar el efecto de la insulina sobre la expresión génica de ALAS en hepatocitos de rata y la línea celular de hepatoma humano HepG2.
2. Determinar en que etapa del flujo de la información genética se encuentra involucrada la hormona
3. Caracterizar las vías de transducción de señales empleadas por la insulina para ejercer la respuesta final. Evaluar el comportamiento de los efectores de las principales cascadas de señalización, activables por la hormona, para dilucidar que proteínas participan en la propagación del estímulo.
4. Delimitar la zona del promotor de ALAS capaz de conferir respuesta a la hormona.
5. Identificar los elementos actuando en *cis* y los factores actuando en *trans* responsables de mediar la regulación hormonal sobre el gen de ALAS.

ABREVIATURAS

8-CPT-cAMP: 8-(4-clorofeniltio)-cAMP
ALAS: 5-aminolevulinato sintetasa
AP-1: proteína activadora 1
APO CIII: apolipoproteína CIII
ASON: oligodeoxinucleótidos antisense
C/EBP: "CAAT enhancer binding protein"
CAT: cloramfenicol acetil transferasa
CRE: elemento de respuesta al cAMP
CREB: proteína de unión a CRE
DMSO: dimetilsulfóxido
DSO: oligodeoxinucleótidos doble cadena
DTT: ditioneitol
EDTA: etilendiamintetraacético
EGTA: etilenglicol-bis (beta aminoetiléter) N, N'- tetraacético
EMSA: ensayo de retardo de la movilidad electroforética
ERK: quinasa regulada por estímulos extracelulares
FB: fenobarbital
FKHR: "forkhead rhabdomiosarcoma"
Grb2: "growth factor receptor binding protein 2"
HNF3: factor nuclear hepático 3
IGF: "insulin like growth factor"
IGFBP-1: "insulin like growth factor binding protein 1"
IRE: elemento de respuesta a insulina
IRS: sustrato del receptor de insulina
LB: medio Luria-Bertani
MAPK: quinasa de proteínas activada por mitógenos
MAPKAPK: quinasa de proteínas activadas por quinasa de proteínas activada por mitógenos
MAPKK: quinasa de quinasa de proteínas activada por mitógenos
MAPKKK: quinasa de quinasa de quinasa de proteínas activada por mitógenos
MBP: proteína mielina básica
MEK: quinasa de quinasa de proteínas activada por mitógenos
NF1: factor nuclear 1
ONPG: ortonitrofenil β galactopiranosido
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS: buffer fosfato salino
PDK1: quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1
PEPCK: fosfoenol piruvato quinasa
PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa
PKB: quinasa de proteínas B
PKC: quinasa de proteínas dependiente de calcio
PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro
p90RSK: quinasa ribosomal p90
PtdIns. fosfatidil inositoles
RNasa: ribonucleasa

SDS: dodecil sulfato de sodio
SOS: “son of sevenless”
SSC: solución de citrato y sodio
TAT: tirosina amino transferasa
TBE: solución de Tris-ácido bórico-EDTA
TE: solución de Tris-EDTA
TEA: solución de Tris-EDTA-acético
TEMED: N, N, N'- tetrametiletilendiamina
TPA: 12-*o*-tetradecanoil forbol 13 acetato
TRE: elemento de respuesta a TPA
TTF2: factor de transcripción tiroideo 2
UV: ultra violeta

Agradecimientos	I
Trabajos publicados	II
Resumen	III
Abstract	V
Objetivos	VII
Abreviaturas	VIII

ÍNDICE	IX
---------------	-----------

INTRODUCCIÓN	1
---------------------	----------

1. Insulina: del receptor al efector	3
---	----------

1.1 La acción de la insulina es iniciada por fosforilaciones en tirosina	3
---	----------

1.1.1 Receptor de insulina	3
1.1.2 Interacción proteína-proteína	5
1.1.3 Proteínas IRSs	6
1.1.4 Proteínas con dominios SH2	6

1.2 Vías implicadas en la transducción de la señal iniciada por insulina	8
---	----------

1.2.1 La PI3K es una enzima clave en la señalización de insulina	8
1.2.2 La PKB es el nexo entre la PI3K y las respuestas finales de insulina	12
1.2.3 La p70 ^{s6k} es un efector de la señalización de insulina	15

1.3 La insulina activa la vía de señalización de Ras/MAPK	16
--	-----------

1.3.1 Ras es una proteína central en la transmisión de la señal hacia la cascada de MAPK	17
1.3.2 Raf es el activador río arriba del módulo de MAPK	18
1.3.3 MEK es la quinasa más específica dentro de la cascada	20
1.3.4 MAPK (ERK) transduce las señales que gobiernan la proliferación, diferenciación y vida celular	21
1.3.5 Las quinasa ribosomales p90RSK son efectores cruciales de la cascada de MAPK	22

2. Insulina y la regulación de la expresión génica	25
---	-----------

2.1 Elementos presentes en genes reprimidos por insulina	26
---	-----------

2.1.1 Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	26
2.1.2 "Insulin-like growth factor binding protein 1"(IGFBP)	28
2.1.3 Glucosa-6 fosfatasa	29
2.1.4 Aspartato aminotransferasa	30

2.2 Factores de transcripción que se unen a los IREs	30
---	-----------

2.2.1 Familia de factores de transcripción: factor nuclear hepático 3	32
2.2.2 Familia de factores de transcripción: factor nuclear 1	34

3. La 5-aminolevulinato sintetasa	36
3.1 Características generales	36
3.2 El gen de ALAS como objeto de investigación de la regulación génica mediada por insulina	40
3.2.1 Regulación de la actividad enzimática por insulina	40
3.2.2 Porfirias y diabetes	40
3.2.3 ALAS como modelo experimental	43
 MATERIALES Y MÉTODOS	 44
1. Cultivos primarios de hepatocitos	45
1.1 Animales utilizados	45
1.2 Obtención de hepatocitos	45
1.3 Determinación del número de células y su viabilidad	46
1.4 Incubaciones	46
 2. Cultivo de la línea celular HepG2	 46
2.1 Cultivo de células	46
2.2 Incubaciones	47
 3. Análisis de RNA por Northern y slot blot	 47
3.1 Obtención de RNA total	47
3.2 Electroforesis de RNA	48
3.3 Transferencia a membrana	48
3.4 Marcación de sondas	49
3.5 Hibridización	50
3.6 Autoradiografía y cuantificación	51
 4. Plásmidos utilizados	 51
4.1 Vectores de expresión	51
4.2 Construcción de vectores	55
 5. Preparación de plásmidos	 57
5.1 Preparación de bacterias competentes	57
5.2 Transformación de bacterias competentes	57
5.3 Preparación de plásmidos en baja escala	58
5.4 Preparación de plásmidos en gran escala	58
5.5 Análisis de las preparaciones plasmídicas	59

6. Determinación de la actividad transcripcional del promotor de ALAS	60
6.1 Transfección de células en cultivo	60
6.2 Preparación de extractos celulares	60
6.3 Determinación de proteínas	61
6.4 Determinación de la actividad β -galactosidasa	61
6.5 Determinación de la actividad cloramfenicol acetiltransferasa	61
6.6 Estudios con oligonucleótidos antisense u oligonucleótidos doble cadena consenso a elementos del DNA actuando en <i>cis</i> para factores de transcripción	62
7. Ensayo de la actividad de quinasa “<i>in vitro</i>”	63
7.1 Obtención de extractos	63
7.2 Actividad de quinasa	63
7.3 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida	64
8. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)	64
8.1 Preparación de núcleos	64
8.2 Tratamientos de extractos nucleares con fosfatasa alcalina	65
8.3 Oligonucleótidos utilizados	65
8.4 Apareamiento	66
8.5 Marcación de los oligonucleótidos	66
8.6 Interacción DNA-proteínas y competencia	67
8.7 Separación de los complejos DNA-proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida	68
RESULTADOS	69
A. Acción de la insulina sobre la expresión de ALAS	70
1. La insulina inhibe la expresión de ALAS en hepatocitos de rata	70
1.1 Efecto de la insulina	70
1.2 La acción inhibitoria de la insulina es dosis dependiente	70
1.3 Curva de tiempo	71
2. La insulina no estimula la velocidad de degradación del mRNA de ALAS	74
2.1 Determinación de la vida media en presencia de actinomicina D	74
2.2 Cálculo de la vida media por consideraciones cinéticas	75
3. Receptores específicos median el efecto inhibitorio de la insulina	78
4. El efecto de insulina no requiere síntesis proteica	78

5. Insulina inhibe la actividad transcripcional del promotor de ALAS en células HepG2	81
6. La región 5' flanqueante del gen de ALAS confiere respuesta a insulina	82
B. Vías de señalización que median el efecto inhibitorio de la insulina sobre la transcripción del gen de ALAS	84
1. La fosfatidilinositol 3 quinasa interviene en la transducción del efecto mediado por insulina	84
1.1 La inhibición de la transcripción de ALAS mediada por insulina es bloqueada por inhibidores de la PI3K	84
1.2 La sobreexpresión de una mutante dominante negativa de la PI3K bloquea la acción de la insulina	88
2. La PKB es el efector río abajo de la PI3K en la transducción del efecto inhibitorio de la insulina	88
2.1 Efecto de la sobreexpresión de mutantes de la PKB sobre la actividad transcripcional del promotor de ALAS	88
2.2 Insulina activa la PKB en células HepG2	90
2.3 La inhibición de la transcripción de ALAS mediada por insulina no es alterada por un inhibidor de la p70 ^{s6k}	91
3. El efecto inhibitorio de la insulina sobre la expresión de ALAS involucra las proteínas SOS y Ras	95
3.1 Inhibidores de la farnesilación de Ras bloquean la represión de ALAS por insulina	95
3.2 La sobreexpresión de una mutante dominante negativa de SOS anula el efecto inhibitorio de la insulina	97
3.3 La sobreexpresión de Ras activa o negativa mimetiza o bloquea, respectivamente, el efecto inhibitorio de la insulina	98
4. Raf y MEK actúan como efectores río abajo de Ras	98
4.1 La sobreexpresión de una mutante dominante negativa de la proteína Raf anula el efecto ejercido por la insulina sobre el mRNA de ALAS	98
4.2 Inhibidores de la proteína MEK bloquean el efecto represor de la insulina	100
4.3 La sobreexpresión de mutantes activas y negativas de MEK confirman su participación en la acción de la insulina	103
5. MAPK/ERK1/2 y p 90RSK quinastas finales involucradas en el efecto inhibitorio de la insulina sobre la expresión de ALAS	104
5.1 La sobreexpresión de una mutante dominante negativa de MAPK/ERK1/2 bloquea la acción de la insulina	104
5.2 Insulina activa MAPK en células HepG2	
5.3 Una mutante constitutivamente activa de la p90RSK mimetiza la inhibición ejercida por la insulina	107

5.4	El efecto de la mutante constitutivamente activa de p90RSK es bloqueado por wortmanina	108
6.	Interdependencia (“crosstalk”) entre vías	110
6.1	Las vías de PI3K/PKB y Ras/MAPK deben estar funcionalmente disponibles para transducir la acción de la insulina hacia el promotor de ALAS	110
6.2	La PKC está involucrada en la regulación de la transcripción de ALAS mediada por insulina	112
6.3	La PKC y la insulina inhiben la expresión génica de ALAS por mecanismos diferentes	112
C.	Elementos de la región promotora y factores de transcripción responsables de la regulación de la expresión del gen de ALAS mediada por insulina	117
1.	Análisis de la región promotora de ALAS	117
1.1	La región -469/-354 del promotor del gen de ALAS de rata es capaz de conferir respuesta a insulina	117
1.2	La región -469/-354 del promotor de ALAS presenta sitios funcionales para los factores de transcripción CREB y AP-1	120
1.3	La región -469/-354 del promotor de ALAS presenta sitios potenciales para unión de los factores de transcripción NF1 y HNF3	121
2.	Caracterización de los factores de transcripción responsables de mediar la acción de la insulina sobre la regulación de la expresión del gen de ALAS	122
2.1	La sobreexpresión de CBP y p300 no revierte la acción inhibitoria ejercida por la insulina en la zona del promotor de ALAS que confiere respuesta a la hormona	122
2.2	Mutantes dominantes negativas de los factores de transcripción CREB, C/EBP o AP-1 no modifican la regulación ejercida por insulina sobre la zona -469/+42 del promotor de ALAS	124
2.3	La sobreexpresión de HNF3 α disminuye la transcripción basal de ALAS mientras que la de HNF3 β revierte la represión hormonal	125
2.4	La actividad transcripcional basal de la región -469/+42 del promotor de ALAS se reduce marcadamente frente a la presencia de oligonucleótidos antisense u oligonucleótidos doble cadena consenso para NF1 o HNF3	126
2.5	Ensayos de retardo de la movilidad electroforética con sondas comprendidas entre los pares de bases -459/-419 y -418/-379 del promotor de ALAS revelan la formación de complejos DNA-proteínas	129
2.6	Mutaciones en ALIRE II no interrumpen la formación de complejos DNA-proteínas	129
2.7	Los complejos DNA-proteínas formados por unión a ALIRE II (-418/-379) son competidos por la versión ALIREmut II que	

	presenta mutaciones en las posiciones -383 y -385	130
2.8	La insulina modifica la afinidad de unión al DNA de los factores HNF3 y NF1	131
2.9	El tratamiento con inhibidores de las vías de transducción de señales Ras/MAPK y PI3K modifica la afinidad de los complejos DNA-proteínas	133
2.10	Los complejos DNA-proteínas formados por unión a la región -418/-379 del promotor de ALAS son competidos por un oligonucleótido consenso para la familia de factores de transcripción HNF3 y viceversa	134
2.11	Los fragmentos -469/-354 y -418/-379 del promotor de ALAS confieren regulación por insulina a un promotor heterólogo	137
2.12	La insulina revierte la estimulación de la actividad promotora de transcripción de la región -469/-354 de ALAS mediada por HNF3 α o β en células HeLa	142
DISCUSIÓN		144
A - Acción de la insulina sobre la expresión de ALAS		145
1. La insulina disminuye los niveles del mRNA de ALAS		145
2. La insulina ejerce su acción a través de receptores específicos y sin el requerimiento de síntesis proteica		146
B - Vías de señalización que median el efecto inhibitorio de la insulina sobre la transcripción del gen ALAS		147
1. La PI3K activa efectores que median las respuestas celulares iniciadas por la hormona sobre el gen de ALAS		147
2. La MAPK es una quinasa muy importante en la señalización de insulina		149
3. Las vías PI3K/PKB y Ras/MAPK/p90RSK deben estar funcionalmente activas para propagar la señal de insulina hacia el punto final		150
4. La deficiencia de PKC disminuye el efecto de insulina sobre el promotor de ALAS		151
C – Regulación de la expresión génica de ALAS		153
1. La región comprendida entre los pares de bases -469 a -354 del promotor de ALAS contiene una secuencia muy similar al IRE		153

2. El promotor de ALAS presenta sitios de unión para los HNF3	154
3. Ciertos miembros de la familia de factores de transcripción “forkhead” son regulados por eventos de fosforilación	155
4. El promotor de ALAS presenta sitios funcionales para los NF1	157
5. El fragmento de 117 pares de bases (-469/-354) del promotor de ALAS confiere respuesta a insulina en un contexto heterólogo	158
6. Modelo propuesto para describir el mecanismo empleado por la insulina para regular la transcripción de ALAS	161
BIBLIOGRAFÍA	164

Las acciones celulares de la insulina están caracterizadas por la regulación de una amplia variedad de efectos que incluyen el transporte de glucosa y aminoácidos, la actividad de enzimas claves del metabolismo, la síntesis de proteínas y de DNA, la transcripción de genes específicos y la proliferación y diferenciación celular (Saltiel, 1994).

La insulina desempeña un papel fundamental en la homeostasis regulando la actividad o cantidad de proteínas críticas. La hormona induce cambios en las actividades enzimáticas mediante eventos de fosforilación y defosforilación. Se han identificado quinasas y fosfatasas estimuladas o inhibidas por insulina responsables de estas modificaciones (Kusari y col, 1997). La insulina también produce efectos en procesos celulares modificando la cantidad de proteínas principalmente en los tejidos hepático, adiposo, músculo esquelético y cardíaco.

Los niveles intracelulares de un determinado mRNA representan el balance entre su síntesis, procesamiento nuclear, transporte desde el núcleo al citoplasma y degradación citoplasmática. Probablemente, la insulina regule todos estos pasos, siendo por cierto, la expresión génica una de las acciones más importantes de la hormona (O'Brien y Granner, 1991). Los genes regulados por insulina están involucrados en diversos fenómenos biológicos. Varios de estos mRNA, codifican la síntesis de enzimas directamente relacionadas con la acción metabólica de la insulina, mientras que otros, representan proteínas secretoras, hormonas, proteínas integrales de membranas, oncogenes y factores de transcripción.

Este amplio espectro de respuestas puede ser fácilmente distinguible en virtud de la dosis, el tiempo, el tipo celular, y otros factores que hacen improbable que un solo mecanismo de cuenta de todas las acciones de la insulina. Esta hipótesis sugiere que diferentes vías fundamentales de transducción de señales deben participar en la regulación

hormonal del crecimiento y metabolismo celular. El mecanismo de acción de la insulina involucraría entonces, una compleja red de vías, algunas independientes y otras interrelacionadas, que divergiría en diferentes puntos de la cascada de transducción de señales.

1 Insulina del receptor al efector

1.1 La acción de la insulina es iniciada por fosforilaciones en tirosina

1.1.1 Receptor de insulina

La transducción de señales inducida por insulina involucra la activación e inactivación transiente de numerosas proteínas mediante ciclos de fosforilaciones y defosforilaciones. Este dinámico proceso es regulado por la acción de quinasas de proteínas y fosfatasas.

La acción de la insulina comienza cuando la hormona se une a su receptor en la superficie celular dando inicio así a la propagación de la señal desde la membrana plasmática hacia el núcleo (Myers y col, 1994). El receptor de insulina está presente en la mayoría de los tipos celulares, variando su concentración desde 40 receptores en eritrocitos circulantes hasta 200.000 receptores en adipocitos y hepatocitos. Este receptor pertenece a la gran familia de receptores de factores de crecimiento con actividad intrínseca de quinasa de tirosinas. Existe en dos isoformas provenientes de “splicing” alternativo productos de un solo gen. Ambas isoformas se expresan de manera tejido específica. La isoforma A (- exón 11) difiere levemente de la isoforma B (+ exón 11) por una afinidad dos veces mayor por insulina (White y col, 1994). Es un heterotetrámero con dos subunidades α , localizadas extracelularmente, que unen al ligando y dos subunidades β transmembrana, con actividad de quinasa de tirosinas ligadas entre sí por puentes disulfuro.

La unión de la hormona a la subunidad α de un dímero $\alpha\beta$ estimula la fosforilación de la subunidad β adyacente. Esto genera un cambio conformacional que conduce a la activación de esta subunidad β y a una rápida cascada de autofosforilación del propio receptor en múltiples residuos tirosina (Kasuga y col, 1985). La región intracelular yuxtamembrana de la subunidad β es esencial para la transmisión de la señal (Eck y col, 1996). La fosforilación en el residuo tirosina 960 de la subunidad β crea un sitio NPXpY,

motivo de reconocimiento para el dominio PTB (“phosphotyrosine binding”) de las proteínas IRSs (“insulin receptor substrate”) (Pawson y col, 1993). La alteración de este residuo tirosina suprime completamente las subsecuentes fosforilaciones en tirosina de las proteínas IRSs y, en consecuencia, la pérdida de la mayoría de las acciones biológicas de la hormona peptídica (Denton y Tabare, 1995).

La activación del receptor de insulina da inicio a los eventos tempranos de la señalización de la hormona, muchos de ellos manifestados a través de interacciones proteína-proteína (Figura 1). Estas interacciones son llevadas a cabo en algunas oportunidades a través de dominios presentes en la estructura terciaria de las proteínas, en otros casos son creadas por modificaciones covalentes postraduccionales como ser fosforilaciones en residuos tirosina, serina o treonina o por modificaciones lipídicas como ser prenilaciones o acilaciones

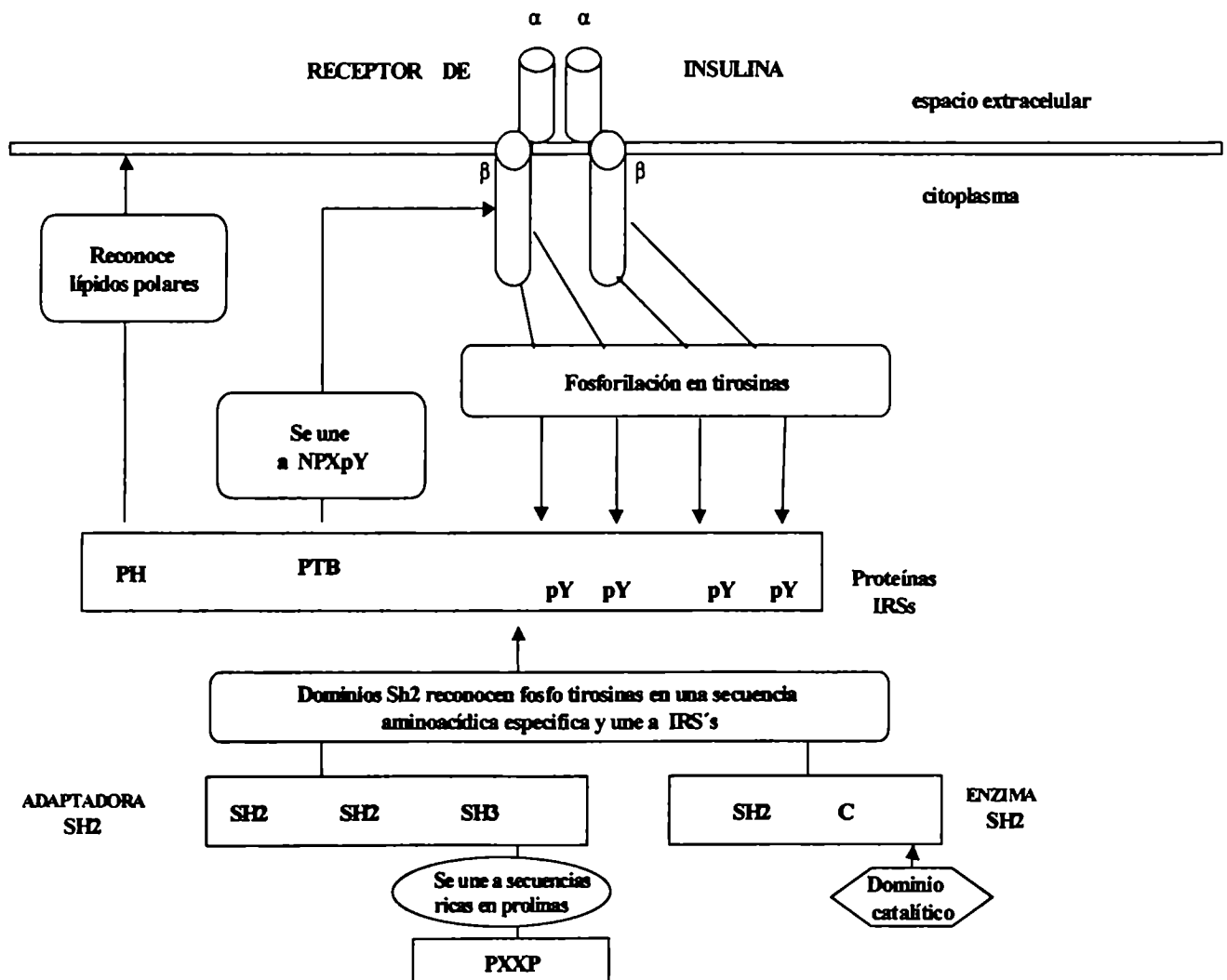


Figura 1 Esquema de la interacción entre el receptor de insulina, IRSs y proteínas adaptadoras

1.1.2 Interacción proteína-proteína

El delineamiento y caracterización de los “módulos proteicos” presentes en los dominios de interacción proteína-proteína ha sido un gran aporte para el entendimiento de los mecanismos moleculares que transcurren durante los eventos de transducción de señales.

Estos dominios están compuestos por unos 40-150 aminoácidos que se pliegan para generar una o más superficies de unión al ligando conocidas como “bolsillos de reconocimiento” (Sudol, 1998). Generalmente, los residuos aminoacídicos conservados del dominio son los responsables de mediar los contactos con los aminoácidos presentes en el ligando y mantener la estructura del dominio. Los ligandos interactúan a través de sus dominios complementarios compuestos por apenas 3-6 aminoácidos. Estos aminoácidos conforman el “core”. Los “cores” están rodeados, salvo escasas excepciones, por aminoácidos flanqueantes hacia la región amino terminal y hacia la región carboxilo terminal que son los que dictan la especificidad de interacción con una determinada familia de dominios modulares (Rickles y col, 1995). Variaciones en la estructura primaria de los dominios contribuyen también a la especificidad de interacción con el ligando.

Algunos de los dominios de interacción proteína-proteína en la señalización mediada por insulina son: PH (“pleckstrin homology”), PTB (“phosphotyrosine binding”), SH2 (“Src homology 2”) y SH3 (“Src homology 3”) (White, 1998). Los dominios PH, que se encuentran en la mayoría de las proteínas que interactúan con el receptor de insulina, se unen a grupos cargados de determinados fosfolípidos de membranas (Yenush y col, 1996).

Los dominios PTB reconocen residuos fosfotirosina en un contexto aminoacídico con la secuencia NPXpY, presente en la subunidad β del receptor de insulina. Los dominios SH2, que consisten en aproximadamente 100 aminoácidos, están presentes en la mayoría de las proteínas intracelulares que interactúan con IRSs. Reconocen también fosfotirosinas, pero presentan mayor afinidad de unión que los PTB, reconociendo motivos aminoacídicos específicos y logrando una interacción proteína-proteína más rígida. Los dominios SH3 están presentes frecuentemente en proteínas con dominios SH2, se unen a secuencias ricas en prolinas siendo la secuencia mínima consenso PXXP con una estructura de hélice específica que permite la unión entre la proteína adaptadora y su blanco. La secuencia consenso general para los ligandos de proteínas con dominios SH3 es Ψ PX Ψ P (Ψ aminoácido hidrofóbico) (Mayer y Eck, 1995).

1.1.3 Proteínas IRSs

La autofosforilación en múltiples residuos tirosina del receptor de insulina resulta en la activación de la familia de proteínas conocidas como IRSs (Sun y col, 1991). Estos sustratos son comúnmente conocidos como proteínas adaptadoras o reclutadoras de otras proteínas intracelulares que se unen, a los sustratos fosforilados en tirosina, para propagar y/o distribuir subcelularmente la señal río abajo (Amoui y col, 2001).

Hasta el momento se han identificado nueve miembros que incluyen IRS1/2/3/4, SHC ("Src homologous and collagen") en tres isoformas (Bevan, 2001), Gab-1 ("growth factor receptor bound 2 associated binder 1") y p62 dok. El extremo NH₂- terminal posee un dominio PH que está involucrado en la localización de IRS en la membrana y en la interacción con el receptor de insulina. El dominio PTB, ubicado al lado del dominio PH hacia el extremo carboxilo terminal, es crítico para el reconocimiento de la secuencia NPXpY en el receptor de insulina.

Desde el punto de vista funcional, todas las proteínas de esta familia se unen en forma transiente al receptor autofosforilado, disociándose luego para poder ser así reconocidas por proteínas con dominios SH2 (O'Neil y col, 1994).

1.1.4 Proteínas con dominios SH2

Estos adaptadores reconocen y se unen a proteínas fosforiladas en tirosina. No poseen actividad enzimática intrínseca, sino que transmiten la señal al ligando mediante interacciones proteína -proteína (Virkamaki y col, 1999).

Grb2 ("growth factor receptor binding protein 2")

Es una proteína de 25 kDa con una estructura SH3-SH2-SH3. Constitutivamente se une a SOS ("son of sevenless"), el intercambiador de GTP específico para Ras, mediante una interacción entre dominios SH3 y una región rica en prolinas. Luego de la estimulación con insulina, el complejo Grb2-SOS es reclutado por el IRS fosforilado en tirosinas, dando lugar a la formación del complejo ternario IRS-Grb2-SOS (Skolnik y col, 1993) y la subsecuente conversión de RAS-GDP inactivo en RAS-GTP activo (Raymond y col, 1999). Este evento lleva a la activación de quinasas de serina y treonina pertenecientes a la cascada de MAPK. Esta cascada transduce señales desde la membrana plasmática hacia al núcleo siendo esencialmente una vía de señalización mitogénica.

Grb2 se une también a SHC, proteína que se une al receptor activado mediante un mecanismo similar a las IRSs (De Meyts y col, 1996). SHC contiene un dominio PTB especial que le permite ser fosforilado en ausencia de dominios PH. Tiene un solo sitio de fosforilación por medio del cual interactúa con Grb2, permitiendo así la activación de la vía Ras/MAPK.

Subunidad regulatoria de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)

La PI3K es una enzima heterodimérica formada por una subunidad catalítica con actividad de quinasa de lípidos y de serinas, y una subunidad regulatoria que contiene dominios SH2.

Hay por lo menos ocho isoformas diferentes de la subunidad regulatoria, seis de las cuales derivan de “splicing” alternativo del gen de la p85 α , entre ellas p55 α y p50 α . Existen también isoformas como la p55^{PIK} y la p85 β productos de diferentes genes. La p85 α se expresa ubicuamente en varios tejidos, las otras isoformas de la subunidad regulatoria son expresadas de manera tejido específica (Antonetti y col, 1996). Cada subunidad regulatoria puede ser responsable de una función determinada dependiendo de su afinidad por IRS, de su capacidad para modular la actividad de la PI3K, como así también de distribuir subcelularmente la señal.

Fosfatasa de tirosina: SHP2

Varias fosfatasas están involucradas en la señalización iniciada por la insulina, entre ellas la SHP2 (“SH2-domain containing phosphatase 2”) que modula la señal de insulina río abajo de las proteínas IRSs.

Esta fosfatasa de tirosinas contiene dos dominios SH2 y se expresa ubicuamente. La SHP2 puede unirse directamente al receptor de insulina y ser subsecuentemente fosforilada debido a la actividad fosfotransferasa que presenta el receptor activado. La fosforilación en residuos tirosina regula la actividad catalítica de la SHP2, pero la unión de la fosfatasa al receptor de insulina no implica la defosforilación del mismo. Por el contrario, la SHP2 también puede unirse a las fosfotirosinas carboxilo terminales de IRS-1 y adquirir capacidad para defosforilarlo (Kuhne y col, 1994). No se le conocen sustratos fisiológicos, pero la sobreexpresión de una mutante catalíticamente inactiva, altera el funcionamiento de la cascada de Ras/MAPK, lo que sugiere la participación de SHP2 en la mediación de la señal disparada por insulina hacia la activación de esta vía de transducción.

1.2 Vías implicadas en la transducción de la señal iniciada por insulina

Luego de los eventos tempranos originados por la insulina, que producen la autofosforilación en tirosina de su receptor y la consecuente fosforilación en tirosina de varias proteínas intracelulares, se inicia la activación de diversas vías implicadas en la transducción de señales. Los pasos que yacen entre el receptor de insulina y la manifestación de la respuesta final están comenzando a esclarecerse existiendo evidencias donde las vías de Ras/MAPK y de la PI3K desempeñan un papel central.

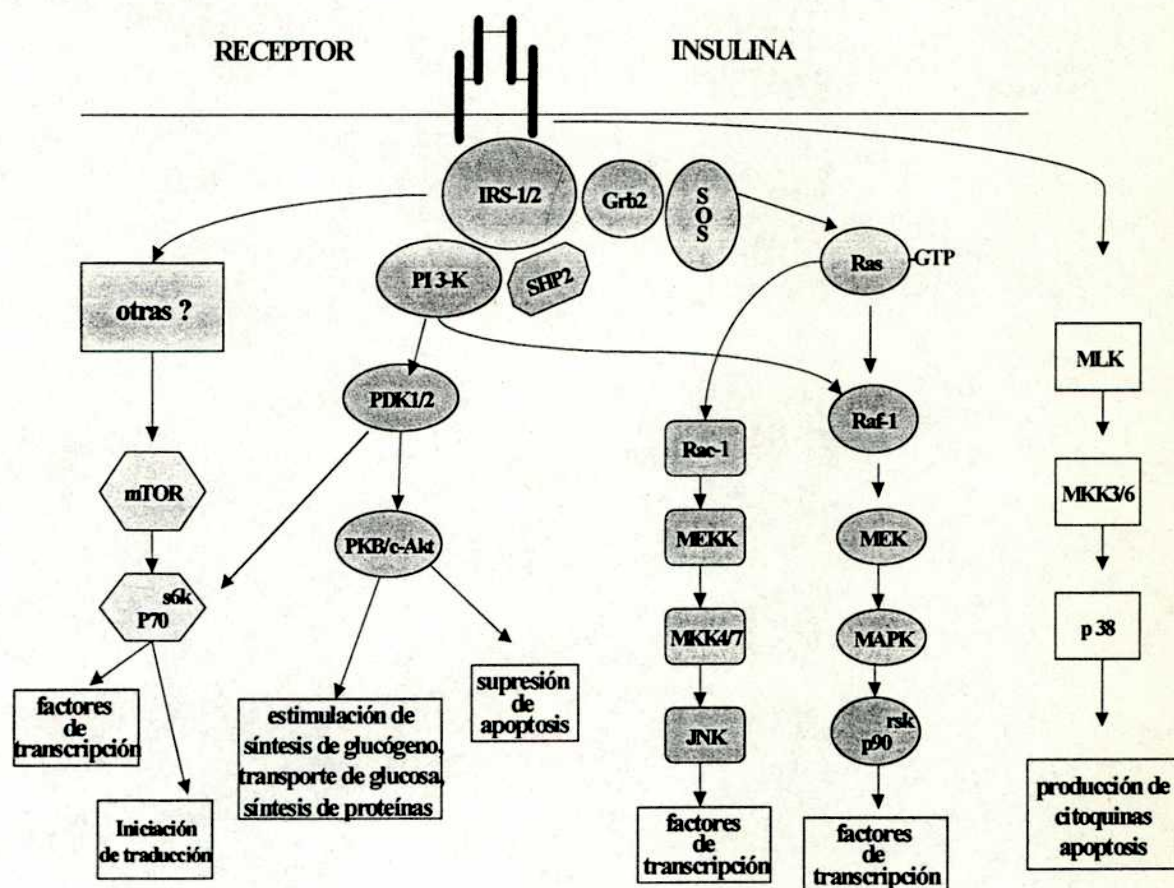


Figura 2 Vías de transducción de señales activadas por insulina

1.2.1 La PI3K es una enzima clave en la señalización de insulina

Actualmente se sabe con claridad que la PI3K desempeña un importante papel en la señalización de insulina, convirtiendo la señal iniciada en los receptores con actividad de fosforilación de tirosinas en activación de cascadas de quinasas de serina/treonina

(Whitehead y col, 2000). La PI3K es un heterodímero que cataliza la transferencia del fosfato y del ATP a la posición D 3 de los fosfoinosítidos (Alessi y Downes, 1998). Dada la selectiva especificidad por el sustrato “*in vitro*” se agrupan en tres clases (Wymann y Pirola, 1998).

PI3K Clase I: heterodímeros de aproximadamente 200 kDa, compuestos por una subunidad catalítica de 100-120 kDa y una subunidad adaptadora de 50-100 kDa, capaces de fosforilar “*in vitro*” a los fosfatidilinosítoles (PtdIns), fosfatidilinosítoles 4-fosfato (PtdIns 4-P) y fosfatidilinosítoles 4,5-bifosfato [PtdIns(4,5)P₂]. La activación de esta clase de PI3K está controlada por señales extracelulares propagadas a través de receptores con actividad de quinasa de tirosina intrínseca.

PI3K Clase II: Proteínas de aproximadamente 170-210 kDa, presentan una especificidad de sustrato “*in vitro*” restringida a PtdIns y PtdIns 4-P. Se desconoce hasta el momento, el mecanismo de activación de esta clase PI3K.

PI3K Clase III: Son homólogas a la proteína “vacuolar protein sorting mutant” (Vps34p) y fosforila exclusivamente a PtdIns.

La activación de las PI3Ks por agonistas extracelulares implica la translocación a membrana y de este modo accede a sus sustratos lipídicos. Teniendo en cuenta que proteína adaptadora está involucrada en mediar dicho efecto, las PI3K clase I se subdividen en dos grupos:

PI3K Clase I A: son las proteínas capaces de asociar su subunidad adaptadora p85 a motivos fosforilados en tirosina.

PI3K Clase I B: son las proteínas cuya subunidad p101 interactúa con las proteínas triméricas G.

Estructura de la subunidad adaptadora de la PI3K Clase I A

La señal disparada por insulina resulta en un rápido reclutamiento de la PI3K a complejos de señalización, siendo las PI3Ks Clase I A las de mayor participación en este evento. La subunidad adaptadora/regulatoria de la PI3K Clase I A está codificada por al menos tres genes que generan productos con alta homología. Todas tienen dos dominios SH2, un dominio inter SH2 que contiene secuencias que permiten la interacción entre la subunidad regulatoria y la catalítica. Dos isoformas generan productos de 85 kDa y se las denomina p85 α y p85 β (Hiles y col, 1992). Ambas contienen un dominio SH3 ubicado hacia el amino terminal con respecto a los dominios SH2, un dominio “Bcr/Rac GTPase-

activating protein homology” (BH) (Gout y col, 1992) y dos regiones ricas en prolinas (P1 y P2) ubicadas a ambos lados del dominio BH (Figura 3). Además se identificaron tres variantes de “splicing” de la p85 α (Shepherd y col, 1998).

La función más importante de los dominios SH2 consiste en incrementar la actividad catalítica de la subunidad p110 e inducir la translocación de esta subunidad hacia complejos de señalización adyacentes a la membrana, donde se encuentran los sustratos lipídicos.

El papel de los dominios SH3, BH, P1 y P2 no está bien establecido. Los dominios SH3 interactúan con dominios específicos ricos en prolinas (Cohen y col, 1995). El dominio rico en prolinas de la p85 coincide con la secuencia consenso de unión del dominio SH3, lo que sugiere que una interacción intramolecular puede ocurrir entre estos dominios P y SH3 y proveer un mecanismo de autoregulación.

El motivo de la existencia de tantas variantes de la subunidad regulatoria no es claro, aunque parece ser importante en la señalización de insulina ya que en los tejidos blanco, como lo son el adiposo y el hepático, se observó que hay diferencias significativas en la habilidad relativa de las variantes individuales de “splicing” en ser reclutadas a complejos de señalización activados por insulina (Inukai y col, 1997).

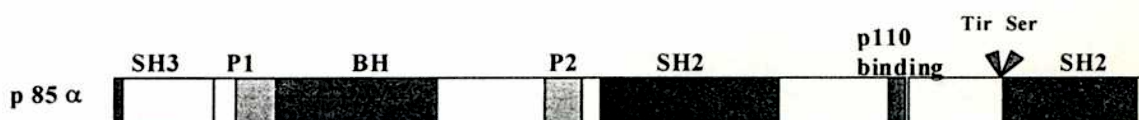


Figura 3 Estructura de dominios presentes en la subunidad adaptadora p85 α de la PI3K Clase IA

Estructura de la subunidad catalítica de la PI3K Clase IA

La región carboxilo terminal es la más conservada entre las PI3Ks y otras proteínas relacionadas, desplegando motivos como los DRHNSN y DFG en la p110 α , que corresponden a residuos que se encuentran en contacto cercano con el ATP. La p110 α posee un “P-loop” con la secuencia GXGXXG, precediendo a la lisina 802, ambos involucrados en la reacción de transferencia de fosfatos (Figura 4).

La lisina 802, altamente conservada dentro de la familia de las PI3Ks y proteínas relacionadas, es la responsable de la formación de la base de Schiff con wortmanina (potente inhibidor de la PI3K).

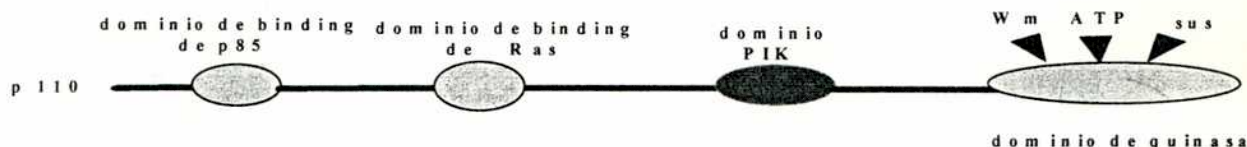


Figura 4 Estructura de dominios presentes en la subunidad catalítica de la PI3K Clase I A. (Wm) sitio de interacción con wortmanina, (ATP) sitio de binding de ATP, (sus) región de “binding” del sustrato.

El dominio “phosphoinositide kinase homology domain” (PIK) está altamente conservado en quinasas de lípidos. Otros rasgos estructurales son el dominio de binding a la p85 y el dominio de interacción con Ras. Estudios con mutantes dominante negativas y oncogénicas de Ras indican que esta interacción aumenta la actividad de la PI3K (Rodríguez Viciano y col, 1996). Es también concebible que la interacción p110-Ras desempeñe un papel importante en la localización de la PI3K a sitios específicos de membranas, ya que Ras es una proteína presente casi exclusivamente en la membrana plasmática (Lowy y col, 1995).

La activación de la PI3K por insulina es mediada principalmente por las proteínas IRSs.

La insulina, a diferencia de otros ligandos que inducen fosforilación en tirosina de sus receptores, produce solamente una moderada interacción entre PI3K y su receptor. El mecanismo más relevante para la activación de esta quinasa por insulina es mediado por proteínas IRSs (Cohen y col, 1997). Todas las IRSs tienen múltiples sitios potenciales de fosforilación en tirosina, siendo aquellas ubicadas en el motivo YMXM los sustratos preferidos del receptor de insulina. Es por esto que la estructura de las proteínas IRSs es la ideal para reclutar la subunidad adaptadora de la PI3K y activarla (Songyang y col, 1995).

A pesar de ser la asociación de los dominios SH2 de la p85 con los motivos de las IRSs fosforilados en tirosina el mecanismo más importante empleado por la insulina para activar a la PI3K, la hormona puede utilizar otros medios para regular la función de ésta

quinasa. Uno de estos medios es vía Ras. Se ha demostrado que Ras-GTP puede interactuar directamente con la PI3K, mediante el bien caracterizado dominio efector de Ras y el dominio amino terminal de la p110 (Rodríguez-Viciano y col, 1996).

El mecanismo mas obvio a través del cual las PI3K Clase I A transducen la señal es mediante sus productos lipídicos. El PtdIns(3,4,5)P₃ es el producto más importante de esta quinasa y hay evidencias que sugieren que desempeña un papel esencial en la señalización (Cross y col, 1997). El aumento en los niveles de PtdIns(3,4,5)P₃ se correlaciona con la activación de respuestas río abajo. Los niveles de PtdIns(3,4,5)P₃ son muy bajos en células sin estimular y son incrementados en segundos luego de la estimulación con el agonista en numerosos tipos celulares (Vanderkaay y col, 1997).

1.2.2 La PKB es el nexo entre la PI3K y las respuestas finales de insulina

Numerosas evidencias indican que la PI3K es necesaria y en algunos casos suficiente para mediar los múltiples efectos disparados por insulina (Vanhaesebroeck y Alessi, 2000). Esto sugiere que la PI3K yace al inicio de una cascada de transducción de señales (Rameh y col, 1999). De todos modos, se sabe que la mayoría de los eventos río abajo en las señalizaciones están controlados por quinasas de serina/treonina

El sistema quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK)/proteína quinasa B (PKB) es el encargado de convertir la señal de la quinasa de lípidos en una señal para cascadas de quinasas de proteínas (Coller y col, 1998).

Estructura de la PKB/Akt

La PKB, también llamada Akt, por su homología con la proteína codificada en el genoma del retrovirus AKT-8 aislada en linfomas de células T de roedores, es una quinasa de serina/treonina de aproximadamente 60 kDa (James y col, 1996). Se han identificado tres isoformas de la PKB. La PKB α es la isoforma más activada por insulina en músculo e hígado. La PKB α y la PKB β desempeñan un papel importante en la señalización de la hormona en adipocitos (Walker y col, 1995). La PKB γ no es regulada por la insulina en estos tejidos blanco de la hormona, sin embargo es activada por insulina en varias líneas celulares en cultivo (Stephens y col, 1998).

Su estructura esta conformada por un dominio amino terminal de aproximadamente 100 residuos, denominado “plekstrin homology” (PH), (Kohn y col, 1996), un dominio

catalítico que se extiende entre los residuos 148 y 411 y una cola hirofóbica carboxilo terminal comprendida entre los residuos 412 y 480.

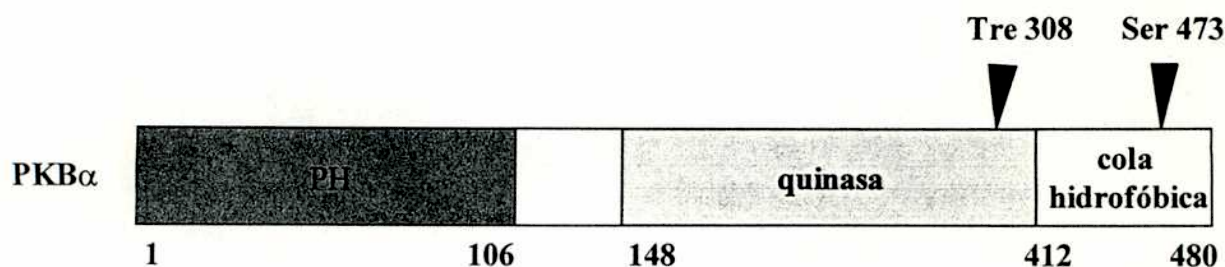


Figura 5 Estructura de la PKB α . Sitios de fosforilación inducidos por insulina: treonina 308 (Tre308) y serina 473 (Ser 473).

Regulación de la PKB

La PKB es activada en respuesta a numerosos estímulos como ser el factor de crecimiento plaquetario ("PDGF, platelet derived growth factor"), el factor de crecimiento neuronal ("NGF, nerve growth factor"), el factor de crecimiento epidérmico ("EGF, epidermal growth factor") e insulina (Marte y Downward, 1997). La activación inducida por estos factores es bloqueada por el tratamiento con wortmanina o la sobreexpresión de mutantes dominante negativas de la subunidad regulatoria p85 de la PI3K. Versiones constitutivamente activas de la PI3K estimulan a la PKB, lo que indica que la PI3K es necesaria y también suficiente para regular a la PKB. La magnitud y duración de su activación esta directamente correlacionada con el aumento de los niveles celulares de PtdIns(3,4,5)P₃ (Fridman y col, 1999).

Inicialmente se propuso un mecanismo PI3K-dependiente donde los fosfoinosítidos podían unirse directamente a PKB y activarla. Posteriormente se demostró que, si bien se unen, no pueden activar directamente a la quinasa (Stokoe y col, 1997).

El mecanismo por el cual la insulina regula a la PKB es mediante fosforilaciones en dos sitios: treonina 308 y serina 473. En este evento la PKB es activada independientemente de los fosfoinosítidos, siendo los procesos que regulan las fosforilaciones en la treonina y en serina los que están regulados por los fosfolípidos (Alessi y Cohen, 1998).

La PKB se encuentra en el citoplasma de células en reposo con muy baja actividad. Luego de la activación de la PI3K, los $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ / $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ son sintetizados en la membrana plasmática e interactúan con PKB a través de su dominio PH. Esta interacción induce la translocación de la PKB desde el citosol a la cara interior de la membrana y un cambio conformacional de la misma (Figura 6). Estos hechos, convierten a la PKB en sustrato para la PDK1, quizás por exposición de los sitios fosforilables de la serina 308 y la treonina 473 (Alessi y col, 1997). La PDK1, que podría estar ya localizada en la membrana, en virtud de la unión de su dominio PH a los $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ / $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ o $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ presentes en condiciones basales, fosforila a la PKB (Vanhesebroeck y Alessi, 2000).

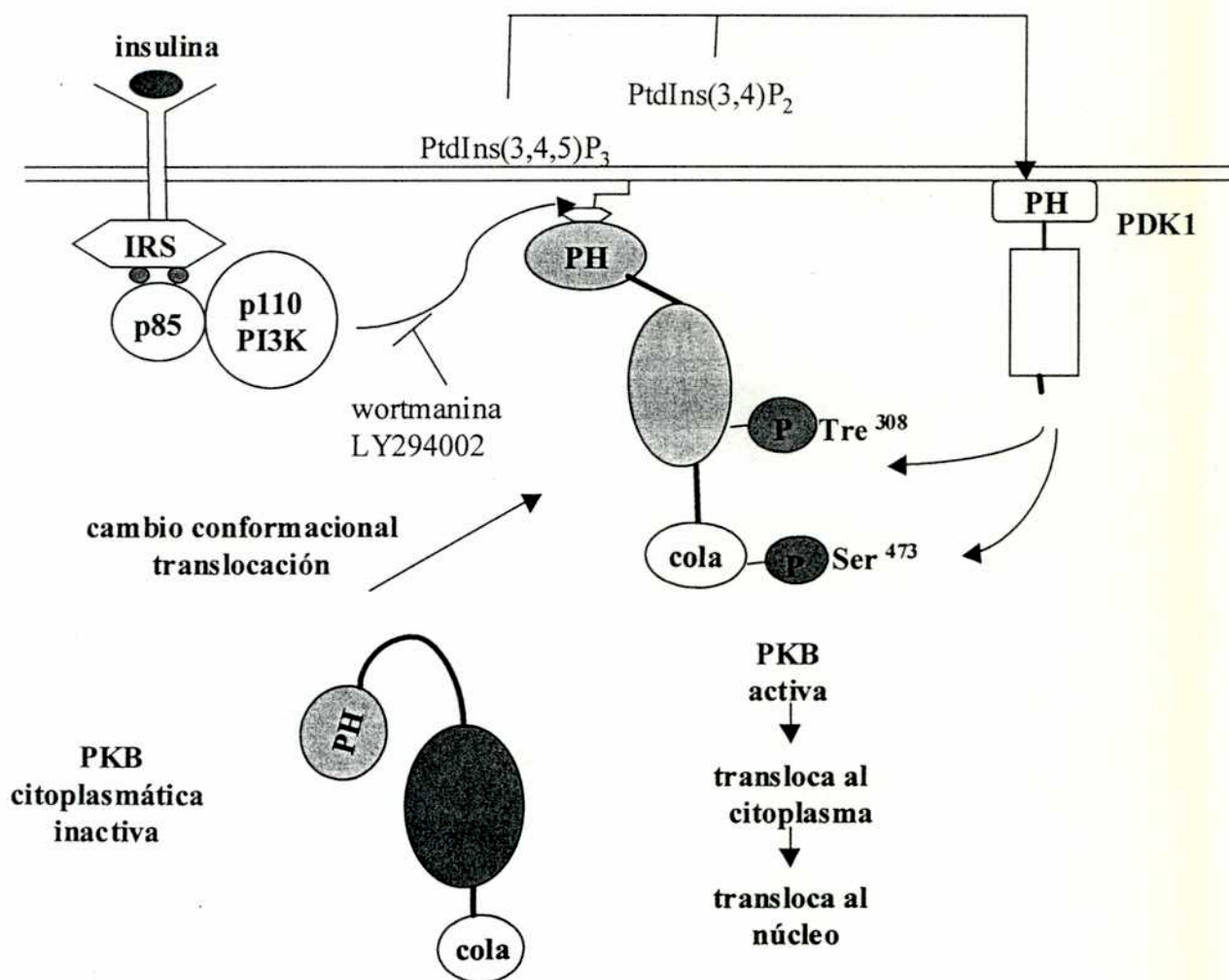


Figura 6 Mecanismo de activación de PKB por insulina

La localización de PKB en la membrana, mediante la inclusión de una secuencia de anclaje o inclusive de una forma truncada de PKB desprovista de su dominio PH, es suficiente para su activación y fosforilación en la serina 308 y la treonina 473 en células no estimuladas (Alessi y col, 1997) Esta observación indica que debe existir una considerable cantidad de PDK1 presente en la membrana de células en reposo. La afinidad de PKB por los PtdIns(3,4,5)P₃ es diez veces menor que la de PDK1, por lo tanto, los niveles basales de estos lípidos no alcanzan para reclutarla a la membrana. Esta sería la explicación de por que la PKB no está permanentemente activa en las células.

La PDK1 es una enzima monomérica de 63 kDa, que se expresa ubicuamente en los tejidos (Alessi y Cohen, 1998). Está compuesta por un dominio catalítico similar a los de la subfamilia de quinasas que incluye a PKA, PKB y PKC, y un dominio PH carboxilo terminal. La PDK1 fosforila a la PKB en la serina 308 y evidencias recientes indican que la misma enzima, formando un complejo con otras proteínas, es la que media la fosforilación en la treonina 473 (Alessi y col, 1996).

Proteínas blanco de PKB en la señalización de insulina

Los sustratos identificados hasta el momento de PKB que pueden estar involucrados en la acción de la hormona son glucógeno sintetasa quinasa (GSK3), fosfodiesterasa 3-B (PDE-3B), “mammalian target of rapamycin” (mTOR), el miembro de la familia de factores de transcripción “fork head” (FKHR) e “insulin receptor substrate-1” (IRS-1) (Obata y col, 2000).

1.2.3 La p70^{s6k} es un efector de la señalización de insulina

La insulina activa marcadamente a la quinasa ribosomal p70^{s6k} Esta quinasa está implicada en la estimulación de la traducción de numerosos mRNA con alto contenido de tramos de polipirimidinas, principalmente los que codifican para proteínas ribosomales y factores de enlongación de la traducción. Los mecanismos de activación de p70^{s6k} por insulina no están totalmente esclarecidos (Downward, 1997). Esta quinasa posee residuos treonina dentro de motivos equivalentes a los de la serina 308 y treonina 473 de la PKB, que se fosforilan luego de estimular las células con insulina. Esto sugiere que la p70^{s6k} puede ser activada por un mecanismo análogo al de la activación de la PKB y que es fosforilada en estos residuos por PDK1 o una proteína relacionada. Además de ser un

importante regulador de la traducción, podría regular también la transcripción al acoplarse a la señalización de PI3K (Chung y col, 1994).

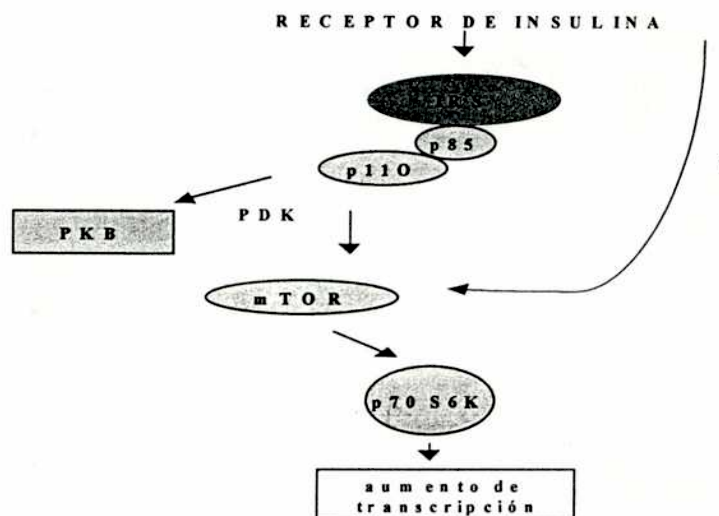


Figura 7 Posibles mecanismos de activación de $p70^{S6K}$ por insulina

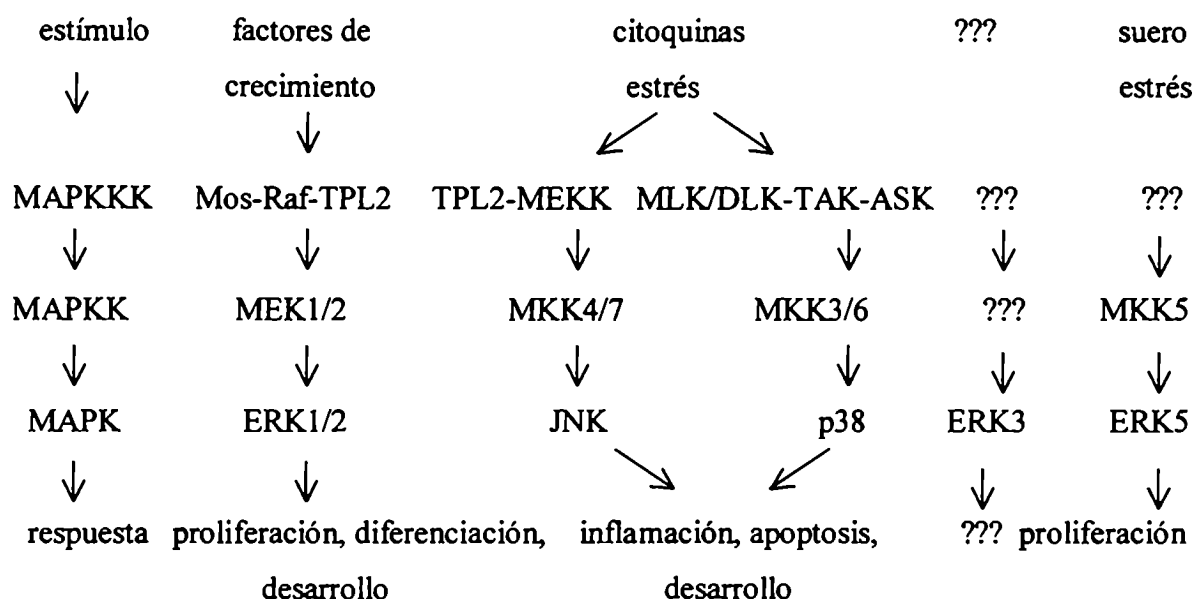
Se ha descrito, que la proteína mTOR puede fosforilar a $p70^{S6K}$ en la treonina 389 “in vitro” y que este evento es inhibido por rapamicina (inhibidor de mTOR), lo que indica que mTOR también es un efector de la señalización de insulina (Takano y col, 2001).

1.3 La insulina activa la vía de señalización de Ras/MAPK

Las vías de transducción de señales le permiten percibir a las células cambios en el ambiente extracelular y montar la respuesta adecuada. La cascada de proteínas activadas por mitógenos (“MAPK, mitogen-activated protein kinase”) participa en la ejecución de diversos programas celulares, incluyendo diferenciación, división, movilidad y muerte celular.

Esta cascada desempeña un papel clave en la regulación de la expresión génica. La organización básica comprende una proteína G actuando río arriba de un módulo de tres quinasas que consisten en: MAPKKK (“MAPK kinase kinase”) un activador de MAPKK; MAPKK (“MAPK kinase”) un activador de MAPK (“MAPK kinase”) y MAPK, que transmiten la señal a través de fosforilaciones/activaciones secuenciales específicas para

cada uno de los componentes (Garrington y Johnson, 1999). En eucariotas superiores existen cinco módulos identificados hasta el momento (Schaeffer y Weber, 2001).



MAPKs

ERK- Extracellular-signal regulated kinase

JNK- c-jun aminoterminal kinase

p38- MAPK involucrada en la respuesta al stress

MKKs

MEK- MAPK/ERK kinase (MEK1=MKK1, MEK2=MKK2)

MKKKs

MEKK- MAPK/ERK kinase kinase

TPL2- tumor progression locus 2

MLK- mixed lineage kinase

DLK- dual leucine zipper bearing kinase

TAK- TGFβ-activated protein kinase

ASK- apoptosis signal-regulating kinase

Tabla 1 Proteínas integrantes de la cascada de MAPK.

1.3.1 Ras es una proteína central en la transmisión de la señal hacia la cascada de MAPK

La activación mediada por insulina de la cascada de MAPK se inicia siguiendo, al menos, dos caminos que conducen a la estimulación de la proteína Ras: uno IRS dependiente y otro Shc dependiente.

La activación de los receptores de insulina resulta en la fosforilación en tirosina de la familia de sustratos intracelulares IRSs y Shc. La fosforilación de estas proteínas genera sitios de reconocimiento para la proteína adaptadora Grb2. Esta proteína, además de poseer

un dominio SH2 central, tiene dos dominios SH3 que dirigen la asociación con el intercambiador de guanil nucleótido específico para Ras, SOS. La formación de los complejos ternarios Shc-Grb2-SOS e IRS-Grb2-SOS resulta en la conversión de la forma inactiva Ras-GDP a la forma activa Ras-GTP (Fucini y col, 1999).

La proteína Ras, presenta cuatro isoformas principales: N, H, Ka y Kb que difieren entre sí principalmente por las modificaciones postraduccionales de sus dominios carboxilo terminales (Campbell y col, 1998). Estas modificaciones implican la farnesilación de su dominio carboxilo terminal, que es llevada a cabo por la enzima farnesiltransferasa y la palmitoilación que sufren las isoformas N y H en la región inmediatamente anterior a la carboxilo terminal. Estas diferencias pueden resultar en la localización específica de las proteínas Ras en subdominios de la membrana plasmática, como por ejemplo, la palmitoilación de N-Ras y H -Ras que las ubica en las zonas ricas en colesterol y caveolinas (Shields y col, 2000). Esta asociación con diferentes subdominios de la membrana puede ser determinante de la interacción con determinados efectores río abajo.

Los mecanismos alternativos para la activación de los efectores de Ras son: la asociación directa induciendo cambios conformacionales en el efector, como sucede en los casos de B-Raf y PI3K (Yamamori y col, 1995), o la translocación hacia la membrana de sus efectores para la posterior activación de los mismos por enzimas allí presentes (ej. Raf-1) (Figura 8).

Ras-GTP tiene muchos efectores siendo sin duda, la quinasa Raf la mejor caracterizada. Esta quinasa conecta las señales disparadas en los receptores y Ras con las quinasas de serina y treonina de la vía de MAPK.

1.3.2 Raf es el activador río arriba del módulo de MAPK

Raf es una quinasa de proteínas que fosforila en serina y treonina, con un peso molecular de 74 kDa. Existen por lo menos tres isoformas, Raf-1, A-Raf y B-Raf, que difieren entre sí por su actividad catalítica basal y su habilidad para ser activadas por diferentes moléculas (Marais y col, 1997). Las tres isoformas comparten a Ras como único activador río arriba y a MEK como único sustrato río abajo. La forma inactiva es llevada a la membrana por Ras-GTP donde es activada por un mecanismo todavía desconocido. La quinasa Raf tiene dos dominios, uno amino terminal autoinhibitorio y uno carboxilo terminal catalítico (Cutler y col, 1998). Dentro de estos dominios existen tres regiones bien conservadas CR1, CR2 y CR3. La CR1 es una región rica en residuos cisteína, la CR2 es

rica en serinas y treoninas y CR3 es el dominio de quinasas. La asociación entre Ras y Raf se produce a través de dos dominios, el dominio de unión a Ras (RBD) mediante una interacción de alta afinidad ($k_D=20$ nM) y el dominio amino terminal que comprende el motivo “dedo de cisteínas” de Raf -1 denominado “dominio rico en cisteínas” (CRD) (Morrison y Cutler, 1997). Los RBD y CRD interactúan con Ras a través de diferentes residuos y las modificaciones postraduccionales de Ras resultan importantes para esta interacción (Figura 9).

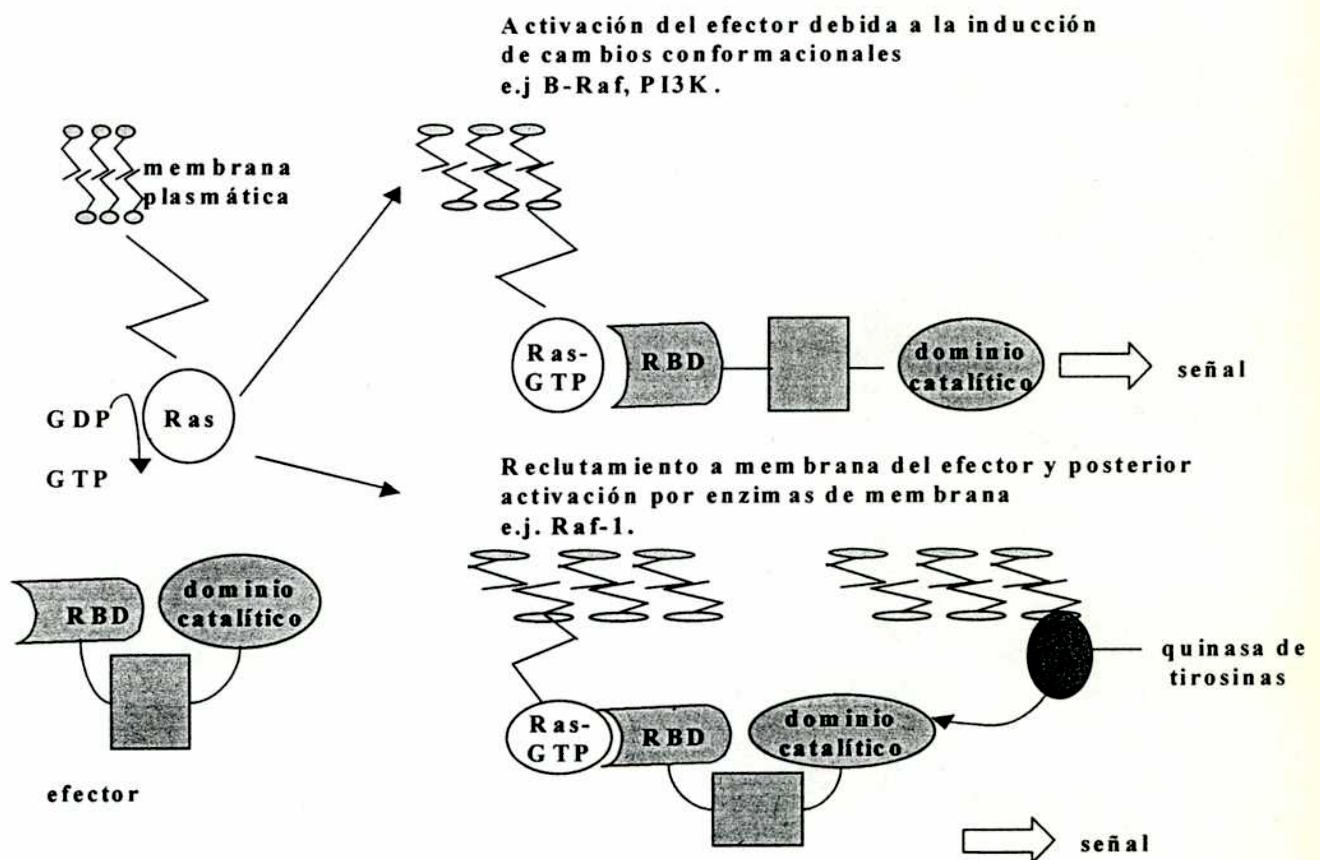


Figura 8 Mecanismos alternativos para la activación de efectores de Ras

En el citoplasma Raf se encuentra inactiva formando complejos con proteínas 14-3-3 y con proteínas chaperonas p50 y “heat shock protein” hsp90. Las proteínas 14-3-3 podrían ser importantes para mantener la estabilidad de Raf favoreciendo su dimerización y para lograr un reciclaje eficiente de Raf en la membrana. Raf-1 presenta dos sitios de fosforilación que son parte de motivos de reconocimiento para la unión de las proteínas 14-3-3. Estos son la serina 259 y la serina 621 en los dominios amino y carboxilo terminal

respectivamente (Tzivion y col, 1998). Otra molécula importante en la activación de Raf es la quinasa supresora de Ras (KSR) que se asocia con Raf en la membrana de una manera dependiente de Ras, y facilita la propagación de la señal río abajo, actuando probablemente como una proteína de andamiaje (Denouel-Galy y col, 1998).

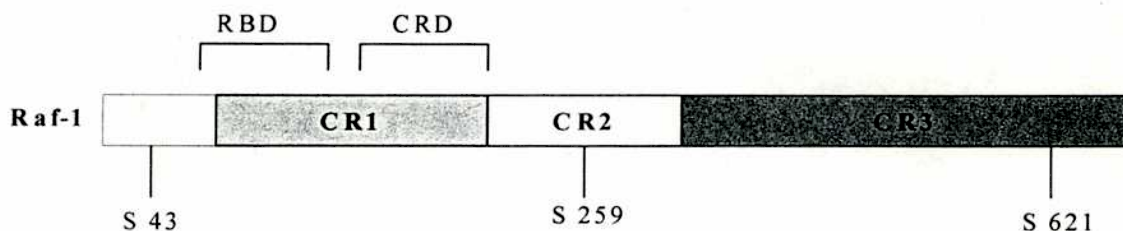


Figura 9 Estructura de Raf-1. Serina (S) S 43, S 259 y S 621 sitios de fosforilación *"in vivo"*

Raf-1 se hiperfosforila en respuesta a los eventos de señalización. Los mecanismos por los cuales la fosforilación puede regular su actividad incluyen la alteración de la actividad intrínseca como también la modificación de interacciones proteína-proteína, como la establecida entre Raf y las 14-3-3 (Avruch y col, 2001). La rápida y transiente activación de Raf, como el bajo porcentaje de la quinasa que es reclutado a membrana, dificultan el estudio de su regulación. Fosforilaciones en los residuos tirosina 340 y 341 incrementan su actividad catalítica siendo las quinasas implicadas en este evento miembros de la familia de quinasas Src y la "Janus kinase" (JAK-2) (Fabian y col, 1993). Otros eventos como ser la dimerización (Weber y col, 2001), la unión a lípidos y la acción de quinasas y fosfatasa pueden ser los responsables de la compleja regulación de la activación de Raf que se traduce en la fosforilación y subsecuente activación de MEK, el único sustrato conocido *"in vivo"*.

1.3.3 MEK es la quinasa más específica dentro de la cascada

La "MAPK/ERK kinase" (MEK) pertenece a la clase de quinasas con especificidad dual, ya que puede fosforilar tanto residuos treonina como tirosina. Existen dos isoformas, MEK1 y MEK 2 que activan a ERK1 y ERK2 mediante fosforilación del motivo TXY presente en el "loop" de activación (Kolch, 2000). Las MEKs reconocen a las ERKs con una marcada selectividad. La estructura primaria de las ERKs circundante a TXY no es suficiente para este reconocimiento, lo que implica la existencia de conformaciones

específicas o determinantes en la estructura secundaria responsables de establecer esa interacción productiva entre ambas quinasas (Wilsbacher y col, 1999).

MEK1 y MEK2 tienen un inserto rico en prolinas en el “core” del dominio catalítico que se encuentra en la región carboxilo terminal, motivo que no está presente en ningún otro miembro de la familia de las MEKs y que es requerido para una eficiente activación de ERK1 y ERK2 (Dang y col, 1998).

Las MEKs están en considerable exceso con respecto a Raf, lo que permite una amplificación de la señal a través de la cascada. Sin embargo, las MEKs y las ERKs se encuentran en igual concentración en casi todos los tipos celulares. Esto sugiere que la transmisión de MEK a ERK existe, no para amplificar, sino para regular la cinética de propagación y/o distinguir señales provenientes de diferentes estímulos (Dang y col, 1998).

1.3.4 MAPK (ERK) transduce las señales que gobiernan la proliferación, diferenciación y vida celular

Las ERK1/2 están formadas por dos dominios, un pequeño dominio amino terminal compuesto en gran parte por láminas β y otro carboxilo terminal compuesto por α hélices. El sitio de unión a ATP se encuentra en la región interdominios y, tanto la superficie de contacto con el sustrato como los dos residuos fosforilables del motivo TXY presentes en el “loop” de activación, se encuentran en la región carboxilo terminal (Cobb y Goldsmith, 2000). La fosforilación de ERK es necesaria y suficiente para su disociación de MEK que actúa también como ancla citoplasmática.

El tipo celular o su estadio puede determinar la disponibilidad de potenciales sustratos. La presencia de los “docking domains” permite explicar la especificidad entre una vasta nómina de sustratos. El dominio específico para las ERKs, denominado DEF (“docking site for ERK, FXFP”), está conformado por los sitios fosforilables SP y TP en la vecindad del motivo FXFP.

La distribución subcelular puede desempeñar un papel importante para acceder al sustrato indicado, particularmente para el caso de las ERK1/2 que sufren redistribución intracelular luego de su activación. Se ha propuesto que esta redistribución está determinada por la existencia de proteínas específicas de anclaje. MEK1/2 retienen en el citoplasma a las ERKs inactivas, liberándolas luego de fosforilarlas, y permitiendo su eventual translocación al núcleo (Adachi y col, 1999). Particularmente, los residuos 312-320 de ERK2 son los responsables de su retención citoplasmática, mientras que los

residuos 321-327 intervienen en el mecanismo de translocación nuclear (Rubinfeld y col, 1999).

La fosforilación y subsecuente activación de las ERKs produce cambios conformacionales que facilitan la formación de homodímeros mediante uniones iónicas y "zippers" hidrofóbicos (Cobb y Goldsmith, 2000).

Se postulan dos mecanismos mediante los cuales la MAPK puede translocar al núcleo. uno por difusión pasiva y otro por transporte activo, siendo este último dependiente del evento de dimerización (Adachi y col, 1999).

A pesar que casi todos los intermediarios de los módulos de MAPK interaccionan con sus activadores y efectores, existen también en esta vía las proteínas de andamiaje o "scaffolds", responsables de aportar contactos adicionales entre los componentes de la cascada. Los complejos de señalización forman estructuras dinámicas con permanentes acoplamientos y desacoplamientos de sus integrantes que pueden dar origen a una regulación muy flexible. Por lo tanto, la asociación estable, mediada por estas proteínas "scaffolds" de algunas pocas interacciones proteína-proteína débiles, puede resultar en una regulación más fina. Para el caso particular de la vía de ERK1 se ha identificado a la proteína "scaffold" "MEK partner 1"(MP1) que interacciona simultáneamente con MEK 1 y ERK 1 (Garrington y Johnson, 1999) (Figura 10).

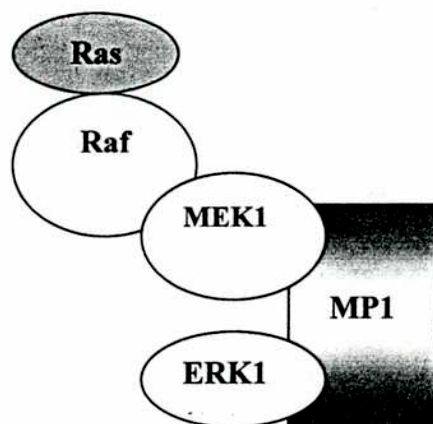


Figura 10 Sitio de acción de la proteína "scaffold" MP1

Las ERKs fosforilan sustratos citoplasmáticos y proteínas nucleares que son cruciales para la regulación de la respuesta celular inducida por diferentes estímulos extracelulares.

Las ERKs pueden fosforilar directamente a factores de transcripción como por ejemplo: Ets 1, Elk-1, Sap 1 a, STATs, Tal, c-Myc entre otros (Garrington y Johnson , 1999; Xing y col,1996); otras quinasas de proteínas como la quinasas ribosomal p90^{rk} ; enzimas regulatorias como la fosfolipasa A2, la fosfatasa de tirosina (PTP) y la fosfatasa de MAPK (MKP) (Kusari y col, 1997) y efectores que yacen río arriba en la cascada como SOS (Corbalan-García y col, 1996).

1.3.5 Las quinasas ribosomales p90 RSK son efectores cruciales de la cascada de MAPK

Las quinasas ribosomales p90 RSK también denominadas “mitogen activated protein kinase activated protein” (MAPKAP) constituyen una familia de proteínas de 85 a 90 kDa que se expresan ubicuamente en eucariotas superiores. Presentan tres isoformas RSK1, RSK2 y RSK3), que se activan únicamente mediante fosforilaciones específicas dependientes de ERK y difieren entre sí con respecto a la respuesta frente al estímulo de diversos factores de crecimiento y a la asociación física con MAPK (Zhao y col, 1996). Las RSKs son quinasas particulares que contienen dos dominios de quinasas dentro del mismo polipéptido. El dominio amino terminal (NTD) es requerido para la fosforilación de sustratos exógenos y el dominio carboxilo terminal (CTD) es capaz de fosforilar la región interdominios y regular de esta manera la actividad del NTD (Nebreda y Gavin, 1999). Las RSKs también contienen una α hélice río abajo del CTD, cuya pérdida o mutación resulta en una proteína constitutivamente activa (Poteet-Smith y col, 1999). En su dominio CTD estas quinasas ribosomales presentan un sitio de anclaje para MAPKs, que es esencial para la fosforilaciones mediadas por las ERKs. La activación completa de las RSKs, requiere además, la fosforilación mediada por PDK1 de su NTD, lo que indica que estas quinasas integran señales dependientes de MAPK y de PDK1 (Figura 11).

Las RSKs regulan la expresión génica asociándose directamente con numerosos factores de transcripción como por ejemplo CREB y c-fos, a los que fosforilan y activan (Nakajima y col, 1996). Recientemente, con la observación que la RSK2 puede fosforilar directamente a la histona H3 (Sassone-Corsi y col, 1999), se ha postulado un papel más general para estas quinasas ribosomales en la regulación de la transcripción. Este evento puede resultar muy importante en el mecanismo de remodelación de la cromatina y en la determinación de una interacción selectiva con factores de transcripción.

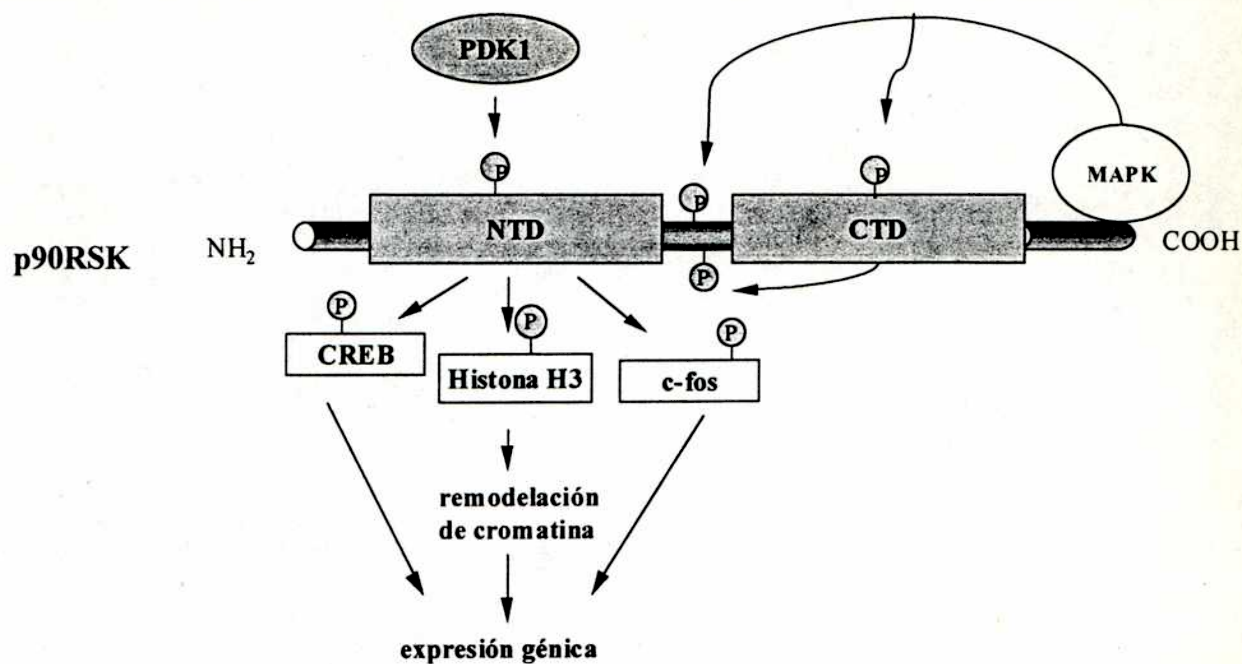


Figura 11 Estructura de la p90RSK y algunos de sus sustratos

2 Insulina y la regulación de la expresión génica

Durante mucho tiempo se ha considerado a la insulina como una hormona capaz de modular la actividad o localización de numerosas enzimas. En los últimos años ha cobrado relevancia la participación de la hormona en la regulación de la expresión génica y actualmente se acepta que ésta es una de sus acciones más importantes (O'Brien y Granner, 1996).

La insulina puede regular la transcripción de manera positiva o negativa. La respuesta a la insulina de un gen particular puede variar entre diferentes tejidos, entre tejidos y líneas celulares derivadas y aún entre diferentes líneas celulares provenientes del mismo tejido. Esta hormona puede estimular (glucoquinasa) e inhibir [fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK)] la expresión génica simultáneamente dentro de un mismo contexto celular, regular gran variedad de genes dentro de un tejido (hepático, adiposo) y muy pocos en otros o ejercer su acción sobre la transcripción selectivamente a diferentes concentraciones dentro de una misma célula (PEPCK y gen 33 en células H4IIE) (O'Brien y Granner, 1991).

La mayoría de los elementos que responden a hormonas “hormone response elements” (HREs) figuran dentro de la clase “enhancer/silencer” de elementos situados en *cis*. Sin embargo, en algunos casos existen HREs que funcionan como elementos del promotor basal, otros involucrados en el control de la expresión tejido específica o en la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Quinn y col, 1988).

Se han definido numerosos elementos que median la acción de la insulina en la regulación transcripcional [“insulin response element” (IRE)/“insulin response sequence” (IRS)] pero, contrariamente a lo que ocurre por ejemplo con otros factores de transcripción, ningún IRE/IRS consenso ha sido identificado hasta el momento (Rahmsdorf y Herrlich, 1990; O'Brien y col, 2001).

Un motivo común para genes regulados negativamente por la insulina ha sido identificado: el heptanucleótido T(G/A)TTT(T/G)(G/T), presente en los promotores de la PEPCK (Yeagley y col, 2000), la tirosina aminotransferasa (TAT) (Nitsch y col, 1993), la glucosa 6 fosfatasa (Streeper y col, 1998), la apolipoproteína CIII (Li y col, 1995), el “insulin receptor substrate 2” (IRS-2) (Zhang y col, 2001), la colesterol 7 α -hidroxilasa

(DeFabiani y col, 2000) y la “insulin-like growth factor binding protein 1”(IGFBP-1) (Hall y col, 2000) que presenta dos copias de esta secuencia en forma de palíndromes invertidos.

La función de este motivo consenso y los factores que interactuarían con él, no han sido aún esclarecidos. En algunos casos la insulina estimularía la unión de factores específicos a los IREs o el despegado de factores actuando en *trans* de los IREs. En otros casos manifestaría su acción a través de fosforilaciones de proteínas que ya se encuentran unidas a los IREs alterando así su capacidad como activadores o represores de la transcripción. Frecuentemente, la posición relativa u orientación de elementos individuales dentro de un “enhancer” o un “silencer” dirigen el ensamblado de un complejo proteico estereoespecífico cuya arquitectura es requerida para la correcta modulación de la intensidad, especificidad y duración de la respuesta. La identificación de los elementos individuales presentes en el DNA, como también la de los factores de transcripción intervinientes, es fundamental para entender el funcionamiento de los complejos multiproteicos que integran las diferentes señales regulatorias (Tijian y Maniatis, 1994).

2.1 Elementos presentes en genes reprimidos por insulina

2.1.1 Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

La inducción por cAMP y la represión por insulina de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) en células H4IIE es mediada por una unidad bipartita de respuesta a cAMP e insulina (C/IRU) que consiste en un elemento “CRE” conteniendo la secuencia TGACGTCA en la posición -95/-87 del promotor y un “enhancer” (AC) situado en la zona -271/-255. Este elemento AC se ha caracterizado en la línea celular HepG2, donde los factores AP-1 y C/EBP se unen al sitio 5' A y 3' C respectivamente (Yeagley y col, 1998). La unión de AP-1 y C/EBP es requerida para la inducción de la transcripción de la PEPCK por cAMP en células HepG2, pero la insulina no inhibe la expresión inducida por PKA en esta línea celular. La región AC también presenta sitios potenciales de unión para factores nucleares de hepatocitos (HNF-1, HNF-3 β y HNF-6), proteínas del grupo “high mobility group” (HMG) y de la familia “forkhead” (FKHR).

En la Figura 12 se ilustra un modelo para explicar la regulación de la PEPCK por cAMP e insulina. Este modelo propone mecanismos diferentes para la transcripción basal y la inducida por cAMP. Asimismo, la insulina utilizaría distintos mecanismos para reprimir

la expresión basal y la inducida por cAMP. Los componentes específicos de esta C/IRU podrían cooperar de manera única para conferir inducción por cAMP y una efectiva inhibición de esta inducción por insulina.

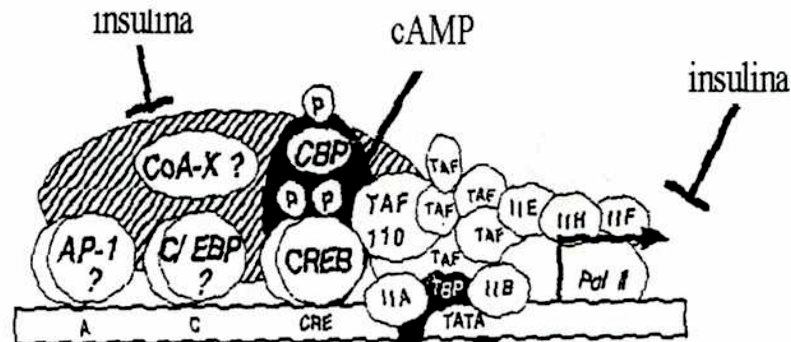


Figura 12 Elementos requeridos para el modelo propuesto para la regulación de la PEPCK por cAMP e insulina. La inducción de PEPCK requiere la asociación de AP-1, C/EBP y CREB. Este particular arreglo sería reconocido por un activador CoA-X. La inhibición mediada por insulina de la transcripción inducida por cAMP podría resultar de la modificación de un componente de la C/IRU o de la interrupción de un complejo de mayor orden donde participarían uno o más coactivadores (Yeagley y col, 1998).

Recientemente, se evaluó, en la línea celular H4IIE el efecto de la unión de los factores AP-1 y C/EBP a la región AC del promotor de la PEPCK mediante el uso de oligonucleótidos específicos y anticuerpos, como así también el de la expresión de mutantes dominantes negativas de CREB, AP-1 y C/EBP en la regulación transcripcional de la PEPCK. Estos estudios revelaron que C/EBP y otros factores que interactúan con CREB se unen al elemento AC para mediar las respuestas al cAMP y a la insulina (Yeagley y col, 2000). Estudios funcionales y de unión al DNA indican que AP-1 no participa en la inhibición hormonal y que C/EBP interviene en la inducción transcripcional ejercida por cAMP pero no en la represión mediada por insulina. La demostración que insulina inhibe la inducción mediada por PKA de PEPCK en células H4IIE y no en células HepG2, apoya la hipótesis que se necesitarían otros factores, diferentes de AP-1 y C/EBP, para mediar la acción de la insulina. En el elemento AC de la C/IRU de la PEPCK se superponen 5 sitios para factores de transcripción, todos requeridos para el funcionamiento del "enhancer", sugiriendo que la interacción de los factores que se unen a esta secuencia es necesaria para la regulación (Yeagley y col, 2000).

Una construcción del promotor de la PEPCK que comprende la zona -437/+69 confirió la totalidad de la respuesta a la inhibición por insulina cuando fue transfectada establemente en células H4IIE, mientras que una construcción conteniendo la región -

402/+69 confirió la mitad de la respuesta al tratamiento con la hormona. La misma habilidad parcial para conferir respuesta a insulina fue observada cuando se emplearon distintos genes de fusión que abarcaban la zona entre -402/-271, lo que indica que por lo menos 2 elementos actuando en *cis* son responsables de mediar la respuesta a la insulina (O'Brien y Granner, 1996). El elemento distal comprendido entre -425/-402 presenta la secuencia descrita en la Figura 13.

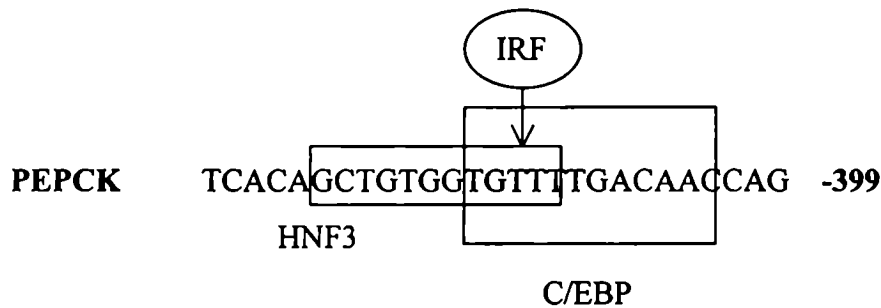


Figura 13 “Core”, señalado en gris, de la secuencia distal IRE ubicada entre -413/-407 del promotor de la PEPCK. Insulina hipotéticamente mediaría su efecto activando una proteína IRF, aún no identificada, que interferiría con la unión/transactivación de HNF3. El significado de la unión de C/EBP al PEPCK-IRE se desconoce. Recuadrados figuran los sitios de unión para HNF3 y C/EBP.

El PEPCK-IRE colocaliza con un el elemento “glucocorticoid accessory factor 2” (gAF2) en el promotor de la PEPCK. Este es un componente de la unidad que confiere respuesta a glucocorticoides (Hall y col, 2000). Las proteínas “winged helix/forkhead” pertenecientes a la subclase HNF3 son responsables de la actividad de gAF2, pero el análisis por mutaciones puntuales de este elemento mostró que no hay correlación entre la unión de los HNF3 y la habilidad del mismo para conferir respuesta a la insulina (Wang y col, 1996).

2.1.2 “Insulin-like growth factor binding protein 1” (IGFBP-1)

Los glucocorticoides y el cAMP estimulan la transcripción de la IGFBP-1 mientras que la insulina tiene un efecto dominante e inhibe tanto la expresión basal como la estimulada por glucocorticoides y cAMP. En el promotor humano la IRE está localizada entre -120 y -96. Este IGFBP-1-IRE también colocaliza con el sitio requerido para dar respuesta a glucocorticoides. La secuencia del IRE es TATTTTG pero, a diferencia del promotor de la PEPCK, en este gen hay dos copias presentes en forma de palíndromes invertidos, como se observa en la Figura 14. Versiones mutadas de la IGFBP-1-IRE, que

son capaces de unir proteínas HNF3, no pudieron mediar la respuesta a insulina (Powell y col, 1995).

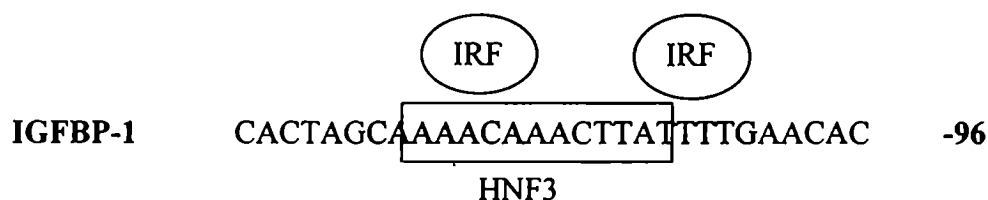


Figura 14 “Core”, señalado en gris, de las secuencias IRE ubicadas entre -120/-96 del promotor de la IGFBP-1. Insulina hipotéticamente mediaría su efecto activando una proteína IRF, aún no identificada, que interferiría con la unión/transactivación de HNF3.

2.1.3 Glucosa-6 fosfatasa

Experimentos en células FAO de hepatoma de rata y en cultivos primarios de hepatocitos de rata demostraron que la insulina inhibe tanto la transcripción basal como la inducida por glucocorticoides de la glucosa 6-fosfatasa. La zona del promotor comprendida entre -271 y -59 es la responsable de conferir respuesta a la hormona. Dentro de esta región se caracterizaron dos zonas: la región A (-271/-199) y la región B (-198/-157), donde deleciones de A reducen parcialmente el efecto inhibitorio de la insulina y deleciones de B la suprimen por completo. La región A no es un IRE, pero actúa como un elemento accesorio que aumenta la acción de los IREs presentes en la región B. El factor de transcripción que se une a la región A es el HNF-1. Sin embargo, este elemento no es capaz de conferir respuesta a insulina en un promotor heterólogo (Streeper y col, 1998). La región B contiene 3 copias de la secuencia T(G/A)TTT(T/G)(G/T) (Figura 15). Un análisis por introducción de mutaciones en este motivo reveló que la sustitución de G/A por C suprime el efecto de la insulina (O’Brien y col, 1995).

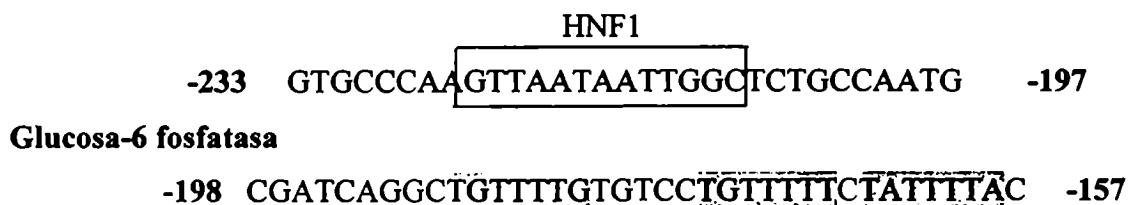


Figura 15 “Cores”, señalados en gris, de las secuencias IREs ubicadas entre -198/-157 (Región B) del promotor de la Glucosa-6 fosfatasa. Recuadrado se indica el elemento de unión a HNF1 presente en la región A.

2.1.4 Aspartato aminotransferasa

La aspartato aminotransferasa citosólica es regulada positivamente por cAMP y glucocorticoides e inhibida por insulina en el hígado. Esta regulación ocurre a nivel transcripcional. Un análisis detallado del promotor de la aspartato aminotransferasa identificó a la región comprendida entre -1818/-1755 como responsable de conferir respuesta a la insulina (Figura 16). Esta zona presenta cinco secuencias similares a IRE como también dos sitios adyacentes para HNF3 y un sitio para NF1.

Aspartato aminotransferasa

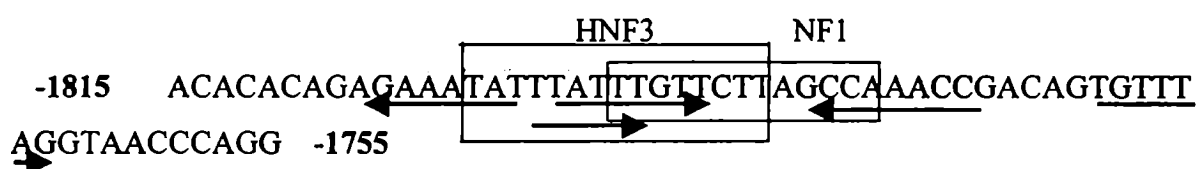


Figura 16 “Cores” señalados en gris y con flechas de las secuencias IREs ubicadas entre -1815/-1755 del promotor de la aspartato aminotransferasa. Recuadrados se indican los sitios de unión para NF1 y HNF3.

Los IREs se superponen con sitios consenso para HNF3 y NF1. Mutaciones de estos IREs producen efectos muy marcados en la respuesta a insulina (Beurton y col, 1999). En la línea 3T3-L1 de adipocitos, el factor NF1 media la represión ejercida por insulina sobre la expresión del gen del transportador de glucosa GLUT4 (Cooke y col, 1999), probablemente a través de variaciones en el estado de fosforilación de estos factores nucleares. Sin embargo, otra proteína no relacionada con NF1, aún no identificada, se une también al IRE del promotor del GLUT4.

Debido a la complejidad de la acción de la insulina a nivel génico sería importante delinear la contribución real de las secuencias regulatorias presentes en varios promotores, para identificar componentes celulares comunes en la señalización hormonal.

2.2 Factores de transcripción que se unen a los IREs

Numerosas proteínas que se unen a los IREs han sido identificadas, incluyendo miembros de C/EBP (O'Brien y col, 1994) y de la familia de los HNF3 (O'Brien y col,

1995). Sin embargo, en ningún caso se correlaciona la unión de estos factores de transcripción con la totalidad del efecto de la insulina. Se ha propuesto la hipótesis que una proteína aún no identificada mediaría el efecto negativo de la insulina a través de estos IREs, tal vez interfiriendo con el pegado de los HNF3.

Dada la importancia de la PKB en la transducción de señales mediadas por insulina, la identificación de sus sustratos ha sido un tema relevante en los últimos tiempos. Trabajos recientes en eucariotas superiores, confirmaron que miembros de la familia “forkhead” o “winged helix” son sustratos de la PKB y son regulados por insulina mediante fosforilaciones (Brunnet y col, 1999). Debido a que la insulina inhibe la expresión de numerosos genes hepáticos y que estos factores de transcripción son regulados negativamente por la hormona, se estudió el comportamiento de los mismos en hepatocitos de ratones. Estos estudios demostraron que el factor FKHR es fosforilado al menos en tres sitios de una manera PI3K dependiente (Nakae y col, 1999). Esta fosforilación en hepatocitos sigue un patrón jerárquico donde la fosforilación de la serina 253 presente en el dominio “forkhead” de unión al DNA es requerida para las fosforilaciones de la treonina 24 y la S 316. Mientras estos tres residuos son fosforilados en respuesta a la insulina en hepatocitos normales, la T 24 no puede fosforilarse en hepatocitos deficientes en receptores de insulina (Nakae y col, 2000). Estas evidencias sugieren un modelo para la regulación de FKHR. En condiciones basales, donde la señalización mediada por insulina está inactiva, el FKHR se localiza en el núcleo. Luego de la estimulación hormonal, la PKB transloca al núcleo y fosforila a la S 253. Este evento habilita al FKHR para las subsiguientes fosforilaciones en los residuos T 24 y S 316. Sólo la fosforilación en T 24 es requerida para la exportación nuclear del factor. Una vez en el citoplasma, el FKHR está potencialmente capacitado para unirse a las proteínas 14-3-3 lo que ocasiona su retención citoplasmática (Figura 17) (Brunet y col, 1999). De esta manera el FKHR quedaría retenido en el citoplasma y no podría unirse a los elementos del DNA para participar en eventos de activación transcripcional. Las quinasas de T 24 y S 316 son PIP₃ dependientes al igual que PKB. Es poco probable que la quinasa de T 24 sea la PKB, ya que esta presenta el mismo grado de activación tanto en hepatocitos normales como deficientes en el receptor de insulina (Park y col, 1999). La identificación de estas quinasas es crucial para entender el mecanismo de acción de la hormona.

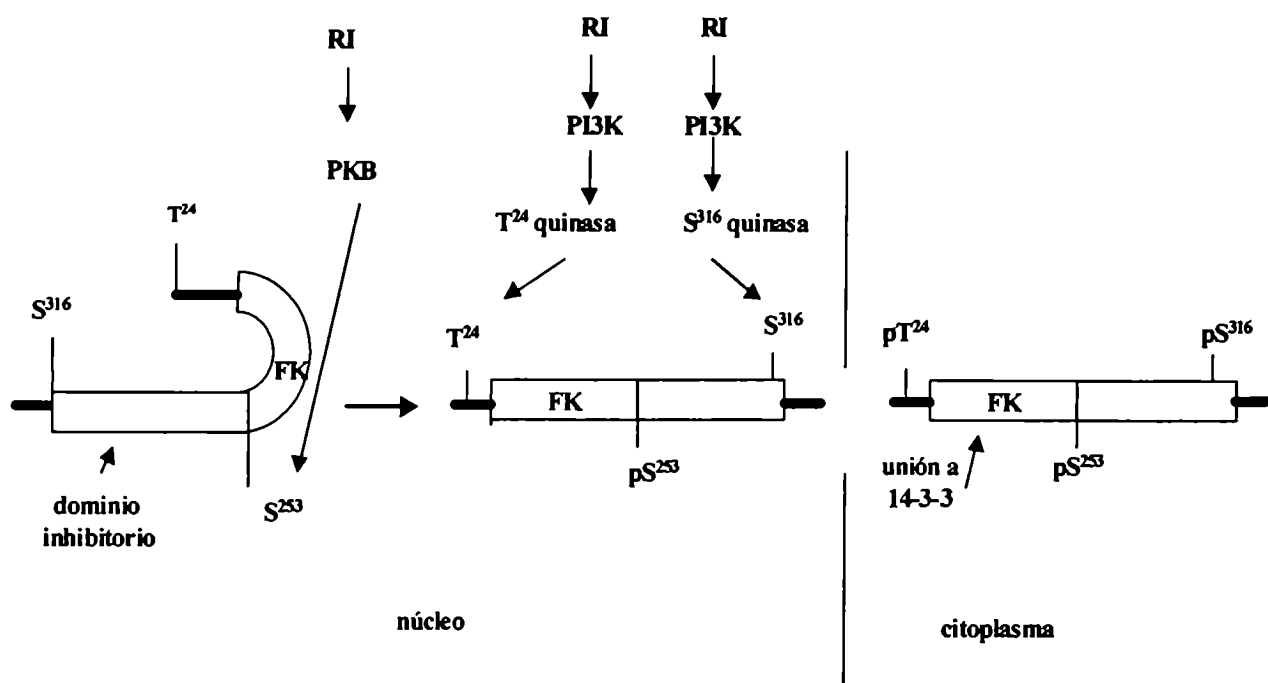


Figura 17 Modelo propuesto para la regulación de FKHR en hepatocitos

2.2.1 Familia de factores de transcripción: factor nuclear hepático 3 (HNF3)

Los HNF3 también denominados “forkhead box A” (FOXA) pertenecen a la gran familia de factores de transcripción “forkhead” integrada por tres miembros: HNF3 α o Foxa1, HNF3 β o Foxa2 y HNF3 γ o Foxa3 codificados por tres genes diferentes. El descubrimiento de esta familia de factores de transcripción ha sido de gran importancia para el análisis de la regulación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario y diferenciación celular (Kaufman y Knochel, 1996). Estas proteínas se unen a elementos presentes en centenares de promotores que codifican para hormonas, proteínas séricas, enzimas gluconeogénicas y enzimas glucolíticas (Kaestner y col, 2000). Estos factores están implicados en la regulación de numerosos genes que confieren respuesta a la insulina. Los genes de la PEPCK, TAT e IGFBP-1 (reprimidos por insulina) presentan IREs similares, que pueden actuar como sitios de unión para miembros de la familia FOX.

Estas isoformas son diferencialmente expresadas durante los estadios del desarrollo (Duncan y col, 1998) y se expresan principalmente en hígado e intestino (Vallet y col,

1995). Todos los miembros de esta familia comparten un dominio de unión al DNA, de aproximadamente 100 aminoácidos, altamente conservado entre los organismos. Los HNF3 se unen al DNA en forma de monómeros, sobre una distancia lineal de 40 Å a lo largo del eje de la doble hélice. El contacto entre la proteína y el DNA tiene lugar en ambas hebras y dado el nivel y el patrón de conservación de secuencia entre los miembros de la familia HNF3, estos deben presentar la misma estructura tridimensional en la región de reconocimiento del DNA (Figura 20) (Clark y col, 1993).

Los HNF3 pueden reconocer diferentes elementos en el DNA, existiendo diferencias de afinidad de unión por los mismos de acuerdo a la secuencia que presentan, como así también de acuerdo al miembro de la familia que intervenga (Lai y col, 1993). De todas formas, un detallado análisis mutacional de los sitios representativos de unión reveló que estas secuencias despliegan rasgos comunes (Roux y col, 1995).

La expresión génica de estos factores es regulada tanto por factores hormonales como nutricionales. En hígado de ratas con diabetes experimental por estreptozotocina, se observa un incremento del mRNA del HNF3 β y HNF3 γ que es revertido de manera dosis dependiente por el tratamiento con insulina. Sin embargo, el nivel del mRNA del HNF3 α es insensible a las variaciones de la insulina (Imae y col, 2000). Por otro lado se ha demostrado que el fenobarbital suprime el crecimiento de hepatocitos en cultivos primarios, manteniendo las células morfológicamente diferenciadas y restableciendo la expresión de marcadores de diferenciación como la albúmina y los citocromos P450 (1A, 2B1/2 y 2E1). Este efecto se correlaciona con el aumento de la expresión de los factores HNF3 y HNF4 (Miyazaki y col, 1998).

El análisis de la estructura cristalizada del dominio de unión al DNA del HNF3 γ reveló una sorprendente similitud con el dominio “winged helix” de las histonas “linker” (Clark y col, 1993). La semejanza entre la estructura del HNF3 y el dominio globular de la histona H5, una variante de la histona H1, podría ser funcionalmente significativa. La unión a dos sitios adyacentes de alta afinidad para HNF3 en la secuencia correspondiente al “enhancer” de la seroalbúmina murina demostró tener influencia sobre el ordenamiento de los nucleosomas allí presentes (McPherson y col, 1993), consistente con la actividad de remodelación de la cromatina que posee la H5 y posiblemente otras proteínas de estructura similar.

Durante el proceso de posicionamiento de nucleosomas se demostró que los HNF3 doblan levemente el DNA hacia la proteína. Los HNF3 se unen al DNA mientras este

envuelve al octámero de histonas, como ha sido propuesto para las histonas “linker”, colaborando de esta manera en estabilizar la posición del “core” de histonas (Yong Shim y col, 1998). De manera más general, podría decirse que la combinación de HNF3, el “core” de histonas y la secuencia del DNA estabilizaría una distorsión del DNA que favorecería la envoltura de la doble hélice alrededor del octámero de histonas.

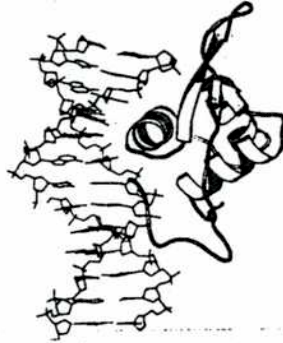


Figura 18 Vista del complejo DNA-HNF3 γ (Clark y col, 1993)

Estas proteínas son expresadas en los estadios tempranos del desarrollo hepático, antes que muchos otros factores de transcripción altamente expresados en este tejido y podrían desempeñar un papel primordial en la organización de la cromatina hepática y en consecuencia en el programa transcripcional hepático.

2.2.2 Familia de factores de transcripción : factor nuclear 1 (NF 1)

Los factores de transcripción NF1 también denominados “CAAT box transcription factors” (CTF), son codificados por cuatro genes NF1-A, B, C y X. El producto de “splicing” alternativo de estos genes comprende unas 20 isoformas (Kruse y col, 1994). Todas las proteínas NF1 poseen un dominio amino terminal (230 aminoácidos) muy conservado importante para la unión al DNA y la dimerización. Por el contrario, sus dominios carboxilo terminal cruciales para la regulación transcripcional, son muy diversos (Osada y col, 1999). Algunos NF1 como el NF1-A1, NF1-A2 y NF1-A4 presentan dos señales de localización nuclear (NLS) que les permiten translocar completamente al núcleo mientras que otras como NF1-A3 carecen de la segunda NLS y permanecen parcialmente

en el citoplasma. Estas diferencias en la translocación al núcleo contribuirían en la regulación de la formación de los homo o heterodímeros de NF1s (Imagawa y col, 2000).

Si bien los NF1 se expresan ubicuamente, difieren entre sí tanto en su patrón de expresión tejido específico como en la habilidad y el mecanismo con que activan o reprimen la transcripción (Gronostajski, 2000). Ciertos miembros de esta familia pueden ser modificados por fosforilaciones, glicosilaciones o estrés oxidativo (procesos redox) (Morel y Barouki, 1998).

Los NF1/CTF se unen al DNA como homo o heterodímeros (Kruse y col, 1994). Estos factores se unen con alta afinidad al palíndrome TGG(N)₇CCA y con menor afinidad a TGGC/A. A pesar que el palíndrome perfecto TGGCCA probablemente pueda existir en el DNA genómico, esta secuencia no se ha encontrado en la región transcribible del genoma (Osada y col, 1999). Esto sugiere que, para la regulación de la transcripción no se necesita una elevada afinidad de unión al DNA o bien que una unión muy estricta pueda resultar inconveniente para este evento. Numerosos promotores de genes eucariotas presentan medio palíndrome en la proximidad de elementos consenso para otros factores, como por ejemplo miembros de la familias AP-1, HNF3 y receptores de hormonas esteroideas (Jackson y col, 1993; Cardinaux y col, 1994). Se ha propuesto que la existencia de interacciones proteína-proteína podría estabilizar la unión de NF1 a esa secuencia.

Los NF1 no pueden unirse a algunos de sus sitios consenso cuando estos están presentes en el “core” de nucleosomas (Taylor y col, 1991). Recientemente, se han descrito interacciones entre NF1 y miembros de la familia “forkhead” como el HNF3 α , el HNF3 β y el factor de transcripción tiroideo-2 (TTF-2) (Ortiz y col, 1999). La unión de las proteínas “forkhead” a sus sitios consenso desestabiliza la cromatina y curva al DNA. Este fenómeno podría desenmascarar un sitio NF1 oculto dentro de la estructura nucleosomal, y transformarlo en uno accesible para el factor de transcripción.

Los NF1 están involucrados en el control de la expresión constitutiva o la inducible de numerosos genes. En el hígado, su participación es crítica para la expresión de la albúmina, el colágeno I y la aspartato aminotransferasa y para la expresión específica de la α -fetoproteína (BoisJoyeux y col, 1994) y la vitelogenina (Morel y Bauroki, 1999). También, los NF1 actúan como factores accesorios para la regulación de la expresión génica mediada por factores de transcripción como CREB y miembros de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas incluyendo los receptores para glucocorticoides, vitaminaD, estrógeno y andrógenos (Hung y col, 1999).

La isoforma NF1-A inhibe la transcripción a través de una zona represora presente en la región carboxilo terminal, constituida por dos dominios de 100 aminoácidos cada uno (RD1 y RD2). Estos dominios reprimen las actividades de los promotores de la glutatión transferasa P, la metalotioneína II A humana y la “CCAAT/enhancer binding protein δ ”. RD1 y RD2 son ricos en serinas y glicinas y prolinas y serinas respectivamente. Contrariamente a lo que ocurre con algunos dominios represores ricos en alaninas, prolinas o serinas que se asocian a factores de la maquinaria de transcripción, los RD del NF1-A no interactúan con el factor de transcripción TFIIB ni con la “TATA binding protein” (TBP) o con los factores asociados a TBP (TAF) “*in vitro*” (Osada y col, 1997).

En células 3T3-L1, la insulina inhibe la expresión del gen del transportador de glucosa GLUT4. La unión de miembros de la familia de NF1 al promotor de GLUT4 es necesaria para su total represión (Cooke y Lane, 1999). En esta línea celular, la insulina induce cambios en el estado de fosforilación de los NF1. Esto abre la posibilidad de un nuevo mecanismo de regulación hormonal, quedando aún por establecer los sitios de fosforilación de NF1 afectados por las señales disparadas por la hormona y la correlación entre modificaciones del estado de fosforilación y la represión transcripcional.

3. La 5-aminolevulinato sintetasa

3.1 Características generales

La 5-aminolevulinato sintetasa (ALAS) cataliza el primer paso de la biosíntesis del hemo en animales, hongos y algunas bacterias. Esta reacción implica la condensación de glicina y succinil-CoA para formar ácido 5-aminolevulínico (ALA), coenzima A y CO₂ (Jordan y Shemin, 1972). La ALAS es una proteína de la matriz mitocondrial, que actúa como homodímero y requiere como muchas otras enzimas que catalizan reacciones de aminoácidos, al 5' piridoxal fosfato (PLP) como cofactor esencial (Gong y col, 1996).

En animales existen dos isoformas codificadas por distintos genes localizados en cromosomas diferentes. Una de ellas, ubicuamente expresada, es la ALAS1, cuyo gen está localizado en el cromosoma 3 (Bishop y col, 1990) es la responsable de la síntesis del grupo hemo necesario para los citocromos respiratorios y otras hemoproteínas. La ALAS2,

codificada en el cromosoma X (Cox y col, 1990), se expresa específicamente en tejidos eritropoyéticos como las células eritroides inmaduras y el hígado en estadios embrionarios y sería responsable del suministro de hemo requerido durante la síntesis de hemoglobina (Cox y col, 1994). La alta homología de secuencia entre los productos de estos genes que presentan una identidad del 70 % en las enzimas humanas maduras, indica una similitud estructural y sugiere que estas dos isoformas difieren primariamente en su patrón de expresión (Riddle y col, 1989).

Los genes de las ALAS1 y ALAS2 han sido aislados en diversas especies y muestran una organización de intrones muy similar (Surinya y col, 1997), pero difieren significativamente en sus promotores y regiones no codificantes.

El análisis de las distintas secuencias clonadas, llevó a la designación de tres regiones. La región 1 corresponde al extremo amino terminal de la proteína precursora y contiene la señal responsable del transporte a la mitocondria. Esta secuencia de aproximadamente 56 bases está presente en los cDNAs aislados de rata, pollo y humano. La región 2 comprende la porción amino terminal de la proteína madura y la región 3 corresponde al 75% restante de la enzima donde se encuentra el sitio activo (Cox y col, 1991).

El gen de ALAS2 tiene aproximadamente 22 kpb y está organizado en 11 exones (Comboy y col, 1992). La transcripción del mismo genera un mRNA maduro de 2 kb que presenta una región 5' no codificante de 52 nucleótidos. El análisis de esta región reveló la presencia de una secuencia palindrómica muy similar al elemento de respuesta al hierro presente en los mRNA de la ferritina y transferrina (Cox y col, 1991).

El análisis de la región 5' flanqueante de la ALAS2 murina permitió identificar la existencia de secuencias consenso y sitios posibles de unión de factores de transcripción específicos de células eritroides (Sadlon y col, 1999). En la región comprendida por las primeras 300 pb de la región 5' flanqueante se caracterizaron sitios de unión para GATA-1, NF-E2 y EKLF, siendo necesarias además secuencias ubicadas entre -718 a -300 para lograr el máximo de activación transcripcional. Entre estas últimas se identificó un sitio consenso para el factor inducible por hipoxia (HIF-1). No obstante, esta región estimula de igual manera la expresión de ALAS2 en células no eritroides, como en las líneas celulares HeLa y NIH/3T3, lo que sugiere que los elementos actuando en *cis* no son los responsables del silenciamiento de este gen en células no eritroides y que la regulación tejido específica de ALAS2 depende de otras regiones del promotor o de eventos de remodelación de la cromatina (Kramer y col, 2000).

El gen de ALAS1 de pollo tiene aproximadamente 6,9 kpb y está organizado en 10 exones y 9 intrones (Maguire y col, 1986), el de rata presenta 11 exones ocupando más de 14 kpb (Yomogida y col, 1993) y el humano tiene alrededor de 17 kpb. El gen de ALAS1 humano difiere del de rata en que presenta un exón adicional, que no se traduce, y que por “splicing alternativo” genera un mRNA minoritario más largo (Roberts y Elder, 2001). El mRNA de la ALAS1 de rata presenta un tamaño molecular de 2,3 kb, dando origen a una preALAS1 de 71 kDa y a una proteína madura de 65 kDa (Yamamoto y col, 1988).

La secuencia promotora de ALAS1 de rata descrita por Yomogida y por Braidotti en 1993 presenta el motivo 5' -TATATTA- 3' en la posición -30 a -24 pb típico de una “TATA box”. El análisis de transcritos de mRNA de rata y humano revelaron diferencias tejido específicas en el uso del sitio de iniciación de la transcripción. En cerebro la iniciación tiene lugar en un elemento “initiator like” ubicado río arriba de la “TATA box”, mientras que en hígado la iniciación es dirigida por la “TATA box” y comienza en un único sitio ubicado inmediatamente río abajo de esta (Roberts y Elder, 2001). Estos hallazgos sugieren que la conformación del “core” del promotor que dirige el ensamblado del complejo de preiniciación puede variar entre tejidos y ser responsable de la regulación tejido específica.

El promotor de ALAS1 de rata presenta un alto contenido de G+C (59 %) en la región -479 a +1 pb que es una característica común de varios genes constitutivos (Leonardson, 1997). Inmediatamente río arriba de la “TATA box”, en las posiciones -59 a -47 pb y -88 a -76 pb, hay dos elementos con alta similitud a la secuencia consenso para el factor nuclear respiratorio 1 (NRF-1). Estos elementos se encuentran presentes en varios promotores de genes nucleares que codifican para componentes mitocondriales, por ello se ha propuesto que el NRF-1 podría intervenir en la coordinación de la expresión de genes nucleares involucrados en la biogénesis mitocondrial (Evans y Scarpulla, 1989). También se ha caracterizado una “CCAAT box” en la posición -330 a -325 pb y un sitio posible de unión para el factor “octamer I” (OctI) en la posición -402 a -395 pb (Pruijn y col, 1987).

La biosíntesis del hemo es un camino metabólico esencial para los organismos aeróbicos, su producción se encuentra eficientemente regulada con el fin de proveer la cantidad de hemo necesaria para la síntesis de las hemoproteínas. En mamíferos, la ALAS1 se expresa basalmente en todos los tipos celulares examinados. Sus niveles son normalmente muy bajos, pero es inducida sustancialmente en hígados de animales tratados con drogas porfirinogénicas como el fenobarbital, la alilisopropilacetamida (AIA) y la 3,5-

dicarbetoxi-1,4-dihidrocolidina (DDC), donde hemo adicional es requerido para la formación de citocromo P450 (May y col, 1986). Al igual que en numerosas vías biosintéticas, la ALAS1 está sujeta a una regulación negativa por el producto final, el hemo. El hemo disminuye tanto la síntesis como la transferencia intracelular de la enzima, reduciendo de esta manera los niveles de ALAS1 en la mitocondria hepática (Yomogida y col, 1993). El fenobarbital induce la expresión de ALAS1, probablemente a través de dos mecanismos, uno que respondería a la disminución de los niveles intracelulares de hemo (Srivastava y col, 1990) y consecuente desaparición de su efecto inhibitorio y otro que afectaría a algún factor de transcripción responsable de ejercer un efecto positivo sobre el promotor (Dogra y May, 1996). Este último es apoyado por la presencia de secuencias con alta homología con elementos “barbiturate-inducible element” (Barbie-box) (Liang y col, 1995) en las posiciones -526/-540, -417/-403 y -238/-224 del promotor de ALAS1 (Varone y col, 1999).

La expresión de ALAS1 es inducida por cAMP mediante la activación de la proteínaquinasa dependiente de cAMP (PKA) (Varone y col, 1999). La respuesta a la estimulación hormonal es mediada a través de elementos conservados “cAMP response element” (CRE) presentes en promotores de numerosos genes eucariotas. Estos sitios CRE son reconocidos por la familia de factores de transcripción “CRE-binding protein” (CREB). Recientemente se han identificado elementos actuando en *cis* en la región promotora de ALAS1, responsables de mediar la respuesta al cAMP. En las posiciones -142/-149 y -38/-45 del promotor de ALAS1 existen dos elementos necesarios para la totalidad de la inducción mediada por la PKA (Giono y col, 2001). El elemento distal es más efectivo en conferir respuesta al cAMP, mientras que el elemento proximal es el único capaz de reprimir la actividad basal del promotor.

EL éster de forbol, 12-*O*-tetradecanoil forbol 13 acetato (TPA), inhibe la expresión del gen de ALAS1 tanto en condiciones basales como estimuladas por fenobarbital (Varone y Cánepa, 1997). Esta inhibición es ejercida a nivel transcripcional mediante un mecanismo que involucra a la proteínaquinasa dependiente de Ca (PKC). En la zona -354/-156 del promotor de ALAS1 existe un elemento “TRE-like” (“TPA response element”), necesario para la regulación negativa mediada por ésteres de forbol (Guberman y col, manuscrito en preparación).

3.2 El gen de ALAS como objeto de investigación de la regulación génica mediada por insulina.

3.2.1 Regulación de la actividad enzimática por insulina

Kim y Kikuchi (1974) encontraron que la inducción de ALAS mediada por alilisopropilacetamida (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.

Por otra parte Cánepa y col (1985), demostraron que la adición de insulina 5×10^{-9} M a cultivos primarios de hepatocitos de rata producía una marcada disminución de la actividad de ALAS tanto en condiciones basales como inducidas por fenobarbital. El efecto inhibitorio de la hormona sobre la actividad basal de ALAS no fue observado en hepatocitos de ratas con diabetes experimental por STZ. Por el contrario, cuando cultivos primarios de hepatocitos diabéticos fueron estimulados con fenobarbital la presencia de insulina 10^{-8} M disminuyó la actividad enzimática de ALAS. En las mismas condiciones experimentales, estos autores también demostraron que la hemoxigenasa no presentaba cambios significativos en su actividad tanto en hepatocitos normales como en diabéticos.

3.2.2 Porfirias y diabetes

La porfiria es una anomalía del metabolismo pigmentario. Esta enfermedad pertenece al grupo de trastornos heredados o, más rara vez adquiridos, del metabolismo de las porfirinas o de una alteración en la biosíntesis del hemo (May y col, 1995). Constituye 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. Basándose en las diferencias clínicas y bioquímicas, es posible clasificar las

porfirias en: eritropoyéticas y hepáticas. Dentro de las hepáticas se encuentran la porfiria intermitente aguda (AIP) y la porfiria mixta, que se heredan como rasgo mendeliano dominante, y la porfiria cutánea tardía (PCT) que se cree que se hereda como rasgo mendeliano dominante con expresividad variable, existiendo también una forma sintomática que puede tener una base adquirida más que hereditaria. Esta última, la padecen personas expuestas a sustancias químicas industriales, a intoxicaciones con plomo o por contacto con hexaclorobenceno (Moore y Hift, 1997).

Ninguno de los distintos tipos de porfirias conocidos presenta una alteración en la enzima ALAS. 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 ALAS 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 ALAS (Bottomley, 1993).

La deficiencia de hemo en hígados de pacientes que sufren AIP estimula el aumento de ALAS, lo que dispara reacciones metabólicas que conducen a un incremento en el contenido de porfirinas. Estas reacciones pueden revertirse tratando a los pacientes con arginato de hemo o con glucosa. Estudios de pacientes con AIP severa revelaron que, si los pacientes manifestaban a lo largo de su enfermedad diabetes mellitus los niveles de ALA en orina decrecían y desaparecían los síntomas de AIP (Andersson y col, 1999).

Pacientes con PCT desarrollan intolerancia a los carbohidratos y manifiestan diabetes mellitus con mayor frecuencia que la población normal.. Estos enfermos presentan resistencia a insulina, sin embargo la evaluación de la cantidad de receptores de insulina en monocitos circulantes no se correlaciona con los elevados niveles observados de resistencia a la hormona (Calcinaro y col, 1989). Estos hallazgos sugieren que un defecto post-receptor ocasionaría la resistencia observada en pacientes con PCT y que una alteración en el metabolismo de las porfirinas podría ser la responsable de este desorden.

La diabetes mellitus es una enfermedad donde la capacidad del organismo para utilizar hidratos de carbono está alterada debido a factores genéticos y ambientales, los cuales se influncian 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 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 al desarrollo de la diabetes (Tisch y 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 aún no se han determinado con certeza los genes responsables.

La diabetes tipo II es la enfermedad metabólica más frecuente, asociada a distintas características como la obesidad, hipertensión, hiperlipidemia y a largo plazo puede llevar a complicaciones 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 y col, 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 algunos han sido identificados en los genes de enfermos con ciertos tipos de NIDDM, como por ejemplo en los genes de la glucoquinasa, el transportador de glucosa GLUT2, el receptor de glucagon, el receptor de insulina, el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1), la glucógeno sintetasa, etc. (Kahn y col, 1996).

Con frecuencia coexisten en pacientes la diabetes mellitus y algún tipo de porfiria hepática, sobre todo la AIP y la PTC (Kappas y col, 1995). 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 y Korda, 1977). Considerando estas observaciones, la precipitación de porfiria en pacientes diabéticos podría atribuirse a la acción de factores

porfirinogénicos endógenos o exógenos que se vería facilitada por la presencia de defectos genéticos en el camino metabólico del hemo.

3.2.3 ALAS como modelo experimental

Los diferentes estímulos que disparan cascadas de señalización ocasionan modificaciones en las actividades de los factores de transcripción que actúan en concierto sobre el promotor de cada gen en particular. La presencia en el promotor de ALAS de elementos para factores de transcripción como CREB y AP-1 entre otros y las diversas vías de transducción involucradas en su regulación permiten considerar a esta enzima como un modelo adecuado para el estudio de la integración de múltiples señales en el contexto de un solo gen.

Con los antecedentes que la insulina inhibe la actividad enzimática de ALAS en hepatocitos, consideramos oportuno elegir al promotor de ALAS como modelo experimental para profundizar el estudio de la regulación hormonal de ALAS en el tejido hepático. Una marcada inducción de ALAS fue observada en hepatocitos de rata y células HepG2 frente a la estimulación con cAMP (actuando vía CREB) (Varone y col, 1999; Giono y col, 2001). En algunos genes insulina interrumpe la interacción entre CRE, CREB y la RNA polimerasa II, proponiéndose varias posibilidades para esta inhibición entre ellas: defosforilación del sitio fosforilable por PKA en CREB, cambio en el estado de fosforilación de CREB mediado por quinasas activadas o inhibidas por insulina o la participación de otros factores de transcripción que antagonizarían la acción de insulina y cAMP (Nakajima y col, 1996). Por el contrario, en los mismos tipos celulares, el éster de forbol, TPA, inhibe la expresión de ALAS (actuando vía proteínas AP-1) (Varone y Cánepa, 1997; Guberman y col, manuscrito en preparación). En el gen de colagenasa, la insulina estimula la transcripción a través de un elemento AP-1 mediante un mecanismo que involucra tanto un aumento en la cantidad de c-Fos y c-Jun como modificaciones postraduccionales de ambos (Kim y col, 1994).

Todavía no se conocen los mecanismos empleados por la insulina para regular la expresión génica, quizás en algunos promotores se necesite la actuación orquestada de factores actuando de una manera única y seguramente en un futuro mediano se identificarán la o las proteínas responsables de mediar la respuesta final.

od

1.Cultivos primarios de hepatocitos de rata

1.1 Animales utilizados

Se utilizaron ratas albinas *chbb THOM* entre 150-200 g de peso, criadas en condiciones estandarizadas de luz (entre 6,30 y 18,30 h) y temperatura (21-22 °C) en el bioterio del IBYME. Las ratas se ayunaron durante las 24 horas previas a su utilización, se sacrificaron y los hígados fueron extraídos inmediatamente.

1.2 Obtención de hepatocitos

Las suspensiones de hepatocitos fueron preparadas por el método descrito por Fry y col (1976). Los hígados de aproximadamente 7-10 g de peso fueron lavados tres veces con NaCl 0,9 %, mantenidos en frío y cortados con bisturí en trozos de 0,5-1 mm de espesor y 1 cm de largo.

Los trozos de hígado se incubaron 10 minutos a 37 °C en baño con agitación en 20 ml de PBS (NaCl 8.000 mg, KCl 200 mg, KH₂PO₄ 200 mg y Na₂HPO₄ 1.140 mg a pH 7,4 por litro de solución). El sobrenadante se retiró por aspiración y se repitió la misma operación. Luego se efectuaron dos incubaciones en PBS conteniendo EGTA 190 mg/l durante 10 minutos manteniendo las condiciones de temperatura y agitación. Se realizó un nuevo lavado con PBS y los trozos de hígado fueron incubados durante 60 minutos a 37 °C con agitación en 20 ml de solución salina balanceada de Hank conteniendo las enzimas dispersantes de células (NaCl 8.000 mg, KCl 400 mg, KH₂PO₄ 60 mg, Na₂HPO₄ 50 mg, NaHCO₃ 840 mg, rojo fenol 10 mg, CaCl₂ 550 mg, colagenasa 500 mg e hialuronidasa 1.000 mg a pH 7,4 por litro de solución). El incubado se filtró a través de tres capas de gasa de algodón y se centrifugó a 5.000 x g durante 5 minutos. El pellet de células obtenido fue lavado con PBS y resuspendido en medio HAM F12 a pH 7,4.

El método empleado para la obtención de hepatocitos produjo un rendimiento de $2,6 \pm 1,4 \times 10^6$ células/gramo de tejido hepático (promedio $\pm$ E.S. de 12 preparaciones diferentes).

1.3 Determinación del número de células y su viabilidad

Para la determinación del número de células y su viabilidad se empleó el método de exclusión del azul tripán. 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 4 % (azul tripán 400 mg, NaCl 810 mg, K_2HPO_4 60 mg y metil-p-hidroxibenzoato 50 mg a pH 7,4). Se colocó una gota de la suspensión así obtenida en una cámara de Neubauer y el recuento se efectuó al microscopio óptico entre los 5 y los 10 minutos luego del agregado del colorante. El conteo de células (N) se realizó en los cuatro cuadrados de la cámara y el número de células totales por ml y el porcentaje de viabilidad se calculó aplicando las siguientes fórmulas.

$$\text{Células / ml} = N \times \frac{1}{4} \times 1.000 \times 25 \times 10$$

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

La viabilidad inicial de las suspensiones de hepatocitos, considerada como el porcentaje de células que excluyeron el azul tripán, fue de 77 ± 2 % (promedio $\pm$ E.S. de 12 preparaciones diferentes), y decayó entre 1 y 2 % por hora y no mas del 10 % durante las primeras 8 horas de incubación a 37 °C.

1.4 Incubaciones

Los hepatocitos se incubaron en medio HAM F12 en baño con agitación a 37 °C durante el tiempo indicado en cada experimento. Las distintas drogas empleadas fueron disueltas de la siguiente manera: insulina, fenobarbital, 8-(4-clorofeniltio)-cAMP (8-CPT-cAMP) en HAM F12 en una concentración no inferior a 100X de lo utilizado. Actinomicina D, calfostin C, 12-*O*-tetradecanoilforbol 13 acetato (TPA), wortmanina, LY294002, PD152440, PD98059, lovastatina y rapamicina en DMSO en una concentración no inferior a 1.000X de lo utilizado.

2. Cultivo de la línea celular HepG2

2.1 Cultivo de células

Las células de hepatoma humano HepG2 fueron cultivadas en monocapa en placas de 9 cm de diámetro conteniendo 10 ml de medio mínimo esencial (MEM) suplementado con

10 % de suero fetal bovino, NaHCO_3 0,2 %, Hepes 10 mM, mezcla de aminoácidos no esenciales 1 %, glutamina 2 mM, anfotericina 1 $\mu\text{g/ml}$, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$. Los cultivos se crecieron en estufa a 37 °C y atmósfera de 5 % de CO_2 . Antes de alcanzar la confluencia los cultivos se pasaron a nuevas placas mediante el despegado de las células por tripsinización. Para ello se aspiró el medio, se lavaron las células con PBS y se incubó cada caja con 1,5 ml de tripsina a 37 °C hasta detectar al microscopio que las células estuvieran sueltas.

Se efectuó el recuento, se determinó la viabilidad de las células (por el método de exclusión del azul tripán anteriormente descrito) y se las plaqueó a una densidad de $1,5 - 2,0 \times 10^6$ células por caja de 9 cm de diámetro en 10 ml de medio

2.2 Incubaciones

En todos los experimentos, antes del agregado de las correspondientes drogas, se eliminó el medio de cultivo por aspiración, se lavaron cuidadosamente las placas con PBS y se incubaron las células en medio MEM libre de suero.

Las distintas drogas empleadas fueron disueltas de la siguiente manera: insulina y fenobarbital en medio MEM libre de suero en una concentración no inferior a 100X de lo utilizado. TPA, wortmanina, LY294002, PD152440, PD98059, lovastatina y rapamicina en DMSO en una concentración no inferior a 1.000X de lo utilizado.

3. Análisis de RNA por Northern y slot blot

3.1 Obtención de RNA total

El RNA total fue obtenido según la metodología descrita por Chomczynsky y Sacchi (1987). Este método se empleó tanto para obtener el RNA a partir de cultivos primarios de hepatocitos como de la línea celular HepG2. Partiendo de $2,5 - 4 \times 10^6$ hepatocitos, se agregaron 5 ml de solución desnaturalizante D (isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM pH 7, N-laurilsarcosina 5 %, β -mercaptoetanol 0,1 M) y se homogeneizaron en un potter. Se agregaron luego 0,5 ml de acetato de sodio 2 M pH 4,5, 4,5 ml de fenol saturado en Tris pH 8 y 1 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). La suspensión fue agitada vigorosamente durante 10 segundos con un vortex y centrifugada durante 20

minutos a 10.000 x g a 4 °C. La precipitación del RNA presente en la fase superior acuosa se efectuó separando y agregando a la misma un volumen de isopropanol durante 1 hora a -20 °C. Se centrifugó luego a 10.000 x g durante 20 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó 2 veces con etanol 75 % y resuspendió en agua estéril libre de RNasas.

Cuando se partió de células HepG2, la monocapa celular se trató directamente, previo descarte del medio de cultivo, con 1,8 ml o 0,75 ml de solución D según sea en cajas de 9 cm o 3,5 cm de diámetro respectivamente. Luego se procedió igual que con los hepatocitos de rata. La concentración del RNA se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm ($1 \text{ DO}_{260} = 40 \mu\text{g}$ de RNA) aceptando como criterio de pureza un cociente A_{260}/A_{280} mayor que 1,7 (Sambrook y col, 1989).

3.2 Electroforesis de RNA

La separación electroforética del RNA total se realizó según una adaptación del método descrito por McMaster y Carmichael (1977). Las muestras de RNA (20 μg) se desnaturalizaron a 50 °C durante 60 minutos en una mezcla conteniendo glioxal 1,2 M, DMSO 7,5 M, fosfato de sodio 10 mM pH 7. Luego, las muestras fueron tratadas con el buffer de siembra (glicerol 50 %, fosfato de sodio 10 mM pH 7, azul de bromofenol 0,25 % y xilene cianol FF 0,25 %) y sembradas en gel de agarosa 1 %. La corrida electroforética fue llevada a cabo durante 2-3 horas a 100 mV en buffer fosfato de sodio 10 mM

3.3 Transferencia a membrana.

Una vez finalizada la electroforesis el gel fue sometido a la transferencia pasiva a una membrana de nylon (Hybond-N+ Amersham) según lo descrito por Sambrook y col (1989). El filtro de nylon fue humedecido previamente durante 45 minutos en SSC 20X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M pH 7). La transferencia se realizó por capilaridad ascendente en una solución de SSC 20X durante 16 horas.

En los análisis de slot blots, 20 μg 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 al tercio en SSC 10X y sembradas en los pocillos del dispositivo Manifold (GIBCO-Life Technologies) conteniendo el filtro de

nylon. Se aplicó vacío, se filtraron por completo las muestras y lavaron reiteradamente los pocillos con SSC 10X.

En ambos métodos los filtros de nylon se secaron con papel Whatman 3 MM durante 30 minutos a temperatura ambiente y fueron colocados en estufa a 80 °C durante 1 hora para que el RNA se fije irreversiblemente al nylon.

3.4 Marcación de sondas

ALAS

Con la finalidad de detectar el mRNA de ALAS en hepatocitos de rata se sintetizó un oligonucleótido de 24 bases complementario a las bases +836 a +859 del mRNA de ALAS de hígado de rata (Yamamoto y col, 1988) cuya secuencia es: 5'-CTCCGGCACCATGCTGTTTCACAG-3'.

Para detectar el mRNA de ALAS en células HepG2 se empleó un oligonucleótido sintético de 29 bases complementario al mRNA de ALAS hepática humana (Bishop, 1990) cuya secuencia es: 5'-GACGGAAGCTTTGTGTTGCCATCTGGACT-3'.

Ambos oligonucleótidos fueron marcados radioactivamente en su extremo 5' mediante una reacción enzimática con la T₄ polinucleótido quinasa. Se preparó la mezcla de reacción conteniendo 3 pmoles de oligonucleótido, el buffer de reacción, 5 U de T₄ polinucleótido quinasa (GIBCO-Life Technologies), 150 µCi de [γ -³²P]ATP (6.000 Ci/mmol), en un volumen total de 25 µl. Esta preparación se incubó 30 minutos a 37 ° C y se detuvo la reacción calentando durante 10 minutos a 65 ° C. La sonda marcada fue purificada, para eliminar el nucleótido radioactivo no incorporado, mediante dos precipitaciones sucesivas con 1/10 del volumen de acetato de amonio 7,5 M pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 30 minutos a -20 °C. Se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos. El precipitado fue lavado con etanol 70 % y resuspendido en 50 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM). Una alícuota de la sonda se colocó en un vial con líquido centellante a base de tolueno y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Las sondas así preparadas poseían una actividad específica aproximada de 4-5 x 10³ cpm/fmol.

β -tubulina

Todos los resultados sobre los niveles de mRNA de ALAS obtenidos en los ensayos de Northern y slot blots fueron normalizados con los valores de los niveles de mRNA de β -

tubulina detectados en paralelo. Se eligió el gen de la β -tubulina por ser un gen de expresión constitutiva, no regulado por insulina en los sistemas celulares empleados.

Para detectar el mRNA de β -tubulina se empleó como molde el cDNA de β -tubulina de pollo que fue escindido del plásmido pBR322 β -tubulina cedido por el Dr. J. Messina (Universidad de South Florida, Florida, EEUU) por digestión con la enzima HindIII. El cDNA se marcó radioactivamente por la técnica de hibridización con hexaoligonucleótidos de secuencia al azar ("random primers"). Para la reacción enzimática se incubaron 40 ng del DNA molde, buffer de reacción correspondiente, 2 U del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E.coli*, 0,25 DO de la mezcla de hexaoligonucleótidos de secuencia al azar, dATP, dTTP, dGTP a una concentración 500 μ M cada uno y [α - 32 P]dCTP 10 μ Ci/ μ l, (3.000 Ci/mmol). La mezcla de reacción fue incubada a 25 °C deteniéndose luego de 1 hora con "stop buffer" (Tris 50 mM pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM y SDS 0,5 %). La sonda fue luego precipitada con 1/10 del volumen de acetato de amonio 7,5 M pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 30 minutos a -20 °C. Se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos, se lavó el precipitado con etanol 70 % y se resuspendió en 50 μ l de buffer TE (Tris 10 mM y EDTA 1mM). Una alícuota de la sonda se colocó en un vial con líquido centellante a base de tolueno y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Las sondas así obtenidas poseían una actividad específica aproximada de $5-7 \times 10^3$ cpm/fmol.

3.5 Hibridización

Las membranas de nylon conteniendo el RNA fijado por calor fueron prehibridizadas en una solución bloqueante. Para detectar el mRNA de ALAS la prehibridización se llevó a cabo en una solución conteniendo SSC 6X, SDS 0,1 %, Denhardt 2X (polivinilpirrolidona 0,04 %, Ficoll 0,04 %, seroalbúmina bovina 0,04 %) y DNA de esperma de salmón 100 μ g/ml durante 1 hora a 70 °C en horno de hibridización con rotación. Posteriormente, la sonda para ALAS fue agregada a la solución y la hibridización se completó a 70 °C por 16 horas más. Finalizado este procedimiento, las membranas fueron sometidas a una serie consecutiva de tres lavados a temperatura ambiente con SSC 1X y SDS 1 % durante 2 minutos cada uno y tres a 70 °C con SSC 0,2X y SDS 0,1 % durante 2 minutos cada uno.

Para detectar el mRNA de β -tubulina la prehibridización se llevó a cabo en una solución bloqueante (SSC 6X, SDS 1 %, Denhardt 2X, formamida 50 % y DNA de

esperma de salmón 100 µg/ml) durante 1 hora a 42 °C en horno de hibridización con rotación. Posteriormente se agregó la sonda para β-tubulina y se completó la hibridización a 42 °C por 16 horas más. Finalizado este procedimiento, las membranas fueron sometidas a una serie consecutiva de dos lavados a temperatura ambiente con SSC 2X y SDS 0,1 % durante 15 minutos y dos a 50 °C con SSC 0,2X y SDS 0,1 % durante 15 minutos.

3.6 Autoradiografía y cuantificación

Las membranas lavadas se secaron con papel Whatman 3MM, se envolvieron con nylon impermeable y se expusieron con films Kodak (X-OMAT XAR-2) durante 3-5 días a -70° C en cassette radiográfico con pantalla intensificadora. Luego de revelar los films, las autoradiografías resultantes se cuantificaron utilizando un analizador de imágenes Bio Rad GS -670 con el programa Molecular Analyst versión 1.1

4. Plásmidos utilizados

4.1 Vectores de expresión

Para determinar la eficiencia de transfección se empleó el plásmido:

pCEFLβ-gal: esta construcción expresa la enzima β-galactosidasa de *E.coli*.

Para determinar la actividad transcripcional del promotor de ALAS fueron utilizados los plásmidos:

pBLCAT6: utilizado como control de expresión de CAT (Boshart y col).

pACAT: esta construcción deriva del plásmido pBLCAT6. Posee una región de 865 pares de bases (-833 a +42) del promotor de ALAS de rata clonada río arriba del gen de la enzima cloramfenicol acetil transferasa (CAT). La región del promotor fue subclonada en los sitios BamHI y XhoI del pBLCAT6 (Scassa y col, 1998).

Para identificar la región del promotor de ALAS responsable de conferir respuesta a la insulina se emplearon los plásmidos contruidos en nuestro laboratorio(Giono y col, 2001):

pACΔ469: esta construcción fue obtenida a partir de la digestión del plásmido pACAT con la enzima de restricción PstI, contiene la región del promotor de ALAS comprendida entre las bases -469 a +42.

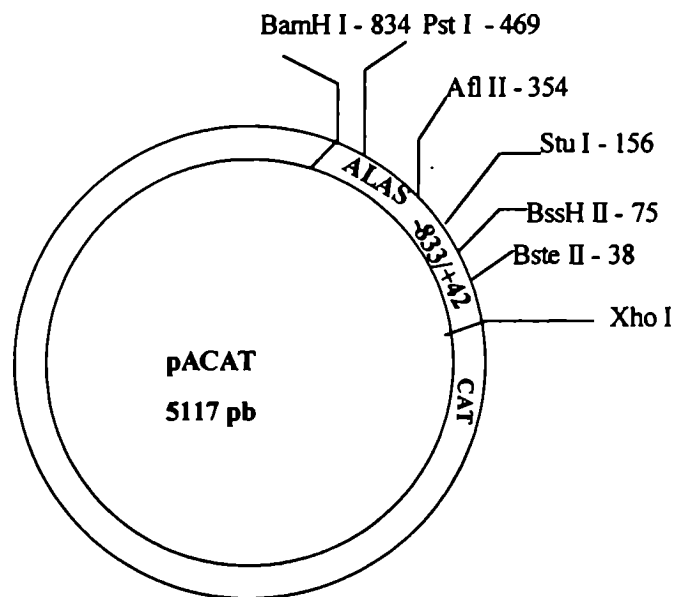
pACΔ354: esta construcción fue obtenida a partir de la digestión del plásmido pACAT

con las enzimas de restricción AflII y BamHI, contiene la región del promotor de ALAS comprendida entre las bases -354 a +42.

pAC Δ 156: esta construcción fue obtenida a partir de la digestión del plásmido pACAT con las enzimas de restricción StuI y BamHI, contiene la región del promotor de ALAS comprendida entre las bases -156 a +42.

pAC Δ 75: esta construcción fue obtenida a partir de la digestión del plásmido pACAT con las enzimas de restricción BssHII y BamHI, contiene la región del promotor de ALAS comprendida entre las bases -75 a +42.

pAC Δ 38 : esta construcción fue obtenida a partir de la digestión del plásmido pACAT con las enzimas de restricción BstEII y Bam HI, contiene la región del promotor de ALAS comprendida entre las bases -38 a +42.



Esquema del plásmido pACAT

Para evaluar la participación de la cascada de transducción de señales de Ras/MAPK en la regulación transcripcional de ALAS mediada por insulina se emplearon los plásmidos:

pCEFLSOS Δ cdc25: este plásmido expresa una mutante negativa de la proteína “son of sevenless”, que carece del dominio involucrado en la actividad intercambiadora de guanil nucleótidos específica para Ras (cedido por el Dr. O. Coso, F.C.E. y N., U.B.A. Argentina.).

pCEV29RASVAL12: esta construcción expresa una mutante constitutivamente activa de la proteína p21^{ras} que presenta la mutación en el residuo glicina 12 por valina (cedido por el Dr. O. Coso).

pCDNA I-N17RAS: este plásmido expresa una mutante dominante negativa de la proteína p21^{ras} que presenta la mutación en el residuo serina 17 por asparragina (cedido por el Dr. O. Coso).

pCDNA I c-Raf K375W: esta construcción expresa una mutante dominante negativa de la proteína Raf debido a la mutación del residuo lisina 375 por triptofano (cedido por el Dr. O. Coso).

pCDNA III-MEK-E: este vector expresa una mutante constitutivamente activa de la proteína MEK (cedido por el Dr. O. Coso).

pCDNA III-MEK-A: esta construcción expresa una mutante dominante negativa de la proteína MEK (cedido por el Dr. O. Coso)

pCDNA I HA-ERK₂ : esta construcción expresa la proteína ERK₂/MAPK murina (cedida por el Dr. J.S. Gutkind, NIDCR, National Institutes of Health, Maryland, EEUU).

pCDNA I HA-ERK₂ dead kinase: esta construcción expresa una mutante de la proteína ERK₂/MAPK murina con pérdida de la actividad de quinasa (cedida por el Dr. J.S. Gutkind).

pK3H.RSK₂: esta construcción expresa la proteína p90^{rsk2} murina (cedida por el Dr. T. Sturgill. Howard Hughes Medical Institute. Universidad de Virginia, Charlottesville, Virginia, EEUU)

pK3H-RSK₂Y707A: esta construcción expresa la proteína p90^{rsk2} murina, constitutivamente activa, debido a una mutación del residuo tirosina 707 por alanina presente en una α hélice de la porción carboxilo terminal de la quinasa, que constituye un potencial dominio autoinhibitorio (cedida por el Dr. T. Sturgill).

Para evaluar la participación de la cascada de transducción de señales de PI3K/PKB en la regulación de la expresión génica de ALAS mediada por insulina se emplearon los plásmidos

pCMV3 myc-PI3K: esta construcción expresa la subunidad catalítica p110 de la PI3K porcina (cedida por la Dra. K. Anderson. The Babraham Institute, Cambridge. Gran Bretaña)

pCMV3 myc-myrPI3K: esta construcción expresa una versión constitutivamente activa de la subunidad catalítica p110 de la PI3K porcina, conteniendo en la región amino terminal la secuencia de miristoilación/palmitoilación MGLCIKSKEDKSM. (cedida por la Dra. K. Anderson).

pCMV3 myc-PI3K R947P dead kinase: esta construcción expresa una mutante de la subunidad catalítica p110 de la PI3K con pérdida de la actividad de quinasa debido a la mutación del residuo arginina 947 por prolina (cedida por la Dra. K. Anderson).

pCEFL HA-c-Akt: este plásmido expresa la proteína Akt/PKB (cedida por el Dr. J.S. Gutkind).

pCEFLHA-c Akt K179M dead kinase: esta construcción expresa una mutante de la proteína PKB con pérdida de la actividad de quinasa debido a la mutación del residuo lisina 179 por metionina. (cedida por el Dr. J.S. Gutkind)

pCEFLHA-myr c-Akt: este plásmido expresa una versión constitutivamente activa de la proteína Akt/PKB debida al contenido de la secuencia de miristoilación. (cedida por el Dr. J.S. Gutkind).

Para identificar los factores de transcripción que intervienen en la regulación transcripcional de ALAS mediada por insulina se emplearon los plásmidos

pCEFLGST p300: esta construcción expresa la proteína p300 (cedida por el Dr. J.S. Gutkind).

pGS5CBP: este plásmido expresa la proteína CBP ("CREB binding protein") (cedida por el Dr. P. Sassone-Corsi, Estrasburgo, Francia).

pRSV A-Fos: esta construcción expresa una mutante dominante negativa de la proteína Fos, presentando una mutación en el dominio básico del zip de leucinas característico de este factor de transcripción, que le impide unirse al DNA (cedido por el Dr. C Vinson, NCI, National Institutes of Health, Maryland, EEUU).

pRSV A-CREB: esta construcción expresa una mutante dominante negativa de la proteína CREB (cAMP response element binding protein). presentando una mutación en el dominio básico del zip de leucinas característico de este factor de transcripción, que le impide la unión al DNA (cedido por el Dr. C Vinson).

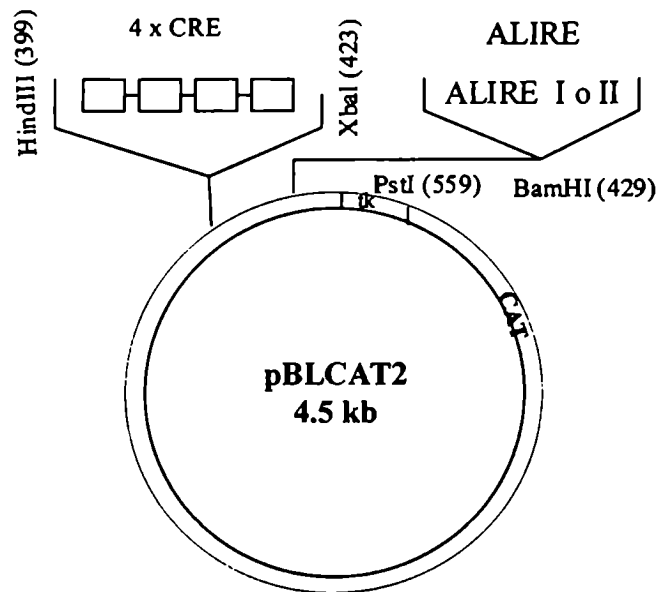
pRSV A-C/EBP: esta construcción expresa una mutante dominante negativa de la proteína C/EBP (“CAAT/enhancer binding protein”) presentando una mutación en el dominio básico del zip de leucinas (bzip) característico de este factor de transcripción, que le impide la unión al DNA (cedido por el Dr. C. Vinson)

pRBT7mHNF3 α : esta construcción expresa el “factor nuclear hepático 3 alfa” murino (cedido por el Dr. K. Zaret, Filadelfia, EEUU).

pCMV HNF3 β : esta construcción expresa el “factor nuclear hepático 3 beta” de rata (cedido por el Dr. R. Costa, Illinois, EEUU).

4.2 Construcción de vectores de expresión

pALIRE-CAT, pALIRE I-CAT y pALIREII-CAT



Con la finalidad de analizar el efecto de los elementos ALIRE, ALIRE I y ALIRE II en un promotor eucariota heterólogo se construyeron los plásmidos pALIRE-CAT, pALIRE I-CAT y pALIRE II CAT.

Los fragmentos ALIRE (115 pb), ALIRE I (40 pb) y ALIRE II (40 pb) que comprenden las regiones -469/-354; -459/-409 y -410/-370 del promotor de ALAS respectivamente, fueron subclonados en el sitio BamHI del plásmido 4XCRE-CAT. El p4XCRE-CAT deriva del plásmido progenitor pBLCAT2 (Luckov y Schultz, 1987) al que se le insertaron cuatro elementos CRE del gen de somatostatina espaciados por 3

nucleótidos (G) entre sí, en los sitios HindIII/XbaI del “polinker” (cedida por el Dr. P. Sassone-Corsi, Estrasburgo, Francia).

Se digirieron 25 µl (10 µg) del vector p4XCRE-CAT con 3 µl (10 U/µl) de la enzima de restricción BamHI, en una mezcla conteniendo 4 µl (100 µg/ml) de BSA, 4 µl de buffer 1 (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM y NaCl 150 mM, DTT 1 mM pH 7,9) y H₂O c.s.p. 40 µl durante 3 horas y por último se inactivó la enzima durante 20 minutos a 80 °C.

Para el subclonado de los fragmentos portadores de extremos romos ALIRE I y ALIRE II en el p4XCRE-CAT fue necesario rellenar los extremos 3' recesivos generados en el vector luego de la digestión con BamHI. La totalidad del vector digerido, se incubó con 3 µl (5,8 U/µl) de T₄ DNA polimerasa (fragmento Klenow), 0,7 µl de BSA, 7 µl de una mezcla de dNTPs 10X (1mM), 7 µl de buffer de reacción 10X [Tris-HCl (pH 8) 500 mM, MgCl₂ 100 mM y NaCl 500 mM] y H₂O c.s.p. 70 µl durante 20 minutos a 12 °C.

El producto de la digestión y “filling in” fue incubado con 1 µl (1 U/µl) de fosfatasa alcalina y 7,5 µl de buffer (Promega) durante 15 minutos a 37 °C y 15 minutos a 56 °C. Luego se agregó una segunda alícuota de enzima y se repitieron las incubaciones durante los mismos tiempos y temperaturas. La reacción fue detenida con “stop buffer” [(Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,5), SDS 0,5 % y NaCl 200 mM)] en una proporción de 300 µl por cada 50 µl de incubado. La mezcla de reacción se sometió a una extracción con fenol y a otra con fenol/cloroformo 1:1 y la recuperación del DNA presente en la fase acuosa se realizó mediante precipitación con 0,5 volumen de acetato de amonio 7,5 M (pH 5,5) y 2 volúmenes de etanol absoluto.

El fragmento ALIRE fue escindido del plásmido pACAT por digestión con las enzimas PstI y AflII y el producto de la digestión fue separado en un gel preparativo de agarosa “low melting” 1 %. Posteriormente, el fragmento de 115 pb fue eluido y purificado empleando el kit Gene Clean II. Por último, los extremos 3' recesivos generados en ALIRE fueron rellenados por el método de “filling in”

Para la ligación se incubaron 0,025 pmoles del vector 4XCRECAT (4,5 kb) defosforilado (1 µg de 1000 pb DNA=1,52 pmoles DNA) con 0,175 pmoles del fragmento ALIRE (115 pb), ALIRE I (40 pb) o ALIRE II (40 pb), 0,5 µl de T₄ DNA ligasa y 1 µl de buffer de ligación 10X durante la noche a 16 °C.

Los productos de ligación fueron empleados para transformar *E.coli*, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Los plásmidos aislados de las transformantes fueron

sometidos a digestiones con HindIII y PstI. Estas enzimas cortan al p4xCRECAT en los nucleótidos 399 y 559 respectivamente, liberando un fragmento de 160 pb o de 275 en el caso de la incorporación de ALIRE y de 160 pb o de 200 pb en el caso de la incorporación ALIRE I o ALIRE II. Debido a la escasa diferencia de apenas 115 pb o 40 pb entre el vector solo y el plásmido conteniendo el inserto, los fragmentos escindidos luego de la digestión fueron detectados por tinción con bromuro de etidio de un gel de poliacrilamida. Las muestras digeridas fueron sembradas en un gel de poliacrilamida 8%, que resuelve DNAs de tamaños comprendidos entre 40 y 600 pb y corridas electroforéticamente a 100V durante 4 horas. Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ ml) durante 45 minutos y las bandas visualizadas por fluorescencia al U.V. En todos los casos la fidelidad de los plásmidos recombinantes fue confirmada por secuenciación.

5. Preparación de plásmidos

5.1 Preparación de bacterias competentes

Se inocularon 2 ml de medio LB líquido (extracto de levadura 5 g, peptona 10 g, NaCl 5 g, H₂O c.s.p. 1.000 ml) con bacterias *Escherichia coli* XL blue o DH5α e incubaron a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se diluyó el cultivo con 50-60 ml de medio LB y se incubó durante 3-4 horas a 37 °C hasta que alcanzó la fase exponencial de crecimiento. Se enfrió el cultivo en hielo y se centrifugó a 5.000 x g durante 5 minutos. El pellet de bacterias fue resuspendido en 10 ml de CaCl₂ 60 mM fría y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó nuevamente a 5.000 x g y el pellet celular se resuspendió en una solución de CaCl₂ 60 mM conteniendo glicerol 15 %. Las bacterias fueron almacenadas a -70 °C.

5.2 Transformación de bacterias competentes

Cien µl de bacterias competentes se mezclaron con 0,5 µl (1 µg/µl) de DNA plasmídico en un tubo eppendorf estéril y se incubaron durante 45 minutos a 0 °C para permitir la adsorción del DNA sobre las células. Las bacterias fueron sometidas a un shock térmico a 42 °C durante 2 minutos para favorecer la entrada del DNA. Luego de mantener la preparación 10 minutos a temperatura ambiente, se agregó un ml de LB y se incubó

durante 45 minutos a 37 °C con agitación. El cultivo fue centrifugado a 5.000 x g durante 5 minutos, se retiraron 0,8 ml del sobrenadante y el pellet fue resuspendido en los 0,2 ml restantes. Luego las bacterias se plaquearon en cajas de Petri conteniendo LB agar 1,5 % con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante 16 horas en estufa a 37 °C.

5.3 Preparación de plásmidos en baja escala

Se empleó el método descrito por Birnboim y Doly (1979). Las bacterias transformadas con el plásmido a aislar fueron inoculadas en 2 ml de medio LB conteniendo ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C con agitación. Se transfirió el cultivo a un tubo eppendorf y se centrifugó a 5.000 x g durante 3 minutos. El sobrenadante fue retirado por aspiración y el pellet de bacterias se resuspendió en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10mM). Se adicionaron 200 µl de solución II de lisis (NaOH 0,2 M y SDS 1 %), se mezcló suavemente por inversión y mantuvo en hielo por 15 minutos. Posteriormente se neutralizó con la solución III (acetato de potasio 3 M pH 5,2) agitando rápidamente y manteniendo en hielo por 15 minutos. Se centrifugó a 10.000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante límpido se transfirió a un tubo eppendorf. Se efectuaron dos extracciones sucesivas. La primera, en un volumen de fenol saturado en buffer Tris 100mM pH 8, la segunda, en un volumen de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1, agitando con vortex y centrifugando durante 5 minutos cada vez. Por último, el plásmido presente en la fase acuosa se precipitó agregando 2 volúmenes de etanol absoluto frío a -20 °C durante 20 minutos. Se centrifugó a 10.000 x g por 10 minutos y el pellet se lavó con etanol 75 %. Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió en 20 µl de agua destilada.

5.4 Preparación de plásmidos en gran escala

Los plásmidos empleados en los ensayos de transfección fueron preparados utilizando el kit de maxipreparación plasmídica Wizard Plus de Promega. Las bacterias transformadas con el plásmido a aislar fueron inoculadas en 300-600 ml de medio LB conteniendo ampicilina (100 µg/ml) e incubadas durante 12-16 horas. Luego, el cultivo fue centrifugado a 5.000 x g durante 10 minutos y el pellet celular fue resuspendido en 15 ml de solución de resuspensión (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, RNasa 100 µg/ml). Se adicionaron luego 15 ml de solución de lisis (NaOH 0,2 M SDS 1 %) y se mezcló

suavemente por inversión hasta que la solución estuviera límpida y viscosa. A continuación se agregaron 15 ml de solución de neutralización (acetato de potasio 1,32 M pH 4,8) mezclando inmediatamente por inversión. Se centrifugó a 14.000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se filtró a través de tres capas de gasa de algodón a un tubo falcon. El DNA plasmídico se precipitó con 0,5 volumen de isopropanol a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14.000 x g por 15 minutos, descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 2 ml de agua destilada. La preparación plasmídica se purificó con la resina provista por el kit, se lavó la columna con la solución de lavado (acetato de potasio 80 mM, Tris-HCl 8,3 mM pH 7,5, EDTA 40 μ M) y posteriormente con etanol 80 %. El plásmido fue eluido con 1,5 ml de agua destilada a 65-70 °C y fue esterilizado a través de un filtro de poro 0,22 μ m.

5.5 Análisis de las preparaciones plasmídicas

Las preparaciones plasmídicas fueron analizadas con el fin de determinar la cantidad y calidad de las mismas.

En primer lugar las preparaciones plasmídicas fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 0,8-1 % en buffer TAE (Tris acético 0,04 M, EDTA 1mM) conteniendo bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g/ml. Las muestras fueron preparadas en buffer de siembra 6X(azul de bromofenol 0,25 %, xilene cianol FF 0,25% y glicerol 30%) y colocadas en los correspondientes pocillos del gel. Simultáneamente se sembró una calle con 200 ng del marcador de peso molecular y masa fago λ digerido con EcoRI y HindIII. La corrida electroforética fue desarrollada en buffer TAE 0,5X a 100 mV durante 45-60 minutos. Las bandas de DNA plasmídico fueron observadas por fluorescencia al UV.

Posteriormente los plásmidos fueron cuantificados espectrofotométricamente midiendo las absorbancias a 260 nm (1 DO = 50 μ g/ml de DNA) y a 280 nm. Se aceptó como criterio de pureza del DNA a una relación A_{260nm} / A_{280nm} mayor que 1,5 (Sambrook y col, 1989).

6. Determinación de la actividad transcripcional del promotor de ALAS

6.1 Transfección de células en cultivo

El día previo a la transfección las células HepG2 fueron tripsinizadas y plaqueadas en cajas de seis pocillos de 3,5 cm de diámetro a una densidad de 5×10^5 células por pocillo en 2,5 ml de medio. Al día siguiente y cuatro horas antes de la transfección, el medio fue reemplazado por uno fresco. El DNA plasmídico fue introducido a las células mediante el método estándar de precipitación con fosfato de calcio (Chen y Okayama, 1988). Por cada pocillo a transfectar se preparó un tubo conteniendo 150 μ l de HeBS 2X (Hepes 1 % pH 7, NaCl 1,6 %) y 3 μ l de buffer fosfato (Na_2HPO_4 0,06 M, NaH_2PO_4 0,07 M). Por otro lado, se prepararon las distintas soluciones de plásmidos en 20 μ l de CaCl_2 2 M y H_2O c.s.p. 147 μ l. Las distintas preparaciones plasmídicas se agregaron lentamente a la solución de fosfato de sodio, mientras se burbujeaba con un pipeteador automático. Se dejó reposar 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del precipitado y se agregaron a cada pocillo 250 μ l de la correspondiente preparación de DNAs. Se dejó recuperar a las células en medio completo aproximadamente por 20 horas. Al cabo de este período, las células fueron lavadas con PBS y cultivadas con 2,5 ml de medio libre de suero. En este momento se agregaron las drogas correspondientes a cada experimento prolongándose la incubación por 24 horas más.

La cantidad final de DNA fue ajustada en todos los casos a 20 μ g por pocillo, la que fue completada con cantidad necesaria de DNA “carrier” (DNA genómico de hígado de rata).

6.2 Preparación de extractos celulares

Las células fueron lavadas 3 veces con 2 ml de PBS frío. Se agregó luego 1 ml de TEN frío (Tris 20mM pH 8, NaCl 100 mM y EDTA 1mM) para favorecer el despegado de las células. La monocapa celular fue levantada mediante el empleo de un “rastrillo de células” y cosechada en tubos eppendorf. Las células fueron centrifugadas a $1.000 \times g$ durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado por aspiración y el pellet celular resuspendido en 200 μ l de buffer Tris 250 mM pH 7,5 conteniendo glicerol 15 %. Las células fueron lisadas sometiéndolas a 3 ciclos consecutivos de 5 minutos cada uno de congelamiento/descongelamiento en baño de etanol/hielo seco y baño de agua a 37 °C,

respectivamente, agitando vigorosamente cada vez. Finalmente, los tubos se centrifugaron a $1.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C para eliminar el debris celular. El sobrenadante así obtenido se dividió en tres alícuotas para la posterior determinación de proteínas, actividad de β -galactosidasa y actividad de cloramfenicol acetil transferasa (CAT).

6.3 Determinación de proteínas

La cuantificación de proteínas presentes en los extractos celulares fue realizada por el método colorimétrico de Bradford (1976). Se utilizaron 2 ml de reactivo de Bradford y 30 μl de extracto celular, midiéndose la absorbancia a 595 nm. Se efectuó una curva de calibración empleando hasta 12 μg de seroalbúmina bovina. La relación μg de proteína/ $A_{595\text{ nm}}$ fue obtenida por regresión lineal.

6.4 Determinación de la actividad de β -galactosidasa

La actividad de la enzima β -galactosidasa se determinó mediante un ensayo colorimétrico donde se cuantificó el sustrato cromogénico liberado por hidrólisis. La reacción se llevó a cabo en una mezcla conteniendo 50-65 μl del extracto, 1 ml de buffer PM2 (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM y MgSO_4 1 mM), 0,25 ml de una solución del sustrato ortonitrofenil β galactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml en PM2 y 0,7 μl de β -mercaptoetanol. La reacción se desarrolló a 37°C hasta la aparición de color amarillo, aproximadamente luego de 3-4 horas. Se registró el tiempo de reacción y se midió la absorbancia a 420 nm. La actividad específica de la enzima β -galactosidasa fue calculada según: $(A_{420\text{nm}} \text{ muestra} - A_{420\text{nm}} \text{ control})/\mu\text{l} \times \text{hora}$.

6.5 Determinación de la actividad de Cloramfenicol acetil transferasa

La actividad de la enzima CAT fue determinada según el método descripto por Seed y Sheen (1988). El extracto celular fue previamente calentado a 65°C durante 5 minutos, con el propósito de inactivar las acetilasas endógenas. Se enfrió inmediatamente en hielo y se centrifugó 15 minutos a $1.500 \times g$ a 4°C para eliminar las proteínas desnaturalizadas. La actividad CAT fue realizada en 50 μl de sobrenadante en una mezcla de reacción conteniendo Tris 100 mM pH 8, butiril-CoA 0,25 mg/ml y 200 nCi de cloramfenicol ^3H (60 Ci /mmol, 0,01 mCi/ml) e incubando entre 90-120 minutos. La reacción fue detenida por el agregado de 200 μl de xileno. Luego de agitar vigorosamente, los incubados fueron

centrifugados a 10.000 x g durante 15 minutos. Se separó la fase orgánica, la que fue sometida a una extracción reversa mediante el agregado de 200 µl de H₂O. Luego de agitar y centrifugar bajo las mismas condiciones, la fase orgánica resultante, conteniendo los derivados butirilados de cloramfenicol -³H, fue colocada en viales con líquido centellante a base de tolueno (PPO 0,4 %, dimetil POPOP 0,05 % en tolueno) contándose la radioactividad en un contador de centelleo líquido. La actividad específica de CAT se determinó como (dpm muestra - dpm control pBLCAT6)/µl x minuto. Las unidades CAT fueron normalizadas contra las unidades β-gal, para ajustar los resultados de acuerdo con la eficiencia de transfección en cada caso.

6.6 Estudios con oligonucleótidos antisense u oligonucleótidos doblecadena consenso a elementos del DNA actuando en “cis” para factores de transcripción

Las células HepG2 transfectadas por la metodología descrita anteriormente, fueron incubadas en medio libre de suero y tratadas con oligonucleótidos antisense (ASONS) u oligonucleótidos doble cadena (DSONS) consenso para factores de transcripción a una concentración final de 2µM. Los DSONs fueron apareados previamente de acuerdo al método que se detalla en la sección 8.4. Simultáneamente se agregaron las drogas correspondientes a cada experimento y se prolongó la incubación por 24 horas más.

Se usaron los siguientes oligonucleótidos:

HNF3 superior: 5'-GCCCATTGTTTGTTTTAAGCC-3'

HNF3 inferior: 5'-GGCTTAAACAAACAATGGGC-3'

HNF3 superior mutado: 5'-GCCCATTGGGCCATTTAAGCC-3'

HNF3 inferior mutado: 5'-GCCTTAAATGGCCCAATGGGC-3'

HNF3 antisense: 5'-CGGCTCGTGCCCTTCCATCTTCAC-3' complementario a los codones 5 al 12 del mRNA del HNF3β humano.

NF1 superior: 5'-GGCACCTGTTTCAATTTGGCACGGAGCCAACAG-3'

NF1 inferior: 5'-CTGTTGGCTCCGTGCCAAATTGAAACAGGTGCC-3'

NF1 superior mutado: 5'-GGCACCTGTTTCAATTTGTTACGGATTCAACAG-3'

NF1 inferior mutado: 5'-CTGTTGAATCCGTAACAAATTGAAACAGGTGCC-3'

NF1 antisense: 5'-CAGTGCCTCGATGAACGGGTGGAA-3' complementario a los codones 4 al 11 del mRNA del NF1 humano.

7. Ensayo de la actividad de quinasa “*in vitro*”

7.1 Obtención de extractos

Las células HepG2 se plaquearon a una densidad de $2,5-3 \times 10^6$ células por caja de 6 cm de diámetro en 5 ml de medio. El día de la determinación, luego de una incubación de 24 horas en medio libre de suero, el medio fue reemplazado por medio fresco sin suero. Las células fueron incubadas entre 0 y 30 minutos con insulina 10^{-8} M. Se aspiró el medio y se lisaron las células con 0,6 ml de buffer de lisis (Tris-ClH 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton 1 %, pirofosfato de Na 2,5 mM, β -glicerolfosfato 1mM, Na_3VO_4 1 mM, leupeptin 1 $\mu\text{g/ml}$). El lisado fue centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos.

7.2 Actividad de quinasa

La actividad de quinasa se determinó midiendo la capacidad de la enzima para fosforilar a la proteína mielina básica (MBP) utilizada como sustrato. Un ml del sobrenadante fue colocado en un eppendorf conteniendo el correspondiente anticuerpo (0,2-2 μg) e incubado durante una hora. Se emplearon anticuerpos monoclonales que detectan fosfo-p44/42 MAPK (treonina202/tirosina204) humana y fosfo-Akt (treonina308) murina que presenta inmunoreactividad cruzada con la humana, ambos de New England BioLabs. Posteriormente se agregaron 20 μl de proteínas A/G conjugadas a agarosa (“immunobeads”) y se incubó durante toda la noche a 4 °C con rotación. Se aislaron los complejos inmunes centrifugando a $1.000 \times g$ por 5 minutos y aspirando cuidadosamente el sobrenadante. Los precipitados se lavaron una vez con PBS, NP40 1 % y Na_3VO_4 2 mM; una vez con TrisHCl 100 mM pH 7,5 y LiCl 0,5 M y tres veces con buffer de reacción de quinasa (MOPS 12,5 mM pH 7,5, β -glicerolfosfato 12,5 mM, MgCl_2 7,5 mM, EGTA 0,5 mM, NaF 0,5 mM, Na_3VO_4 0,5 mM). Los complejos inmunes se resuspendieron en: 30 μl buffer de reacción de quinasa, 1 μl DTT 100 mM, 1 μl ATP 1 mM, 1 μl [γ - ^{32}P]ATP 1 mM (150 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) y 4 μl MBP (5 mg/ml). Luego las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 30 °C, deteniéndose la reacción con buffer desnaturizante. Se hirvieron durante 2-3 minutos, se centrifugaron y los sobrenadantes se sometieron a electroforesis en gel de SDS-PAGE 15%.

7.3 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida

Los sobrenadantes conteniendo los complejos inmunes disociados por calentamiento en buffer desnaturalizante (Tris 50 mM, SDS 2%, β -mercaptoetanol 2 %, glicerol 20 %, EDTA 1mM y azul de bromofenol) se sembraron en un gel de poliacrilamida 15 % (Laemli, 1970) en condiciones desnaturalizantes. Se prepararon las siguiente soluciones para armar la porción inferior y superior del gel: acrilamida/bisacrilamida (30 %) acrilamida 29,2 g / bis (N,N' metilen-bis-acrilamida) 0,8 g, persulfato de amonio 10%, Tris 1,5M pH 8,8, SDS 0,4% (porción inferior), Tris 0,5M pH 6,8, SDS 0,4 % (porción superior). El gel se preparó como se detalla:

Gel inferior (separador) 15 %		Gel superior (concentrador) 3%	
Acr/ bis	5,00 ml	Acr/ bis	0,50 ml
Tris	5,00 ml	Tris	1,25 ml
APS	2,50 ml	APS	0,02 ml
TEMED	0,01 ml	TEMED	0,01 ml
H ₂ O	2,50 ml	H ₂ O	3,25 ml

Se sembraron las muestras y se corrieron a 150 V durante 2,5-3 horas en buffer de corrida a pH 8,3 (10X: 30 g Tris 0,25 M, 174 g glicina 2,32 M, 10 ml SDS 10 % por litro). Por último, se secó el gel y se expuso con films Kodak (X-OMAT XAR-2) durante toda la noche a -70 °C en cassette radiográfico con pantalla intensificadora. La radioactividad incorporada en la fosforilación de la proteína MBP fue visualizada por autoradiografía.

8. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

8.1 Preparación de núcleos

Los extractos nucleares fueron preparados de acuerdo a la metodología descripta por Andrews y Faller (1991). Las células HepG2 fueron plaqueadas a una densidad de 2,5-3,0

$\times 10^6$ células por caja de 9 cm de diámetro en 10 ml de medio. El día del ensayo, luego de una incubación de 24 horas en medio libre de suero, se reemplazó el medio por medio fresco sin y se incubaron las células durante 10 minutos con insulina 10^{-8} M. Se aspiró el medio y las células fueron despegadas con PBS y el uso de un “rastrillo de células”. Las células se transfirieron a eppendorf y centrifugaron 10 segundos a 1.000 x g. El pellet celular se resuspendió en 400 μ l de buffer A frío (Hepes-KOH 10 mM pH 7,9, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,2 mM). Las muestras fueron enfriadas durante 10 minutos en hielo y pasadas por jeringa con aguja de 0,25 g. Luego se centrifugaron 10 segundos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 μ l de buffer C frío (Hepes-KOH 20 mM pH 7,9, NaCl 420 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, glicerol 25 %, EDTA 0,2 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,2mM) e incubó 20 minutos en hielo. Finalmente, se centrifugó 2 minutos a 4 °C y el sobrenadante, conteniendo las proteínas que se pegan al DNA se conservó a -70 °C en alícuotas de 150 μ g de proteínas/eppendorf.

Las proteínas presentes en los sobrenadantes celulares fueron determinadas por el método colorimétrico de Bradford. Se utilizaron 2 ml de reactivo de Bradford y 2 μ l de extracto nuclear, se agitó con vortex y midió la absorbancia a 595 nm. Se efectuó una curva de calibración empleando hasta 60 μ g de seroalbúmina bovina. La relación μ g de proteína/ A_{595nm} se obtuvo por regresión lineal. El rendimiento fue aproximadamente de 5,0-7,5 μ g de proteína/ μ l.

8.2 Tratamiento de extractos nucleares con fosfatasa alcalina

Los extractos nucleares de las células HepG2 fueron incubados con 2 unidades (1 U/ μ l) de fosfatasa alcalina por cada 15 μ g de proteínas, buffer 10X (Promega) y 0,3X buffer NUN (NaCl 0,3 M, urea 1 M, Nonidet P-40 1% y hepes 25 mM pH 7,9) durante 3 horas a 37 °C. La fosfatasa alcalina fue inactivada posteriormente mediante el tratamiento de las muestras con los inhibidores Na_3VO_4 5 mM y β -glicerolfosfato 30 mM durante 4 horas a 37 °C. Los extractos control fueron incubados en el buffer de reacción en ausencia de la enzima a 37 °C durante el mismo período.

8.3 Oligonucleótidos utilizados

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos en sentido 5'-3':

ALIRE I superior: GCATCTCTTCACCAGGACCATTCTATTCTTGGGCCATTCA

ALIRE I inferior: TGAATGGCCCAAGAATAGAATGGTCCTGGTGAAGAGATGC
ALIRE II superior: TCAAGTAAAGAATCCCTGTCATCGATGCAAACAAAACCAA
ALIRE II inferior: TTGGTTTTGTTTGCATCGATGACAGGGATTCTTTACTTGA
ALIRE II mutado sup: TCAAGTAAAGAATCCCTGTCATCGATGCAAACGATACCAA
ALIRE II mutado inf: TTGGTATCTTTGCATCGATGACAGGGATTCTTTACTTGA
HNF3 β PEPCK superior: GCACTAGCAAAACAAACTTATTTTGAACACGA
HNF3 β PEPCK inferior: TCGTGTTCAAATAAGTTTGTGTTTGCTAGTGC
NF-1 superior: CGATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAACGAT
NF-1 inferior: ATCGTTATCATATTGGCTTCAATCCAAAATCG
CRE superior: AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG
CRE inferior: CTAGCTCTCTGACGTCAGGCAATCTCT
AP-1 superior: CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA
AP-1 inferior: TTCCGGCTGACTCATCAAGCG

8.4 Apareamiento

Los oligonucleótidos se resuspendieron en agua estéril a una concentración final de 500 nM. Para la reacción de apareamiento se colocaron 5 nmoles del oligonucleótido ALIRE I superior y 5 nmoles del oligonucleótido ALIRE I inferior en un eppendorf y se llevó a un volumen final de 100 μ l con buffer de apareamiento (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM, glicerol 40%). El mismo procedimiento se realizó con todos los oligonucleótidos utilizados. Las preparaciones se calentaron a 95 °C y se dejaron enfriar muy lentamente hasta 30 °C. Luego, se mantuvieron 1 hora a 30 °C, 3 horas a 4 °C y se conservaron a -20 °C.

8.5 Marcación de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos doble cadena (DSO) fueron marcados radioactivamente en su extremo 5' mediante una reacción enzimática con la T₄ polinucleótido quinasa. La mezcla de reacción conteniendo 10 pmoles de oligonucleótido doble cadena, el buffer de reacción, 5 U de T₄ polinucleótido quinasa, [γ -³²P]ATP 50 μ Ci (6000 Ci/mmol, 150 μ Ci/ μ l) fue

preparada en un volumen total de 20 μ l. Esta preparación se incubó 30 minutos a 37 °C y se detuvo calentando durante 10 minutos a 65°C.

Las sondas así obtenidas fueron purificadas para eliminar los nucleótidos radioactivos no incorporados según la metodología descrita por Garabedian y col (1992) para separar DNA marcado de precursores radioactivos. El fondo de una jeringa descartable de 1 ml fue ocluido con poca cantidad de lana de vidrio y posteriormente rellena con Sephadex G-50 equilibrado en buffer TEN (Tris-ClH 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM) en una proporción de 1 g Sephadex G-50 con 10 ml de TEN. La jeringa se centrifugó varias veces a 1.600 x g durante 4 minutos a temperatura ambiente hasta que la matriz quedara compactada. La columna fue lavada 3 veces con 0,1 ml de buffer TEN y guardada a 4 °C hasta el momento de su utilización.

La muestra de DNA marcado radiactivamente se llevó a un volumen de 0,1 ml con buffer TEN y se agregó a la columna de Sephadex G-50. La jeringa fue colocada dentro de un tubo plástico de 15 ml conteniendo un eppendorf en su interior, donde fue recolectado el eluido luego de la centrifugación a 1.600 x g. Una alícuota de la sonda se colocó en un vial con líquido centellante a base de tolueno y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Las sondas así preparadas poseían una actividad específica aproximada de $3-4,5 \times 10^3$ cpm/fmol.

8.6 Interacción DNA-proteínas y competencia

La interacción proteína-DNA fue llevada a cabo en una mezcla conteniendo 10 μ l buffer de "binding" 2X (Tris-HCl 100 mM pH 7,9, MgCl₂ 25 mM, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, glicerol c.s.p. 40 %), entre 5-20 μ g de extracto nuclear, 3 μ g poli dIdC, 2×10^5 cpm oligonucleótido marcado radioactivamente (0,07-0,1 pmoles) y c.s.p 20 μ l H₂O durante 30 minutos a temperatura ambiente.

En los ensayos donde se efectuaron competencias, el DNA competidor fue agregado 20 minutos antes que el oligonucleótido marcado radioactivamente a una concentración entre 20 a 500 veces mayor que la molaridad de la sonda, según se detalla en cada experimento.

8.7 Separación de los complejos DNA-proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida

Los incubados resultantes del paso anterior fueron sembrados en un gel de poliacrilamida 5 % precorrido durante una hora a 80 V en buffer TBE 0,25X. El gel 5 % fue preparado utilizando las siguientes soluciones: 3,5 ml de acrilamida/bisacrilamida (30 %): acrilamida 29,2 g / bis (N,N' metilen-bis-acrilamida) 0,8 g, 1 ml de TBE 5X (54 gr de Tris-base, 27,5 gr de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 por litro), 4 ml de glicerol, 0,2 ml de persulfato de amonio 10 %, 0,2 ml de TEMED y c.s.p. 20 ml H₂O. La corrida electroforética fue llevada a cabo a 180 V durante 2,5 -3,5 horas en buffer TBE 0,25X

El gel fue secado y expuesto a films Kodak (X-OMAT XAR-2) durante toda la noche a -70 °C en cassette radiográfico con pantalla intensificadora. El pegado de complejos de proteínas a elementos presentes en el promotor de ALAS fue visualizado por autoradiografía.

A - Acción de la insulina sobre la expresión de ALAS

1 - La insulina inhibe la expresión de ALAS en hepatocitos de rata

1.1 Efecto de la insulina

Existen varios datos bibliográficos donde se describe la acción de la insulina modificando la actividad de numerosas enzimas (Messina y col, 1992; Welsh y col, 1994). En nuestro laboratorio hemos obtenido resultados donde la hormona inhibió la actividad de ALAS (Cánepa y col, 1989; Scassa y col, 1998).

La finalidad de este trabajo fue determinar el mecanismo por el cual la insulina ejerce la regulación de ALAS. Con el objetivo de establecer si este efecto se observa a nivel transcripcional, se analizó la acción de la insulina sobre la expresión del gen de ALAS. Para ello, cultivos primarios de hepatocitos de rata en condiciones basales o estimulados con fenobarbital fueron tratados con insulina 10^{-8} M y los niveles del mRNA de ALAS fueron determinados por Northern blot. La presencia de insulina provocó una disminución de cinco veces en los niveles basales del mRNA de ALAS y nueve veces en los de los hepatocitos expuestos a la droga porfirinogénica.

Los niveles del mRNA de β -tubulina fueron detectados en paralelo, con el fin de normalizar la cantidad de RNA total presente en cada calle del gel (control de siembra). Este gen fue elegido por ser de expresión constitutiva y no presentar regulación por insulina ni por fenobarbital en el sistema de células empleado (Figura 1).

1.2 La acción inhibitoria de la insulina es dosis dependiente

La variación de los niveles del mRNA de ALAS en función de la concentración de insulina fue analizada tanto en condiciones basales como estimuladas con fenobarbital. La insulina fue efectiva dentro de un rango de concentraciones comprendido entre 10^{-11} y 10^{-6} M. El mayor efecto inhibitorio fue observado a una concentración de 10^{-8} M o mayor. La dosis necesaria, en ambas condiciones, para alcanzar el 50 % del efecto (ID_{50}) correspondió aproximadamente a 5×10^{-11} M (Figura 2).

1.3 Curva de tiempo

Los cambios en los niveles del mRNA de ALAS fueron estudiados a lo largo del tiempo en condiciones basales y de estimulación por fenobarbital. Con esta finalidad, se preincubaron suspensiones de hepatocitos de rata durante 2,5 horas en presencia o ausencia de fenobarbital, luego de las cuales se determinaron los niveles del mRNA de ALAS en presencia o ausencia de insulina 5 nM a los tiempos indicados en las figuras 3 A y B. El

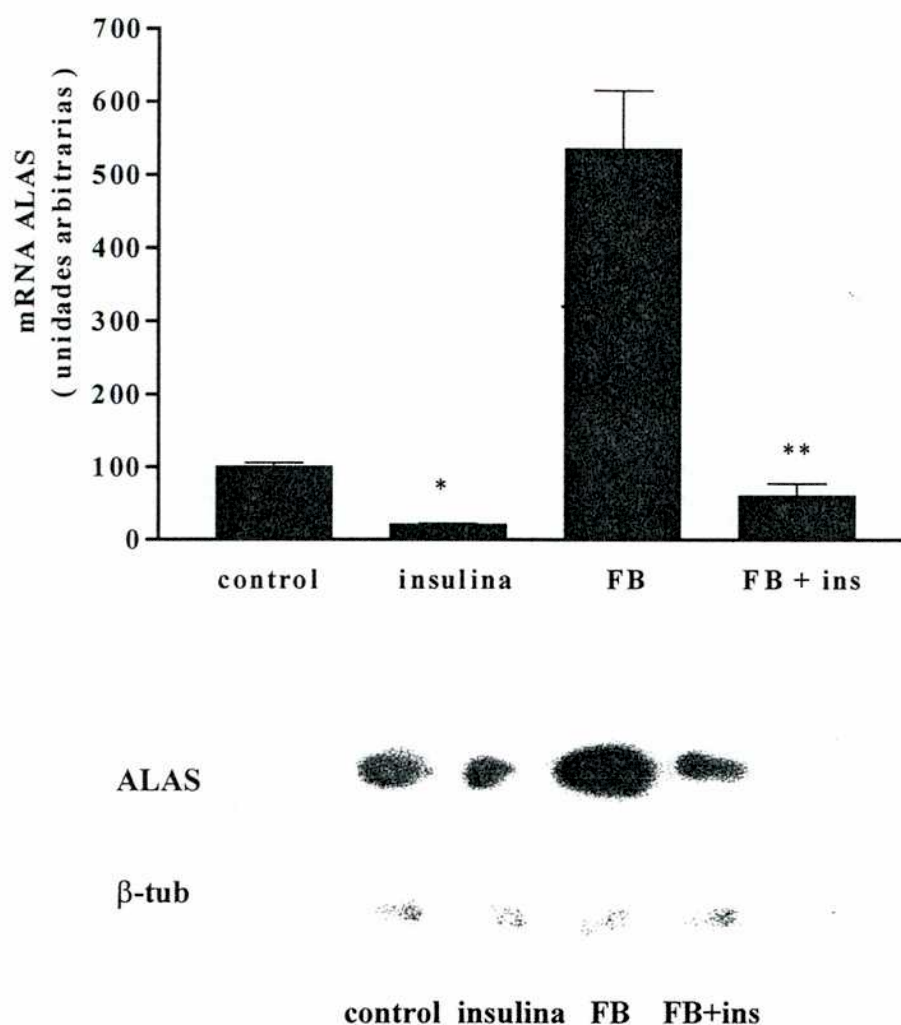


Figura 1 Efecto de la insulina sobre el mRNA de ALAS: Las suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 3 horas con los agregados indicados en la figura. La cuantificación de los niveles del mRNA de ALAS se realizó mediante el análisis de los ensayos de Northern blot como se describe en Materiales y Métodos. Las autorradiografías muestran un experimento representativo. Las señales autorradiográficas cuantificadas por densitometría se presentan como gráfico de barras normalizadas con las de β -tubulina. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar la muestra conteniendo insulina con la muestra control (* $P < 0,01$) y la muestra conteniendo fenobarbital e insulina con la muestra con fenobarbital solo (** $P < 0,05$). FB, fenobarbital 0,6 mM. ins, insulina 10^{-8} M.

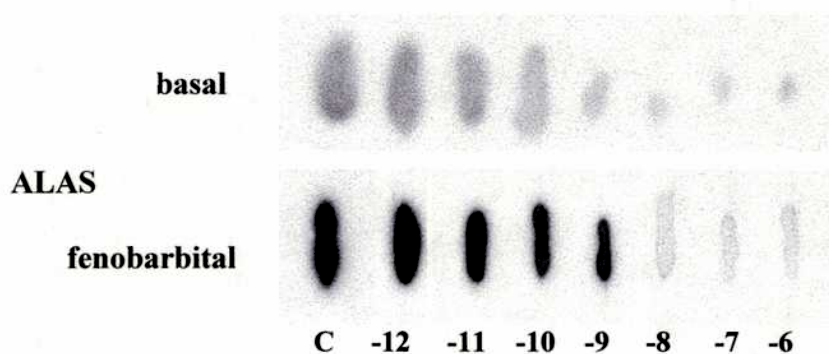
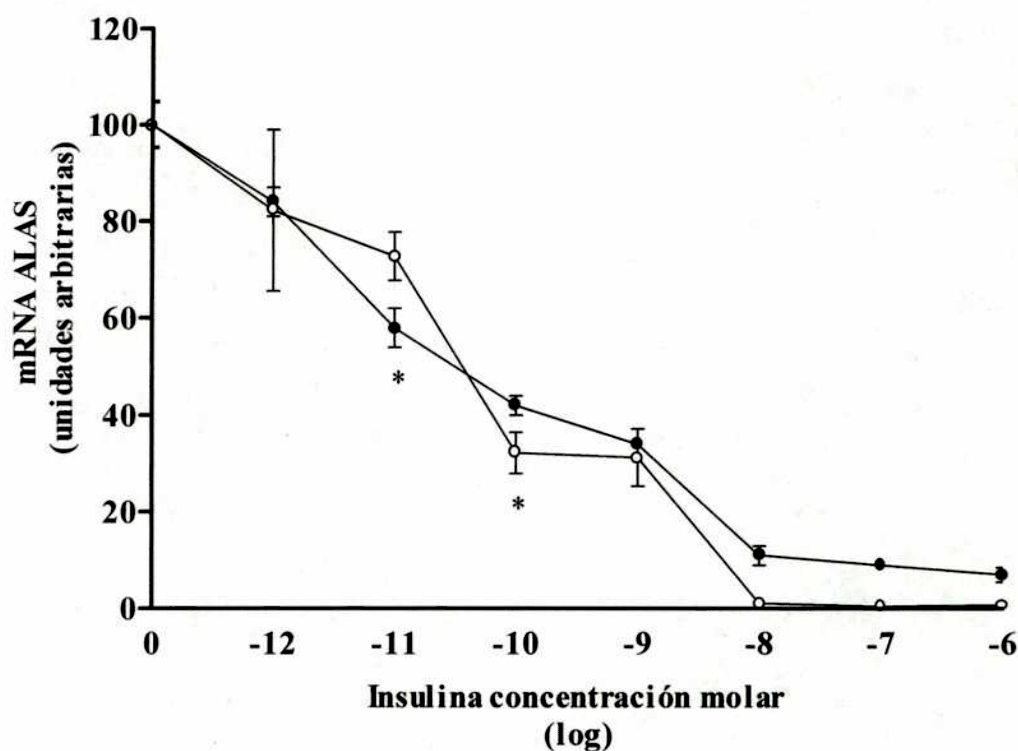


Figura 2 Curva dosis respuesta de insulina sobre los niveles del mRNA de ALAS: Las suspensiones de hepatocitos fueron preincubadas durante 2,5 horas en ausencia (o) o en presencia (●) de fenobarbital 0,6 mM, posteriormente distintas concentraciones de insulina fueron agregadas prolongándose la incubación por 1,5 horas más. La cuantificación de los mRNA de ALAS se realizó mediante el análisis de los ensayos de slot blot como se describe en Materiales y Métodos. Las autoradiografías corresponden a un experimento representativo donde cada slot blot representa una concentración sucesiva de insulina. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno o con fenobarbital solo y representan el promedio $\pm$ E.S. de cuatro determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras conteniendo insulina con la muestra control y las muestras conteniendo fenobarbital e insulina con la muestra conteniendo fenobarbital solo (* $P < 0,01$)

nivel del mRNA de ALAS aumentó mas de tres veces cuando los hepatocitos fueron preincubados con fenobarbital 0,6 mM y se mantuvieron en ese nivel por, al menos, dos horas más. El agregado de insulina, luego del tratamiento con el barbitúrico, ocasionó una rápida disminución en el nivel del mRNA de ALAS.

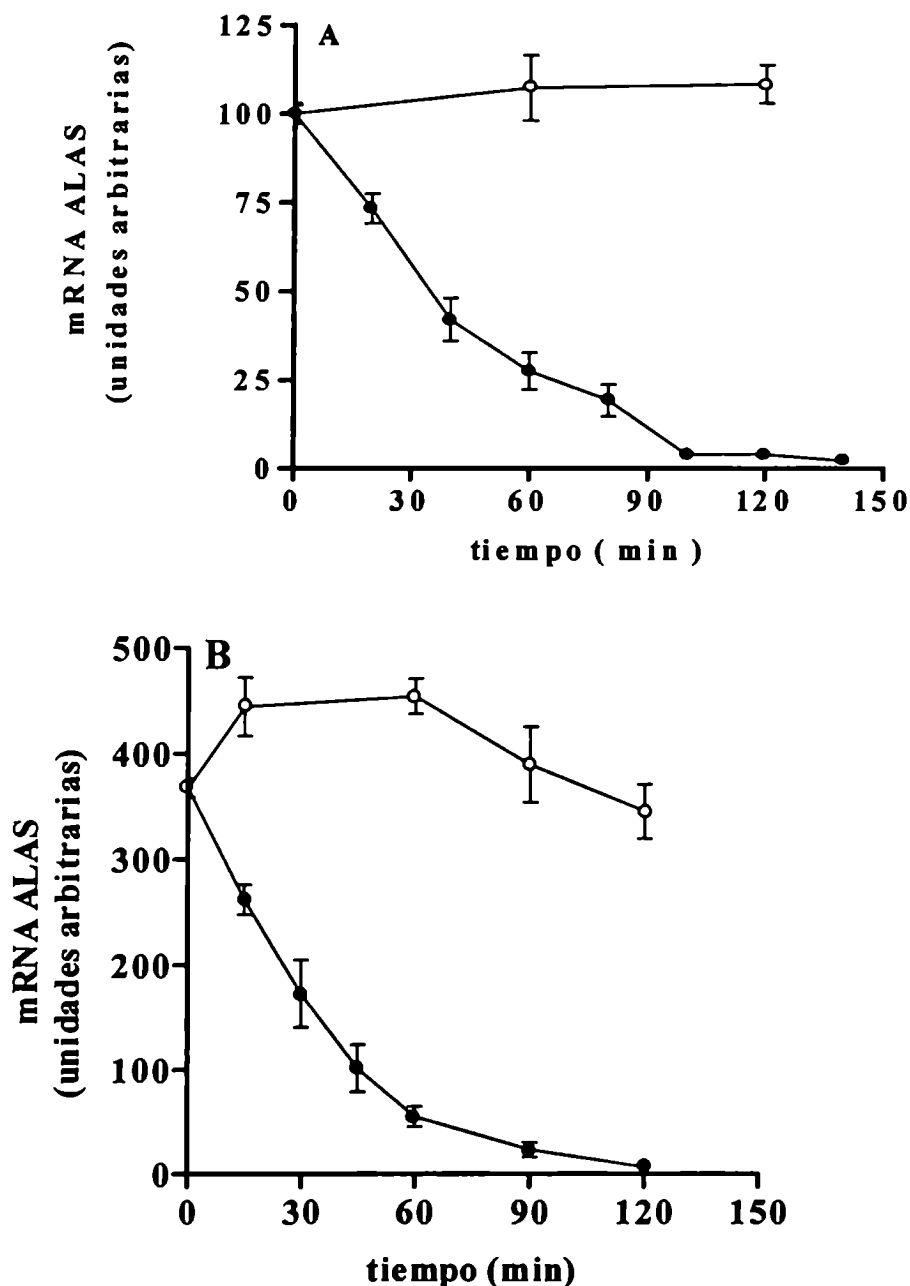


Figura 3 Curva de tiempo del efecto de insulina sobre el mRNA de ALAS en condiciones basales e inducidas con fenobarbital: Las suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 2,5 horas en ausencia (A) o en presencia (B) de fenobarbital. Posteriormente, las muestras fueron procesadas a los tiempos indicados en la figura. Los niveles del mRNA de ALAS fueron determinados por análisis de los slot blots como se describe en Materiales y Métodos. Tiempos en presencia de insulina 10^{-8} M (●) y en ausencia (○). Los resultados se expresan como relativos al control a tiempo cero y representan el promedio $\pm$ E.S. de cuatro determinaciones independientes .

Estos resultados demuestran que la insulina inhibe la expresión de ALAS en hepatocitos de rata, de manera dosis dependiente, tanto en condiciones basales como estimuladas con fenobarbital.

2 - La insulina no estimula la velocidad de degradación del mRNA de ALAS

Con el objetivo de determinar si las modificaciones en los niveles del mRNA de ALAS, posteriores al tratamiento con insulina y/o fenobarbital, obedecían a cambios en su estabilidad, se calculó la constante de degradación y la vida media del mensajero bajo estas condiciones en hepatocitos de rata.

Utilizamos dos metodologías para determinar estos parámetros. Por un lado, realizamos mediciones del nivel del mRNA de ALAS a distintos tiempos luego del agregado del inhibidor de la transcripción actinomicina D, por otra parte calculamos la vida media del mRNA de ALAS a partir de consideraciones cinéticas obtenidas de las curvas de tiempo.

2.1 Determinación de la vida media en presencia de actinomicina D

Los niveles del mRNA de ALAS fueron determinados a distintos tiempos luego del agregado del inhibidor de la transcripción actinomicina D 0,5 μM en presencia o ausencia de insulina 10^{-8} M que, en los casos correspondientes, fue adicionada simultáneamente con el inhibidor.

De esta manera, se pudo calcular la vida media ($t_{1/2}$), de acuerdo al tiempo necesario para tener el 50 % del nivel del mensajero. De los datos graficados en la figura 4 se obtuvieron valores de 31 minutos para el tiempo de vida media del mRNA de ALAS en condiciones basales y de 32 minutos para el tiempo de vida media en presencia de insulina. Estos resultados indican que la velocidad de degradación del mRNA de ALAS no fue modificado por el tratamiento con insulina. Sin embargo, existen publicaciones donde se advierte acerca del uso de inhibidores de transcripción para la determinación de la vida media, ya que estos pueden presentar un efecto estabilizador sobre los mensajeros y sobre estimar así los valores obtenidos (Tilghman y col; 1974; Goldberg y col, 1994).

2.2 Cálculo de la vida media por consideraciones cinéticas

En este abordaje, se calculó la vida media a partir de los parámetros cinéticos obtenidos de las curvas de tiempo de las figuras 3 A y B (Nickol y col, 1978). Este método se basa en el modelo matemático de “un solo compartimiento” (Hargrove y Schmidt, 1989). 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 recalcularon en la forma integrada aplicando la relación:

$$\ln (R_o' - R / R_o' - R_o)$$

donde R es el nivel de mRNA en cada tiempo, R_o y R_o' los niveles inicial y final, repectivamente. De esta manera los cambios en los niveles del mensajero se midieron entre dos estados de equilibrio: el correspondiente al nivel inducido y el correspondiente al nivel basal. 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 calculó de la relación:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k .$$

Las constantes de degradación resultantes fueron $k = 0,0296 \pm 0,0018$ en condiciones basales y $k = 0,0393 \pm 0,0038$ en presencia de fenobarbital. Los tiempos de vida media del mRNA de ALAS que surgieron de estos análisis fueron de 18 ± 2 minutos luego del tratamiento con insulina para hepatocitos en condiciones basales y 23 ± 2 luego del tratamiento con insulina para hepatocitos preincubados con fenobarbital (Figura 5 A y B). En un abordaje similar se determinaron en el laboratorio los tiempos de vida media del mRNA de ALAS que para condiciones basales fue de 19 ± 2 minutos y para condiciones de estimulación con fenobarbital de 21 ± 2 minutos. Estos valores fueron medidos entre dos estados de equilibrio: de no inducido a inducido en presencia de fenobarbital y de inducido a no inducido luego de la deprivación del barbitúrico. Estos datos indican que el tratamiento con insulina no produjo variaciones en la velocidad de degradación del mensajero de ALAS.

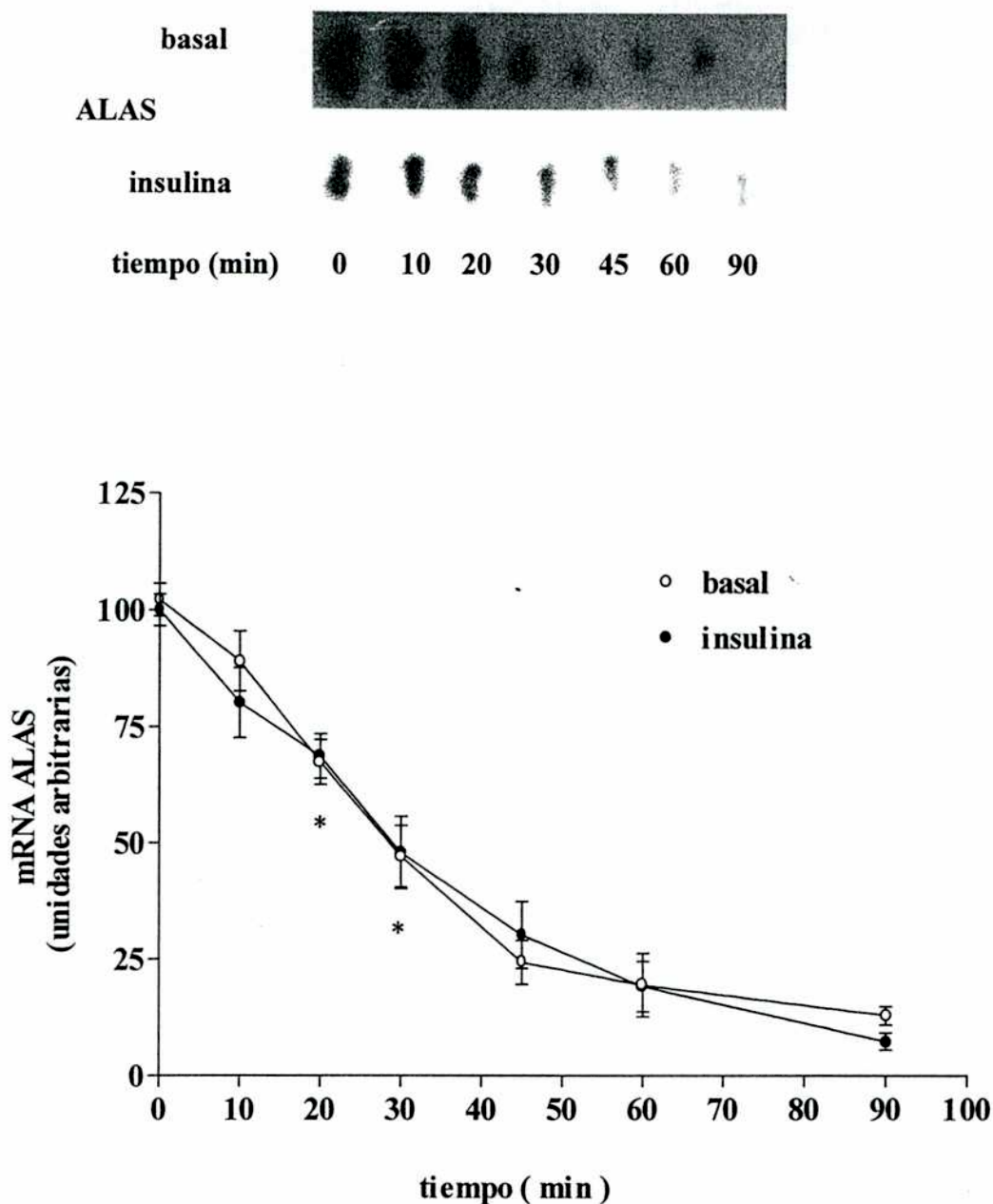


Figura 4 Determinación de la vida media del mRNA de ALAS en presencia de actinomicina D: Las suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 2,5 horas, luego de las cuales se adicionó actinomicina D 0,5 μ M. A partir de este momento las muestras fueron procesadas a los tiempos indicados en la figura. Se determinaron los niveles del mRNA de ALAS en ausencia (○) o en presencia (●) de insulina 10^{-8} M, que fue agregada simultáneamente con el inhibidor como se describe en Materiales y Métodos. Las autoradiografías corresponden a un experimento representativo. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student en cada determinación para comparar la muestra conteniendo actinomicina D con la muestra control y la muestra conteniendo actinomicina D e insulina con la muestra con insulina solo (* $P < 0,01$).

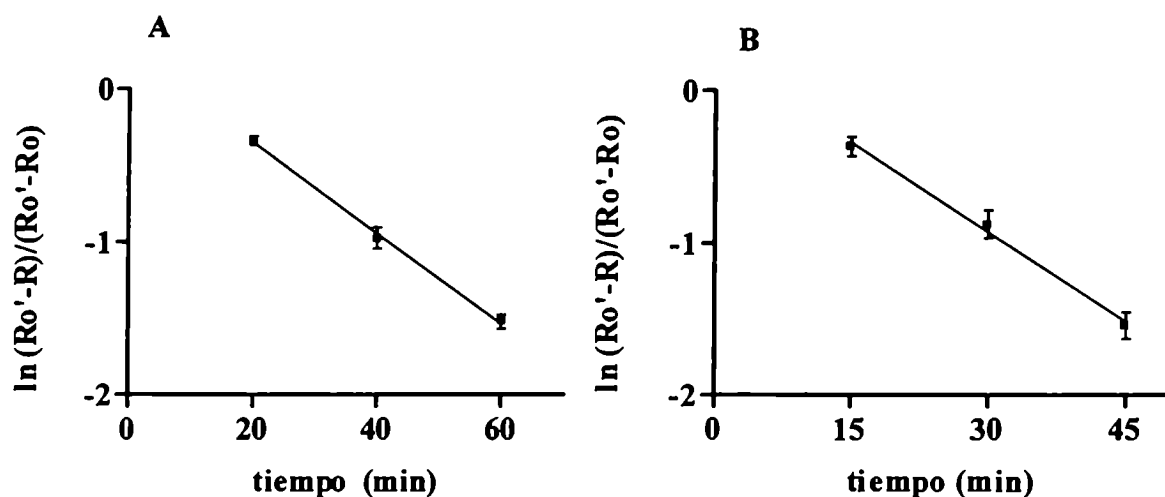


Figura 5 Cálculo de la vida media por consideraciones cinéticas: Los datos de las curvas de tiempo (Figuras 3 A y B) fueron integrados aplicando la relación: $\ln(R_o' - R / R_o' - R_o)$ donde R es el nivel de mRNA en cada tiempo, R_o y R_o' los niveles inicial y final, respectivamente. Las pendientes negativas de las rectas son equivalentes a la constante de degradación k . (A) $k = 0,0296 \pm 0,0018$ (B) $k = 0,0393 \pm 0,0038$. La mejor recta en todos los casos presenta un coeficiente de correlación $> 0,99$.

Tratamiento		con actinomicina D	Análisis cinético
		$t_{1/2}$ (min)	$t_{1/2}$ (min)
basal		29	23
fenobarbital	0,6 mM	32	18
insulina	10^{-8} M	30	19

Tabla 1 Valores de la vida media ($t_{1/2}$) del mRNA de ALAS

Los resultados obtenidos por dos metodologías diferentes indican que la insulina no modifica la velocidad de degradación del mRNA de ALAS en hepatocitos de rata tanto en condiciones basales como estimulados con fenobarbital.

3 - Receptores específicos median el efecto inhibitorio de la insulina

La insulina se une a su receptor con una afinidad entre 15 a 20 veces mayor que la proinsulina (Freychet y col, 1971). Por otra parte, la insulina y la proinsulina se unen con similar afinidad a los receptores de péptidos de crecimiento (Rechler y col, 1977).

Con el propósito de determinar que tipo de receptores estaban involucrados en la acción ejercida por insulina, estudiamos el efecto producido por la proinsulina sobre los niveles del mRNA de ALAS. La respuesta a agregados de proinsulina, crecientes en concentración, fue analizada en condiciones de estimulación con fenobarbital. La proinsulina fue efectiva dentro de un rango de concentraciones comprendido entre 10^{-9} y 10^{-6} M. El mayor efecto inhibitorio fue observado a una concentración de 10^{-6} M o mayor. La dosis necesaria para alcanzar el 50 % del efecto (ID_{50}) correspondió aproximadamente a 10^{-8} M, unas 200 veces mayor que la dosis necesaria de insulina (Figura 6).

Las concentraciones de insulina y proinsulina necesarias para ejercer el mismo efecto inhibitorio difieren marcadamente entre si, por lo tanto estos resultados sugieren que la insulina ejerce la regulación de la expresión génica de ALAS en hepatocitos de rata, a través de receptores específicos

4 - El efecto de insulina no requiere síntesis proteica

Ciertas hormonas o segundos mensajeros transducen la señal hacia el gen blanco a través de la síntesis de activadores o represores. En otros casos modificaciones postraduccionales activan o inhiben moléculas preexistentes

Con el objetivo de determinar de que modo la insulina ejerce su acción inhibitoria sobre el gen de ALAS, suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante tres horas con cicloheximida $10\mu\text{M}$, concentración a la cual se bloquea completamente la síntesis proteica en estas células hepáticas. El tratamiento con cicloheximida aumentó el nivel basal del mRNA de ALAS y disminuyó el nivel del mRNA de células estimuladas con fenobarbital. No obstante el inhibidor de síntesis proteica no suprimió el efecto ejercido

por la insulina a nivel basal ni con estimulación con fenobarbital (comparar las calles 3 con 5 y 7 con 8 de la Figura 7).

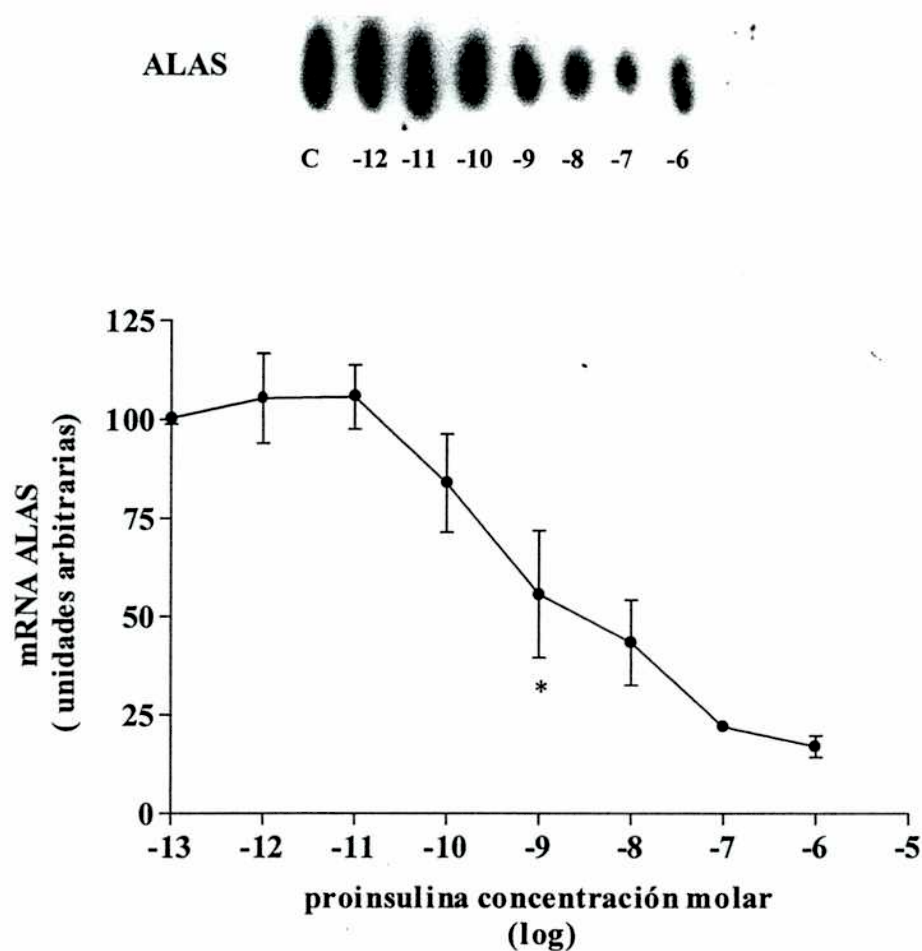


Figura 6 Curva dosis respuesta de proinsulina sobre los niveles del mRNA de ALAS : Las suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 2,5 horas con distintas concentraciones de proinsulina. La cuantificación del mRNA de ALAS se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Las autoradiografías corresponden a un experimento representativo donde cada slot blot representa una concentración sucesiva de proinsulina. Los resultados se expresan como relativos al control con fenobarbital y representan el promedio $\pm$ E.S. de cuatro determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar en cada caso la muestra conteniendo proinsulina con la muestra control (* $P < 0,01$).

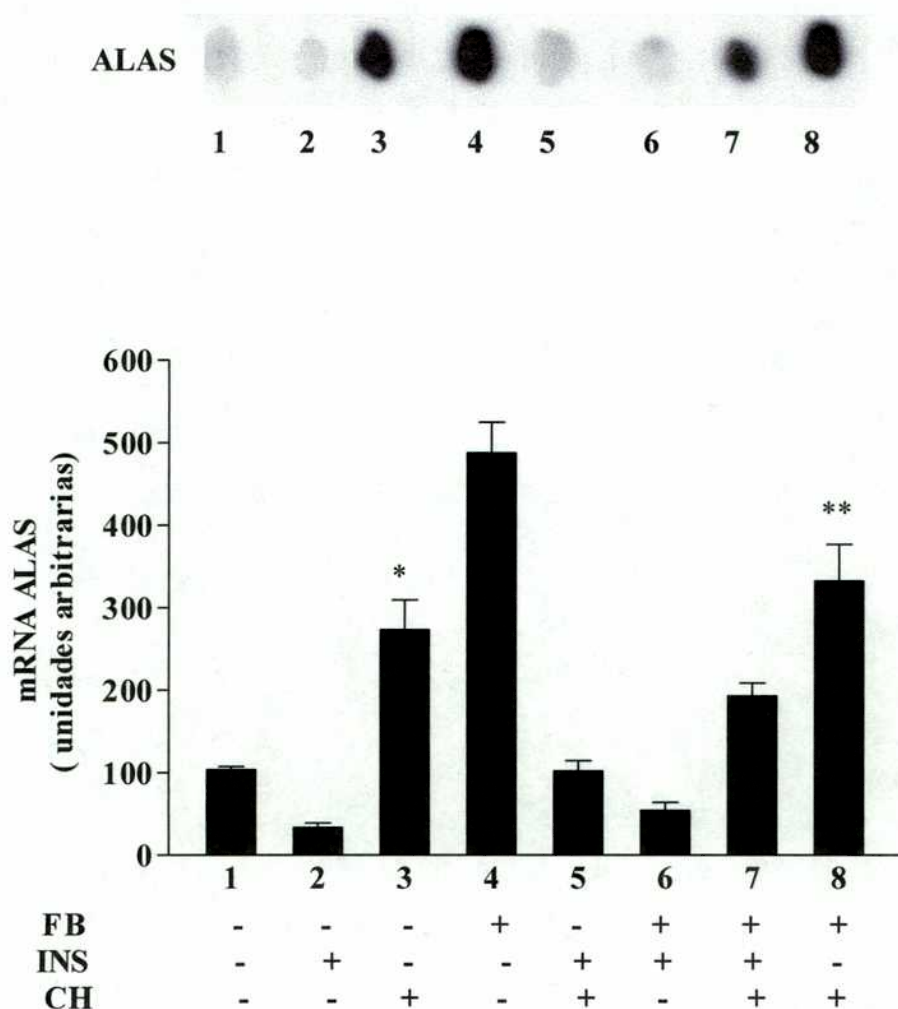


Figura 7 Efecto de cicloheximida e insulina sobre el mRNA de ALAS: Las suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 3 horas con los agregados indicados. La determinación de los niveles del mRNA de ALAS se realizó mediante el análisis de los ensayos de slot blot como se describe en Materiales y Métodos. La autoradiografía muestra un experimento representativo. Las señales autoradiográficas cuantificadas por densitometría se presentan como gráfico de barras. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de cinco determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar la muestra 3 con la 5 (* $P < 0,01$) y la 8 con la 7 (** $P < 0,02$). Insulina 10^{-8} M, FB, fenobarbital 0.6 mM, CH cicloheximida 10 μ M.

Estos resultados indican que la hormona ejerce su acción regulatoria sobre el gen de ALAS sin requerimiento de síntesis proteica.

5 - Insulina inhibe la actividad transcripcional del promotor de ALAS en células HepG2

Analizamos en la línea de hepatoma humano HepG2 las variaciones en los niveles de mRNA de ALAS frente a agregados crecientes en concentración de insulina. La hormona fue efectiva en un rango de concentraciones comprendido entre 10^{-9} y 10^{-7} M. La dosis necesaria para alcanzar el 50 % del efecto (ID_{50}) correspondió aproximadamente a 5×10^{-9} M (Figura 8).

Con la finalidad de estudiar las variaciones del mRNA de ALAS a lo largo del tiempo frente a la presencia de insulina, células HepG2 fueron incubadas con insulina 10^{-8} M durante distintos tiempos según se indica en la figura 9. Los niveles del mRNA de ALAS disminuyeron considerablemente durante el período de incubación comprendido entre las 8 y 24 horas posteriores al agregado de la hormona.

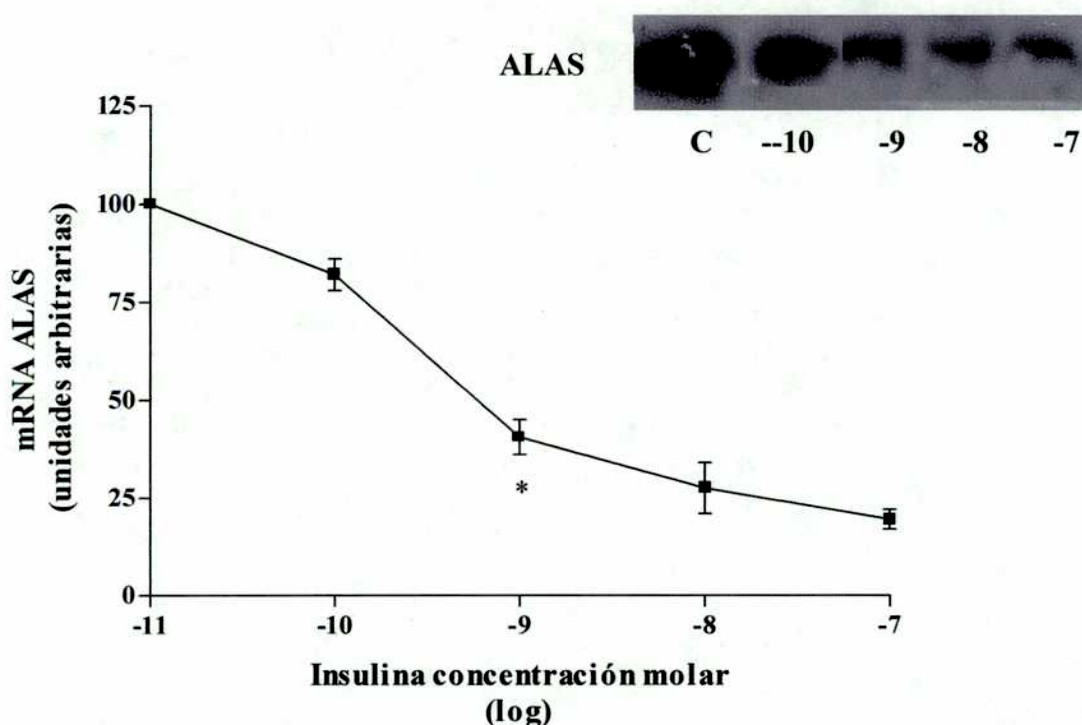


Figura 8 Curva dosis respuesta de insulina sobre los niveles del mRNA de ALAS humana.: Las células HepG2 fueron incubadas durante 2,5 horas con distintas concentraciones de insulina. La cuantificación de los mRNA de ALAS se realizó por análisis de Northern blot como se describe en Materiales y Métodos. La autoradiografía muestra un experimento representativo. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado y representan el promedio $\pm$ E.S. de cuatro determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar en cada caso la muestra conteniendo insulina con la muestra control (* $P < 0,01$).

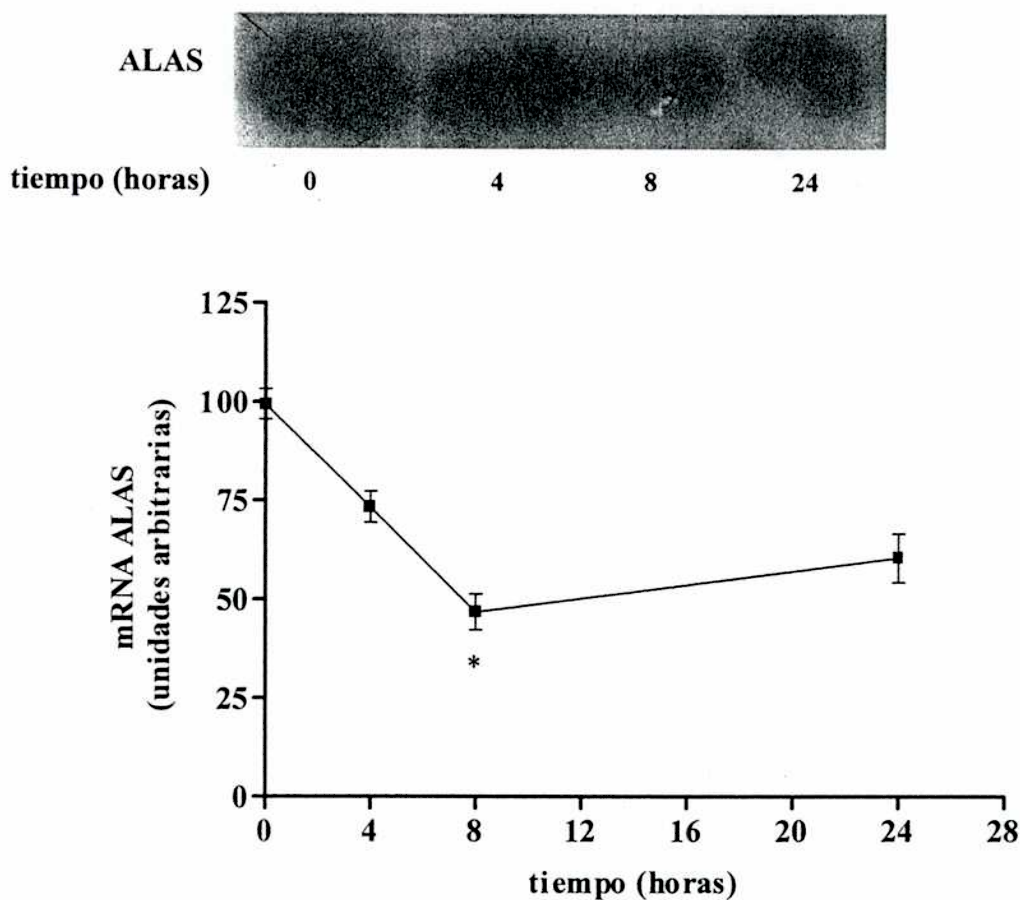


Figura 9 Curva de tiempo del efecto de insulina sobre el mRNA de ALAS humana: Las células HepG2 se incubaron con insulina 10^{-8} M. Los valores del mRNA de ALAS humana fueron determinados a los tiempos indicados mediante análisis de los ensayos de northern blot según se describe en materiales y métodos. La autoradiografía muestra un experimento representativo. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar en cada caso la muestra conteniendo insulina con la muestra control (* $P < 0,01$)

Los resultados obtenidos confirman que la insulina inhibe la expresión del gen de ALAS en células de hepatoma humano HepG2 de manera similar a la observada en hepatocitos de rata.

6 - La región 5' flanqueante del gen de ALAS confiere respuesta a insulina

Los resultados anteriores nos indican que la insulina disminuye la expresión de ALAS sin producir cambios en la estabilidad del mRNA. Con el propósito de analizar si este efecto es transcripcional e implica una interacción con el promotor de ALAS, realizamos

ensayos de transfecciones transientes en la línea celular HepG2 con el plásmido pACAT. De esta manera se pudo estudiar la actividad promotora de la transcripción de la región 5' flanqueante del gen de ALAS comprendida entre las bases -833 y +42, dirigiendo la expresión del gen reporter CAT.

Las células de hepatoma humano transfectadas transientemente fueron incubadas durante 24 horas en medio libre de suero con insulina 10^{-8} M en presencia o ausencia de fenobarbital 0,6 mM. La presencia de fenobarbital incrementó aproximadamente cinco veces la actividad CAT, mientras que el tratamiento con insulina produjo una marcada disminución en la actividad CAT tanto en condiciones basales como de estimulación con fenobarbital.

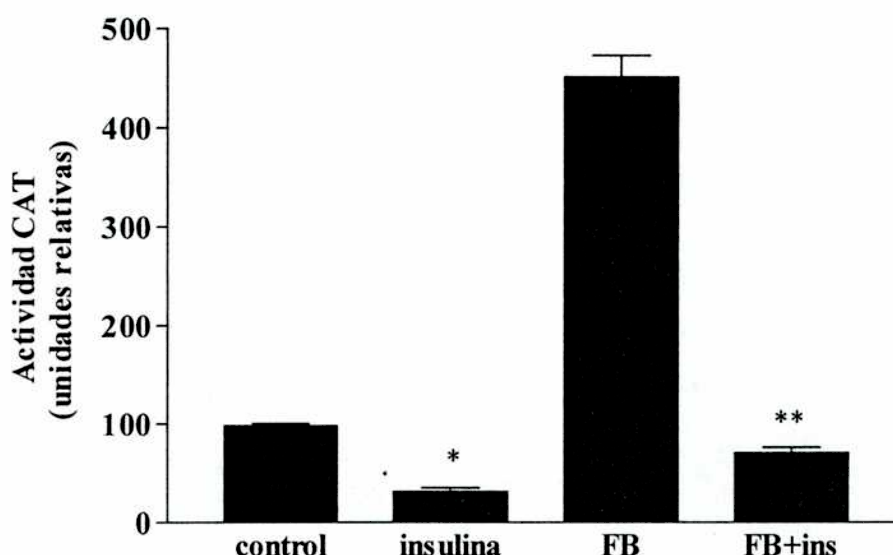


Figura 10 Efecto de insulina en transfecciones transientes con el gen de fusión pACAT: Las células HepG2, transfectadas transientemente con 4 μ g del plásmido pACAT, se incubaron durante 24 horas en medio libre de suero con los agregados indicados en la figura. La actividad CAT fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como la actividad CAT relativa al control que se establece como 100 y representan el promedio $\pm$ E.S de cuatro determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras conteniendo insulina con la muestra control (* $P < 0,01$) y las muestras conteniendo fenobarbital e insulina con la muestra conteniendo fenobarbital solo (** $P < 0,001$). ins, insulina 10^{-8} M, FB, fenobarbital 0,6 mM

Estos resultados indican que la región de 833 pares de bases localizada río arriba del sitio de iniciación de la transcripción de ALAS es capaz de conferir respuesta a insulina y confirman que la regulación hormonal del gen de ALAS se ejerce a nivel transcripcional.

B - Vías de señalización que median el efecto inhibitorio de la insulina sobre la transcripción del gen de ALAS.

1 - La fosfatidilinositol 3 quinasa interviene en la transducción del efecto mediado por insulina.

1.1 La inhibición de la transcripción de ALAS mediada por insulina es bloqueada por inhibidores de la PI3K

La insulina activa marcadamente a la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) en numerosos tipos celulares, siendo este el primer evento dentro de una compleja cascada de transducción de señales regulada por la hormona en múltiples procesos celulares (Alessi y col, 1998). Con el propósito de establecer el rol de la PI3K en la inhibición de la expresión génica de ALAS mediada por insulina, suspensiones de hepatocitos fueron incubadas en presencia o ausencia de insulina 10^{-8} M y/o fenobarbital 0,6 mM con wortmanina 200 nM, un potente inhibidor de la PI3K que se une covalentemente a su unidad catalítica p110, induciendo un cambio conformacional (Gabbay y col, 1996).

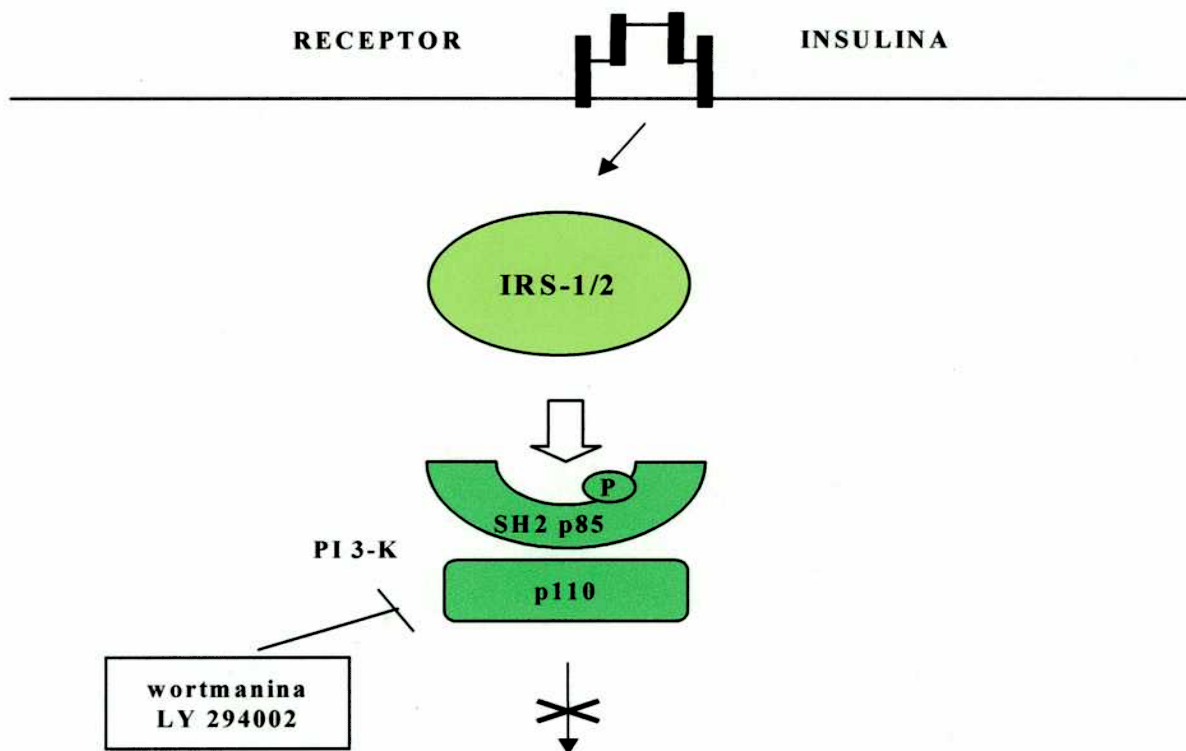


Figura 11 Sitio de acción de wortmanina y LY 294002

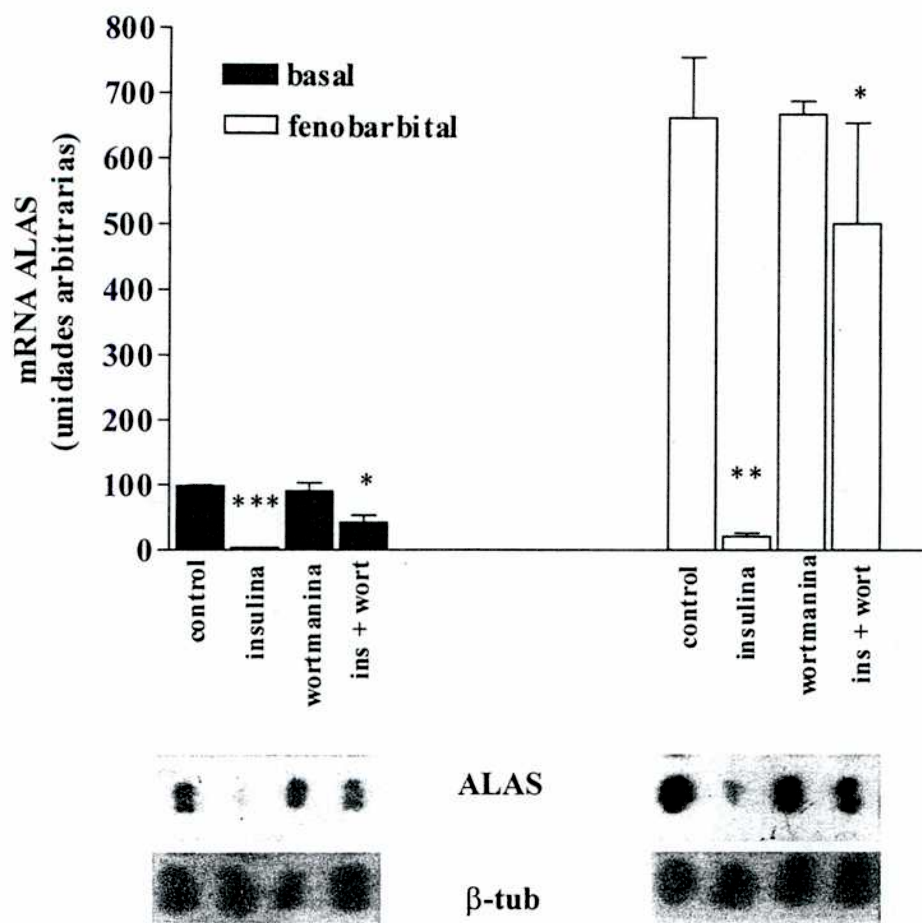


Figura 12 .Efecto de la wortmanina sobre el mRNA de ALAS en hepatocitos de rata: Las suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 2,5 horas con wortmanina (wort) 200 nM en presencia o en ausencia de insulina (ins) 10^{-8} M y/o fenobarbital 0,6 mM. La cuantificación de los niveles del mRNA de ALAS se realizó mediante el análisis de los ensayos de slot blot como se describe en Materiales y Métodos. Las autoradiografías muestran un experimento representativo. Las señales autoradiográficas cuantificadas por densitometría se presentan como gráfico de barras normalizadas con las de β -tubulina. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar la muestra conteniendo insulina con la muestra control y la muestra conteniendo wortmanina e insulina con la muestra con insulina (* $P < 0,05$; ** $P < 0,02$; *** $P < 0,01$)

La insulina reprimió significativamente la expresión de ALAS tanto en condiciones basales como estimuladas con fenobarbital. La wortmanina bloqueó parcialmente este efecto en ambas condiciones. Para confirmar estos resultados, recurrimos al uso de otro inhibidor LY294002, compuesto sintético estructuralmente no relacionado con la wortmanina, que compite por el sitio de unión de ATP a la p110 (Vlahos y col, 1994; Walker y col, 2000). El tratamiento con LY 294002 50 μ M revirtió por completo la acción

ejercida por la hormona en hepatocitos tanto en condiciones basales como de estimulación con la droga porfirinogénica. Los niveles del mensajero de la β -tubulina no variaron frente al tratamiento con los inhibidores. La presencia de wortmanina o de LY294002 no modificó la expresión de ALAS con respecto al nivel basal, en ausencia de insulina (Figuras 12 y 13).

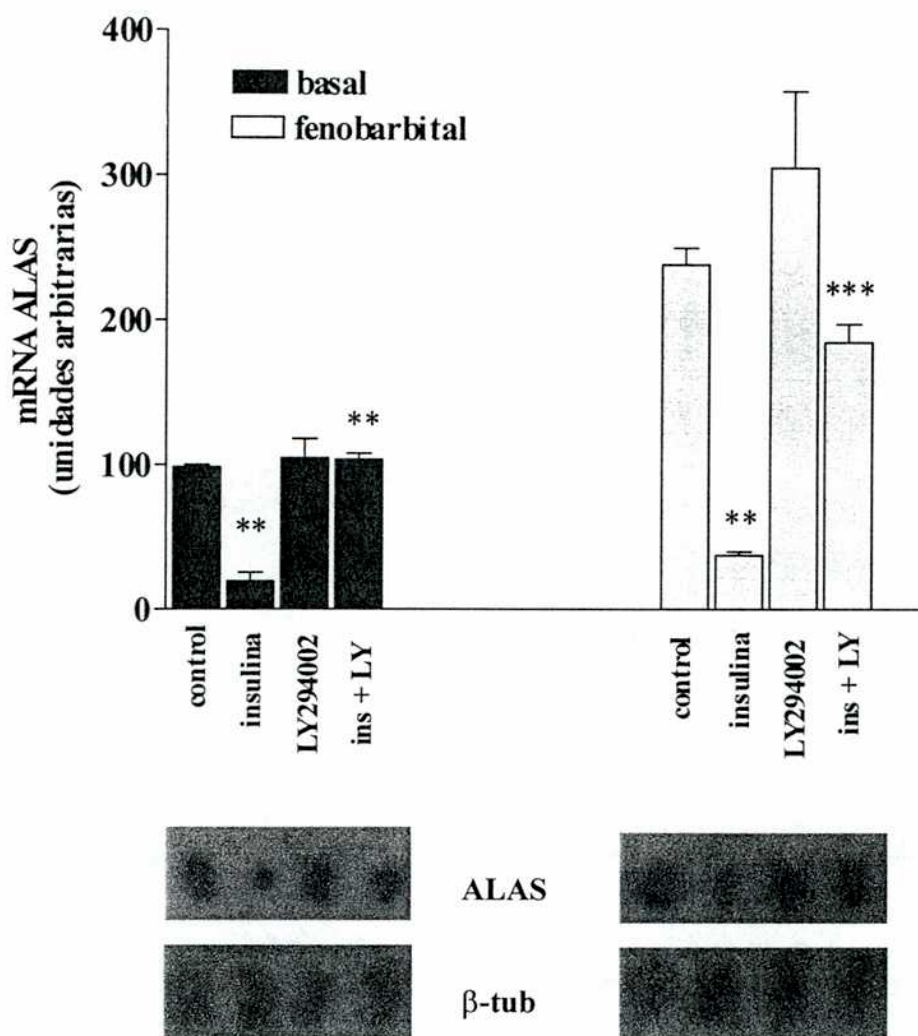


Figura 13 Efecto de LY294002 sobre el mRNA de ALAS en hepatocitos de rata: Las suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 2,5 horas con LY294002 (LY) 50 μ M en presencia o en ausencia de insulina(ins) 10^{-8} M y/o fenobarbital 0,6 mM. La cuantificación de los niveles del mRNA de ALAS se realizó mediante el análisis de los ensayos de slot blot como se describe en Materiales y Métodos. Las autoradiografías muestran un experimento representativo. Las señales autoradiográficas cuantificadas por densitometría se presentan como gráfico de barras normalizadas con las de β -tubulina. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S.de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar la muestra conteniendo insulina con la muestra control y las muestra conteniendo LY294002 e insulina con la muestra con insulina (** $P < 0,02$, *** $P < 0,01$).

Luego determinamos el efecto de estos inhibidores de la PI3K sobre la represión de la transcripción de ALAS ejercida por insulina en la línea celular HepG2. Las células fueron deprivadas de suero durante 24 horas y tratadas posteriormente con el correspondiente inhibidor en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. El agregado de wortmanina 200 nM o de LY294002 50 μ M bloqueó la inhibición dependiente de insulina de la transcripción de ALAS de una manera similar a la observada en los cultivos primarios de hepatocitos (Figura 14). Estos datos indican que la PI3K interviene en la transducción del efecto inhibitorio ejercido por la insulina sobre la expresión de ALAS.

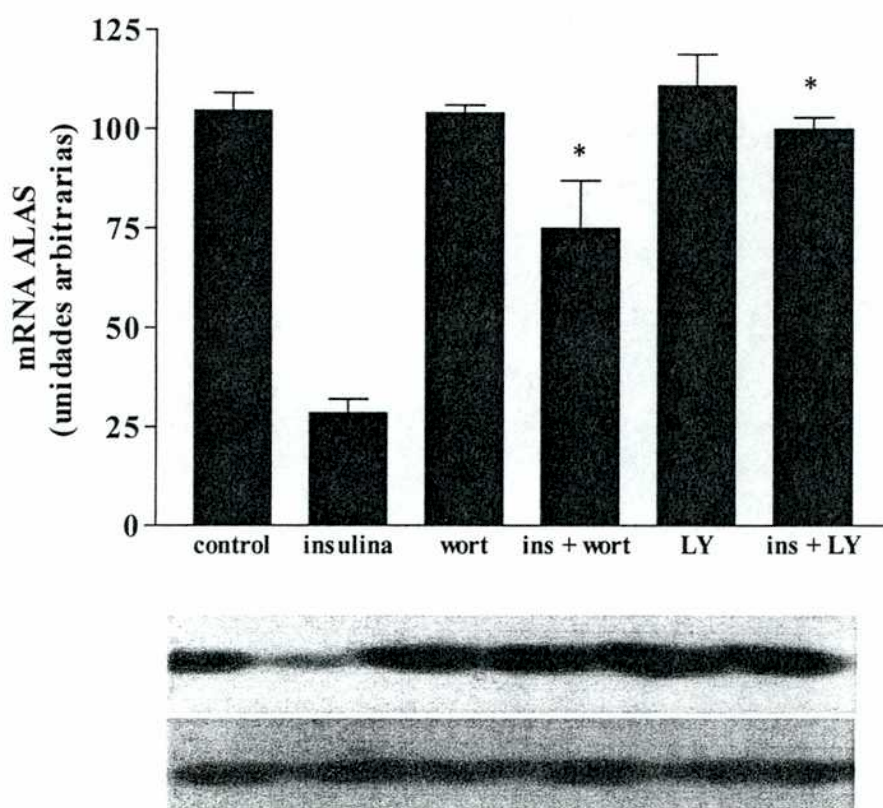


Figura 14 Efecto de wortmanina o LY294002 sobre el mRNA de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron deprivadas de suero durante 24 horas e incubadas posteriormente durante 8 horas con wortmanina (wort) 200nM o LY294002 (LY) 50 μ M en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La cuantificación de los niveles del mRNA de ALAS se realizó mediante el análisis de los ensayos de Northern blot como se describe en Materiales y Métodos. Las autoradiografías muestran un experimento representativo. Las señales autoradiográficas cuantificadas por densitometría se presentan como gráfico de barras normalizadas con las de β -tubulina. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras conteniendo insulina y wortmanina o LY 294002 con la muestra con insulina (* $P < 0,02$).

1.2 La sobreexpresión de una mutante dominante negativa de la PI3K bloquea la acción de la insulina.

Con la finalidad de determinar si la activación de la PI3K es suficiente para reprimir la expresión de ALAS se realizaron ensayos de transfecciones transientes en células HepG2. Las células de hepatoma humano fueron cotransfectadas con el plásmido pACAT, que contiene 870 pb del promotor de ALAS dirigiendo la expresión de CAT y el plásmido pCMV3myr-PI3K, una mutante constitutivamente activa de la subunidad catalítica p110 de la PI3K, que contiene en su región amino terminal la secuencia de miristoilación/palmitoilación: MGLCIKSKEDKSM. La presencia de insulina redujo marcadamente la actividad del promotor, mientras que la sobreexpresión de mir-p110 ocasionó solamente un leve descenso de la misma (Figura15). Por otra parte, en cotransfecciones con el plásmido pCMV3PI3KR947P kd, una mutante dominante negativa de la p110, con pérdida de la actividad de quinasa, la acción ejercida por insulina fue reducida en un 50 %, mientras que la actividad basal del promotor no fue afectada. La actividad del promotor de ALAS no presentó variaciones respecto a su actividad basal ni tampoco respecto a la ejercida frente a la presencia de insulina en ensayos de cotransfecciones con el plásmido pCMV3PI3K, una p110 “wild type” (Figura 15).

2 - La PKB es el efector río abajo de la PI3K en la transducción del efecto inhibitorio de la insulina

2.1 Efecto de la sobreexpresión de mutantes de la PKB sobre la actividad transcripcional del promotor de ALAS

Existen numerosas evidencias que la PKB/Akt es activada por la PI3K en respuesta al tratamiento con insulina, y que esa activación es bloqueada por wortmanina y LY294002 o por la expresión de mutantes dominantes negativas de la PI3K (Marte y Downward, 1997). Debido a lo mencionado, evaluamos el efecto de la sobreexpresión de mutantes de la PKB sobre la inhibición de la expresión génica de ALAS ejercida por insulina. Las células de hepatoma humano HepG2 fueron cotransfectadas con el plásmido pACAT y vectores de expresión para PKB “wild type”, PKB miristoilada y PKB con pérdida de la actividad de quinasa. La sobreexpresión del plásmido pCEFL

HA-myr-cAkt, una mutante constitutivamente activa de PKB que presenta una secuencia de miristoilación que la localiza en la membrana plasmática, ocasionó una reducción de la actividad del promotor que fue aún más marcada en presencia de insulina. Por otra parte, en las cotransfecciones con el plásmido pCEFL HA-cAkt K179M kd, una mutante dominante negativa con pérdida de la actividad de quinasa, el efecto inhibitorio de insulina fue revertido mientras que la actividad basal del promotor de ALAS no sufrió variaciones (Figura 16). La expresión del plásmido pCEFL HA-cAkt una PKB "wild type" no modificó la actividad transcripcional del promotor de ALAS tanto en condiciones basales como en presencia de insulina.

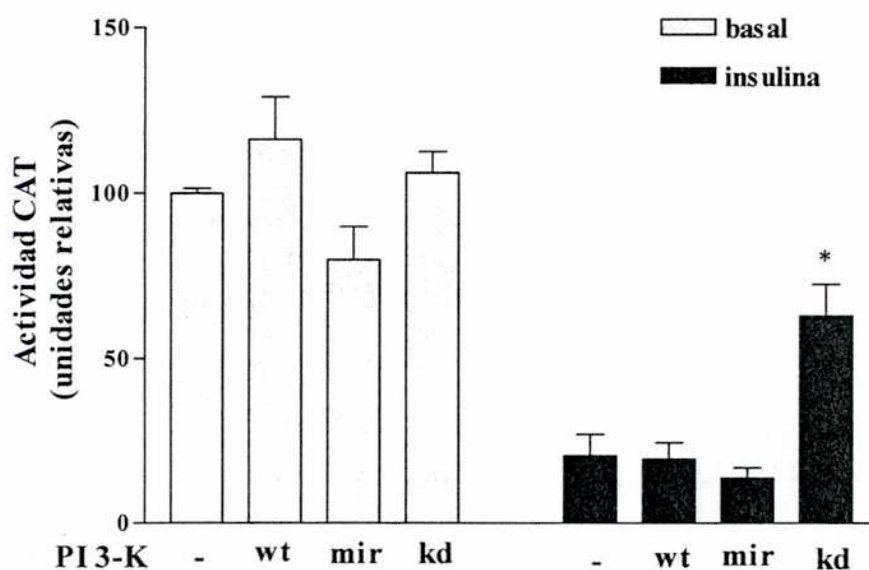


Figura 15 Efecto de la sobreexpresión de mutantes de la PI3K sobre la actividad transcripcional del promotor de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 4 μ g del plásmido pACAT, 6 μ g de los plásmidos pCMV3PI3K (wt), pCMV3myr-PI3K (mir) o pCMV3R947Pkd (kd) según se indica en la figura y 6,5 μ g del plásmido de referencia pCEFL β -gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno, que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras cotransfectadas con las muestras sin cotransfectar (* $P < 0,05$)

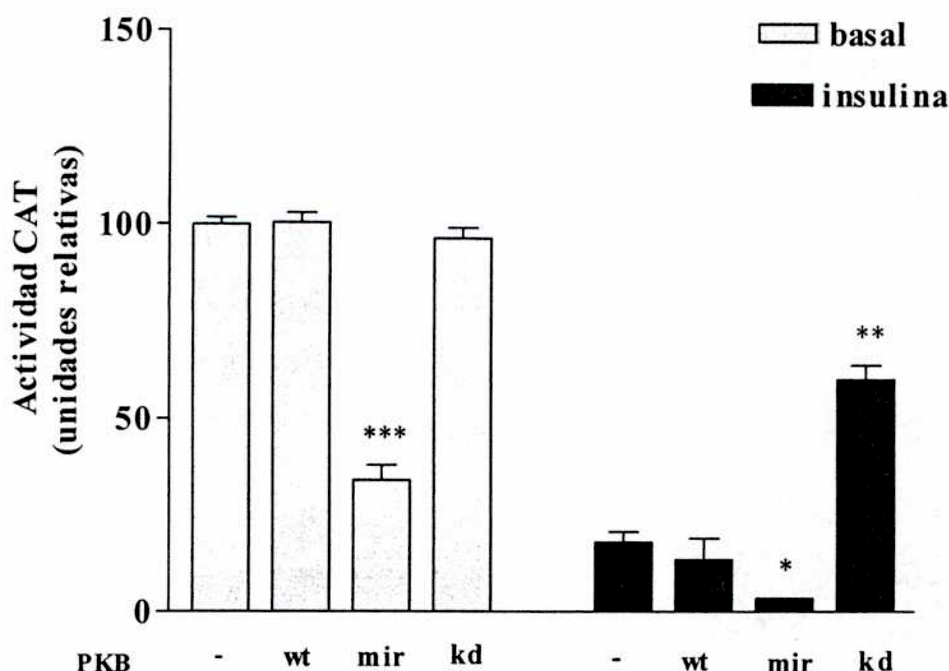


Figura 16 Efecto de la sobreexpresión de mutantes de la PKB sobre la actividad transcripcional del promotor de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 4 μ g del plásmido pACAT, 6 μ g de los plásmidos pCEFL HA-cAkt, pCEFL HAmir-cAkt o pCEFL HA-cAkt K179M kd según se indica en la figura y 6,5 μ g del plásmido de referencia pCEFL β -gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa relativa al control sin agregado alguno, que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de cuatro determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras cotransfectadas con las muestras sin cotransfectar (* $P < 0,05$, ** $P < 0,02$, *** $P < 0,01$)

2.2 Insulina activa la PKB en células HepG2

Con la finalidad de confirmar que insulina activa a la PKB en las células HepG2 y que los inhibidores wortmanina y LY 294002 son efectivos a las concentraciones empleadas en los experimentos anteriores determinamos la actividad de quinasa *in vitro* de PKB en dichas condiciones. La actividad de la PKB aumentó frente a la presencia de insulina 10^{-8} M y este aumento fue bloqueado cuando las células se preincubaron con wortmanina 200 nM o LY294002. El inhibidor de la farnesil transferasa, PD152440, no modificó la actividad de la PKB tanto en presencia como en ausencia de insulina (Figura 17).

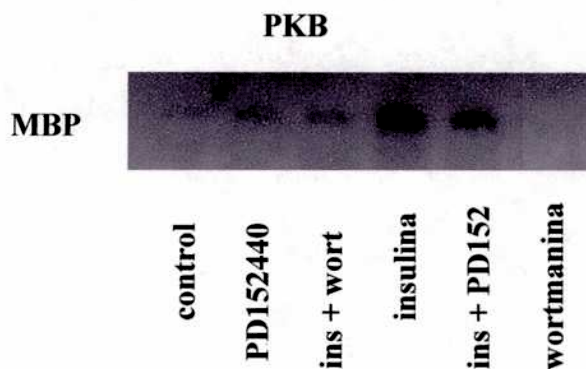


Figura 17 Efecto de insulina, wortmanina y PD152440 sobre la actividad de la PKB. Las células HepG2 fueron deprivadas de suero durante 24 horas e incubadas en presencia o en ausencia de los inhibidores indicados en la figura durante 30 minutos previo al agregado de insulina 10^{-8} M. La actividad de la fosfoPKB, inmunoprecipitada luego de 10 minutos del tratamiento con insulina, se determinó según lo descrito en Materiales y Métodos. La radioactividad incorporada en la MBP se visualiza en la autoradiografía

2.3 La inhibición de la transcripción de ALAS mediada por insulina no es alterada por un inhibidor de la $p70^{s6k}$

En numerosos tipos celulares la quinasa ribosomal $p70^{s6k}$ es una proteína intermediaria de la señalización de la PI3K, que es activada en respuesta a diferentes estímulos, entre ellos la insulina. En el laboratorio analizamos la respuesta de la acción de la insulina sobre los niveles del mRNA de ALAS frente a rapamicina, un conocido inmunosupresor, que inhibe la fosforilación de la $p70^{s6k}$, bloqueando la actividad de la proteína mTOR (“mammalian target of rapamycin”) que esta ubicada río arriba de esta quinasa ribosomal en la cascada de transducción de señales (Ferrari y col, 1993). El tratamiento de los hepatocitos con rapamicina 100 nM no produjo variaciones en el nivel del mRNA de ALAS tanto en condiciones basales como de estimulación con fenobarbital, en ausencia o en presencia de insulina (Figura 19).

Luego determinamos el efecto de la rapamicina sobre la represión de la transcripción de ALAS ejercida por insulina en la línea celular HepG2. Las células fueron deprivadas de suero durante 24 horas y tratadas posteriormente con rapamicina en un rango de concentraciones comprendidas entre 50 y 500 nM en presencia de insulina 10^{-8} M. El agregado del inhibidor, aún a concentraciones de 500 nM, no

modificó la acción inhibitoria de la insulina sobre la transcripción de ALAS de manera similar a lo observado en los cultivos primarios de hepatocitos. Estos datos indican que la $p70^{s6k}$ no es una quinasa obligatoria en la señalización para reprimir la expresión de ALAS (Figura 20).

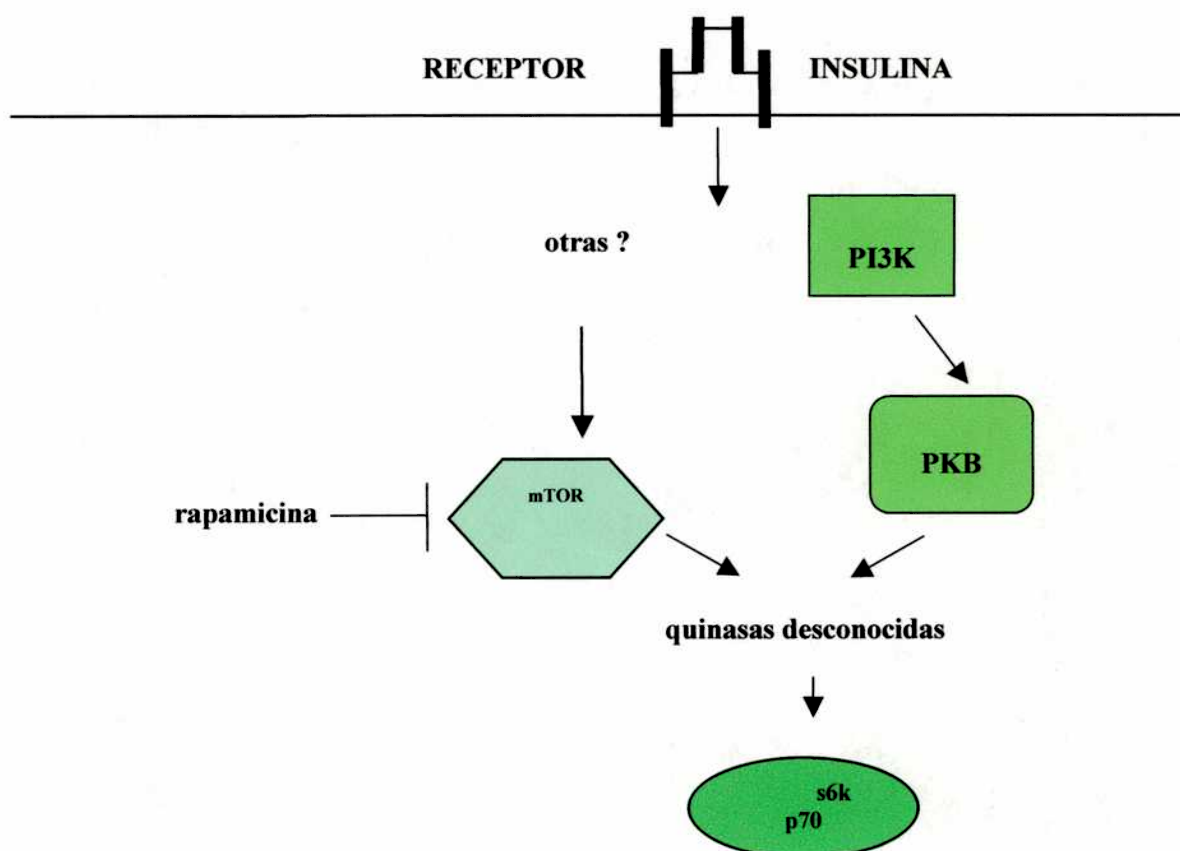


Figura 18 Sitio de acción de la rapamicina

Estos resultados indican que la PI3K es necesaria pero no suficiente para que la insulina ejerza su respuesta final sobre el promotor de ALAS. Además sugieren que la PKB es el efector río abajo de la PI3K, en la cascada de transducción, que participa en la regulación de la transcripción de ALAS mediada por insulina.

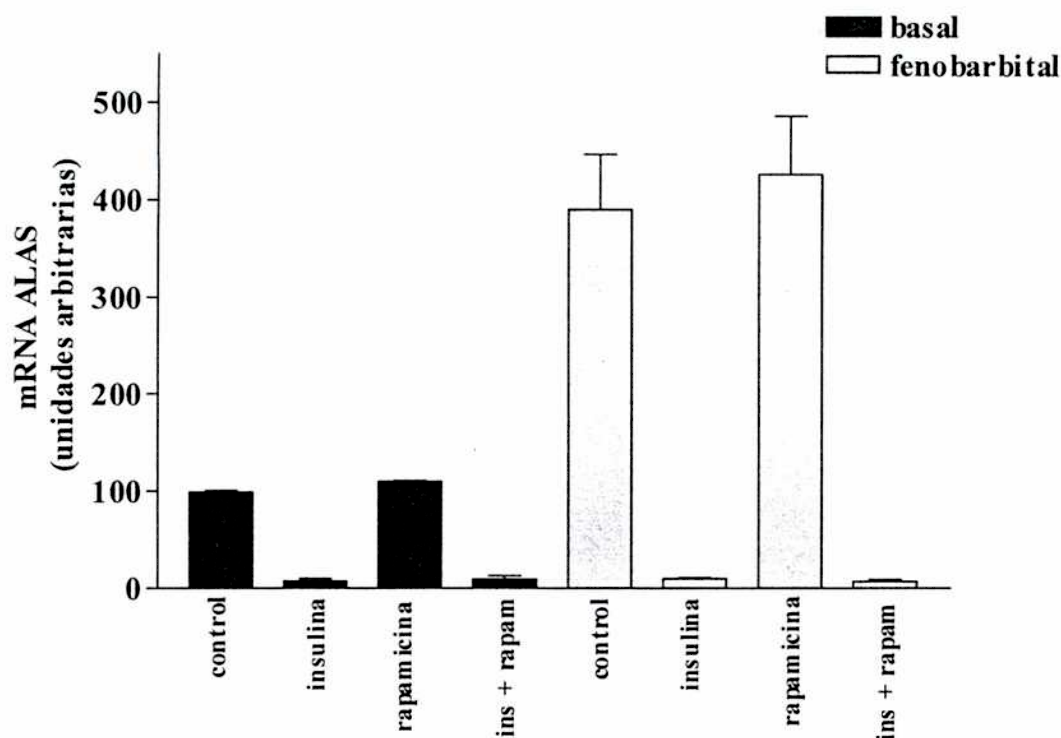


Figura 19 Efecto de la rapamicina sobre el mRNA de ALAS: Las suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 2,5 horas con rapamicina 100 nM en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M y/o fenobarbital 0,6 mM. La cuantificación de los niveles del mRNA de ALAS se realizó mediante el análisis de los ensayos de slot blot como se describe en Materiales y Métodos. Las señales autoradiográficas cuantificadas por densitometría se presentan como gráfico de barras normalizadas con las de β -tubulina. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de cuatro determinaciones independientes.

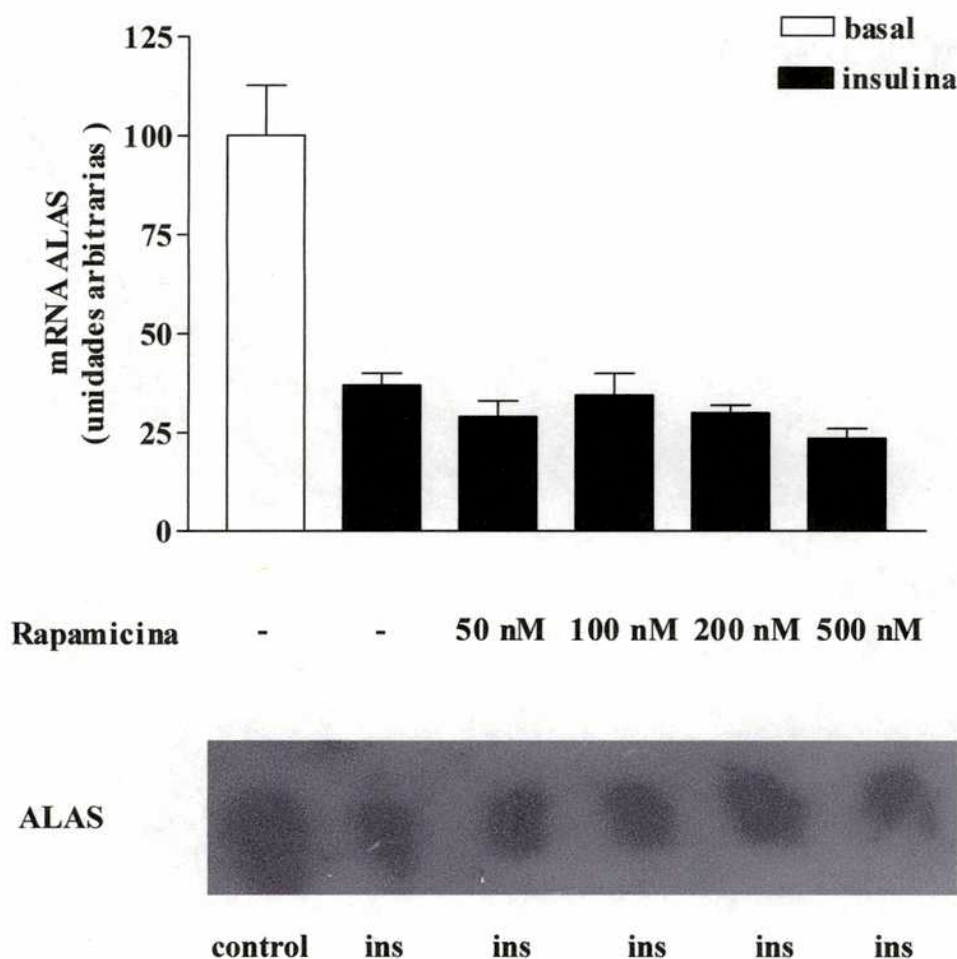


Figura 20 Efecto de la rapamicina sobre el mRNA de ALAS: Las células HepG2 fueron deprivadas de suero durante 24 horas e incubadas durante 8 horas en presencia de insulina 10^{-8} M y rapamicina en las concentraciones indicadas en la figura. La cuantificación de los niveles del mRNA de ALAS se realizó mediante el análisis de los ensayos de slot blot como se describe en Materiales y Métodos. Las autoradiografías muestran un experimento representativo. Las señales autoradiográficas cuantificadas por densitometría se presentan como gráfico de barras normalizadas con las de β -tubulina. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes.

3 - El efecto inhibitorio de la insulina sobre la expresión de ALAS involucra las proteínas SOS y Ras.

3.1 Inhibidores de la farnesilación de Ras bloquean la represión de ALAS por insulina.

La vía de señalización de Ras yace en el centro de numerosas cascadas activables por diversos factores de crecimiento. La insulina es una potente estimuladora de esta vía provocando una serie de eventos, entre ellos, el aumento de la actividad de la farnesil transferasa, enzima que farnesila a Ras promoviendo así su translocación a la membrana plasmática (Goalstone y Draznin, 1998). En vista de estos conocimientos, decidimos evaluar el efecto de inhibidores de la farnesil transferasa, lovastatina y PD152440 sobre la regulación mediada por insulina de la transcripción de ALAS. El tratamiento de distintos tipos celulares con cualquiera de estos inhibidores, no relacionados estructuralmente, disminuye la disponibilidad intracelular de Ras para su subsecuente activación en la membrana e impide la propagación de la señal a través de la cascada de MAPK (Cox y col, 1994) (Figura 21).

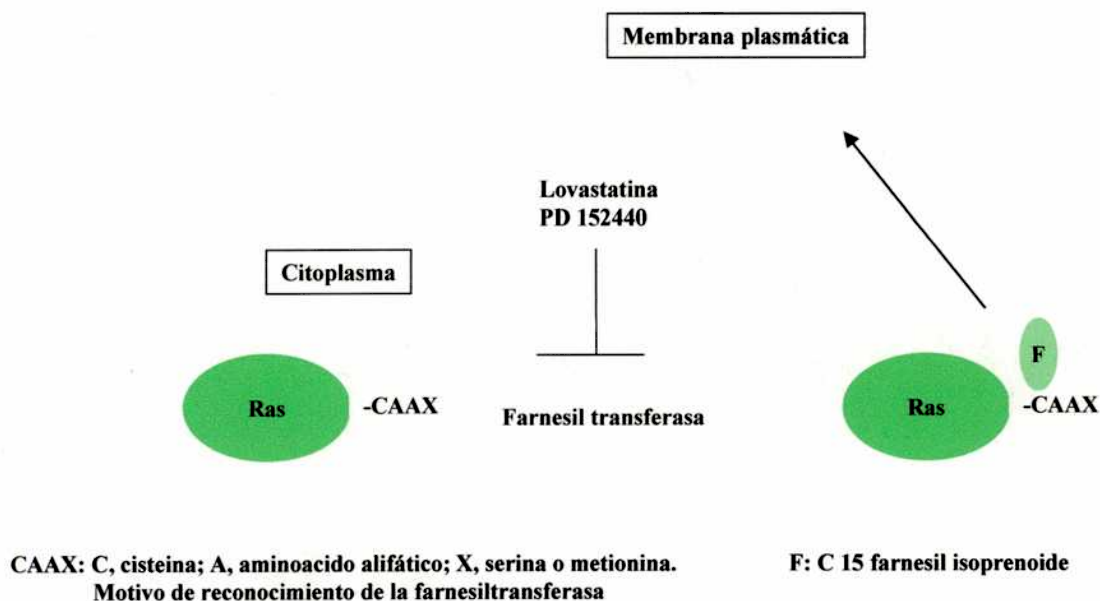


Figura 21 Mecanismo de acción de lovastatina y PD152440

El tratamiento de hepatocitos con lovastatina 500 nM o con PD152440 10 μ M produjo una disminución del efecto inhibitorio de la insulina sobre la expresión de ALAS tanto en condiciones basales como estimuladas por fenobarbital (Figura 22). Sin embargo, estos inhibidores de la farnesilación de Ras no modificaron los niveles del mRNA de ALAS en ausencia de insulina.

Similares resultados se obtuvieron en células HepG2 con el inhibidor lovastatina (ver más adelante Figura 28).

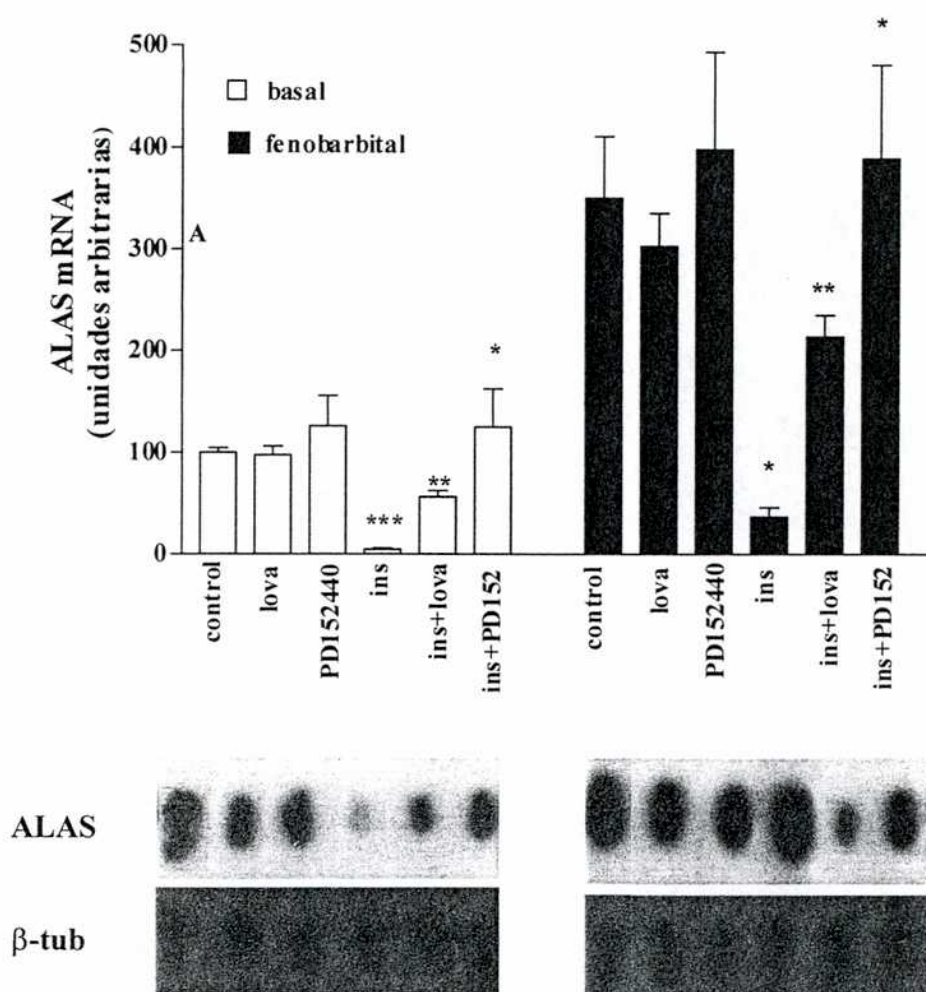


Figura 22 Efecto de lovastatina o PD 152440 sobre el mRNA de ALAS: Las suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 2,5 horas con lovastatina (lova) 500 nM o PD152440 10 μ M en presencia o en ausencia de insulina (ins) 10^{-8} M y/o fenobarbital 0,6 mM. Los inhibidores fueron agregados 30 minutos antes del tratamiento con insulina. La cuantificación de los niveles del mRNA de ALAS se realizó mediante el análisis de los ensayos de slot blot como se describe en Materiales y Métodos. Las autoradiografías muestran un experimento representativo. Las señales autoradiográficas cuantificadas por densitometría se presentan como gráfico de barras normalizadas con las de β -tubulina. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar la muestra conteniendo insulina con la muestra control y las muestras conteniendo lovastatina o PD152440 e insulina con la muestra con insulina (* P < 0,05, ** P < 0,02, *** P < 0,01)

3.2 La sobreexpresión de una mutante dominante negativa de SOS anula el efecto inhibitorio de la insulina.

En otro abordaje experimental, con el fin de obtener mas evidencias acerca de la participación de Ras en la transducción de señales mediada por insulina para regular la expresión de ALAS, recurrimos a ensayos de transfecciones transientes en la línea celular HepG2 con vectores que expresan proteínas intermediarias de la cascada Ras /MAPK. En una primera instancia analizamos el comportamiento de una mutante dominante negativa de la proteína "son of sevenless" (SOS). Esta proteína, intercambiadora de guanil nucleótidos, forma constitutivamente un complejo con la proteína adaptadora "growth factor receptor substrate 2" (Grb2) que, frente a la estimulación con insulina, es reclutada hacia Ras, activándola subsecuentemente, aumentando la relación Ras-GTP/Ras-GDP.

La sobreexpresión del plásmido pCEFLSOS Δ cdc25 (mutante dominante negativa de SOS) en células HepG2 cotransfectadas con el vector pACAT redujo significativamente la acción inhibitoria de la insulina (Figura 23). Por el contrario, la actividad transcripcional basal del promotor de ALAS no fue modificada por la proteína SOS mutada.

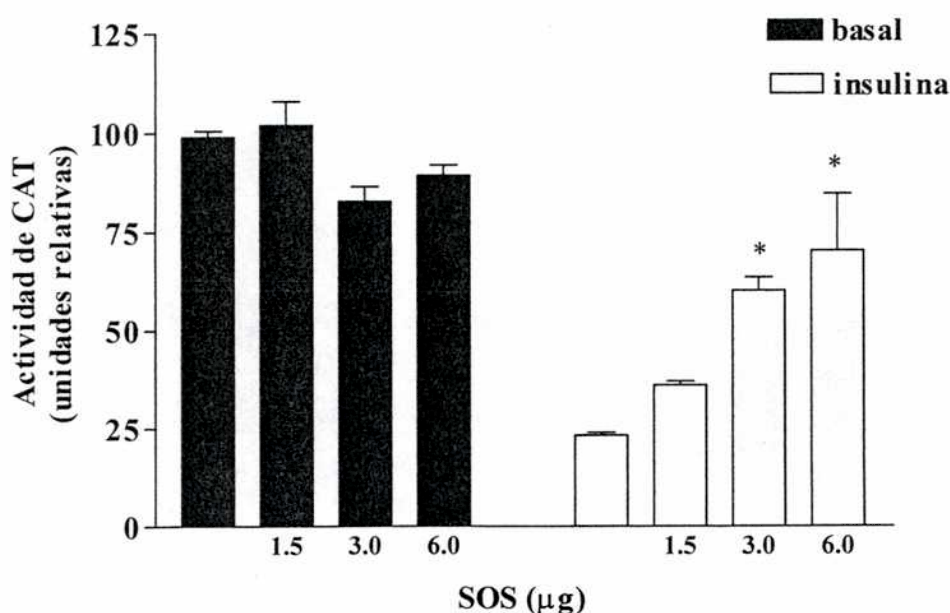


Figura 23 Efecto de la sobreexpresión de una mutante dominante negativa de SOS sobre la actividad transcripcional del promotor de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 4 μg del plásmido pACAT, las cantidades indicadas del plásmido pCEFLSOS Δ cdc25 y 6,5 μg del plásmido de referencia pCEFL β -gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección, en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de cuatro determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras cotransfectadas con las muestras sin cotransfectar (* $P < 0,01$).

3.3 La sobreexpresión de Ras activa o negativa mimetiza o bloquea, respectivamente, el efecto inhibitorio de la insulina.

En esta etapa del trabajo evaluamos el efecto de la sobreexpresión de mutantes de Ras en ensayos de cotransfecciones en células de HepG2. La sobreexpresión del plásmido pCDNA I-RasN17, una mutante dominante negativa que impide el intercambio de GDP por GTP en Ras endógena anulando la transducción de la señal, suprimió la inhibición ejercida por la insulina (Figura 24 A). Por otra parte, la sobreexpresión del plásmido pCEV29RasV12, una mutante constitutivamente activa de Ras, mimetizó el efecto ejercido por la insulina *per se*, independizándose de la señal en el receptor, efecto que se vio incrementado en presencia de la hormona (Figura 24 B). De estos resultados, podemos concluir que la activación de la cascada de Ras/MAPK al nivel de Ras es tan efectiva como la insulina para reprimir la expresión de ALAS.

4. Raf y MEK actúan como efectores río abajo de Ras

4.1 La sobreexpresión de una mutante dominante negativa de la proteína Raf anuló el efecto ejercido por insulina sobre el mRNA de ALAS

La transmisión de señales de proliferación y diferenciación desde la membrana hacia el núcleo requiere la acción coordinada de numerosas proteínas. La quinasa Raf actúa como intermediaria central en varias vías de transducción, conectando quinasas de tirosina y Ras con quinasas de serina/treonina que yacen río arriba y río a bajo de ella, respectivamente. La forma activada de Ras-GTP puede unirse a Raf. Esta interacción, por cierto de alta afinidad ($K_D = 20$ nM), localiza a Raf en la membrana plasmática, constituyendo el primer evento de su activación para poder así, continuar la propagación de la señal hacia el núcleo (Morrison y Cutler, 1997). Con el objeto de determinar como se transduce la señal activada por insulina río abajo de Ras, evaluamos el efecto de una mutante de la quinasa de serina/treonina (pCDNA I c-Raf K375W). La sobreexpresión de este vector en células HepG2 transfectadas con el plásmido pACAT bloqueó significativamente la inhibición de la transcripción mediada por insulina. La actividad basal del promotor no se vio modificada por la presencia de esta mutante de Raf (Figura 25).

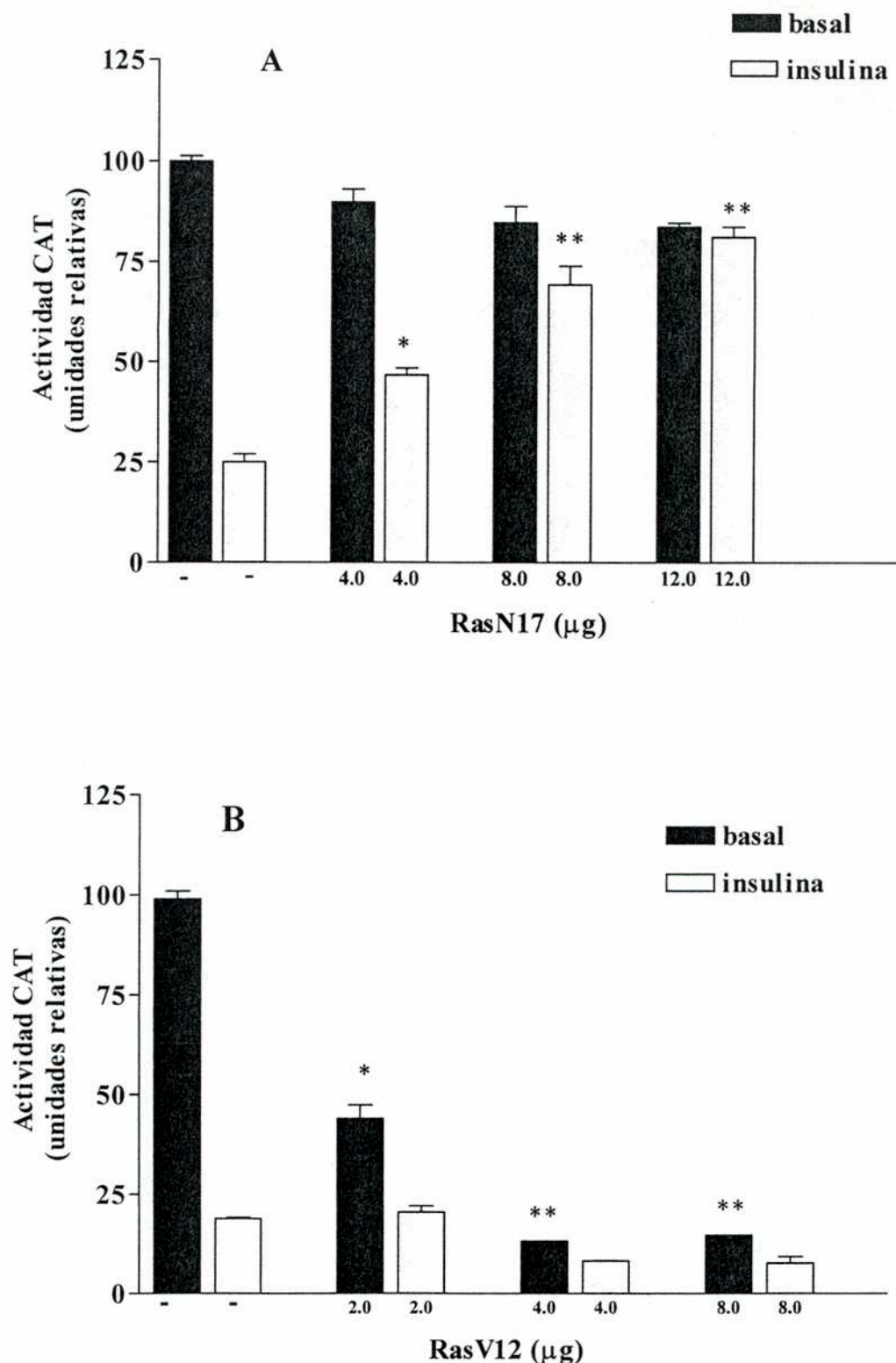


Figura 24 Efecto de la sobreexpresión de mutantes de Ras sobre la actividad transcripcional del promotor de *ALAS* en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 4 µg del plásmido pACAT y distintas cantidades del plásmido pCDNAI-RasN17 o pCEV29RasV12 según se indica en la figuras A o B y 6,5 µg del plásmido de referencia pCEFLβ-gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno, que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras cotransfectadas con las muestras sin cotransfectar. (* $P < 0,01$, ** $P < 0,02$).

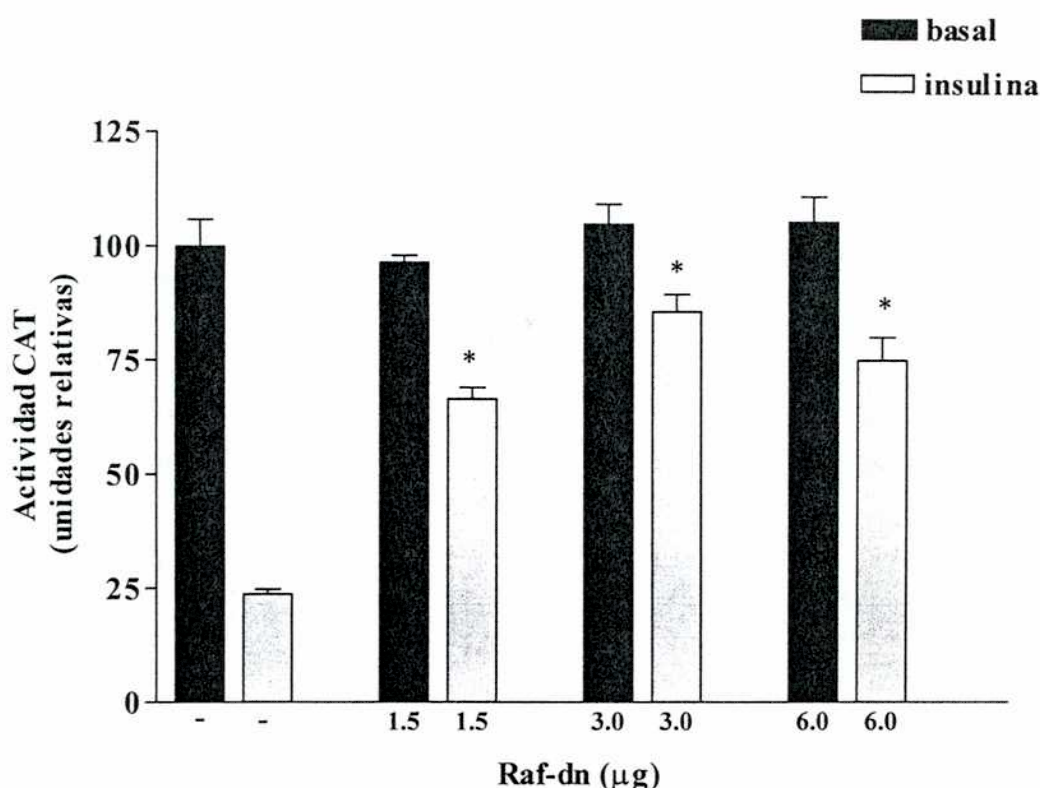


Figura 25 Efecto de la sobreexpresión de una mutante dominante negativa de Raf sobre la actividad transcripcional del promotor de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 4 µg del plásmido pACAT, las cantidades indicadas del plásmido pCDNAI c-Raf K375W (Raf-dn) y 6,5 µg del plásmido de referencia pCEFL β-gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección, en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras cotransfectadas con las muestras sin cotransfectar (* $P < 0,01$).

4.2 Inhibidores de la proteína MEK bloquean el efecto represor de la insulina

Analizamos el efecto de un inhibidor de la quinasa MEK sobre la acción ejercida por la hormona en la regulación de la expresión de ALAS. Acudimos al uso de PD98059, un agente químico de bajo peso molecular, permeable a la membrana plasmática, que inhibe la actividad de MEK, impidiendo de este modo la activación de MAPK *in vivo* e *in vitro* (Alessi y col, 1995) (Figura 26).

El PD98059 suprimió la acción inhibitoria de insulina sobre la transcripción de ALAS en cultivos primarios de hepatocitos tanto en condiciones basales como de estimulación por fenobarbital. El inhibidor de MEK no produjo modificaciones en los niveles del

mensajero de ALAS en ausencia de insulina y en ningún caso modificó los niveles del mRNA de la β -tubulina (Figura 27).

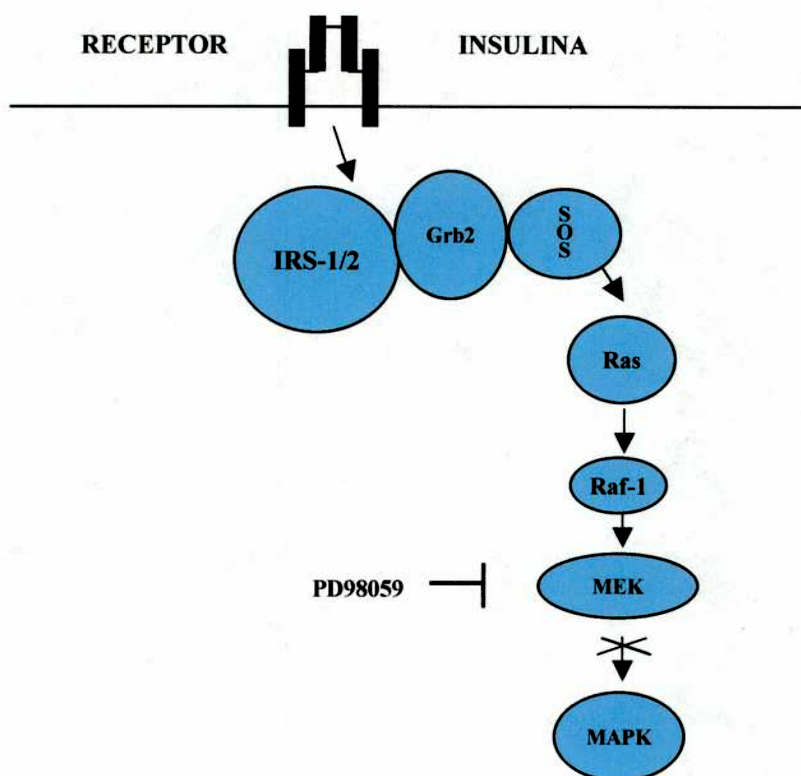


Figura 26 Sitio de acción de PD98059.

Luego determinamos el efecto de estos inhibidores de proteínas intermediarias de la cascada de Ras/MAPK sobre la represión de la transcripción de ALAS ejercida por insulina en la línea celular HepG2. Las células fueron deprivadas de suero durante 24 horas y tratadas posteriormente con el correspondiente inhibidor en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M (Figura 28). El agregado de lovastatina 500 nM o de PD098059 10 μ M bloqueó la inhibición, dependiente de insulina, de la transcripción de ALAS de una manera similar a la observada en los cultivos primarios de hepatocitos. La presencia de estos agentes químicos no modificó los niveles basales del mensajero de ALAS en ausencia de la hormona y en ningún caso los niveles de la expresión del gen de la β -tubulina. Estos datos indican que la vía de Ras/MAPK interviene en la señalización de insulina ejercida sobre la expresión de ALAS.

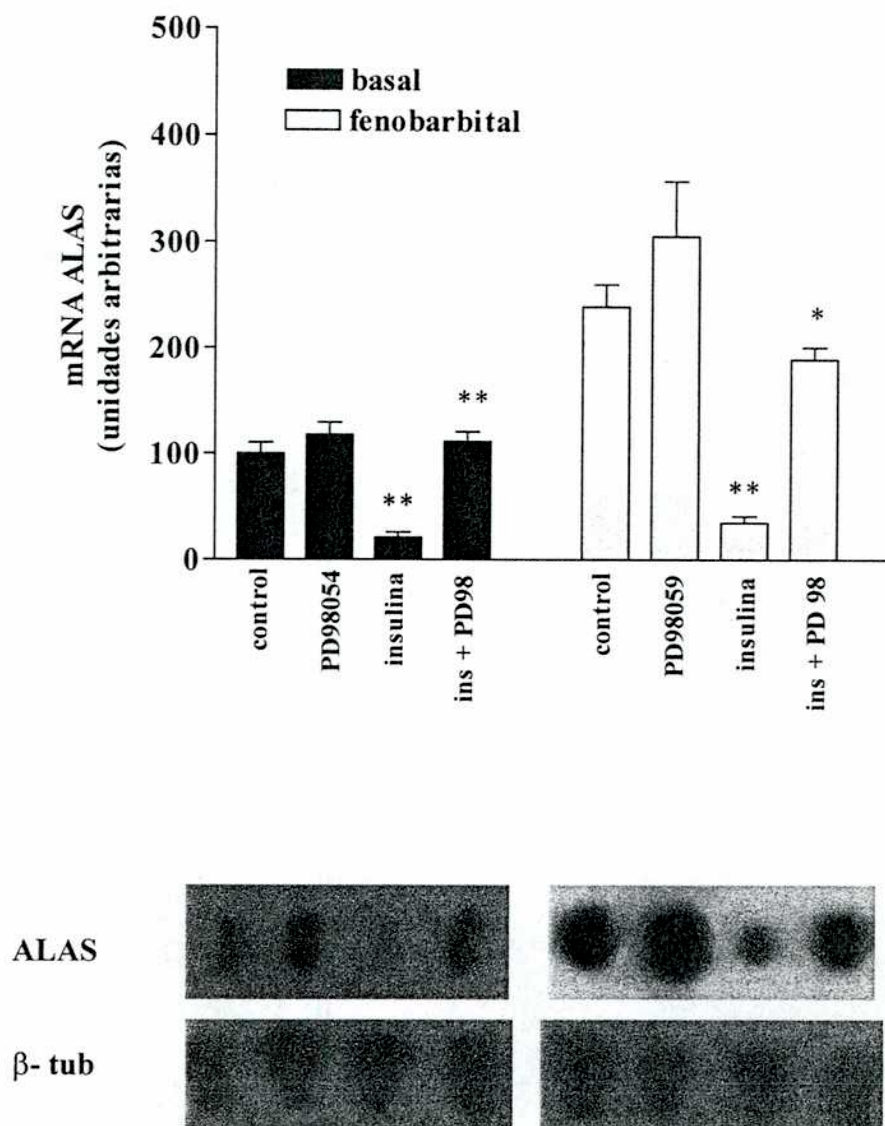


Figura 27 Efecto de PD98059 sobre el mRNA de ALAS en hepatocitos de rata: Las suspensiones de hepatocitos fueron incubadas durante 2,5 horas con PD98059 10 μ M en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M y/o fenobarbital 0,6 mM. Los inhibidores fueron agregados 30 minutos previos al tratamiento con insulina. La cuantificación de los niveles del mRNA de ALAS se realizó mediante el análisis de los ensayos de slot blot como se describe en Materiales y Métodos. Las autoradiografías muestran un experimento representativo. Las señales autoradiográficas cuantificadas por densitometría se presentan como gráfico de barras normalizadas con las de β -tubulina. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de cuatro determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar la muestra conteniendo insulina con la muestra control y las muestras conteniendo PD98059 e insulina con la muestra con insulina (* $P < 0,05$, ** $P < 0,02$).

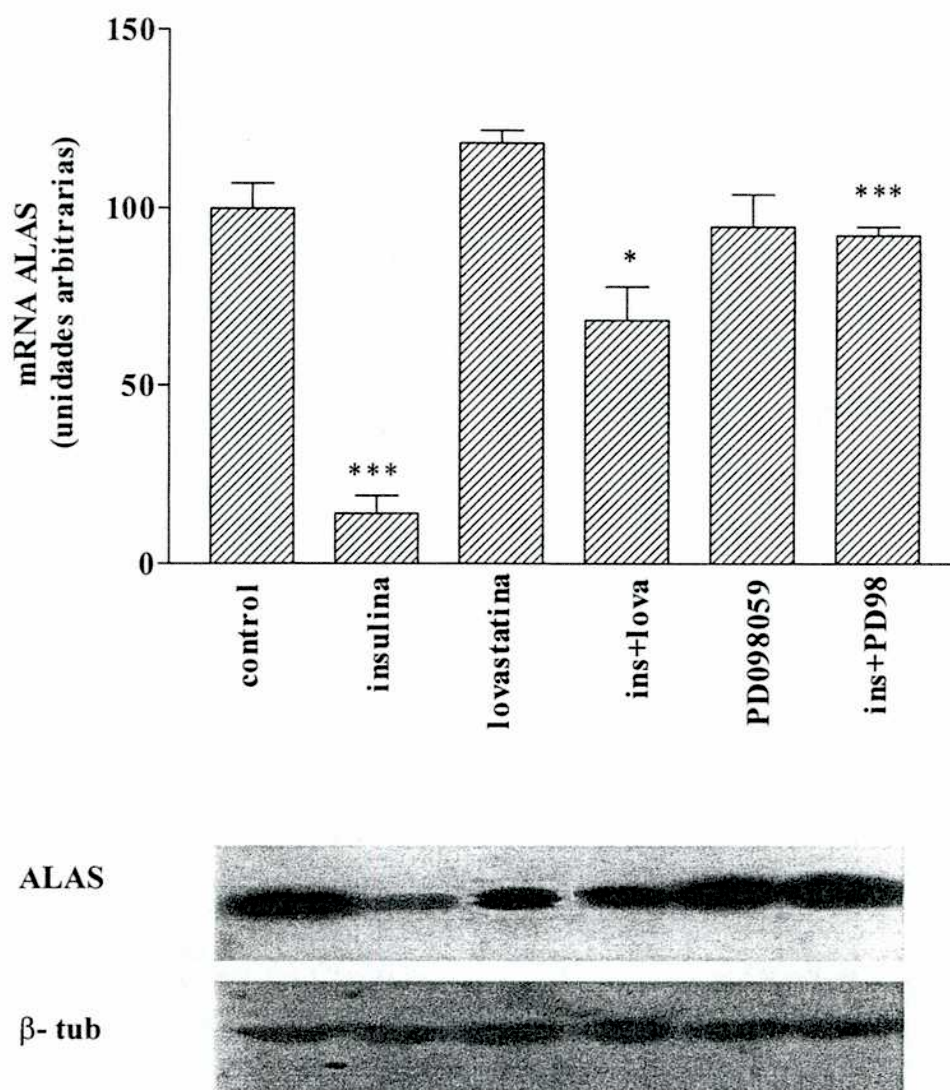


Figura 28 Efecto de lovastatina o PD98059 sobre el mRNA de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron deprivadas de suero durante 24 horas e incubadas posteriormente durante 8 horas con lovastatina 500nM o PD98059 10 μ M en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. Los inhibidores fueron agregados 30 minutos previos al tratamiento con insulina. La cuantificación de los niveles del mRNA de ALAS se realizó mediante el análisis por Northern blot como se describe en Materiales y Métodos. Las autoradiografías muestran un experimento representativo. Las señales autoradiográficas cuantificadas por densitometría se presentan como gráfico de barras normalizadas con las de β -tubulina. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar la muestra conteniendo insulina y lovastatina o PD98059 con la muestra con insulina (* $P < 0,05$, *** $P < 0,01$).

4.3 La sobreexpresión de mutantes activas y negativas de MEK confirman su participación en la acción de la insulina

Las cascadas de señalización de las MAPKs son las principales rutas de comunicación entre la membrana plasmática y proteínas regulatorias intracelulares, organizadas dentro de una vasta red que concluye en dar respuestas celulares determinadas.

En vista de las evidencias obtenidas de los resultados descriptos y con el objetivo de confirmar la participación de MEK en la cascada de transducción de señales disparada por insulina que ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de ALAS, se estudió el comportamiento de dos mutantes, una constitutivamente activa y otra dominante negativa de MEK.

La sobreexpresión del plásmido pCDNA III-MEK-A, una mutante dominante negativa de MEK, reprimió el efecto de insulina sobre la actividad transcripcional del promotor de ALAS en ensayos de cotransfecciones con el plásmido pACAT en la línea celular HepG2. Por otra parte, en el mismo tipo de ensayos, la presencia de una mutante constitutivamente activa de MEK, obtenida a partir del vector de expresión pCDNA III-MEK-E mimetizó *per se* el efecto ejercido por la insulina (Figura 29).

5. MAPK/ERK1/2 y p90RSK quinasas finales involucradas en el efecto inhibitorio de la insulina sobre la expresión de ALAS

5.1 La sobreexpresión de una mutante dominante negativa de MAPK/ERK1/2 bloquea la acción de la insulina

La MAPK está localizada al final de la cascada que se inicia en los receptores de la membrana, receptores con actividad de quinasa de tirosina, y que continúa a través de un proceso de múltiples pasos donde intervienen moléculas claves que integran apropiadamente la señal hacia el núcleo. Luego del estímulo, en nuestro caso con insulina, la MAPK es fosforilada de manera específica por MEK y transloca al núcleo, donde fosforila numerosos sustratos entre ellos factores de transcripción (Adachi y col, 1999). Decidimos entonces evaluar la participación de la MAPK en la inhibición ejercida por insulina sobre el gen de ALAS.

Realizamos ensayos de cotransfecciones con vectores de expresión para MAPK “wild type” (pCDNA I HA-ERK2) o MAPK con pérdida de actividad de quinasa pCDNA I HA-

ERK₂ dk) y el plásmido pACAT en células HepG2. La sobreexpresión del plásmido MAPK wt no modificó la actividad del promotor tanto en presencia como en ausencia de insulina. La sobreexpresión de la mutante sin actividad de quinasa bloqueó la acción de la hormona pero no modificó la actividad basal del promotor de ALAS (Figura 30).

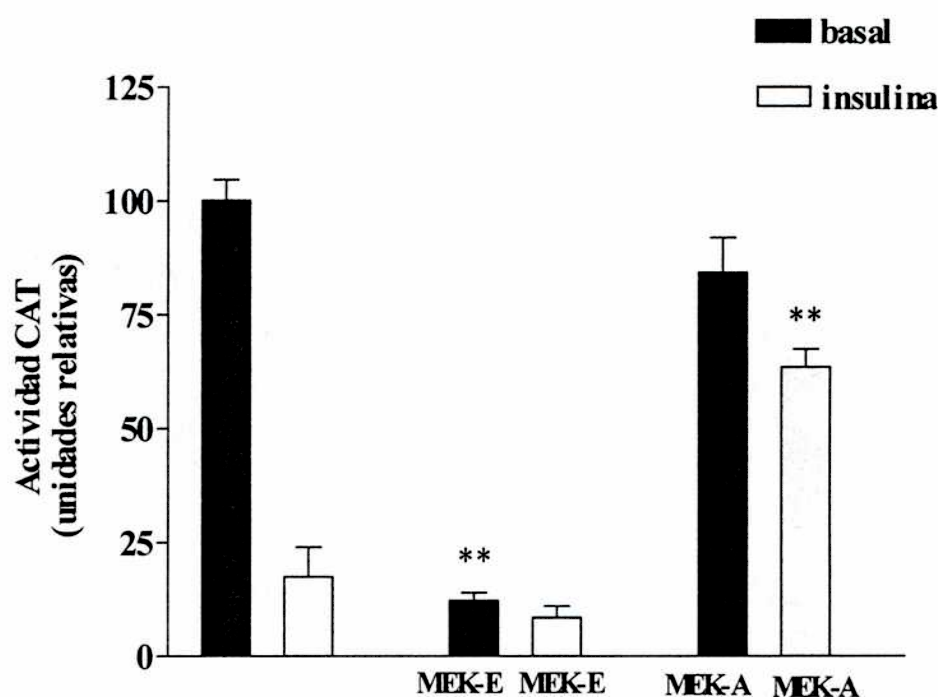


Figura 29 Efecto de la sobreexpresión de mutantes de MEK sobre la actividad transcripcional del promotor de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 4 µg del plásmido pACAT, 3 µg del plásmido pCDNAIII-MEK-E (MEK-E) o 3 µg del plásmido pCDNAIII-MEK-A (MEK-A) según se indica en la figura y 6,5 µg del plásmido de referencia pCEFLβ-gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección, en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10⁻⁸ M. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno, que se establece como 100. Los resultados representan el promedio ± E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras cotransfectadas con las muestras sin cotransfectar (** P < 0,01).

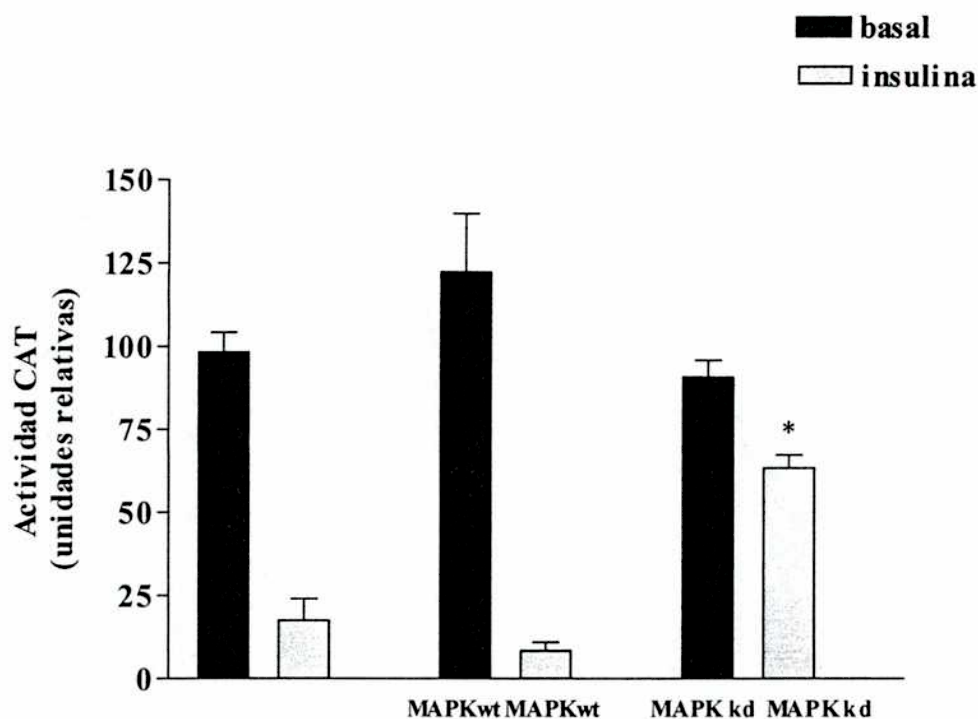


Figura 30 Efecto de la sobreexpresión de mutantes de MAPK sobre la actividad transcripcional del promotor de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 4 μ g del plásmido pACAT, 3 μ g del plásmido pCDNA I HA-ERK₂ (MAPKwt) o 3 μ g del plásmido pCDNA I HA-ERK₂ d.k. (MAPK kd) según se indica en la figura y 6,5 μ g del plásmido de referencia pCEFL β -gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección, en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras cotransfectadas con las muestras sin cotransfectar (* $P < 0,05$).

5.2 Insulina activa a la MAPK en células HepG2

Con la finalidad de confirmar que insulina activa a la MAPK en las células HepG2 y que los inhibidores PD152440 o PD98059 son efectivos a la concentración empleada en los experimentos anteriores determinamos la actividad de quinasa de MAPK. La incubación de células HepG2 con insulina 10^{-8} M causó un aumento de la actividad de MAPK determinado como la capacidad de fosforilar al sustrato MBP. Este aumento fue bloqueado cuando las células fueron previamente incubadas con PD152440 10 μ M o PD98059 10 μ M. El preincubado de las células con wortmanina 200 nM no modificó la activación de MAPK por insulina (Figura 31)

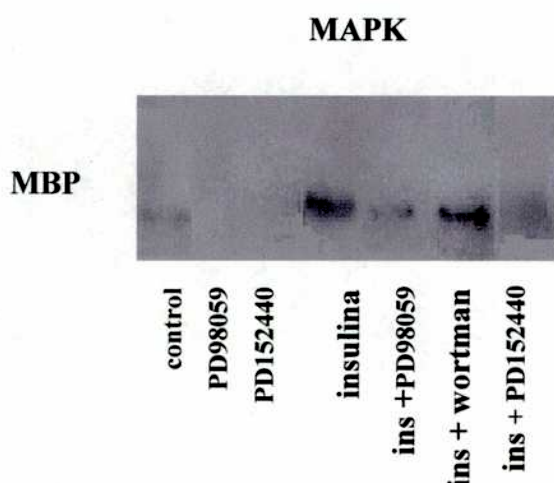


Figura 31 Efecto de insulina, wortmanina, PD 152440 y PD98059 sobre la actividad de la MAPK en células HepG2. Las células HepG2 fueron deprivadas de suero durante 24 horas e incubadas en presencia o en ausencia de los inhibidores indicados en la figura durante 30 minutos previos al agregado de insulina 10^{-8} M. La actividad de la fosfoMAPK inmunoprecipitada se determinó luego de 10 minutos del tratamiento con insulina, según lo descrito en Materiales y Métodos. La radioactividad incorporada en la MBP se visualiza en la autoradiografía.

5.3 Una mutante constitutivamente activa de la p90RSK mimetiza la inhibición ejercida por la insulina.

La quinasa ribosomal p90RSK es un miembro de la creciente familia de quinasas de proteínas activadas por MAPK (MAPKAPK). Esta proteína, que es fosforilada por MAPK, desempeña un papel muy importante en la regulación de la transcripción de diferentes genes (Chen y col, 1996). Debido a lo expuesto, analizamos el comportamiento de una mutante constitutivamente activa de la p90RSK frente a la regulación ejercida por insulina en la transcripción de ALAS.

Células HepG2 fueron transfectadas con el plásmido pACAT y el plásmido pK3HRSK₂ que expresa la forma “wild type” de la quinasa ribosomal o con el plásmido pK3HRSK₂Y707A que expresa una mutante constitutivamente activa de la p90RSK. En esta última se ha reemplazado el residuo tirosina 707 por alanina, presente en un dominio autoinhibitorio, ubicado en una α hélice de la porción carboxilo terminal de la proteína (Poteet-Smith y col, 1999). La forma “wild type” de la p90RSK no modificó la actividad del promotor de ALAS tanto en presencia como en ausencia de insulina. La versión constitutivamente activa de la p90RSK mimetizó *per se* el efecto de la insulina, el cual se vio incrementado ante la presencia de la hormona (Figura 32).

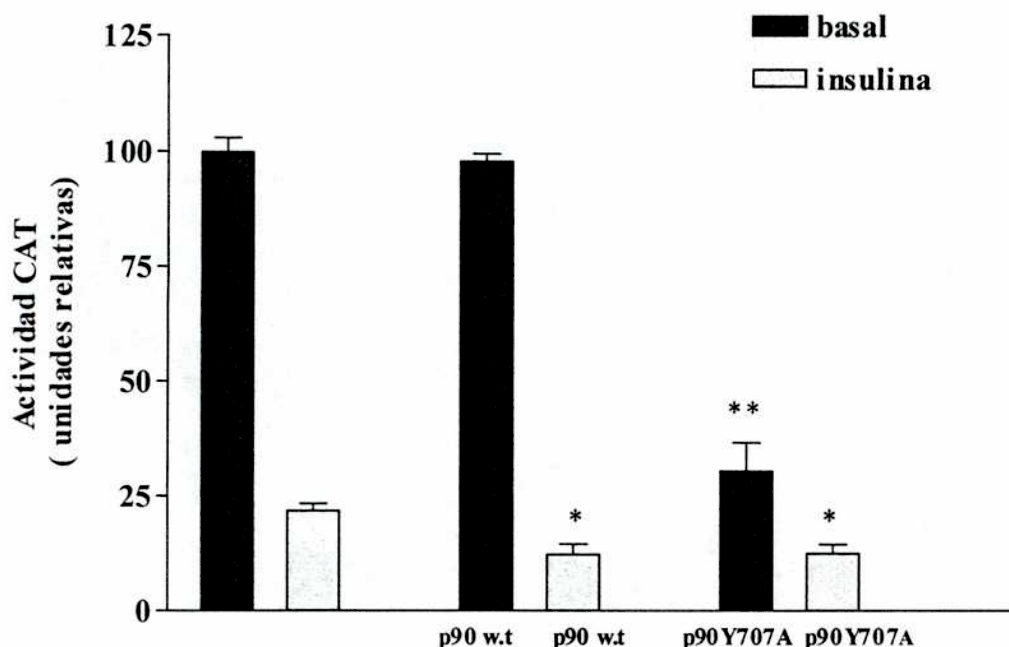


Figura 32 Efecto de la sobreexpresión de mutantes de p90RSK sobre la actividad transcripcional del promotor de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 4 μ g del plásmido pACAT, 3 μ g del plásmido pK3HRSK₂ (p90wt) o 3 μ g del plásmido pK3HRSK₂Y707A (p90Y707A) según se indica en la figura y 6,5 μ g del plásmido de referencia pCEFL β -gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa relativa al control sin agregado alguno, que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras cotransfectadas con las muestras sin cotransfectar (*P < 0,05, **P < 0,01).

5.4 El efecto de la mutante constitutivamente activa de la p90RSK sobre la transcripción de ALAS es bloqueado por la wortmanina

Publicaciones recientes indican que la p90RSK debe ser fosforilada en sus dos dominios catalíticos, uno amino y otro carboxi-terminal para ejercer la totalidad de su actividad de quinasa. El dominio carboxi-terminal, que se piensa, está involucrado en eventos de autofosforilación es fosforilado por MAPK/ERK, mientras que el dominio catalítico amino terminal, responsable de fosforilar sustratos exógenos, es fosforilado por la quinasa dependiente de fosfoinosítidos PDK-1 (Richards y col., 1999). La activación de la quinasa ribosomal *in vivo* requiere ambas fosforilaciones, estando regulada entonces, por vías dependientes de MAPK/ERK y de PDK-1. Por este motivo y dado que tanto, inhibidores de la cascada de PI3K/PDK-1/PKB como de la de Ras/MAPK suprimen en gran parte la inhibición ejercida por insulina sobre la expresión de ALAS, decidimos

analizar el efecto de la wortmanina en cotransfecciones realizadas con el plásmido pACAT y pK3HRSK₂Y707A.

Supusimos que la versión constitutivamente activa de la quinasa ribosomal iba a permanecer insensible al inhibidor, ya que prescindía de la necesidad de ser fosforilada por PDK-1. Los resultados de la Figura 33 demuestran, sin embargo, que el efecto producido por la mutante constitutivamente activa de la p90RSK sobre la actividad del promotor de ALAS fue atenuado frente al tratamiento con wortmanina 200 nM

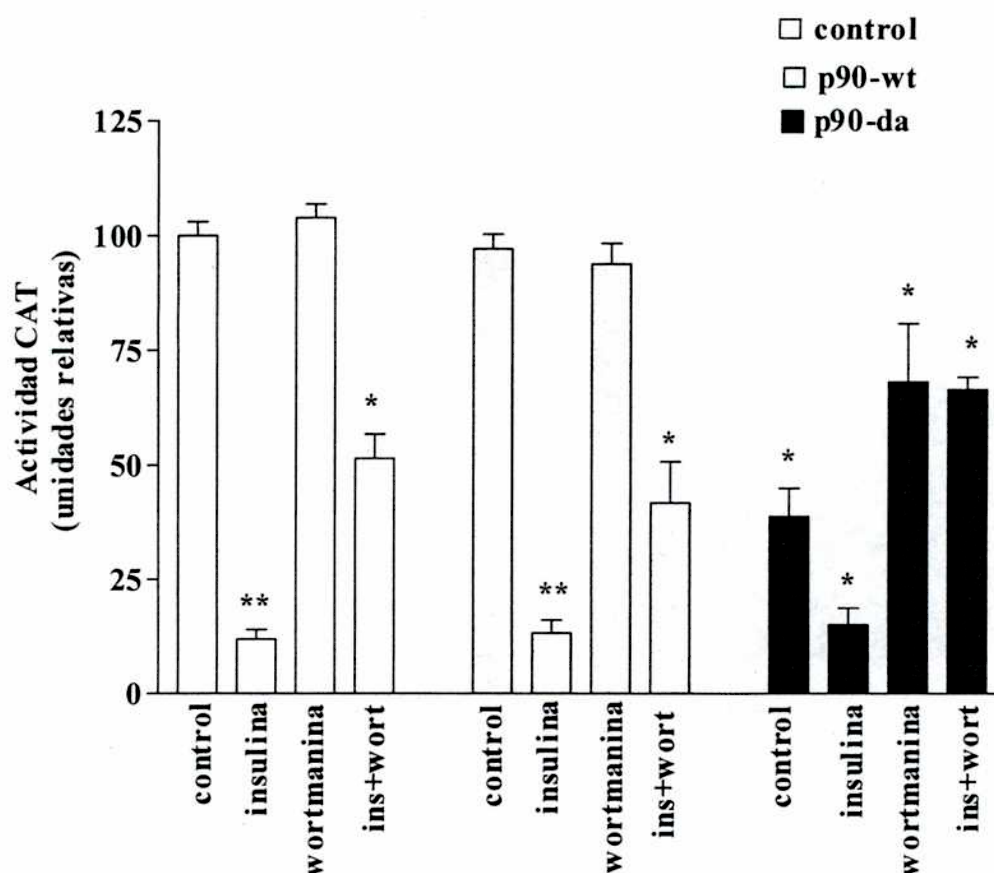


Figura 33 Efecto de la sobreexpresión de mutantes de p90RSK sobre la actividad transcripcional del promotor de ALAS en células HepG2 en presencia de wortmanina: Las células HepG2 fueron transfectadas con 4 µg del plásmido pACAT, 3 µg del plásmido pK3HRSK₂ (p90 wt) o 3 µg del plásmido pK3HRSK₂Y707A (p90 da) según se indica en la figura y 6,5 µg del plásmido de referencia pCEFLβ-gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10⁻⁸ M y/o wortmanina 200 nM. La wortmanina fue agregada 30 minutos previos al agregado de la hormona y repuesta cada 6 horas de incubación. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno. Los resultados representan el promedio ± E.S. de cuatro determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras conteniendo insulina con las muestras control y las muestras conteniendo el inhibidor e insulina con las muestras conteniendo solamente insulina (*P< 0,05, **P< 0,01).

Estos datos sugieren que ambas vías deben estar funcionalmente activas para lograr la totalidad del efecto inhibitorio de la insulina sobre la transcripción de ALAS.

6. Interdependencia (“crosstalk”) entre vías

6.1 Las vías de PI3K/PKB y Ras/MAPK deben estar funcionalmente disponibles para transducir la acción de la insulina hacia el promotor de ALAS

Los datos obtenidos de los experimentos anteriores sugieren que la activación de una de las dos vías de transducción es suficiente para inhibir la actividad transcripcional del promotor de ALAS mimetizando el efecto producido por la insulina. Dado que eventos individuales de señalización no forman simplemente una cascada lineal sino que son parte de una compleja e interdependiente red celular, analizamos en el laboratorio la posibilidad de la existencia de un nexo (“cross-talk”) entre las vías de PI3K/PKB y la de Ras/MAPK.

Para ello, realizamos ensayos de cotransfecciones con mutantes constitutivamente activas de una vía en presencia de un inhibidor de la otra y viceversa. Las mutantes constitutivamente activas de PKB-mir, RasV12 y MEK-E inhibieron la actividad transcripcional del promotor de ALAS independientemente de la presencia de insulina como pudo observarse en resultados anteriores (figuras 16, 24 B y 29). El tratamiento con wortmanina 200 nM de las células HepG2 cotransfectadas transientemente con el plásmido pACAT y los vectores de expresión para RasV12 o MEK-E bloqueó significativamente la inhibición de la transcripción de ALAS tanto en presencia como en ausencia de insulina (Figura 34). Del mismo modo cuando las células HepG2 cotransfectadas con la mutante constitutivamente activa PKB-mir, fueron incubadas con el inhibidor de MEK, PD98059 10 μ M, el efecto inhibitorio de la insulina fue bloqueado independientemente de la presencia de la hormona peptídica (Figura 34).

Estos datos sugieren que ambas vías deben estar disponibles y pasibles de ser activadas para obtener una respuesta completa a la presencia de insulina sobre la regulación transcripcional del gen de ALAS.

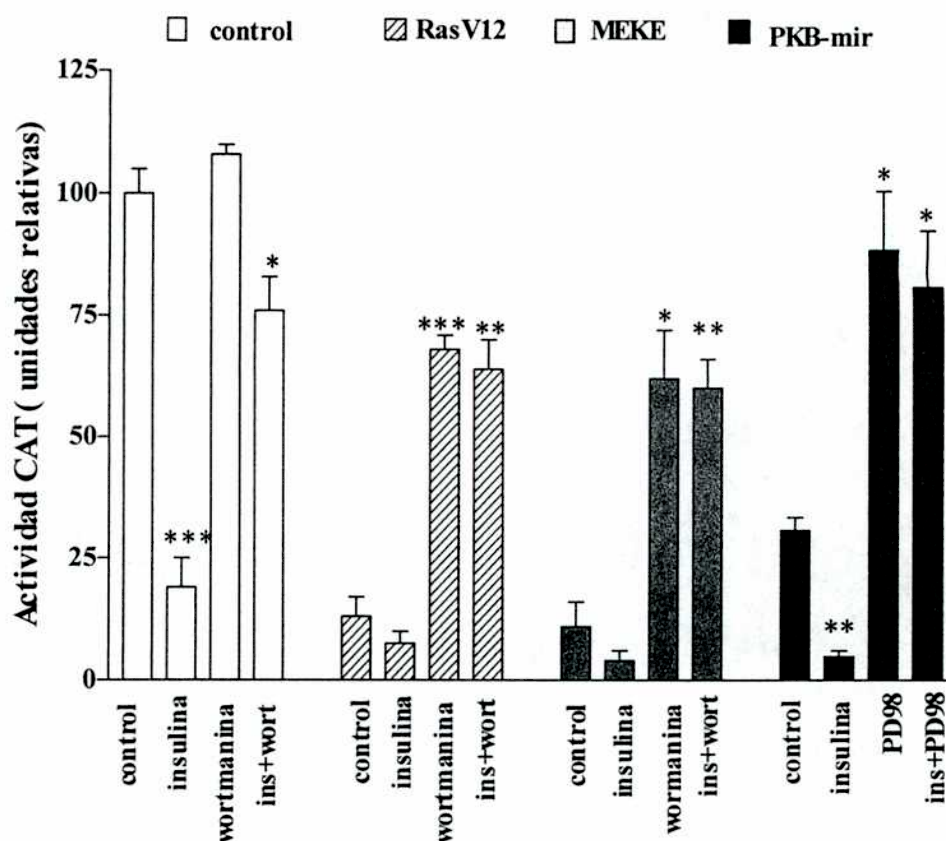


Figura 34. Las vías de la PI3K/PKB y de Ras/MAPK participan en la inhibición mediada por insulina de la actividad transcripcional del promotor de ALAS: Las células HepG2 fueron transfectadas con 4 μ g del plásmido pACAT y 4 μ g del plásmido pCEV29RasV12 (RasV12), o 3 μ g del plásmido pCDNAIII-MEKE (MEKE), 6 μ g del plásmido pCEFL HA-myrAkt (PKB-mir). Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M y/o wortmanina (wort) 200 nM y/o PD98059 (PD98) 10 μ M. Los inhibidores fueron agregados 30 minutos previos a la adición de la hormona. La wortmanina fue repuesta cada 6 horas de incubación. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se utilizó el test de Student para comparar las muestras conteniendo insulina con las muestras control y las muestras conteniendo el inhibidor e insulina con las muestras conteniendo solamente insulina (* $P < 0,05$; ** $P < 0,02$; *** $P < 0,01$).

6.2 La PKC está involucrada en la regulación de la transcripción de ALAS mediada por insulina

La activación de la PKC conlleva a la iniciación de diversas respuestas celulares tales como alteración de actividades metabólicas, diferenciación, proliferación y apoptosis. La existencia en la bibliografía de datos acerca de genes que son regulados de manera similar por insulina y ésteres de forbol (Chao y col, 1993) y la demostración en el laboratorio que el éster de forbol, TPA, inhibe la expresión del gen de ALAS tanto en condiciones basales como estimuladas por fenobarbital (Varone y Cánepa, 1997) abre la posibilidad que PKC esté involucrada en el efecto de la represión del gen de ALAS mediado por insulina. Con este objetivo analizamos el efecto de la “downregulation” y de la inhibición de la actividad de PKC sobre la acción de la insulina.

La activación de la PKC por ésteres de forbol ocasiona su translocación a la membrana plasmática y consecuentes cambios conformacionales, por los cuales se exponen sitios sensibles a clivajes por proteasas (Orr y Newton, 1994). Los hepatocitos de rata fueron preincubados con TPA 1 μ M durante 1,5 horas, prolongándose la incubación por 2,5 horas más en presencia o en ausencia de insulina 5 nM y/o fenobarbital 0,6 mM. El tratamiento prolongado con TPA suprimió el efecto inhibitorio de insulina sobre el mRNA de ALAS tanto en condiciones basales como estimuladas con fenobarbital (comparar la calle 4 con la 2 y la calle 8 con la 7 de la Figura 35). Para confirmar estos resultados estudiamos el efecto de la hormona en presencia de calfostin C, un inhibidor específico de la PKC. La presencia del inhibidor revirtió casi por completo la represión de la transcripción de ALAS ejercida por insulina (comparar la calle 11 con la 2 y la calle 12 con la 6 de la Figura 35).

6.3 La PKC y la insulina inhiben la expresión génica de ALAS por mecanismos diferentes

La estimulación de células con factores de crecimiento, ésteres de forbol e insulina induce la activación de ciertos miembros de la superfamilia de quinasas de proteínas AGC, que incluye la PKB, la p70^{S6K}, la quinasa inducida por suero y glucocorticoides (SGK) y múltiples isoformas de la PKC (Balendran y col, 2000). Por otra parte, la activación de la MAPK es una respuesta temprana a una amplia variedad de agentes como insulina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), ionóforos de calcio y ésteres de forbol (Chao y col, 1994). La propagación de señales extracelulares de manera secuencial desde Ras hacia Raf y MEK ha sido propuesta como el mecanismo más importante para la activación de

MAPK. Sin embargo, hay evidencias que la PKC- α puede fosforilar y activar directamente a Raf-1 (Kolch y col, 1993).

Tomando en cuenta estos datos, investigamos si estos agentes individualmente, emplean el mismo o diferente camino para alcanzar el mismo punto final. Los hepatocitos de rata fueron incubados con TPA 1 μ M, en ausencia o en presencia de los inhibidores wortmanina 200 nM, rapamicina 100 nM o lovastatina 500 nM. También se preincubaron con TPA (TPA pre) por 1,5 horas las células con la finalidad de depletar a la PKC. La inhibición de la transcripción de ALAS por TPA fue insensible a la presencia de los inhibidores mencionados (comparar el efecto de wortmanina y lovastatina en células tratadas con insulina y en células tratadas con TPA en la Figura 36). El efecto inhibitorio de TPA prevaleció en células incubadas con insulina y wortmanina o lovastatina. La represión del gen de ALAS fue revertida en todos los casos donde los hepatocitos fueron expuestos al tratamiento prolongado con el éster de forbol. La presencia de wortmanina no afectó la acción ejercida por PKC, lo que sugiere que esta quinasa ejerce su acción de manera independiente de la vía de la PI3K.

La PKC puede activar a la MAPK por una ruta distinta a la empleada por insulina, que presumiblemente convergería al nivel de, o río abajo de Raf-1 obviando la necesidad de la activación de Ras por el mecanismo disparado por insulina en su receptor .

Con el propósito de confirmar los resultados obtenidos al tratar las células con TPA y lovastatina en ausencia o presencia de insulina, realizamos experimentos empleando otro inhibidor de la farnesilación de Ras, PD152440 (Figura 37). Este agente químico no modificó la represión ejercida por el éster de forbol sobre la expresión de ALAS, tanto en presencia como en ausencia de la hormona.

En varios estudios (Chao y col, 1993) se ha demostrado que Raf-1 es necesaria para la activación de MAPK frente algunos pero no todos los estímulos dentro de un mismo contexto celular, lo que indica la existencia de vías alternativas

Considerando la posibilidad de rutas alternativas, analizamos la necesidad de MEK en el camino de señalización de PKC hacia el gen de ALAS. Las suspensiones de hepatocitos fueron preincubadas con PD98059 10 μ M y al cabo de 30 minutos estimuladas con TPA en presencia o en ausencia de insulina. El inhibidor de MEK no alteró el efecto inhibitorio de TPA en las condiciones ensayadas (Figura 37).

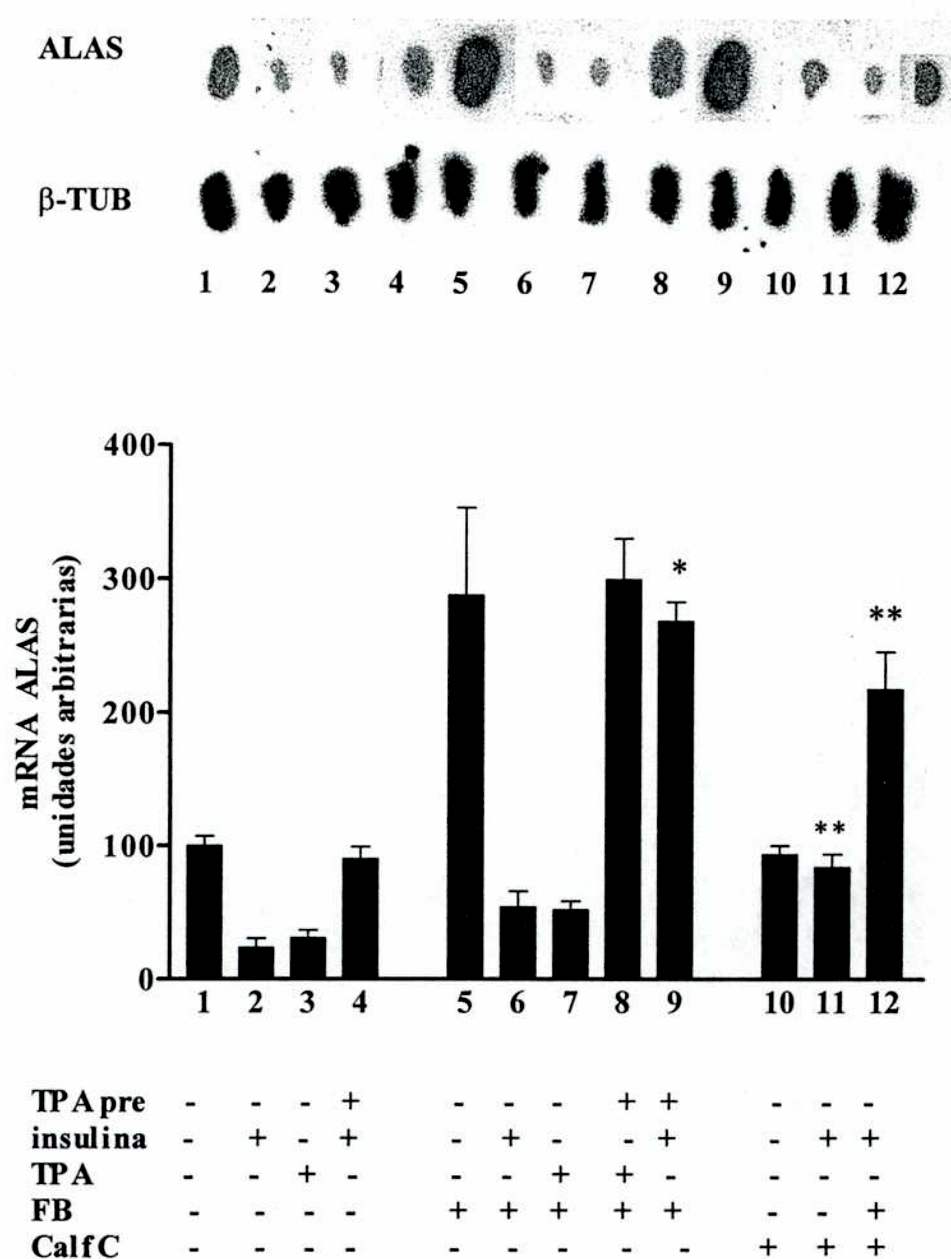


Figura 35 Efecto del tratamiento prolongado con TPA o calfostin C sobre el mRNA de ALAS en hepatocitos de rata: Los hepatocitos fueron preincubados durante 1,5 horas en presencia o ausencia de TPA 1 μ M (TPApre), prolongándose la incubación por 2,5 horas más con las adiciones indicadas en la figura. La cuantificación de los mRNA de ALAS se realizó mediante ensayos de slot blot como se describe en Materiales y Métodos. Las autorradiografías corresponden a un experimento representativo. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de cuatro determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar la muestra 9 con la muestra 6 (* $P < 0,01$), la muestra 11 con la muestra 2 y la muestra 12 con la muestra 6 (** $P < 0,02$). FB, fenobarbital 0,6 mM; TPA 1 μ M; insulina 5 nM; Calf C, calfostin C 1 μ M; β -TUB, β -tubulina.

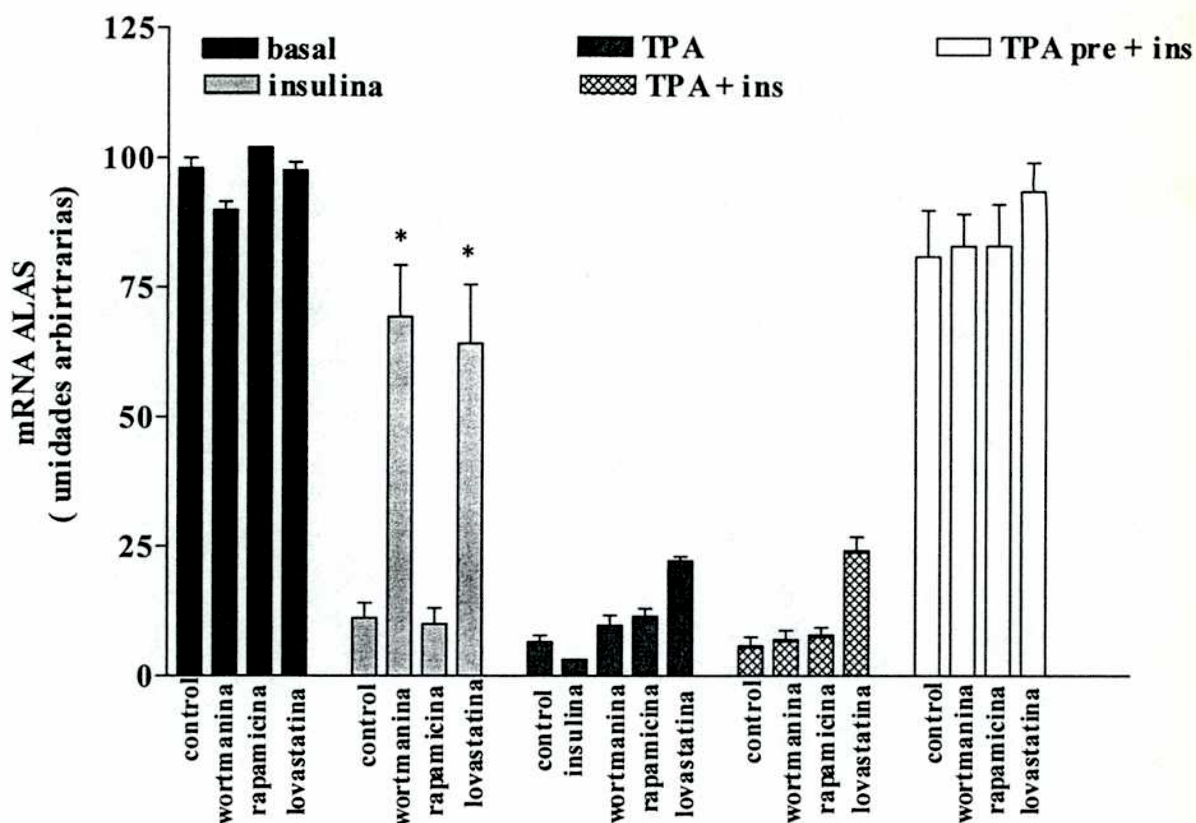


Figura 36 Efecto del TPA o del tratamiento prolongado con TPA y wortmanina, lovastatina o rapamicina sobre el mRNA de ALAS en hepatocitos de rata: Los hepatocitos fueron incubados 2,5 horas con TPA $1\mu\text{M}$ en presencia o ausencia de insulina 10^{-8} M (ins), wortmanina 200 nM, rapamicina 100 nM o lovastatina 500 nM o preincubados durante 1,5 horas en presencia o ausencia de TPA $1\mu\text{M}$ (TPApre), prolongándose la incubación por 2,5 horas más con las adiciones indicadas en la figura. Los inhibidores fueron agregados 30 minutos antes del tratamiento con insulina y/o TPA. La cuantificación de los mRNA de ALAS se realizó mediante el análisis de los ensayos de slot blot como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras con inhibidores con las muestras control (* $P < 0,01$).

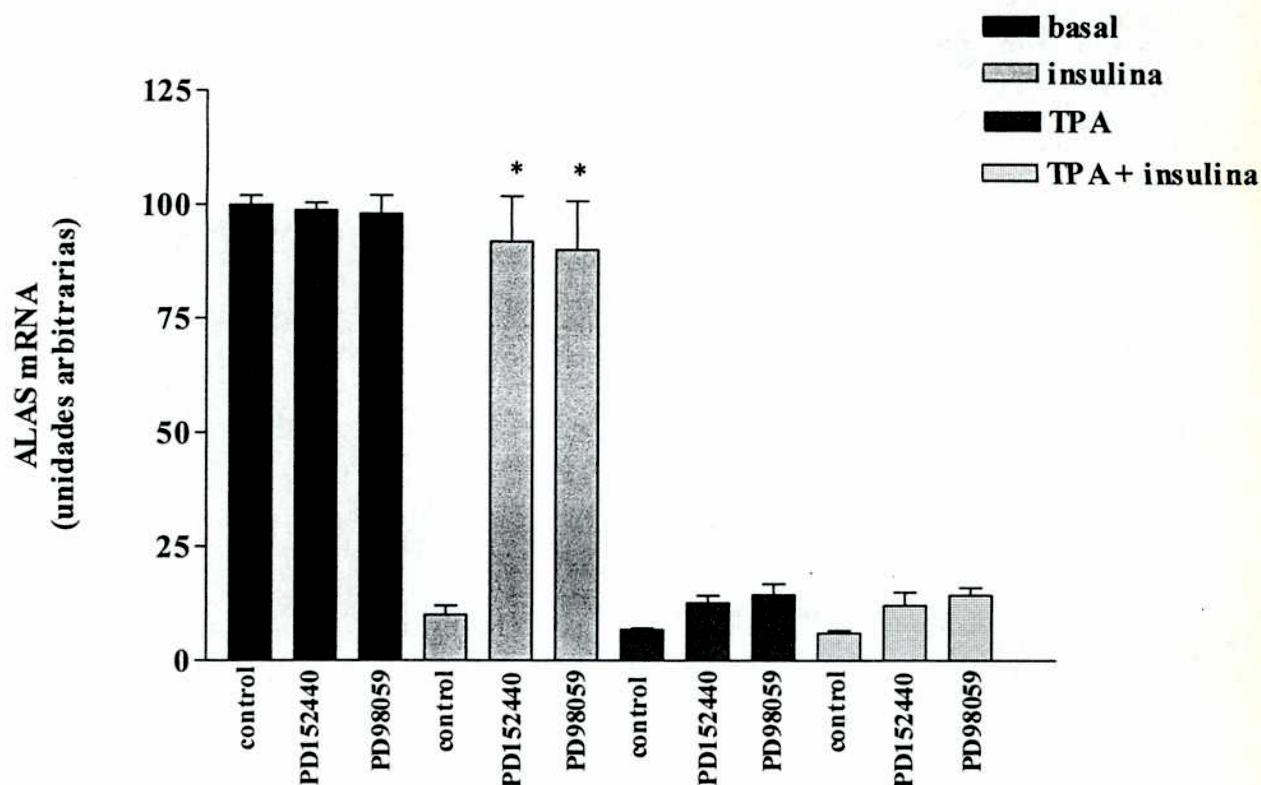


Figura 37 Efecto de TPA y PD152440 o PD98059 sobre el mRNA de ALAS en hepatocitos de rata: Los hepatocitos fueron incubados 2,5 horas con TPA $1\mu\text{M}$ en presencia o ausencia de insulina 10^{-8}M , PD 152440 $10\mu\text{M}$ o PD98059 $10\mu\text{M}$. Los inhibidores fueron agregados 30 minutos previos al tratamiento con insulina y/o TPA. La cuantificación de los mRNA de ALAS se realizó mediante ensayos de slot blot como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como relativos al control sin agregado alguno y representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras con inhibidores con las muestras control (* $P < 0,01$).

Estos datos nos permiten concluir que la PKC está involucrada en la represión de ALAS mediada por insulina. El TPA y la insulina emplean un mecanismo diferente para llegar al mismo punto final, que puede converger río abajo de MEK teniendo en cuenta que ambos son potentes activadores de MAPK.

C. Elementos de la región promotora y factores de transcripción responsables de la regulación de la expresión del gen de ALAS mediada por insulina

Los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión génica por insulina no están aún bien caracterizados. Los efectos de la hormona sobre la transcripción son mediados por elementos presentes en el promotor de los genes. Pueden existir diversos elementos respondedores para insulina, que difieren levemente entre sí en secuencia u orientación, para permitir tal vez, una estricta regulación hormonal tejido específica. Sin embargo, estos elementos son lo suficientemente similares para ser reconocidos por factores de transcripción activables por insulina, constituyéndose como elementos respondedores consenso. Hasta el momento, se ha identificado un elemento respondedor “insulin response element” (IRE) o secuencia respondedora a insulina “insulin response sequence”(IRS), el heptanucleótido [T(G/A)TTT(T/G)(G/T)]. Este elemento esta presente en promotores de genes reprimidos por la hormona, entre ellos, los IREs de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), aspartato aminotransferasa, tirosina aminotransferasa, glucosa-6 fosfatasa e “insulin like growth factor binding protein one” (IGFBP-1) (Beurton y col, 1999).

1. Análisis de la región promotora de ALAS

1.1 La zona -469/-354 de la región del promotor -833/+42 del gen de ALAS de rata es capaz de conferir respuesta a insulina

La región comprendida entre las bases -833/+42 del promotor de ALAS, según fue demostrado en resultados anteriores, resultó ser suficiente para conferir capacidad de respuesta a la insulina (Figura 10). Con el propósito de identificar la zona del promotor involucrada en la respuesta hormonal, empleamos construcciones con deleciones 5' seriadas de esta región del promotor. Las deleciones se efectuaron en forma creciente desde el extremo 5' hacia el 3', mediante el uso de las enzimas de restricción BamHI, PstI, AflII, StuI, BssHI y BstEII, respectivamente (Figura 38).

Las células HepG2 fueron transfectadas con los plásmidos pACAT, pAC Δ 469, pAC Δ 354, pAC Δ 156, pAC Δ 75 y pAC Δ 38 en ausencia o en presencia de insulina 10^{-8} M. Las sucesivas deleciones realizadas sobre la región promotora -833/+42 del gen de

ALAS, con excepción de pACΔ38, presentaron un discreto aumento en la actividad transcripcional basal que osciló entre el 4 y el 15 %, con respecto a la actividad observada con la construcción parental (Figura 40). Debido a estos resultados, en los experimentos siguientes, las variaciones en la expresión del gen CAT para las distintas construcciones fueron referidas a la expresión basal de cada una de ellas.

-847	CGACTCT	AGAGGATCCA	AGCATGCAGA	AGACCCTAGA	TTCCATCCTC
-800	AGTGCTGCAT	CCTGTAGGCA	TGGCGGCTCC	TACCTGCAAT	CCCAGCACTG
-750	GGGAGGTAGA	GACAGGATGC	CTCCAAGGTT	GGCTACATAG	CAACTTTGAG
-700	GACAGTATGG	TGTGACTACA	TGAGACCTTG	TCTCAAATTA	AAAAACAAGA
-650	TAATTTAGCT	GTTCAATCCT	GTGCAGGCCC	TGTGCTGTCA	TGACACCCCTC
-600	ACCATCTGGG	TGACTAGACT	GTGGAGCTAT	GAGCTCCATC	TAGTCAGTCC
-550	TCTGTTCCCT	GCTCTCTCTT	TTCTTCAATT	CGGATCAGAA	CGTATCACCC
-500	TTCTGCGGCT	GCTTCTTCAA	TCCCGTGTCT	<u>GCAGCCCCTT</u>	AGCATCTCTT
-450	CACCAGGACC	ATTCTATTCT	TGGGCCATTC	ATCAAGTAAA	GAATCCCTGT
-400	CATCGATGCA	AACAAAACCA	AGCAAGCCCC	TCGTTGATCT	<u>GATCTTAAGA</u>
-350	CCCTGGCGTG	AAACCCCTTC	CTGTGCGCCC	AATAAACCTT	TTTACCAGGG
-300	TGGGTTTGGT	TTACGACCTA	CGCCGGGGGC	CCAGGAGTCT	GACGCACAGG
-250	GCTGTCGTGG	AAGGTGAAAG	AGGGACGAAG	GGTAGAGATC	CAAAAAGGGA
-200	CTTGCCCGTC	CACTGCCCTG	CTCTCCTGGC	TCAGGCAGCG	<u>TAGGCCTAAG</u>
-150	ACATAGTCAC	AAGAGTTGGA	GCAGAGCCCA	CACAGAGGGA	CCTGGCACCC
-100	TGCCGGGCCG	ACTCGGTGCC	<u>GTGCGCGCGG</u>	CAGGCCGCAC	CCACAGCGCA
-50	<u>TGCGCAGCGG</u>	<u>TCACCCCGG</u>	CTCTATATTA	GGCCAACAGC	GGCCCTAGCC
+1	GAGGCTGTTC	GTGAAGAAGG	GCACTGGTCG	GTTTAGCGTC	<u>CTCGAGAGCT</u>

Figura 38 Secuencia de la región promotora -833/+42 del gen de ALAS de rata: Las secuencias subrayadas corresponden a los sitios de corte de las enzimas BamHI, PstI, AflII, StuI, BssHII, BstEII y Xho I, en ese orden. Las secuencias en negrita corresponden al vector pBLCAT6 donde está clonada esta región.

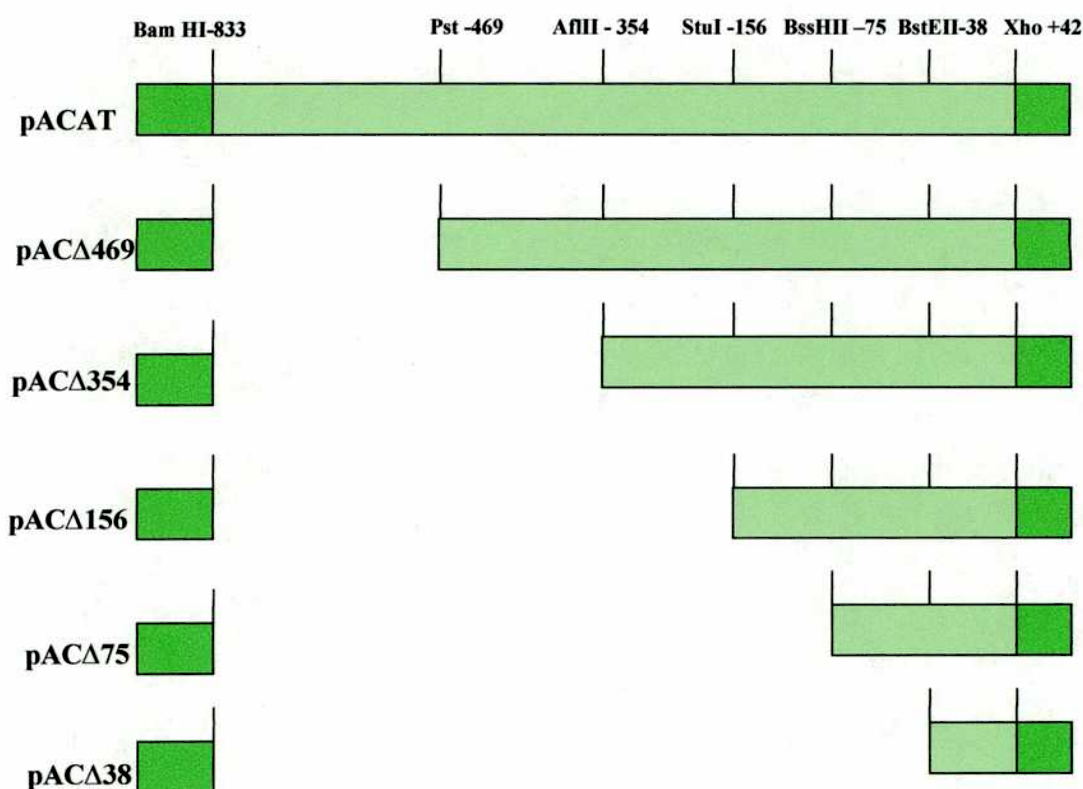


Figura 39 Delecciones seriadas de la región -833 a +42 del gen de ALAS de rata

La marcada disminución de la actividad transcripcional basal que presentaron las células transfectadas con el plásmido pACΔ38 puede atribuirse a una parcial interrupción del sitio de ensamblaje de la maquinaria de transcripción basal dado que entre las bases -27/-22 se encuentra la secuencia "TATA".

El efecto inhibitorio ejercido por la insulina se mantuvo en células transfectadas con el plásmido pACΔ469, perdiéndose esta capacidad de dar respuesta a la hormona en las sucesivas delecciones (Figura 40).

Estos resultados indican que en la zona comprendida entre los pares de bases -469 y -354 hay elementos necesarios para conferir respuesta a la insulina.

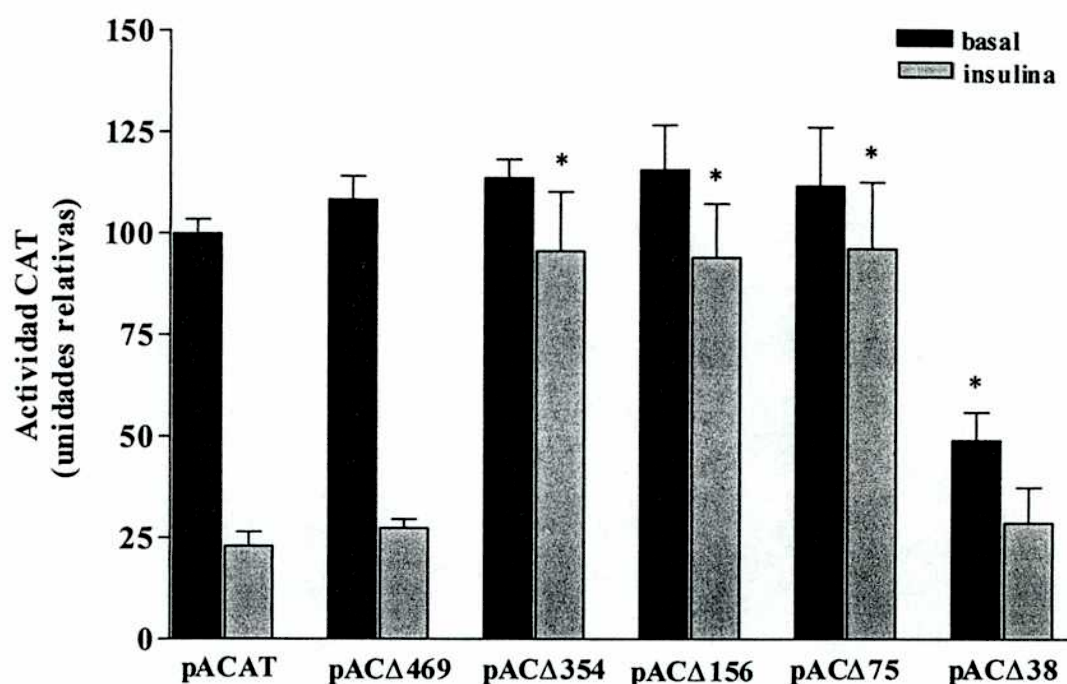


Figura 40 Análisis de la actividad transcripcional de la región -833/+42 del promotor de ALAS mediante expresión transiente de construcciones con delecciones 5' sucesivas en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 4 µg de los plásmidos indicados y 6,5 µg del plásmido de referencia pCEFLβ-gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno, que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras transfectadas con las sucesivas delecciones y la muestra transfectada con la construcción parental en ausencia o en presencia de insulina (* $P < 0,01$).

1.2 Sitios funcionales para factores de transcripción situados río abajo de la posición -469 del promotor de ALAS

Estudios realizados en el laboratorio revelaron la existencia de elementos funcionales para los factores de transcripción CREB y miembros de la familia AP-1 responsables de la regulación transcripcional de ALAS frente a la estimulación con cAMP y TPA, respectivamente. En las posiciones -142/-149 y -38/-45 del promotor de ALAS existen dos elementos necesarios para la totalidad de la inducción mediada por la PKA (Giono y col, 2001). El elemento "TRE-like" ("TPA response element") presente en la zona -354/-156 resultó ser necesario para la regulación negativa mediada por ésteres de forbol (Guberman y col, manuscrito en preparación). Entre los pb -469 a -354 se encontraría la unidad de respuesta a insulina como puede observarse en la Figura 41.

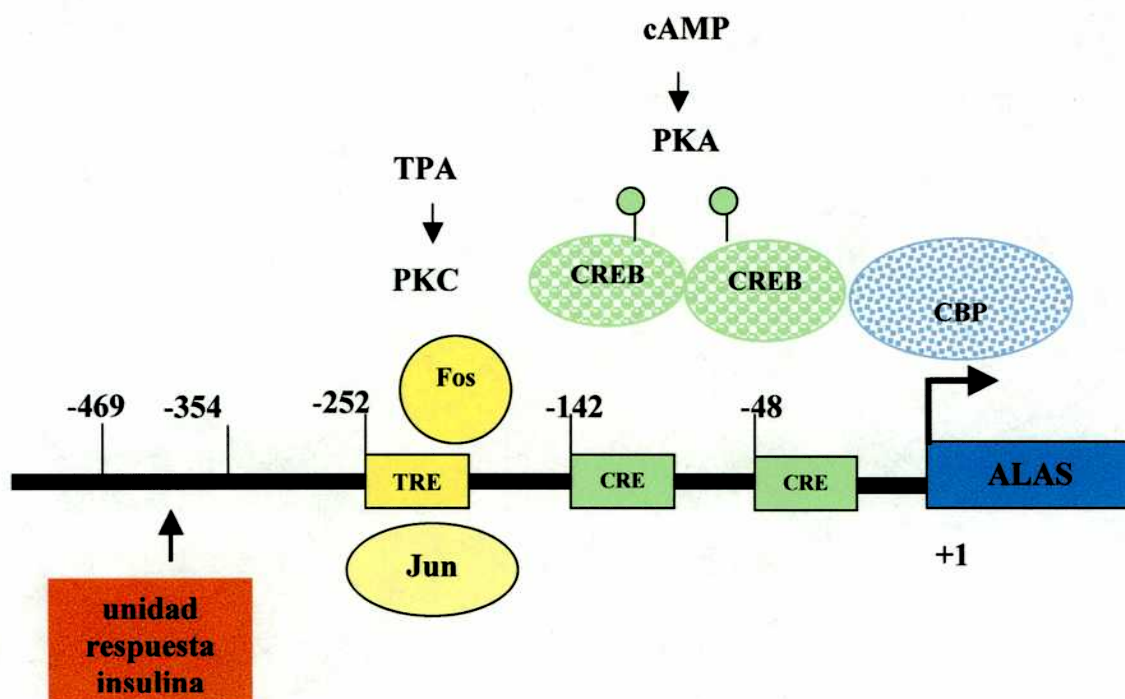


Figura 41 Estructura de la región promotora -469 a +1 del promotor de ALAS

1.3 La región -469/-354 del promotor de ALAS presenta sitios potenciales para unión de los factores de transcripción NF1 y HNF3.

La región -469/-354 del promotor de ALAS fue analizada con los programas “MatInspector V 2.2”(Quandt y col, 1995) y “Lalign Search Help” (Person y col, 1997) para detectar potenciales elementos regulatorios en dicha región. Se encontraron varias secuencias con mayor o menor grado de homología con elementos de unión al factor nuclear 1(NF1) y al factor nuclear hepático3 (HNF3). Las que presentan una homología completa para el “core” y alta homología para el entorno están señaladas en la Figura 42. También se encontró entre los nucleótidos -382/-388, un IRE muy similar al canónico presente en los promotores de varios genes reprimidos por insulina.

-469

CAGCCCCTTAGCATCTCTTCACCAGGACCATTCTATTCTTGGGCCATTTCATCAAGTAAAGA

GTCGGGGAATCGTAGAGAAGTGGTCCTGGTAAGATAAGAACCCGGTAAGTAGTTCATTTCG

ATCCCTGTCATCGATGCAAACAAAACCAAGCAACCGCTCGTTGATCTGATCTT

TAGGGACAGTAGCTACGTTTGTTTTGGTTCGTTGGCGAGCAACTAGACTAGAA

-354

HNF3 = factor nuclear hepático 3

NF1 = factor nuclear 1

IRE = "insulin response element" [T(G/A)TTT(T/G)(G/T)]

Figura 42 *Análisis in silico* de la región -469/-354 del promotor de ALAS: Las secuencias señaladas en amarillo corresponden a secuencias con alta homología con el elemento consenso para NF1 y las secuencias señaladas en verde corresponden a secuencias con alta homología con el elemento consenso para HNF3. Las secuencias señaladas en turquesa representan superposición de sitios para NF1 y HNF3. En rojo se indica el IRE, elemento presente en numerosos promotores de genes reprimidos por la insulina.

2. Caracterización de los factores de transcripción responsables de mediar la acción de la insulina sobre la regulación de la expresión del gen de ALAS

2.1 La sobreexpresión de CBP y p300 no revierte la acción inhibitoria ejercida por la insulina en la zona del promotor de ALAS que confiere respuesta a la hormona.

La presencia de histona acetiltransferasas (HAT) y de histona deacetilasas (HDAC) es crítica para la regulación de la expresión génica. El descubrimiento de proteínas reguladoras de la transcripción que poseen actividad de HAT como CBP y p300 ha sido un gran aporte para establecer la relación entre la estructura de la cromatina y la actividad transcripcional.

Numerosos trabajos demuestran que CBP/p300 pueden acetilar, además de histonas, factores de transcripción modificando así la manera de unirse al DNA (Gu y Roeder,

1997). Estudios empleando el sistema del doble híbrido indican que la fosforilación de CBP/p300 en la serina 1834 mediada por PKB, interrumpe la interacción con factores de transcripción que regulan la expresión génica en tejidos respondedores a insulina (Guo y col, 2001). Recientemente, se han descrito mecanismos de represión génica por reclutamiento o expulsión de coactivadores de transcripción de “enhanceosomas” presentes en promotores de diferentes genes (Senger y col, 2000).

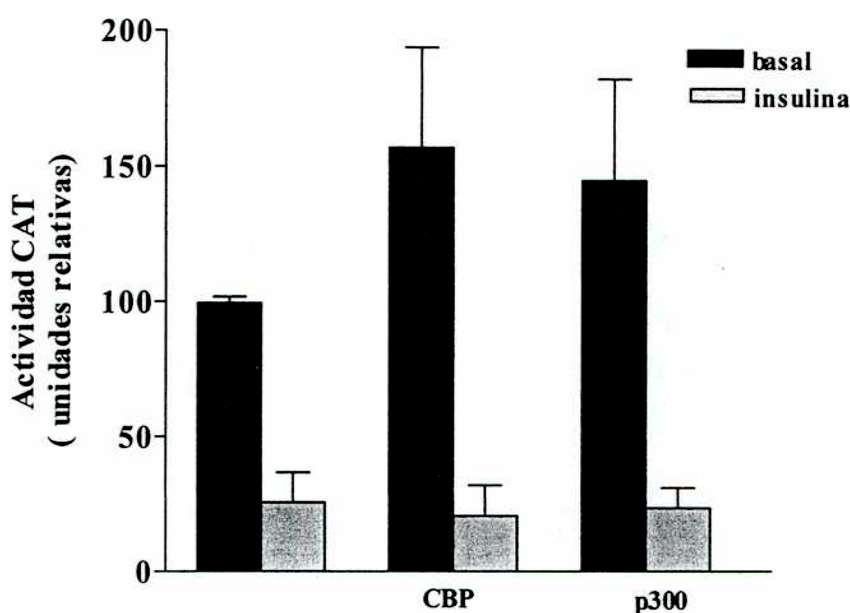


Figura 43 Efecto de la sobreexpresión de CBP y p300 sobre la actividad transcripcional de la región -469/+42 del promotor de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 3 µg del plásmido pACΔ469, 3 µg del plásmido pGS5CBP o 3 µg del plásmido pCEFL-GSTp300 según se indica en la figura y 6,5 µg del plásmido de referencia pCEFLβ-gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección, en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno, que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes.

Por ello y por datos bibliográficos que describen que p90 RSK, luego de su activación a través de la vía de Ras/MAPK, reprime la activación de genes que se inducen por cAMP mediante el reclutamiento de CBP (Nakajima y col, 1996) decidimos evaluar el efecto de la sobreexpresión de CBP y p300 sobre la represión de la transcripción de ALAS mediada por insulina. Realizamos, en la línea celular HepG2, cotransfecciones con el plásmido pACΔ469 y pGS5CBP o pCEFL-GSTp300 tanto en condiciones basales como en

presencia de insulina. La sobreexpresión de CBP o la de p300 no modificó la represión del gen de ALAS mediada por insulina (Figura 43).

Estos resultados nos permiten concluir que CBP y p300 no participan en el efecto inhibitorio de la insulina sobre la expresión del gen de ALAS.

2.2 Mutantes dominantes negativas de los factores de transcripción CREB, C/EBP o AP-1 no modifican la regulación ejercida por insulina sobre la zona -469/+42 del promotor de ALAS

O'Brien y Granner (1996) han descripto que miembros de la familia de AP-1/CREB intervienen en la regulación mediada por insulina de ciertos genes. Debido a la presencia en la región involucrada de elementos funcionales para CREB y AP-1 (Giono y col, 2001; Guberman y col, manuscrito en preparación) examinamos el comportamiento de estos factores de transcripción en la regulación hormonal de ALAS. Estas proteínas que se expresan en la línea celular HepG2 y que son reguladas por eventos de fosforilación, pertenecen a la familia de factores de transcripción que contienen un dominio básico denominado “zipper” de leucinas (bZIP), a través del cual dimerizan y se unen luego al surco mayor del DNA. Utilizamos mutantes dominantes negativas (A-ZIP) (Yeagley y col, 2000) de miembros de esta familia que presentan un dominio ácido complementario en distribución de cargas al dominio básico presente en los factores bZIP salvajes. El resultado de la interacción entre un factor A-ZIP y un factor bZIP constituye un complejo helicoidal muy estable, incapaz de unirse al DNA. La sobreexpresión de mutantes A-CREB, A-C/EBP o A-Fos no tuvo efecto en la actividad transcripcional de la zona -469 a +42 del promotor de ALAS, según lo observado en ensayos de cotransfecciones en células HepG2 con el plásmido pACΔ469 tanto en ausencia como en presencia de insulina 10^{-8} M (Figura 44).

Estos resultados sugieren que los factores de transcripción CREB, C/EBP y c-Fos no median la represión de la transcripción de ALAS ejercida por insulina.

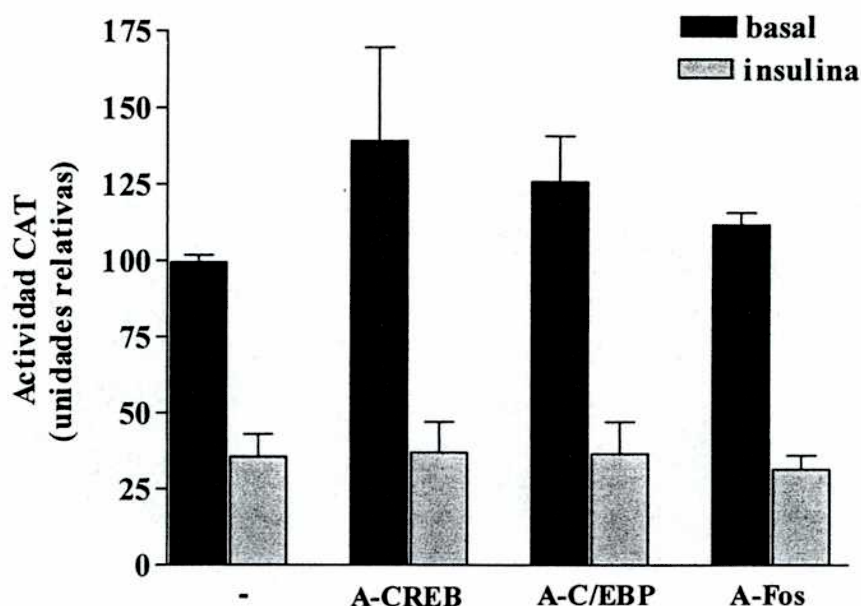


Figura 44 Efecto de la sobreexpresión de mutantes dominantes negativas de CREB, C/EBP y AP-1 sobre la actividad transcripcional de la región -469/+42 del promotor de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 3 μ g del plásmido pAC Δ 469 y 3 μ g del plásmido pRSV A-Fos, pRSV A-CREB o pRSV A-C/EBP según se indica en la figura y 6,5 μ g del plásmido de referencia pCEFL β -gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección, en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno, que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes.

2.3 La sobreexpresión de HNF3 α disminuye la transcripción basal de ALAS mientras que la de HNF3 β revierte la represión hormonal

La transcripción de genes específicos del tejido hepático requiere la interacción de sus regiones regulatorias con una combinación particular de numerosos factores nucleares. Entre ellos se encuentra la familia del factor nuclear hepático 3 (HNF3), compuesta por las proteínas HNF3 α , HNF3 β y HNF3 γ (actualmente denominadas Foxa1, Foxa2 y Foxa3 respectivamente, por "forkhead box"), altamente expresadas en hígado pero ausentes en otros tejidos como por ejemplo en cerebro y riñón (Lai y col, 1993). Los factores de transcripción HNF3 α y HNF3 β se unen al DNA como monómeros a través de un dominio denominado "winged helix" y comparten la misma secuencia de reconocimiento en el DNA (Duncan y col, 1998). Generalmente HNF3 α y HNF3 β actúan como activadores de la expresión génica, sin embargo, en el contexto de cromatina nativa, el HNF3 α es un

activador pobre y en algunos promotores podría inhibir la actividad del HNF3 β al competir por el mismo elemento de unión al DNA (Duncan y col, 1998).

Dado que el análisis *in silico* de la región del promotor de ALAS responsable de conferir respuesta a insulina, reveló la existencia de secuencias con alta homología a los elementos a los cuales se unen estos factores, evaluamos el efecto de la sobreexpresión del HNF3 α o la del HNF3 β sobre la represión ejercida por la hormona. Realizamos experimentos de cotransfección con el plásmido pAC Δ 469 y distintas cantidades de los vectores de expresión para HNF3 α o HNF3 β tanto en condiciones basales como en presencia de insulina 10⁻⁸ M. El empleo de 8 μ g del vector de expresión para HNF3 α disminuyó aproximadamente un 40 % la transcripción basal, mientras que no alteró el efecto ejercido por la insulina en ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 45 A). La sobreexpresión de 4 u 8 μ g del vector para HNF3 β suprimió aproximadamente unas cinco veces la represión hormonal, mientras que la expresión basal no presentó modificaciones significativas (Figura 45 B).

2.4 La actividad transcripcional basal de la región -469/+42 del promotor de ALAS se reduce marcadamente frente a la presencia de oligonucleótidos antisense u oligonucleótidos doble cadena consenso para NF1 o HNF3.

Las células HepG2 transfectadas con el plásmido pAC Δ 469 fueron incubadas en ausencia o en presencia de insulina 10⁻⁸ M con oligonucleótidos antisense (ASON) u oligonucleótidos doble cadena (DSON) consenso para los factores de transcripción NF1 o HNF3 a una concentración final de 2 μ M. El tratamiento con ASON fosforotiolados, complementarios a los codones 5 al 12 del mRNA del HNF3 β humano, con la finalidad de formar un híbrido doble cadena, blanco de RNasa H, e impedir de este modo la síntesis proteica (Stein y Cheng, 1993; Branch, 1997), disminuyó notablemente la actividad transcripcional basal del promotor (Figura 46 A). Por otra parte, la presencia de insulina no produjo un efecto inhibitorio adicional sobre la actividad del promotor observada en condiciones basales en presencia del ASON para HNF3 β . Los mismos resultados se obtuvieron cuando empleamos DSON consenso para HNF3, con el propósito de desplazar las proteínas de los sitios potenciales presentes en pAC Δ 469 (Figura 46 A).

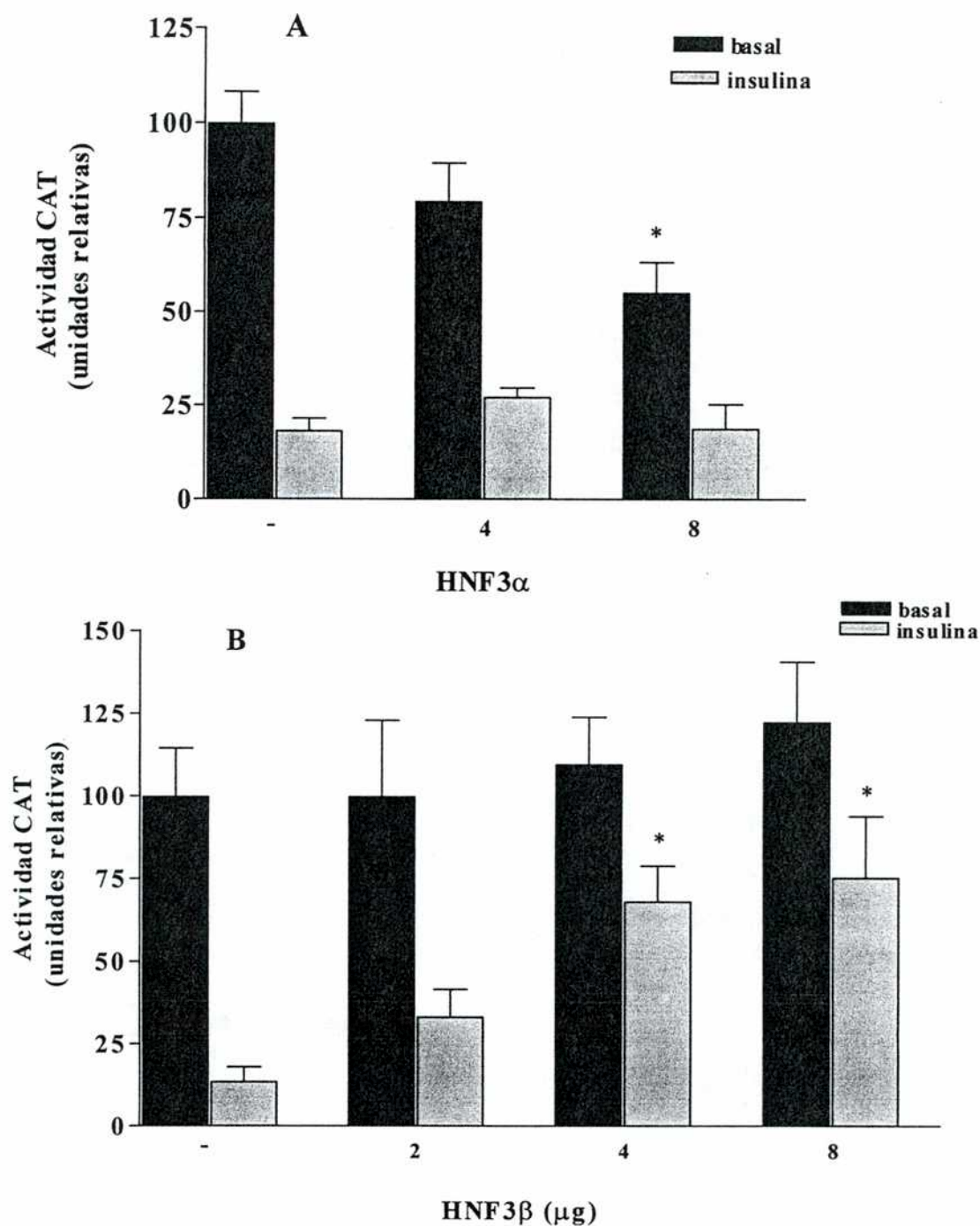


Figura 45 Efecto de la sobreexpresión de HNF3α o de HNF3β sobre la actividad transcripcional de la región -469/+42 del promotor de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 3 μg del plásmido pACΔ469, 4 μg u 8 μg del plásmido pRBT7mHNF3α o 2, 4 u 8 μg del plásmido pCMVHNF3β y 6,5 μg del plásmido de referencia pCEFLβ-gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de cuatro determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras cotransfectadas con las muestras sin cotransfectar (* $P < 0,02$).

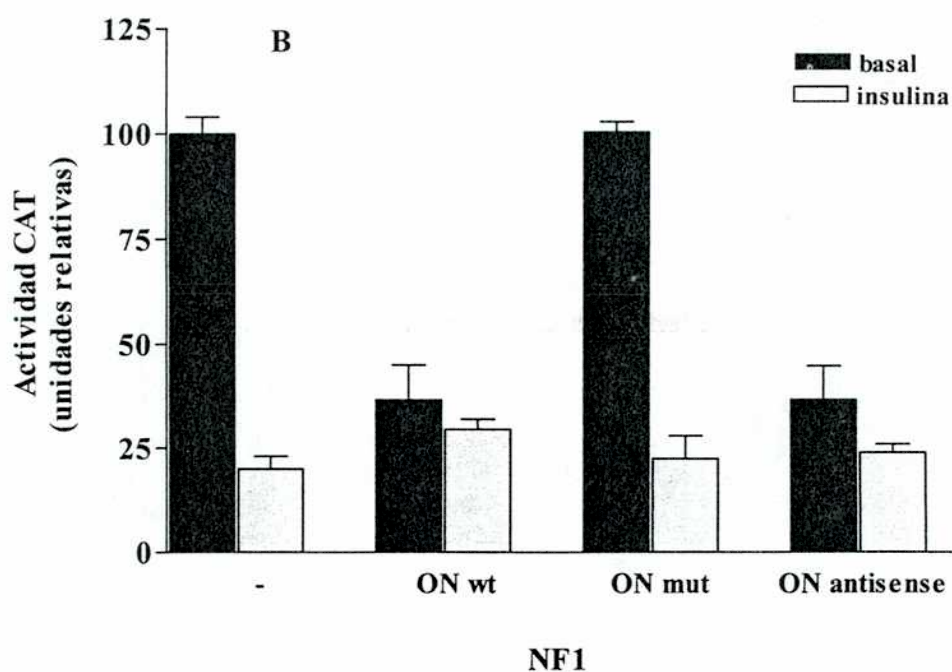
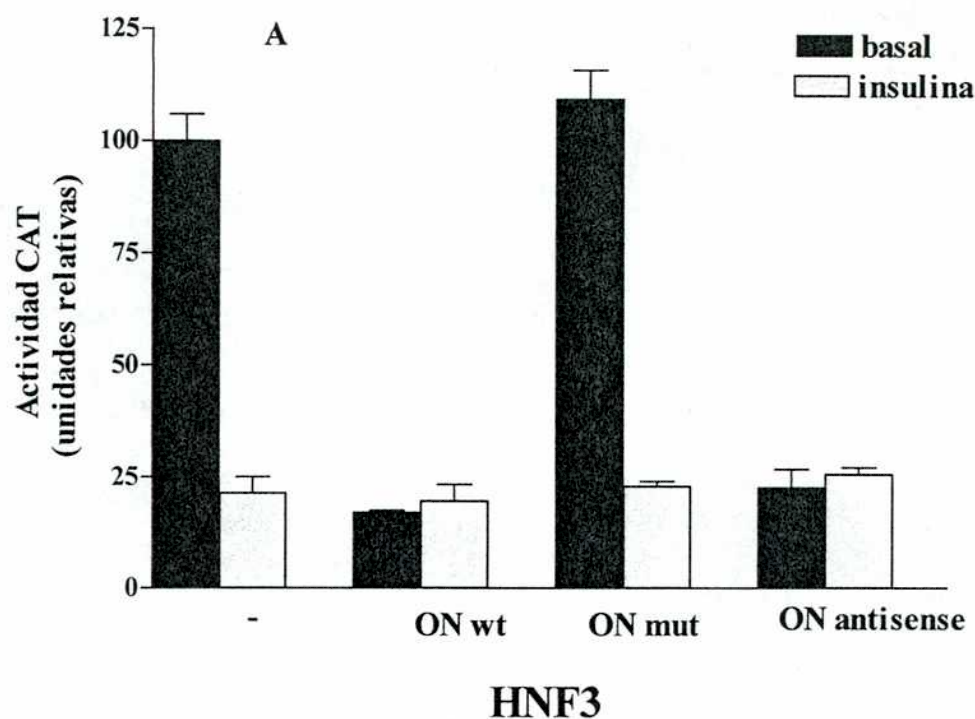


Figura 46 Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisense u oligonucleótidos doble cadena consenso para HNF3 β o NF1 sobre la actividad transcripcional de la región -469+42 del promotor de ALAS en células HepG2: Las células HepG2 fueron transfectadas con 3 μ g del plásmido pAC Δ 469 y 6,5 μ g del plásmido de referencia pCEFL β -gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección, en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M y los ASON (ONantisense), DSON (ON wt) o DSON mutados (ON mut) 2 μ M para HNF3 β (A) o NF1 (B). La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno, que se establece como 100.

La incubación con DSON presentando mutaciones en el “core” del elemento en *cis* no produjo variaciones en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 46 A).

Un comportamiento similar se observó cuando incubamos las células HepG2 transfectadas, con ASON complementarios a los codones 4 al 11 del mRNA del NF1 humano o DSON consenso (Figura 46 B) Estos resultados sugieren que tanto HNF3 como NF1 participarían en la expresión basal de ALAS.

Estos resultados indican que en la región comprendida entre los pb -469 a +42 del promotor de ALAS existen sitios funcionales para los factores de transcripción HNF3 y NF1.

2.5 Ensayos de retardo de la movilidad electroforética con sondas comprendidas entre los pares de bases -459/419 y -418/-379 del promotor de ALAS revelan la formación de complejos DNA-proteínas

Con la finalidad de identificar el papel de estas secuencias y los factores de transcripción involucrados en la respuesta a insulina se emplearon dos sondas de 40 pb cada una: ALIRE I (-459/-419) y ALIRE II (-418/-379) para realizar ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). El diseño de las sondas se basó en la existencia de sitios con alta homología a los consenso para los factores de transcripción NF1 y HNF3 como así también en la presencia de una secuencia muy similar al heptanucleótido [T(G/A)TTT(T/G)(G/T)] presente en varios promotores de genes regulados negativamente por la insulina.

Los EMSAs revelaron la formación de complejos DNA-proteínas con ambas sondas tanto en condiciones basales como en presencia de la hormona (Figura 47).

2.6 Mutaciones en ALIRE II no interrumpen la formación de complejos DNA-proteínas

Con el propósito de observar si mutaciones en la secuencia del potencial IRE, presente en la región -382/-388 del promotor de ALAS, interrumpían la formación de complejos DNA-proteínas, realizamos EMSAs con la sonda ALIRE II (40 pb) o ALIREmut II (40 pb) donde la secuencia del IRE: GTTTTG fue mutada por ATCTTG. Como se puede ver en la Figura 48 no hubo diferencias entre las bandas observadas por unión a ALIRE II o a

ALIREmut II cuando empleamos extractos nucleares provenientes de células HepG2 en condiciones basales o estimuladas con insulina.

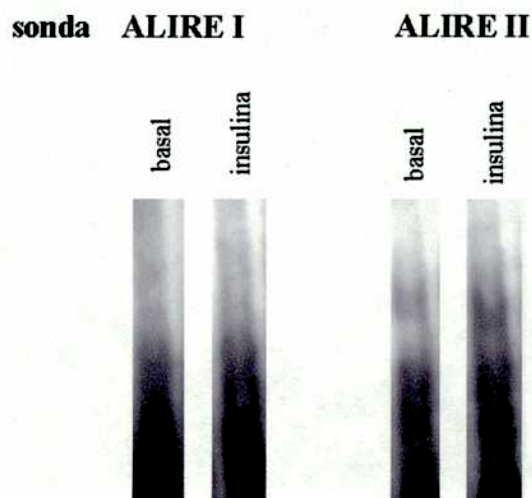


Figura 47 Unión de proteínas a los oligonucleótidos doble cadena ALIRE I y ALIRE II: Los oligonucleótidos doble cadena ALIRE I y ALIRE II marcados radioactivamente con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ fueron incubados con 15 μg de extractos nucleares provenientes de células HepG2 en condiciones basales o pretratadas con insulina (10^{-8} M, 15 minutos) a temperatura ambiente durante 30 minutos y separados por electroforesis en gel de poliacrilamida 5% durante 3 horas. Las sondas ALIRE I y ALIRE II contienen los pb comprendidos entre -459/-419 y -418/-379 del promotor de ALAS. Las autoradiografías muestran un experimento representativo de tres.

2.7 Los complejos DNA-proteínas formados por unión a ALIRE II (-418/-379) son competidos por ALIREmut II que presenta mutaciones en las posiciones -383 y -385

Considerando los resultados obtenidos, analizamos la especificidad de los complejos formados mediante EMSAs compitiendo la sonda salvaje con el oligonucleótido conteniendo la secuencia mutada. Los complejos proteicos unidos a la sonda ALIRE II fueron desplazados por ALIREmut II frío cuando este estuvo presente a una concentración 50 veces mayor que la de la sonda ALIRE II. Esta competencia tuvo lugar tanto cuando empleamos extractos nucleares provenientes de células incubadas con la hormona como cuando utilizamos extractos de células sin tratar (Figura 49). El mismo comportamiento se observó, en ambas condiciones experimentales, cuando efectuamos la competencia inversa (Figura 49).



Figura 48 Efecto de la introducción de mutaciones en ALIRE II en la formación de complejos DNA-proteína: Los oligonucleótidos doble cadena ALIRE II y ALIREmut II marcados radioactivamente con [γ - 32 P]ATP fueron incubados con 15 μ g de extractos nucleares provenientes de células HepG2 en condiciones basales o pretratadas con insulina (10^{-8} M, 15 minutos) a temperatura ambiente durante 30 minutos y separados por electroforesis en gel de poliacrilamida 5% durante 3 horas. La sonda ALIRE II contiene los pb comprendidos entre -418/-379 del promotor de ALAS y la sonda ALIREmut II abarca los 40 pb de esta región presentando las mutaciones A por G y T por C en el -382 y -388 respectivamente. Las autoradiografías muestran un experimento representativo de tres.

2.8 La insulina modifica la afinidad de unión al DNA de los factores HNF3 y NF1 en células HepG2.

Con el propósito de determinar si el tratamiento con insulina induce modificaciones en los factores de transcripción que alterarían su afinidad por elementos del DNA, realizamos ensayos de EMSA empleando oligonucleótidos doble cadena conteniendo secuencias consenso para NF1, HNF3 y CREB. Se estudió el comportamiento de la proteína CREB, por tratarse de un factor presente en los extractos nucleares de HepG2 y cuya actividad se regula por eventos de fosforilación.

El tratamiento de las células HepG2 durante 15 minutos con insulina 10^{-8} M disminuyó el pegado de los factores de transcripción NF1 y HNF3 al DNA, mientras que la afinidad

de CREB por el DNA no fue modificada frente a la presencia de la hormona como puede observarse en la Figura 50.

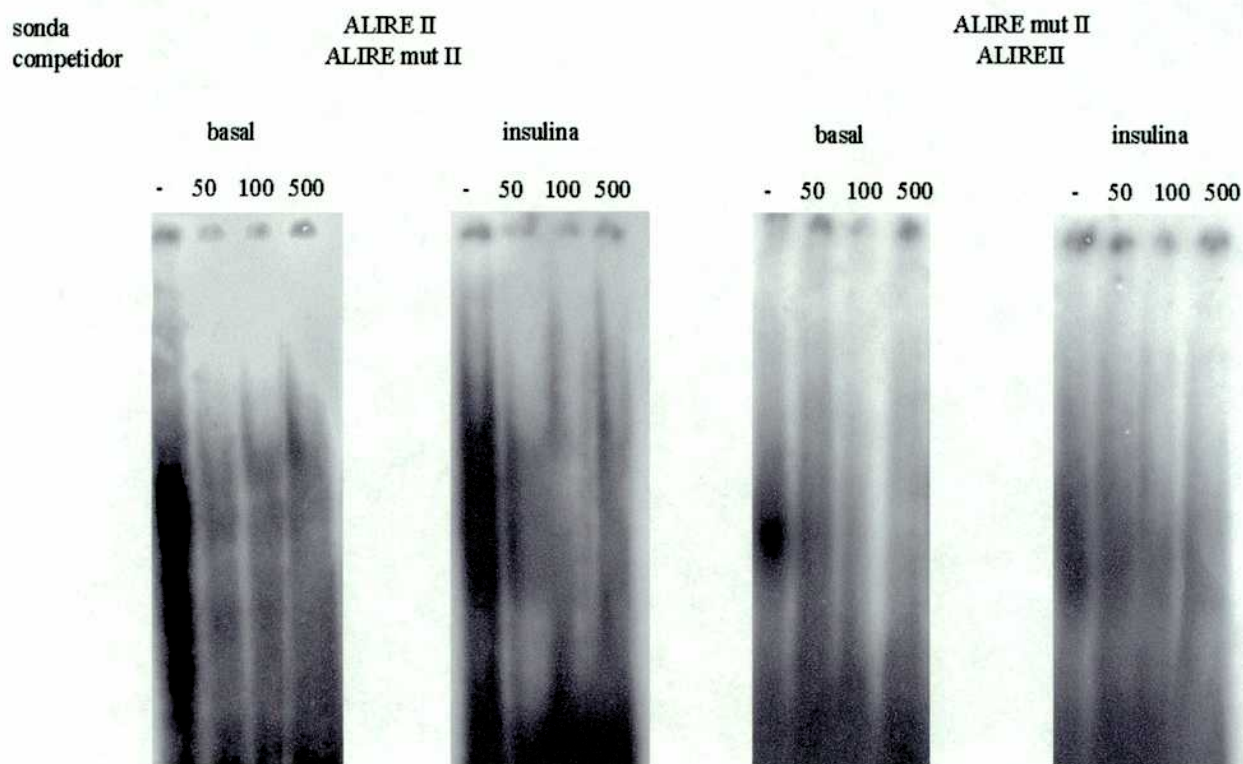


Figura 49 Efecto de la competencia con ALIREmut II sobre los complejos proteicos formados por unión a ALIRE II y viceversa: Extractos nucleares (15 μ g) provenientes de células HepG2 en condiciones basales o pretratadas con insulina 10^{-8} M durante 15 minutos, fueron incubados en ausencia o en presencia de 50, 100 o 500 veces exceso molar del oligonucleótido frío para ALIREmut II durante 20 minutos. Las muestras se incubaron luego a temperatura ambiente con la sonda ALIRE II marcadas radioactivamente con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ durante 30 minutos más y separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 5% durante 3 horas. En el caso de la competencia de la sonda ALIRE mut II con ALIRE II frío se procedió de manera igual a la descrita para competir con ALIREmut II. Las autoradiografías muestran un experimento representativo de tres.

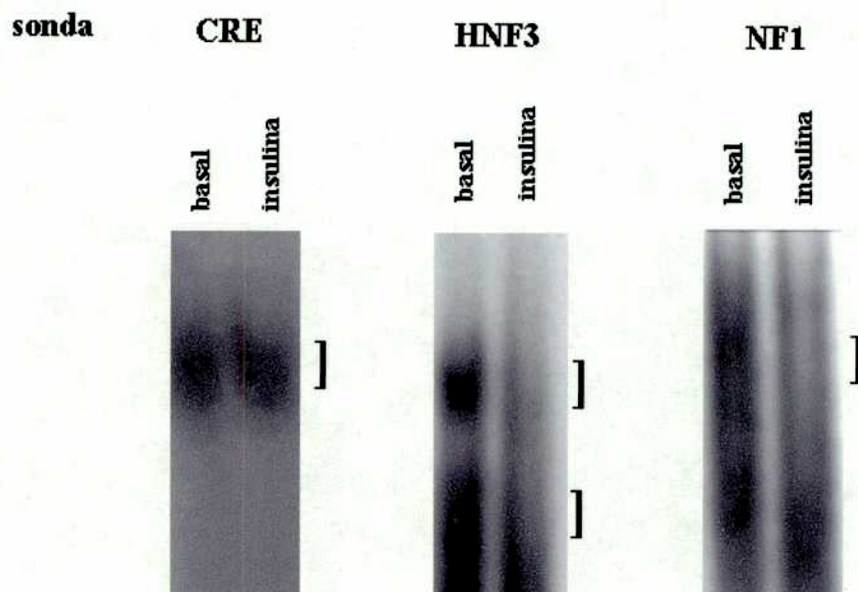


Figura 50 Efecto del tratamiento con insulina sobre la afinidad de unión al DNA de los factores de transcripción CREB, HNF3 y NF1 presentes en extractos nucleares de células HepG2: Los oligonucleótidos doble cadena CRE, HNF3 y NF1 marcados radioactivamente con [γ - 32 P]ATP fueron incubados con 15 μ g de extractos nucleares provenientes de células HepG2 en condiciones basales o pretratadas con insulina (10^{-8} M, 15 minutos) a temperatura ambiente durante 30 minutos y separados por electroforesis en gel de poliacrilamida 5% durante 3 horas. Las sondas contienen las secuencias consenso para los respectivos factores descriptas en Materiales y Métodos. Las autorradiografías muestran un experimento representativo de dos realizados

2.9 El tratamiento con inhibidores de las vías de transducción de señales de Ras/MAPK y PI3K modifica la afinidad de los complejos DNA-proteínas.

Los resultados obtenidos previamente sugieren que las vías de Ras/MAPK y PI3K deben estar funcionalmente activas para lograr la totalidad del efecto producido por la insulina en la regulación transcripcional de ALAS. Evaluamos entonces, el efecto del bloqueo de la transducción de señales iniciadas por la hormona a través de estas cascadas en la formación de complejos DNA-proteína, tratando a las células HepG2 con inhibidores específicos de proteínas intermediarias. Con esta finalidad, realizamos EMSAs con extractos nucleares provenientes de células pretratadas durante 30 minutos con PD98059 10 μ M y/o wortmanina 200 nM y estimuladas luego con insulina 10^{-8} M por 15 minutos más y utilizando las sondas ALIRE I o ALIRE II. El tratamiento con insulina y uno o ambos inhibidores causó modificaciones en el patrón de bandas de retardo con respecto al que se observa con extractos nucleares provenientes de células incubadas solamente con la hormona (Figura 51).

La existencia de datos bibliográficos que describen que, tanto NF1 (Misawa y col, 2000) como miembros de la familia “forkhead” (Guo y col, 1999; Lee y col, 2000), modifican su afinidad y/o especificidad de unión a elementos del DNA por eventos de fosforilación nos llevó a analizar del mismo modo la formación de complejos por unión a sondas para NF1 o HNF3. Como puede observarse en la Figura 51, el patrón de bandas de retardo varió en cada condición experimental. Particularmente, el patrón de bandas obtenido por unión a ALIRE I presentó un comportamiento similar al observado con la sonda NF1, mientras que los complejos formados por unión a ALIRE II tuvieron una apariencia similar a los unidos a la sonda HNF3. Los resultados sugieren que estas proteínas nucleares se unen específicamente a elementos del DNA y que esta unión podría estar regulada por proteínas intermediarias de las cascadas de Ras/MAPK y/o de PI3K que median eventos de fosforilación.

2.10 Los complejos DNA-proteínas formados por unión a la región -418/-379 del promotor de ALAS son competidos por un oligonucleótido consenso para la familia de factores de transcripción HNF3 y viceversa.

El descubrimiento de la familia de factores de transcripción “forkhead”/HNF3 ha cobrado importancia para el análisis de la regulación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular (Kaufman y Knochel, 1996), principalmente en tejidos como el hepático y el pancreático.

Los factores de transcripción HNF3 están implicados en la regulación de numerosos genes respondedores a insulina. Los genes reprimidos por insulina, PEPCK, tirosina aminotransferasa e IGFBP-1, presentan IREs similares que pueden actuar como sitios de unión para proteínas de la familia FOX (“forkhead box”) a la que pertenecen los HNF3 (Hall y col, 2000).

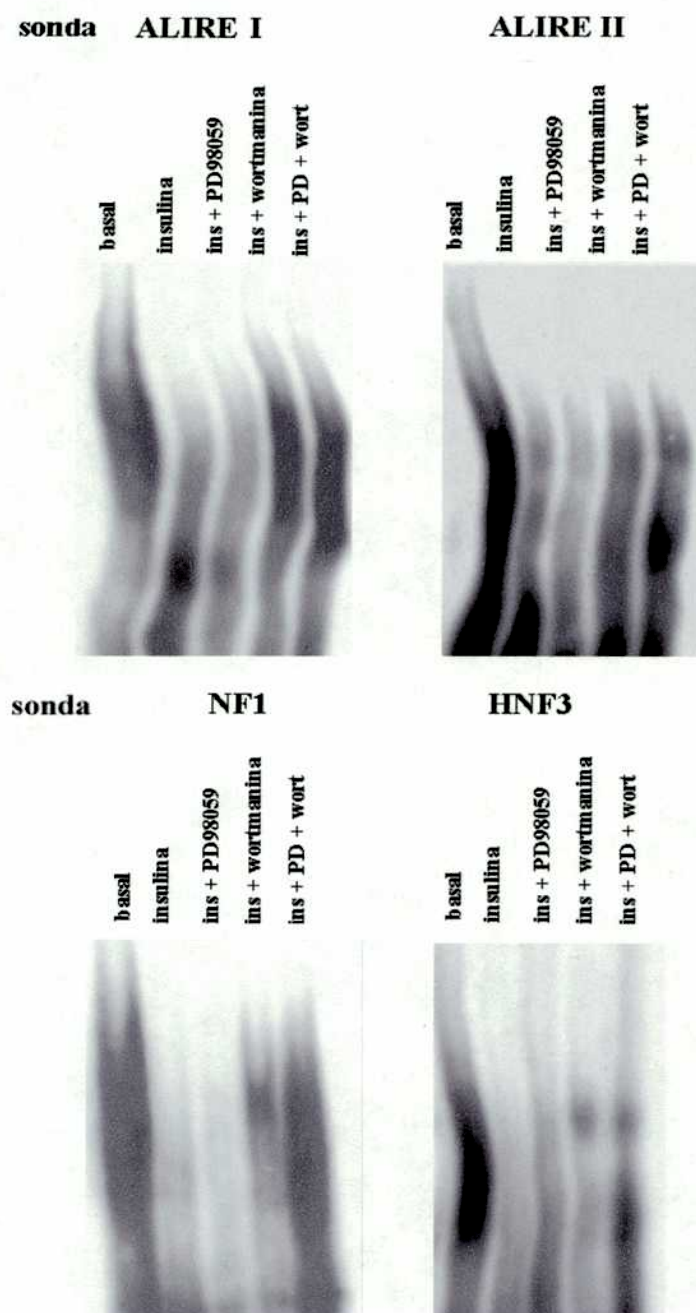


Figura 51 Efecto de los inhibidores PD98059 y wortmanina en la formación de complejos DNA-proteínas. Las células HepG2 fueron pretratadas durante 30 minutos con PD98059 10 μ M y/o wortmanina 200 nM y estimuladas luego con insulina 10^{-8} M por 15 minutos más. Los respectivos oligonucleótidos doble cadena ALIREI, ALIREII, NF1 y HNF3 marcados radioactivamente con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ fueron incubados con 15 μ g de extractos nucleares de células HepG2 en condiciones basales, pretratadas con insulina o con insulina y él o los inhibidores, durante 30 minutos y separados por electroforesis en gel de poliacrilamida 5% durante 3 horas. Las autoradiografías muestran un experimento representativo de tres.

Estos resultados sugieren que la insulina no interrumpe la formación de complejos entre factores de transcripción y los oligonucleótidos ALIRE I o ALIRE II. La presencia de inhibidores específicos de PI3K o de MEK o ambos y la hormona modifica la capacidad de unión de la/s proteína/s al DNA. Esta modificación se ve representada por el patrón de bandas de retardo observado en cada condición experimental. Este evento abre la posibilidad de considerar como muy relevante al estado de fosforilación final que presentan las proteínas.

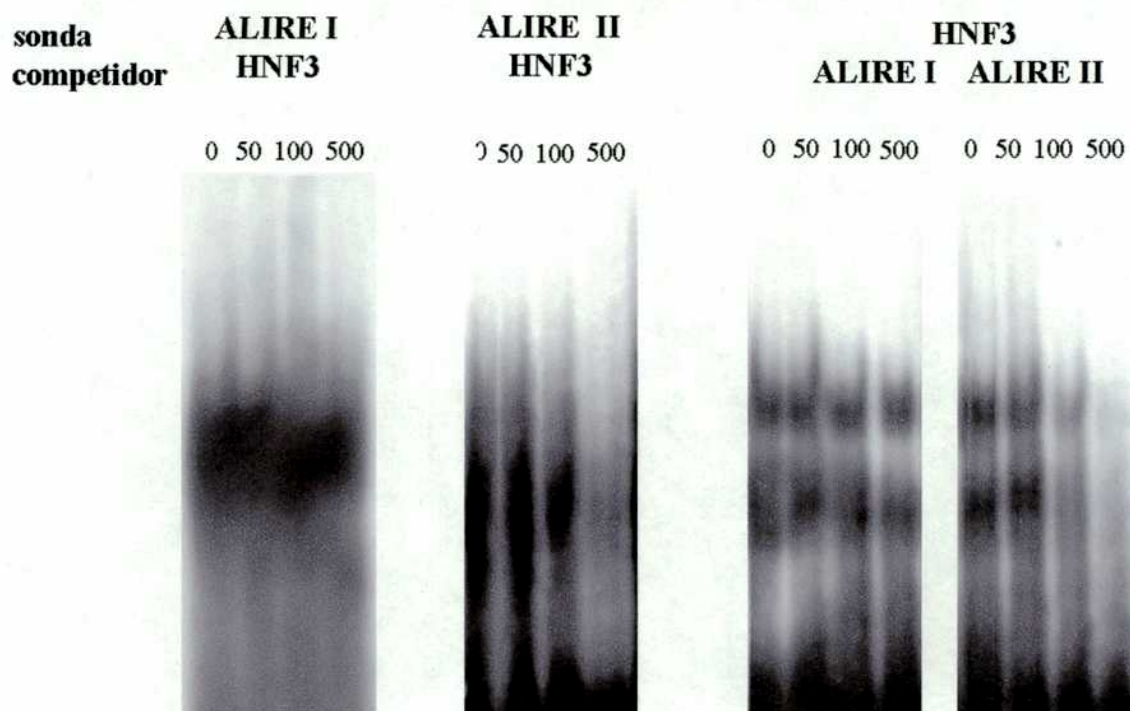


Figura 52 Efecto de la competencia con un oligonucleótido doble cadena consenso para HNF3 sobre los complejos proteicos formados por unión a ALIRE I o a ALIRE II y viceversa: Extractos nucleares (15 µg) provenientes de células HepG2 en condiciones basales fueron incubados en ausencia o en presencia de 50, 100 o 500 veces exceso molar del oligonucleótido frío para HNF3 durante 20 minutos. Posteriormente las muestras se incubaron a temperatura ambiente con las sondas ALIRE I o ALIRE II marcadas radioactivamente con [γ - 32 P]ATP durante 30 minutos más y separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 5% durante 3 horas. En el caso de la competencia de la sonda HNF3 con ALIRE I o ALIRE II fríos se procedió de manera igual a la descrita para competir con HNF3. Las autoradiografías muestran un experimento representativo de tres.

Para confirmar si las proteínas que se unen a los oligonucleótidos ALIRE I o ALIRE II pertenecen a la familia de factores de transcripción HNF3, efectuamos ensayos de EMSA empleando como competidor un oligonucleótido doble cadena 5'-GCACTAGCAAAACAACTTATTTTGAACACGA-3' (Wang y col, 2000) consenso para HNF3. Los complejos DNA-proteínas formados en condiciones basales, cuando empleamos la sonda ALIRE I, no fueron competidos por el oligonucleótido consenso para HNF3 frío, aún con un exceso molar de 500 veces. Solamente, la presencia de un exceso molar de 500 veces del oligonucleótido HNF3 frío compitió los complejos unidos a ALIRE II, probablemente debido a una gran afinidad del factor por el promotor de ALAS (Figura 52). Los complejos proteicos unidos a la sonda HNF3 no fueron competidos por ALIRE I frío. Los mismos, fueron desplazados por el oligo ALIRE II frío cuando estuvo presente a una concentración 100 veces mayor que la de la sonda HNF3, y casi por completo cuando se lo utilizó a una concentración que excedió 500 veces la molaridad de la sonda HNF3 (Figura 52).

Estos resultados indican que miembros de la familia de factores de transcripción HNF3 se unen con gran afinidad al oligonucleótido ALIRE II.

2.11 Los fragmentos -469/-354 y -418/-379 del promotor de ALAS confieren regulación por insulina a un promotor heterólogo

Resultados anteriores donde determinamos que en la zona -469 a -354 del promotor de ALAS hay elementos necesarios para conferir respuesta a la insulina (Figura 40), nos llevaron a examinar que secuencias del DNA están involucradas en dicha regulación. Para ello, realizamos una serie de construcciones insertando diferentes fragmentos de esta región río arriba (-156) del promotor de la quinasa de timidina (TK) en el vector 4XCRECAT y generamos la familia de plásmidos ALIRE (Figura 53).

Con la finalidad de determinar si esta región, o fragmentos de ella, eran capaces de responder a insulina en un contexto heterólogo transfectamos a las células HepG2 con los plásmidos ALIRE I (-459/-419), ALIRE II (-418/-379) o ALIRE (-469/-354). A continuación, evaluamos la habilidad de la insulina para reprimir la transcripción a partir del promotor quimera midiendo la actividad de la CAT. Como puede observarse en la

Figura 54 la incorporación del fragmento de 40 pb, ALIRE I, en el vector 4XCRECAT no confirió sensibilidad a la hormona. La incubación de células HepG2 tranfectadas con el plásmido ALIRE (117 pb) con insulina produjo una reducción de aproximadamente un 60 % en la actividad transcripcional con respecto a la observada en células sin tratar. Además, la inclusión de ALIRE II (40 pb) también fue capaz de reducir un 33 % la actividad transcripcional basal en presencia de insulina. Debemos destacar que los fragmentos ALIRE y ALIRE II presentan la secuencia GTTTTG muy similar al IRE canónico T(G/A)TTT(T/G)(G/T) reportado para varios promotores entre ellos los de la PEPCK y la IGFBP-1.

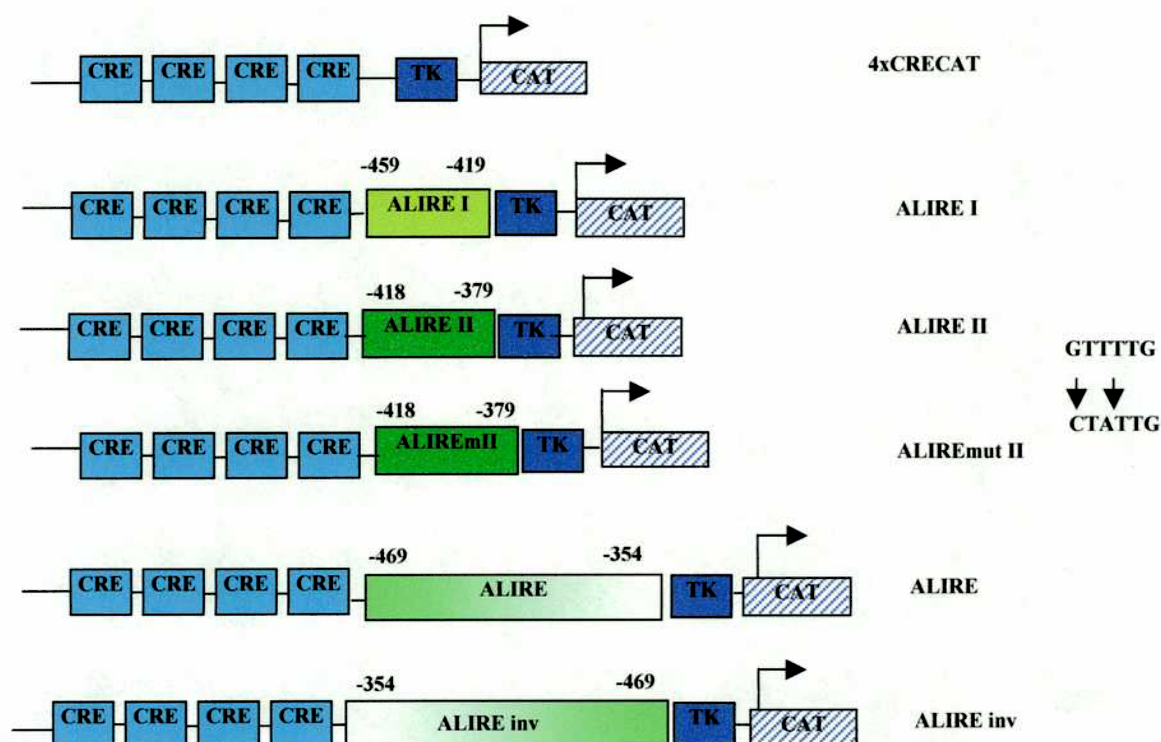


Figura 53: Familia de plásmidos ALIRE

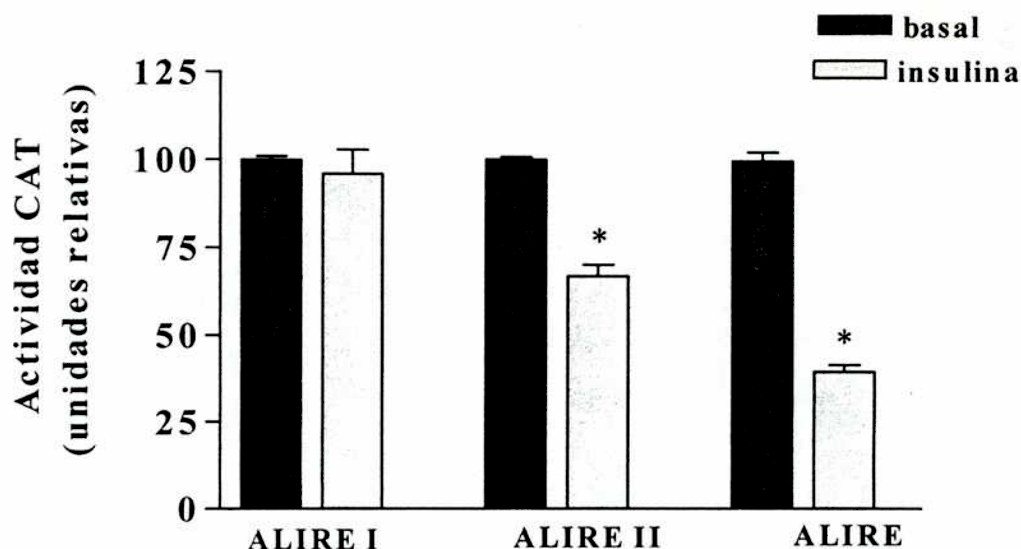


Figura 54 Efecto de la insulina sobre la actividad transcripcional de construcciones conteniendo fragmentos del promotor de ALAS insertados río arriba del promotor de la TK: Las células HepG2 fueron transfectadas con 4 μ g de los plásmidos indicados y 6,5 μ g del plásmido de referencia pCEFL β -gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa como relativa a cada construcción sin agregado alguno que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de cuatro determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras en estado basal con las muestras tratadas con la hormona (* $P < 0,01$).

En trabajos preliminares demostramos, mediante ensayos de slot blot, que el tratamiento de hepatocitos de rata con el derivado del cAMP, 8-CPT-cAMP 100 μ M, incrementaba aproximadamente 8 veces los niveles del mRNA de ALAS (Varone y Cánepa, 1997). Observamos también que esta inducción era revertida cuando las células se incubaban con insulina 5 nM prevaleciendo el efecto inhibitorio de la hormona sobre la expresión del gen de ALAS (Scassa y col, 1998). También evaluamos el comportamiento de la construcción pAC Δ 469 en células HepG2 transfectadas y estimuladas con 8-CPT-cAMP en presencia o en ausencia de insulina. La actividad transcripcional de pAC Δ 469 se redujo aproximadamente un 70 % en células tratadas con la hormona (Figura 55). De estos resultados podemos concluir que en ambos sistemas celulares la insulina ejerce su efecto inhibitorio de manera dominante con respecto a la acción del cAMP.

Con estos datos, decidimos evaluar el comportamiento de las construcciones ALIRE en células estimuladas con 8-CPT-cAMP con la intención de poder visualizar mejor el efecto inhibitorio de la insulina. La inclusión del fragmento ALIRE I no produjo modificaciones en la actividad transcripcional en presencia de la hormona coincidiendo

con los resultados obtenidos en el experimento anterior. La construcción conteniendo las 40 pb que conforman a ALIRE II mostró sensibilidad a la insulina ocasionado una disminución de aproximadamente un 40 % de la actividad transcripcional similar a lo observada en células en condiciones basales. Numerosos trabajos (O'Brien y col, 1995; Streeper y col, 1997; Hall y col, 2000) describen que mutaciones puntuales en el IRE presente en los promotores de la PEPCK, la IGFBP-1 y la glucosa-6 fosfatasa entre otros, ocasionan la pérdida de respuesta a la insulina. Hall y colaboradores (2000) comprobaron que la mutación de TGTTTGTG por TCTTTTGTG suprime por completo la acción de la hormona ejercida sobre el promotor de la PEPCK de la misma manera que la mutación de TGTTTGTG por TGTATTGTG, mientras que mutaciones en las otras bases del heptanucleótido no resultan significativas. Teniendo en cuenta estas evidencias construimos el vector ALIREmut II donde introdujimos dos mutaciones en el putativo IRE de ALAS GTTTTGTG por CTATTGTG. Como puede observarse en la Figura 56, la construcción ALIREmut II no fue capaz de responder a la insulina. Finalmente, para evaluar si la orientación de la secuencia era importante para la regulación hormonal

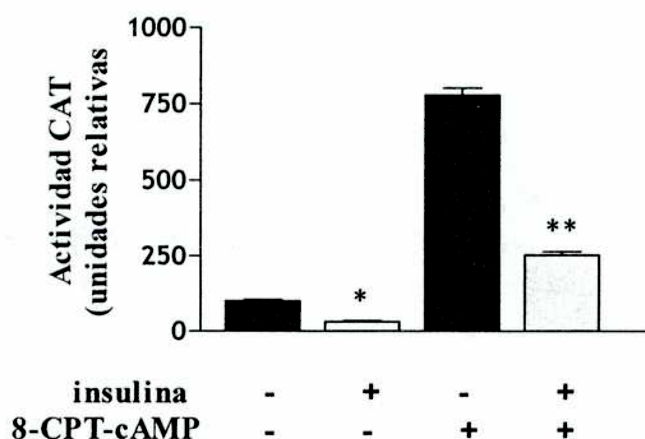


Figura 55 Efecto de la insulina sobre la actividad transcripcional de pACΔ469 en células HepG2 tratadas con cAMP: Las células fueron transfectadas con 4 µg del plásmido pACΔ469 y 6,5 µg del plásmido de referencia pCEFLβ-gal. Luego, las mismas fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección en medio libre de suero e inducidas con 8-CPT-cAMP 100 µM en presencia o en ausencia de insulina 10⁻⁸ M. La actividad específica CAT se expresa como relativa al basal sin agregado alguno que se establece como 100. Los resultados representan el promedio ± E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar la muestra conteniendo insulina con la muestra control (* P < 0,01) y la muestra conteniendo 8-CPT-cAMP e insulina con la muestra con 8-CPT-cAMP solo (** P < 0,001).

empleamos las construcciones ALIRE y ALIREinv que presentan el fragmento -469/-354 del promotor de ALAS subclonado de manera directa o invertida respectivamente. La construcción ALIRE redujo la actividad transcripcional en un 62 % en respuesta al tratamiento con la insulina mientras que ALIREinv resultó ser insensible (Figura 56).

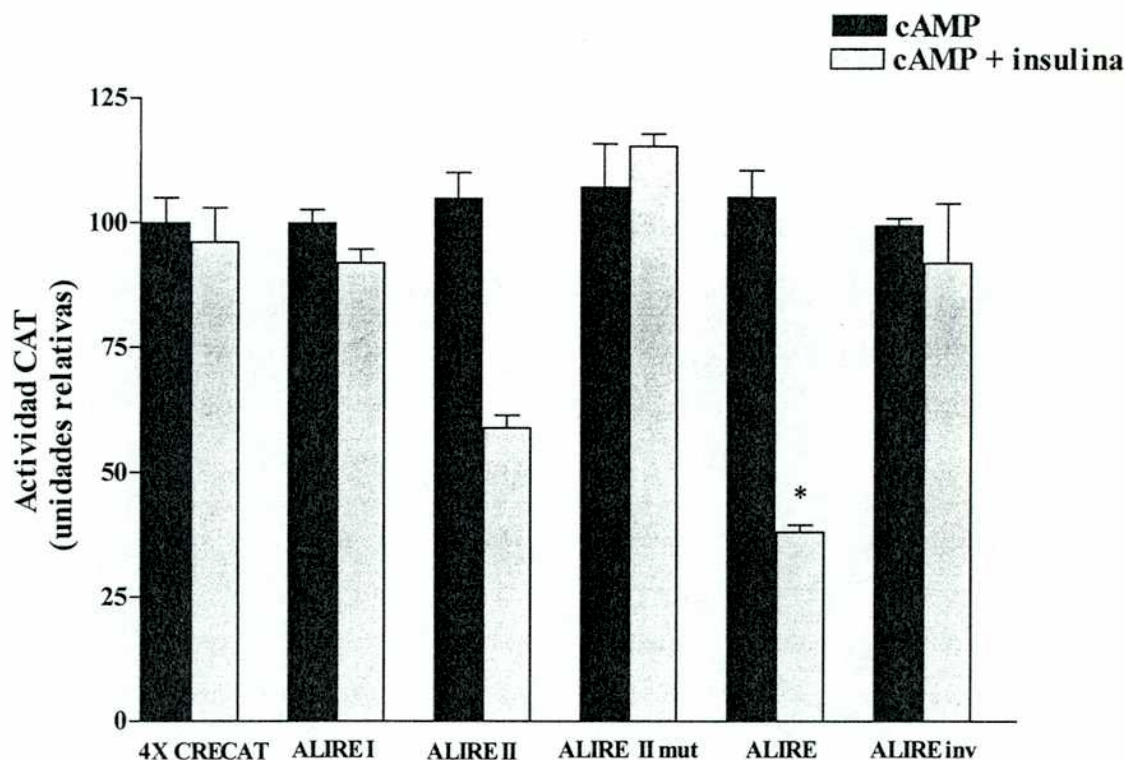


Figura 56 Efecto de la insulina sobre la actividad transcripcional de construcciones conteniendo fragmentos del promotor de ALAS insertados río arriba del promotor de la TK en células tratadas con cAMP: Las células fueron transfectadas con 4 μ g de los plásmidos indicados y 6,5 μ g del plásmido de referencia pCEFL β -gal. Luego, las mismas fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección en medio libre de suero e inducidas con 8-CPT-cAMP (cAMP) 100 μ M en presencia o en ausencia de insulina 10^{-8} M. La actividad específica CAT se expresa como relativa a cada construcción particular en presencia de 8-CPT-cAMP que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de cuatro determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras cotransfectadas con ALIRE con las muestras cotransfectadas con ALIRE II (* $P < 0,01$).

Estos resultados sugieren que la región -469/-354 del promotor de ALAS sería necesaria para manifestar el efecto inhibitorio de la insulina, ejerciéndolo de manera dependiente de la orientación. La secuencia GTTTTG (-382/-388), presente en el fragmento de 40 pb (-418/-479), podría constituir un IRE en este promotor.

2.12 La insulina revierte la estimulación de la actividad promotora de transcripción de la región -469/+42 de ALAS mediada por HNF3 α o β en células HeLa

Con el propósito de establecer el significado de la presencia de las isoformas α o β de los HNF3 en la expresión y la regulación hormonal de ALAS analizamos la actividad promotora de transcripción del plásmido pAC Δ 469 en células HeLa. Elegimos esta línea celular porque tiene receptores de insulina y presenta un escenario muy diferente al observado en hepatocitos o células derivadas de tejido hepático como lo son las HepG2. La línea celular HeLa presenta altos niveles de NF1, factores pobremente expresados en hígado (Osada y col, 1999), y además en ella no se han detectado los mRNA de los HNF3 (Cha y col, 2001). Realizamos experimentos de cotransfección con los vectores de expresión para HNF3 β o HNF3 α tanto en condiciones basales como en presencia de insulina 10^{-6} M. Es importante remarcar, que en términos absolutos los valores de la actividad CAT obtenidos en células HeLa, en condiciones basales, resultaron aproximadamente un 60 % inferiores a los medidos en células HepG2. Estos datos coinciden con resultados anteriores donde sugerimos la necesidad de la participación de miembros de la familia de factores de transcripción HNF3 para una correcta expresión de ALAS. Como puede observarse en la Figura 57, la actividad promotora de pAC Δ 469 no fue modificada en presencia de insulina en este tipo celular. Sin embargo, la sobreexpresión de HNF3 β o α estimuló la actividad transcripcional entre 2,5 o 1,75 veces, respectivamente.

Por otra parte, observamos que la estimulación de la actividad transcripcional mediada por los HNF3 fue revertida por la presencia de insulina. Esto sugiere que la hormona podría provocar modificaciones postraduccionales que disminuirían la capacidad transactivadora de estos factores de transcripción tan importantes para el programa de diferenciación hepática.

Estos resultados abren la posibilidad de pensar que la regulación de ALAS mediada por insulina tendría una restricción tejido específica

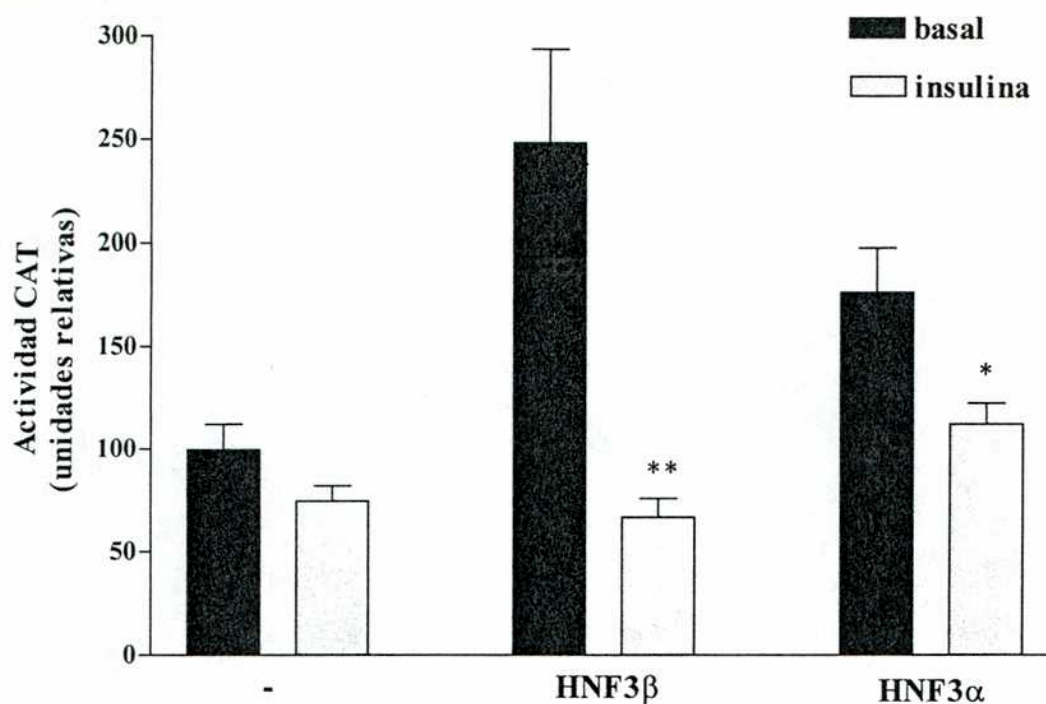


Figura 57 Efecto de la sobreexpresión de HNF3β o HNF3α sobre la actividad transcripcional de la región -469/+42 del promotor de ALAS en células HeLa: Las células HeLa fueron transfectadas con 3 µg del plásmido pACΔ469, 8 µg del plásmido pCMVHNF3β u 8 µg del plásmido pRBT7mHNF3α y 6,5 µg del plásmido de referencia pCEFLβ-gal. Las células fueron incubadas durante 24 horas posteriores a la transfección en medio libre de suero en presencia o en ausencia de insulina 10^{-6} M. La actividad específica CAT se expresa como relativa al control sin agregado alguno en cada condición, que se establece como 100. Los resultados representan el promedio $\pm$ E.S. de tres determinaciones independientes. Se aplicó el test de Student para comparar las muestras en estado basal con las muestras tratadas con la hormona (* $P < 0,05$; ** $P < 0,02$).

O

La insulina puede afectar potencialmente cualquiera de los múltiples pasos en el flujo de información desde la expresión del gen hasta la adquisición de la actividad biológica de la proteína. Sin embargo, la transcripción, la estabilidad del mRNA y la traducción son los sitios primarios de acción de la hormona. Actualmente se conocen más de 150 genes cuya expresión es regulada por la insulina (O'Brien y col, 2001), sugiriendo que es ésta una de las acciones más relevantes de la hormona. La regulación transcripcional es observada principalmente en tejidos asociados con los efectos metabólicos de la hormona como los son el hepático, el adiposo y el muscular.

El propósito de este trabajo consistió en determinar las vías de señalización implicadas en la transducción del efecto de la insulina y los factores proteicos y elementos del DNA asociados a la regulación de la expresión génica de la 5-aminolevulinato sintetasa (ALAS).

A - Acción de la insulina sobre la expresión de ALAS

En la primera parte del presente trabajo demostramos que la insulina disminuye los niveles del mRNA de ALAS en cultivos primarios de hepatocitos de rata y en células de hepatoma humano HepG2 tanto en condiciones basales como de estimulación con fenobarbital. Esta disminución obedece a la inhibición de la actividad transcripcional del promotor del gen de la ALAS.

1. La insulina disminuye los niveles del mRNA de ALAS

Frecuentemente, variaciones de los niveles del mRNA reflejan cambios del nivel transcripcional más que del de procesamiento o la estabilidad. Para determinar si las modificaciones en los niveles del mRNA de ALAS en presencia de insulina y/o fenobarbital obedecían a cambios en su estabilidad, calculamos la constante de degradación y la vida media del mRNA. La vida media del mRNA de ALAS fue calculada a partir de los parámetros cinéticos obtenidos en curvas de tiempo en presencia o ausencia de insulina y/o fenobarbital y también a distintos tiempos luego del agregado del inhibidor de la transcripción actinomicina D en presencia o ausencia de insulina. Los datos obtenidos por ambas metodologías indicaron que la velocidad de degradación del mRNA no fue modificada en las condiciones ensayadas, siendo por lo tanto poco probable la participación de la insulina en procesos que afecten la estabilidad del mRNA de ALAS. Por otra parte, hubo una significativa correlación entre la disminución de los niveles del

mRNA de ALAS, tanto en condiciones basales como de estimulación con fenobarbital, y la presencia de la hormona según lo observado en experimentos de curvas de tiempo. Finalmente, ensayos de transfecciones transientes de células HepG2 demostraron que el fragmento conteniendo 870 pb de la región 5' flanqueante del promotor de ALAS es capaz de conferir sensibilidad a la hormona. Hubo una marcada disminución de la actividad transcripcional del gen de fusión ALAS/CAT ante la presencia de insulina. Teniendo en cuenta todos estos resultados podemos sugerir que la hormona ejerce su acción a nivel transcripcional.

2. La insulina ejerce su acción a través de receptores específicos y sin el requerimiento de síntesis proteica

Analizamos luego las características de esta inhibición transcripcional. La variación de los niveles del mRNA de ALAS frente a agregados crecientes en concentración de insulina en condiciones basales o en presencia de fenobarbital resultó ser dosis dependiente. El efecto inhibitorio de la insulina se manifestó a concentraciones fisiológicas, siendo la concentración necesaria para alcanzar el 50 % del efecto (ID_{50}) aproximadamente 50 pM. La hormona ejerció su acción a través de receptores específicos ya que la proinsulina fue 200 veces menos efectiva para causar la misma inhibición. Por último, la regulación hormonal fue específica ya que en todos los casos analizados los niveles del mRNA de la β -tubulina no fueron afectados.

Tratamientos con cicloheximida demostraron que no era necesaria la síntesis proteica en este evento, tanto en condiciones basales como de estimulación con la droga porfirinogénica. El inhibidor de síntesis proteica duplicó los niveles del mRNA de ALAS en condiciones basales. Este efecto se había reportado anteriormente para varios genes, incluyendo el de la PEPCK y también el de la ALAS hepática en embriones de pollo (Dogra y col, 1993). Una explicación para este fenómeno podría ser la reducción de la síntesis de un represor lábil que conlleva a un aumento en la expresión de genes basalmente reprimidos por esta proteína. Otra posibilidad sería la disminución de la síntesis de una proteína responsable de la degradación del mRNA de ALAS. El hecho que la vida media del mRNA determinada en presencia de actinomicina D resultó ser 50 % mayor que en ausencia del inhibidor transcripcional apoya la idea que una proteína lábil (codificada por un mRNA lábil) podría degradar específicamente al mRNA de ALAS. Newton y colaboradores (1997) describieron que la superinducción de los niveles del

mRNA de la ciclooxigenasa por cicloheximida ocurrían por la activación de la transcripción y no por aumento de la estabilidad del mRNA. Por otro lado, Zinck y colaboradores (1995) demostraron que el bloqueo de la síntesis proteica con cicloheximida activaba las cascadas de MAPK y SAPK.

Los resultados obtenidos en presencia de fenobarbital son más complejos debido a un efecto adicional de la cicloheximida. De acuerdo al modelo clásico de regulación de ALAS, la síntesis de la apoproteína citocromo P450 es obligatoria para la inducción del mRNA de ALAS mediada por el barbitúrico (Kappas y col, 1989). Este efecto sería opuesto al efecto estabilizador de la cicloheximida y explicaría la disminución de los niveles del mRNA de ALAS en presencia de fenobarbital y cicloheximida. A pesar de estas consideraciones, queda claro que la insulina puede reprimir la expresión génica de ALAS independientemente de la necesidad de síntesis proteica

B - Vías de señalización que median el efecto inhibitorio de la insulina sobre la transcripción del gen de ALAS.

Después de demostrar que la insulina inhibe la transcripción del gen de la ALAS, investigamos los mecanismos involucrados en dicha regulación, que se inician luego de la unión de la hormona a su receptor y son los responsables de transducir la señal para dar la respuesta final.

1. La PI3K activa efectores que median las respuestas celulares iniciadas por la hormona sobre el gen de ALAS

La activación de la PI3K es mediada por fosforilaciones específicas en tirosinas de las proteínas IRSs (tirosinas 608, 895 y 1172) (Amoui y col, 2001) en respuesta a la activación del receptor de insulina luego de la unión de la hormona. Numerosos procesos celulares donde interviene la insulina, como la translocación del transportador GLUT4 (Saltiel y Pessin, 2002), mitogénesis, prevención de apoptosis, diferenciación celular, homeostasis de glucosa, entre otras, requieren la activación de la PI3K (De Meytis y col, 1996). De acuerdo a nuestros resultados, la PI3K está involucrada en la actividad transcripcional del promotor de ALAS. Los inhibidores específicos de la PI3K, wortmanina y LY294002, bloquearon la represión mediada por insulina del mRNA de ALAS en hepatocitos de rata y en células HepG2, como también la actividad CAT dirigida por el promotor de ALAS de

una construcción transfectada a células HepG2. Estos agentes químicos han sido empleados para indicar la importancia de la PI3K en la regulación transcripcional de varios genes entre ellos los de la PEPCK (Gabbay y col, 1996) y la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (Wagle y col, 1998).

El mecanismo de transducción entre la PI3K activada y el potencial elemento respondedor a insulina (IRE) presente en los promotores no está completamente esclarecido. Una de las proteínas que se encuentra inmediatamente río abajo de la PI3K es la p70^{s6k}. Esta quinasa ribosomal, además de regular la traducción mediante la fosforilación de la S6, fosforila y activa proteínas nucleares íntimamente relacionadas con la expresión génica. El efecto inductor de la insulina en los niveles del mRNA de la hexoquinasa II en músculo esquelético (Osawa y col, 1996) y el efecto inhibitorio en la expresión de IGFBP-1 (Band y col, 1997) es inhibido por wortmanina y rapamicina. Por otro lado, la represión hormonal de la expresión de la PEPCK en células de hepatoma de rata (Sutherland y col, 1995) y la translocación del transportador GLUT4 (Cheatham y col, 1995) es prevenida por wortmanina y no por rapamicina, sugiriendo que la PI3K puede transducir las señales disparadas por insulina independientemente de la p70^{s6k}. El inmunosupresor rapamicina fue incapaz de revertir la acción de la insulina sobre la expresión de ALAS/CAT aún estando presente a concentraciones muy elevadas. Estos resultados apoyan la existencia de una vía insensible a rapamicina.

Los productos de la PI3K, los PtdIns(3,4)P₂ y PtdIns(3,4,5)P₃, interactúan con el dominio PH presente en la PKB ocasionando los cambios conformacionales necesarios para completar su activación por PDK1. La PKB media numerosos procesos celulares de la insulina, siendo la glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK3), la fosfodiesterasa-3B (PDE-3), el IRS-1 y miembros de la familia "forkhead", algunos de los sustratos involucrados en esta acción (Alessi y col, 1998). La sobreexpresión de formas constitutivamente activas de PKB en células respondedoras a insulina produjo el mismo efecto que la hormona (Kohn y col, 1996), mientras que su activación disminuyó en adipocitos de pacientes que padecen diabetes Tipo 2 (Roncinone y col, 1999). Nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de una mutante dominante negativa de PKB fue capaz de revertir la represión de la actividad transcripcional del promotor de ALAS ejercida por insulina. Por otra parte, una versión miristoilada de la enzima logró mimetizar los efectos de la regulación hormonal. Estas evidencias sugieren que la PKB sería el efector río abajo de la PI3K en la inhibición transcripcional de ALAS.

2. La MAPK es una quinasa muy importante en la señalización de insulina

Nuestros resultados indican que la cascada de Ras/MAPK interviene en la regulación transcripcional de ALAS mediada por insulina. La insulina es uno de los mayores inductores de Ras, promueve la translocación de la proteína farnesilada a la membrana permitiendo de esta manera la propagación de la señal río abajo (Goalstone y col, 1998). O'Brien y Granner (1996) describieron que la expresión de formas dominante negativas de Ras suprime la inducción de la expresión génica de la collagenasa y de la albúmina en hepatocitos. La MAPK activada, transloca al núcleo y regula directamente la expresión génica mediante la fosforilación de factores de transcripción (Kusari y col, 1997). La MAPK, también puede ejercer su acción en respuesta a insulina de forma indirecta, fosforilando a la p90RSK o a la glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK3) (Sutherland y col, 1994). Tres evidencias apoyan la idea de la participación de esta vía en la regulación de ALAS por insulina. En primer lugar, la expresión de versiones dominante negativas de tres proteínas diferentes, intermediarias de esta vía de señalización, RasN17, dn-Raf y MEKA suprimió el efecto inhibitorio de la insulina sobre la actividad transcripcional del gen de fusión ALAS/CAT. El hecho que estas mutantes actúan a distintos niveles de la cascada de MAPK sostiene la hipótesis de la intervención de esta vía en la inhibición hormonal. En segundo término, las formas constitutivamente activas RasV12 y MEKE reprimieron la expresión de ALAS/CAT de manera similar a la insulina. Por último, el bloqueo de la farnesilación de Ras con lovastatina o PD152440 o la inhibición de MEK con el agente químico PD98059 impidieron el efecto final sobre el promotor de ALAS frente a la señal iniciada por insulina. Estas evidencias, obtenidas por diferentes abordajes experimentales, favorecen la hipótesis de un mecanismo que involucra la activación de la vía de Ras/MAPK.

La activación frente a estímulos mitogénicos de la p90RSK produce su translocación al núcleo donde puede fosforilar numerosos sustratos entre ellos factores de transcripción (Richards y col, 1999). Si la quinasa ribosomal estuviera involucrada en la señalización de insulina sobre el gen de ALAS su activación ocasionaría una disminución en la actividad del promotor. La sobreexpresión de una mutante constitutivamente activa de p90RSK redujo la actividad transcripcional basal de ALAS/CAT. Además, esta disminución se vio incrementada ante la presencia de insulina lo que sugiere que la p90RSK no sería el único efector río abajo en este evento. Estas evidencias sugieren que la p90RSK estaría involucrada en la transducción de la señal, siendo quizás necesaria la activación de otra

cascada para lograr la totalidad de la respuesta. No podemos dejar de considerar que los niveles de expresión alcanzados no hallan sido suficientes para lograr el efecto máximo. Una probable explicación a este resultado podría ser lo reportado por Alessi y Cohen. Estos investigadores observaron en células de embriones de ratón que la quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK1, intermediaria de la vía de la PI3K/PKB) no activa a la p90RSK *per se*, sino que completa la activación iniciada por la MAPK de esta quinasa ribosomal.

3. Las vías PI3K/PKB y Ras/MAPK/p90RSK deben estar funcionalmente activas para propagar la señal de insulina hacia el punto final

Nuestros resultados sugieren que ambas vías PI3K/PKB y Ras/MAPK/p90RSK desempeñan un papel importante en la regulación de ALAS por insulina. Todas estas quinasas participan en uno o varios de los efectos regulados por la hormona. En algunos casos la activación de una vía puede resultar suficiente, mientras que en otras la activación de más de una de estas vías sería necesaria. Por ejemplo, la activación de las vías de la PI3K y de la MAPK son requeridas para la estimulación de la síntesis proteica en general, mientras que solamente la vía de la PI3K es requerida para la síntesis de proteínas relacionadas con el desarrollo celular (Mendez y col, 1997).

En el caso particular de la ALAS demostramos que la activación de PI3K/PKB o la de Ras/MAPK/p90RSK es capaz de mimetizar el efecto ejercido por la insulina. Nos preguntamos entonces, si ambas vías actúan independientemente o, por el contrario, están relacionadas o son funcionalmente dependientes. La transducción de señales no es simplemente una propagación lineal del estímulo desde el receptor al núcleo sino que implica una basta red de proteínas interaccionando entre sí. Numerosos datos bibliográficos describen entrecruzamientos de vías. Las PI3K clase IA y IB pueden interaccionar con Ras. A partir de ensayos de inmunoprecipitaciones empleando anticuerpos anti-Ras se obtuvieron evidencias de la interacción física existente entre p21ras y el heterodímero p85/p110 α (PI3K) (Rodriguez Viciano y col, 1994). Posteriormente, se demostró que la forma Ras-GTP, y no Ras-GDP, era la que interactuaba con la PI3K IA y que la farnesilación de Ras en la cisteína 186 era crucial para la activación de la PI3K α (Wymann y Pirola, 1998). En células NIH3T3, la sobreexpresión de RasV12 incrementó los niveles de los PtdIns(3,4)P₂ y PtdIns(3,4,5,)P₃ y la de RasN17 alteró la activación mediada por factores de crecimiento de la PI3K. Por otro lado, una versión constitutivamente activa

de la PI3K incrementó la actividad transcripcional del gen de fusión fos/luc en este tipo celular, efecto que fue completamente inhibido mediante la coexpresión de una mutante dominante negativa de Ras (Hu y col, 1995).

Estudios recientes demostraron que la PKB puede inhibir a la proteína Raf mediante la fosforilación en la serina 239. Este evento permite la interacción entre Raf y las proteínas 14-3-3 y la consecuente inactivación de la transducción de la señal desde Raf hacia MAPK. Este entrecruzamiento de vías tal vez no funcione ubicuamente, ya que PKB no inhibe a Raf en células precursoras de mioblastos pero sí en miotubos de músculo esquelético (Rommel y col, 1999). Debe remarcarse que, en varias líneas celulares, inhibidores de la PI3K y por ende de la PKB, no afectan la activación de Raf llevada a cabo por diferentes agonistas, lo que sugiere que la PKB podría inhibir a Raf solamente bajo ciertas circunstancias (Dockworth y col, 1997).

Nuestros resultados avalan la hipótesis en la cual ambas vías deben estar funcionalmente disponibles para transducir el efecto inhibitorio de la insulina

Esta afirmación se basa en que la inhibición de una vía abolió el efecto logrado por la activación de la otra. Sugerimos entonces, que la actividad basal de las vías PI3K/PKB y Ras/MAPK/ p90^{RSK} mantienen al gen de ALAS parcialmente reprimido y que la inhibición de ambas vías revierte la represión basal. Por otro lado la represión mediada por la insulina requeriría al menos la activación de una de las vías y la integridad de la actividad basal de la otra para dar la respuesta final. Una explicación para la participación de ambas vías podría ser la necesidad de una regulación más fina que aseguraría un estricto control de los niveles del mRNA de ALAS frente a diferentes estímulos.

4. La deficiencia de PKC disminuye el efecto de insulina sobre el promotor de ALAS

Trabajos anteriores del laboratorio demostraron que el éster de forbol TPA inhibe la expresión de ALAS mediante un mecanismo que involucra a la PKC (Varone y Cánepa, 1997). Nuestros resultados indican que la depleción de la PKC, luego de tratamientos prolongados con TPA o la inhibición de la quinasa con calfostin C, afectan la señalización de insulina hacia el promotor de ALAS. El efecto inhibitorio de TPA prevaleció en células incubadas con insulina y wortmanina, lovastatina, PD152440 o PD98059. La represión del gen de ALAS fue revertida en todos los casos donde las células fueron expuestas al tratamiento prolongado con el éster de forbol. Estas evidencias sugieren que el TPA y la insulina emplearían mecanismos diferentes para llegar al mismo punto final, que podrían

converger río abajo de MEK teniendo en cuenta que ambos son potentes activadores de MAPK.

Según trabajos reportados, la PKC podría emplear diferentes mecanismos para ejercer su acción, dependiendo quizás de factores como el gen, el tipo celular, la duración o la intensidad del estímulo entre otros. En células COS la estimulación de PKC lleva a la activación de Ras y la formación del complejo Ras-Raf-1, donde Raf-1 se encuentra activa (Marais y col, 1998). Esta activación de Raf-1 por PKC no es bloqueada por la sobreexpresión de la mutante dominante negativa RasN17, lo que indica que PKC activa a Ras por un mecanismo diferente al que se inicia por activación de receptores de quinasa de tirosinas.

En células Swiss3T3 la activación de ERK/MAPK por la proteína oncogénica p21 ras está conducida a través de vías dependientes e independientes de PKC. Sin embargo, en esta línea celular la ruta PKC-dependiente aparenta ser la que aporta la mayor contribución a la activación de ERK/MAPK. Esto sugiere que PKC actuaría río abajo de Ras coincidiendo con resultados que indican que la inducción de ERK/MAPK mediada por PKC no es abolida por la mutante dominante negativa RasN17 (Vries-Smits y col, 1992).

En células totipotenciales de embriones de ratón el tratamiento con el éster de forbol TPA aumenta seis veces la actividad del bien caracterizado sustrato de MAPK, la p90RSK. Esta activación es prevenida totalmente cuando se incuban las células con el inhibidor de MEK, PD98059 (Williams y col, 2000).

Messina y Weinstock demostraron que la tirosina aminotransferasa, la albúmina y la PEPCCK responden de diferente manera a la insulina luego de exposiciones prolongadas a TPA. Los genes de la glucosa-6 fosfatasa y la IGFBP-1 presentan secuencias homólogas en los promotores necesarias para la represión mediada por insulina. A pesar de esto, el tratamiento con ésteres de forbol mimetizó la acción de la insulina en la regulación de la glucosa-6 fosfatasa pero no en la de la IGFBP-1, donde por el contrario la presencia de ésteres de forbol bloqueó la acción de la insulina. Además, la acción de los ésteres de forbol se vió sustancialmente reducida frente a la presencia de inhibidores de la vía de MAPK. Por esto se sugiere que la activación de la MAPK podría reducir la sensibilidad del promotor de la IGFBP-1 pero no el de la glucosa-6 fosfatasa a insulina (Patel y col, 2001). Estos antecedentes sugieren que el papel que desempeña la PKC en la señalización de insulina varía de acuerdo al gen.

C. Regulación de la expresión génica de ALAS

1. La región comprendida entre los pares de bases -469 a-354 del promotor de ALAS contiene una secuencia muy similar al IRE.

La insulina regula la expresión de más de 150 genes. Por lo menos ocho elementos respondedores han sido descritos a través de los cuales la hormona puede regular la transcripción. Estos incluyen, entre otros, al elemento de respuesta al suero (SRE), al motivo para la proteína activadora 1 (AP-1), al elemento para los factores Ets, a la secuencia “E-box” y al elemento consenso para el factor de transcripción tiroideo 2 (TTF2) (O’Brien y col, 2001). Todos estos IREs están presentes en promotores donde la hormona ejerce efectos estimulatorios. Por el contrario, una secuencia consenso T(G/A)TTT(T/G)(G/T) media el efecto inhibitorio de la insulina sobre un número creciente de promotores como los de la PEPCK, IGFBP-1, glucosa-6 fosfatasa, apolipoproteína CIII, IRS-2, aspartato aminotransferasa, colesterol 7 α hidroxilasa (De Fabiani y col, 2000), tirosina aminotransferasa (O’Brien y col, 2001) y “aquaporin adipose” (canal específico para glicerol en adipocitos) (Kishida y col, 2001).

Trabajos previos del laboratorio demostraron la existencia de sitios funcionales para CREB y para miembros de la familia de factores de transcripción AP-1 dentro de los primeros 469 pb del promotor de ALAS. La sobreexpresión de mutantes dominantes negativas que impiden la unión al DNA de AP-1, CREB y C/EBP no modificó la regulación hormonal. Estas evidencias indican que la remoción de la contribución endógena de AP-1, CREB o C/EBP por las versiones dominante negativas no afectaría la acción de los factores de transcripción asociados a la respuesta final de la insulina.

Ensayos de transfecciones transientes en células HepG2 con construcciones portando delecciones 5’ seriadas de la región -833/+42 del promotor de ALAS nos permitieron caracterizar a la región comprendida entre las bases -469 y-354 como la responsable de conferir sensibilidad a la insulina. El análisis *in silico* de estos 117 pb reveló la existencia de un IRE muy similar al descrito para la PEPCK en la posición -383 a -389, como también la presencia de sitios con alta homología a los consenso para los HNF3 en las posiciones -397 a -387 y -383 a -373 y para los NF1 entre las bases -428 y -424.

2. El promotor de ALAS presenta sitios de unión para los HNF3

Varias proteínas que se unen a los IREs han sido identificadas, entre ellas las que integran las familias de factores de transcripción de C/EBP y de HNF3 (Streeper y col, 1997). Particularmente en los promotores de la PEPCK, tirosina aminotransferasa y IGFBP-1 existen sitios consenso para HNF3 que se superponen parcialmente con los respectivos IREs (Wang y col, 1996).

Los HNF3 desempeñan un papel importante en la regulación del metabolismo y diferenciación en tejidos como el hepático y el pancreático. Estas proteínas se unen como monómeros a elementos en *cis* presentes en centenares de genes que codifican hormonas, enzimas gluconeogénicas, glucolíticas y proteínas séricas (Kaestner 2000). Estos factores participan también en la organización temprana de la cromatina alrededor de genes cuya expresión es específica para hígado y otros tejidos derivados del endodermo. Vallet y colaboradores (1995) proponen que los HNF3 se necesitarían para mantener la expresión de ciertos genes cuyos promotores presentan sitios de unión para los mismos y le adjudican la participación en al menos dos tipos de actividades diferentes. Una, la de ubicar a genes hepáticos específicos en una estructura de cromatina permisiva y la otra la de mantener activa la transcripción de genes específicos derivados del endodermo. En esta segunda actividad estarían quizás involucrados los dominios amino y carboxilo terminales interaccionando directa o indirectamente con el complejo transcripcional.

Ensayos de retardo en la movilidad electroforética con los oligonucleótidos ALIRE I (-459/-419) y ALIRE II (-418/-379) revelaron la formación de complejos proteicos cuando empleamos extractos nucleares de células en condiciones basales o estimuladas con insulina. Los complejos formados por unión a ALIRE II no fueron interrumpidos cuando se introdujeron mutaciones en el putativo IRE allí presente. Por otro lado, estos complejos fueron competidos por exceso de oligonucleótidos consenso para HNF3.

Los miembros de la familia de factores de transcripción “forkhead” pueden regular la transcripción de diferentes maneras. En particular, los HNF3 se comportan como: activadores potentes en el promotor del transportador de glucosa tipo2 (GLUT2) (Cha y col, 2000), como activadores débiles en el gen de la albúmina (Vallet y col, 1995), como inhibidores sobre el promotor de la aldolasa B (Gregori y col, 1993) contrarrestando la acción de los HNF1 y como factor accesorio en la inducción mediada por glucocorticoides de la PEPCK (Wang y col, 2000). También ciertos miembros de esta familia pueden actuar de manera muy específica como lo demostraron Barthel y colaboradores (2001) en la línea

de hepatoma de rata H4IIEC3 donde la sobreexpresión de FKHR (“forkhead rhabdomiosarcoma”) incrementó marcadamente la expresión basal de la glucosa-6 fosfatasa mientras que no alteró los niveles del mRNA de la PEPCK en el mismo contexto celular. En el caso particular de ALAS, la sobreexpresión de HNF3 β revirtió parcialmente la inhibición ejercida por insulina sobre la actividad transcripcional del promotor del gen de fusión ALAS/CAT, mientras que la de la isoforma α disminuyó la actividad basal del mismo. En estudios realizados en células de endodermo visceral, donde la regulación de la expresión génica es similar a la hepática se pudo concluir que dentro de un contexto de cromatina nativa los HNF3 α y HNF3 β son activadores de la transcripción, siendo el primero un activador más pobre (Duncan y col, 1998). Con estos resultados, sugerimos que la disminución de la transcripción basal de ALAS puede atribuirse entonces a una inhibición de la actividad de HNF3 β debida al desplazamiento del factor de su sitio de unión al DNA ocasionado por la sobreexpresión de HNF3 α . También observamos que la actividad transcripcional basal se redujo marcadamente cuando los HNF3 fueron desplazados de los sitios actuando en *cis* al incubar las células con oligonucleótidos doblecadena consenso o cuando fueron degradados los híbridos formados entre el mRNA de HNF3 β y las moléculas “antisense” incorporadas, por la actividad endógena de la RNasa H (Koller y col, 2000).

3. Ciertos miembros de la familia de factores de transcripción “forkhead” son regulados por eventos de fosforilación

Los factores FKHL1 y FKHR que integran la familia “forkhead”, a la que pertenecen los HNF3, son inhibidos por fosforilaciones, PKB dependientes, en respuesta a la insulina o IGF-1. Estas fosforilaciones ocurren secuencialmente, produciendo la exclusión nuclear del factor y la posterior retención citoplasmática por unión a proteínas 14-3-3. Recientemente se demostró que la fosforilación mediada por PKB del factor de transcripción AFX, otro miembro de la familia “forkhead”, atenúa la importación nuclear del mismo, cambiando la localización de la proteína de nuclear a citoplasmática y ocasionando la pérdida de su función (Brownawell y col, 2001). En *Caenorhabditis elegans*, una vía de señalización similar a la empleada por insulina a través de la cascada PI3K/PKB, regula negativamente la actividad transcripcional de DAF-16 (miembro de la familia “forkhead”). En células de mamíferos Cahill y colaboradores (2001) demostraron

que *C.elegans* DAF-16 es blanco de PKB y que las fosforilaciones llevadas a cabo por esta quinasa generan sitios de unión para las proteínas 14-3-3 regulando así la distribución nuclear/citoplasmática de DAF-16.

En la segunda parte de los resultados demostramos que las vías de la PI3K y MAPK participan en la regulación de la expresión de ALAS por insulina (Scassa y col, 2001). A partir de estas evidencias podríamos especular que un evento de fosforilación podría constituir un paso crítico en esta regulación. Pani y colaboradores (1992) demostraron mediante experimentos realizados con geles de dos dimensiones que múltiples formas fosforiladas de HNF3 β pueden detectarse en extractos nucleares de hepatocitos. Además, Quian y Costa (1995) reportaron la existencia de formas fosforiladas de HNF3 α y β en células HepG2. Un cambio en el estado de fosforilación de estos factores podría explicar la disminución en la capacidad de unión al DNA que observamos en los EMSAs realizados con la sonda consenso para HNF3 y extractos nucleares provenientes de células tratadas con insulina. Esto también podría relacionarse con las variaciones en el patrón de bandas de retardo que obtuvimos cuando incubamos los extractos nucleares de células pretratadas con wortmanina y/o PD98059 e insulina. Estos inhibidores bloquean específicamente a la PI3K y a MEK e impiden la propagación de la señal hacia el punto final. Finalmente, cabe resaltar que los complejos DNA-proteínas formados tanto por unión a ALIRE II como por unión a la sonda consenso para HNF3 exhibieron un comportamiento casi idéntico en cada condición experimental ensayada.

En este trabajo hemos demostrado que la PKC participaría en la regulación hormonal de ALAS. Kumar y colaboradores (1997) han descrito un modelo para la regulación mediada por TPA de la proteína surfactante B en células de pulmón. Sus hallazgos proponen un mecanismo totalmente diferente al que involucra la participación de AP-1, AP-2, NF- κ B u “octamer binding protein”. Estos investigadores comprobaron que el tratamiento de las células con TPA activa a la PKC y esto ocasiona la fosforilación en el citoplasma del HNF3. La fosforilación podría ocurrir directamente por PKC o a través de una cascada de señalización. Este evento bloquea la translocación al núcleo de HNF3 e implica una disminución en el contenido nuclear de este factor. Estos autores proponen que la retención citoplasmática de HNF3 podría asociarse también con la represión mediada por PKC de la expresión de ciertos genes tiroideos y hepáticos. Este novedoso proceso abre la posibilidad de pensar que la insulina y el TPA podrían regular a través de diferentes mecanismos a un mismo factor.

4. El promotor de ALAS presenta sitios funcionales para los NF1

Los factores nucleares NF1 están implicados tanto en la activación como en la represión de numerosos genes. Se han postulado diversos mecanismos a través de los cuales los NF1 afectarían la transcripción. Entre ellos podemos mencionar el reclutamiento o desplazamiento de coactivadores o represores, la interacción directa con factores de la maquinaria basal de transcripción y el desplazamiento de histonas (Gronostajski, 2000). Estas proteínas inducen la expresión del gen de la peroxidasa interaccionando con el factor de transcripción tiroideo 2 en células tiroideas FRTL-5 (Ortiz y col, 1999). Leahy y colaboradores (1999) detectaron mediante ensayos de doble híbrido interacciones entre los dominios carboxilo terminal ricos en prolinas de los NF1 y los residuos 451-682 del coactivador CBP (Leahy y col, 1999). Los NF1 reprimen la expresión de la piruvato quinasa y la albúmina en hepatocitos de rata al competir con los factores nucleares hepáticos HNF1 y HNF4 respectivamente, por los sitios en *cis* presentes en los promotores (Yamada y col, 1997) En células HeLa la expresión de NF1-C o NF1-X reprime la actividad inducida por glucocorticoides del promotor del virus del tumor mamario murino (MMTV), mientras que la expresión de las isoformas A y B no lo hacen. Esta represión es revertida por la sobreexpresión de CBP/p300 (Chaudhry y col, 1999).

Evidencias de la participación de NF1 en la expresión basal de ALAS se pueden obtener a partir de los resultados de los ensayos de transfecciones transientes de células HepG2. En estos, la actividad transcripcional basal del promotor de ALAS se redujo marcadamente cuando las células de hepatocarcinoma se incubaron con oligonucleótidos doble cadena consenso para NF1 o con moléculas “antisense”.

Numerosos genes regulados por insulina presentan sitios de unión para NF1 (Cooke y Lane, 1999). Estos científicos detectaron que la insulina ocasiona cambios rápidos en el estado de fosforilación de los NF1 y que estos cambios se correlacionan con variaciones en la expresión de genes que presentan elementos para NF1. En EMSAs realizados con extractos nucleares de células HepG2 tratadas con insulina observamos una modificación en la capacidad de unión de los factores nucleares al oligonucleótido consenso para NF1 con respecto a la que presentan en estado basal. Además comprobamos que el tratamiento con los inhibidores wortmanina y/o PD98059 e insulina produce alteraciones en la formación de complejos entre proteínas nucleares y la sonda consenso para NF1, muy similares a las observadas con el oligonucleótido ALIRE I, que difieren de acuerdo a la condición experimental ensayada. Misawa y Yamaguchi (2000) estudiaron en células de

hepatoma H4-II-E la regulación transcripcional de la regucalcina de rata cuyo promotor presenta un motivo consenso para NF1 dentro de la región -523/-506. En su trabajo describieron modificaciones en la capacidad de unión de proteínas nucleares al oligonucleótido conteniendo la secuencia TTGGC frente a tratamientos con PD98059 o wortmanina. Estos investigadores también observaron diferencias cuando incubaron las células con ortovanadato (inhibidor de fosfatasa de tirosina). Esto sugiere que la capacidad de unión al DNA de estas proteínas podría estar regulada en parte por eventos de fosforilación. Estas observaciones ofrecen la posibilidad de pensar que NF1 regularía la expresión basal de ALAS y que la insulina ocasionaría un cambio en el estado de fosforilación de los NF1 que disminuiría su capacidad de unión al DNA

5. El fragmento de 117 pares de bases (-469/-354) del promotor de ALAS confiere respuesta a insulina en un contexto heterólogo.

Una vez caracterizada la región y comprobada la formación de complejos entre proteínas nucleares y oligonucleótidos con secuencias presentes en la misma, decidimos evaluar la funcionalidad de estos complejos y acotar la secuencia que confiere respuesta a la insulina. Con este objetivo, generamos la familia de plásmidos ALIRE que nos permitió comprobar que la región comprendida entre los pb -469 a -354 confiere una respuesta a la hormona en un contexto heterólogo, similar a la alcanzada en el promotor de ALAS. La construcción ALIRE_{inv} que contiene el fragmento de 117 pb subclonado en sentido invertido con respecto al nativo no fue capaz de inhibir la actividad transcripcional. Este hallazgo da cuenta de la importancia de la orientación de la secuencia en esta regulación. También observamos que el plásmido ALIRE I que contiene insertadas las bases comprendidas entre -459 y -419 fue insensible a la insulina mientras que ALIRE II portando el fragmento de 40 pb (-418/-379) pudo inhibir en gran parte la actividad del promotor de la quinasa de timidina en presencia de la hormona. Las construcciones ALIRE y ALIRE II pudieron conferir sensibilidad a la insulina aunque la diferencia entre los efectos alcanzados por cada una de ellas fue significativa, lo que sugiere que en el fragmento de 40 pb hay elementos necesarios pero no suficientes para lograr la totalidad de la represión hormonal. Además, no podemos dejar de considerar que, si bien el fragmento ALIRE I no exhibió por sí solo sensibilidad a la insulina, este podría aportar elementos necesarios para lograr la totalidad del efecto hormonal. Por otro lado, el plásmido

ALIREmut II que presenta las mutaciones CTATTG en el putativo IRE de ALAS: GTTTTG perdió por completo la capacidad de responder a la hormona indicando que esta secuencia es crucial para la inhibición. Todos estos resultados y los observados en la línea celular HeLa nos permiten proponer que dentro de la región comprendida entre los pb -469 a -354 del promotor de ALAS existen elementos que conformarían una unidad regulatoria importante tanto para la expresión basal en hígado como para la restricción tejido específica de la acción de la insulina. Además, dentro de esta zona se encuentra la secuencia GTTTG similar al IRE canónico reportado para numerosos genes reprimidos por la hormona, que se comportaría como el elemento respondedor a insulina en este gen

En los múltiples ensayos de retardo de la movilidad electroforética que realizamos pudimos observar que la formación de los complejos por unión a los oligonucleótidos ALIRE I y ALIRE II no era interrumpida por el tratamiento con la insulina ni tampoco por introducción de mutaciones en la secuencia del IRE. Comportamientos similares se obtuvieron con los complejos formados por unión a los IREs de la IGFBP-1 (Suwanickul y col, 1993; O'Brien y col, 1993) y la PEPCK (Hall y col, 2000) entre otros. Una serie de análisis mutacionales de los IRE de la IGFBP-1 y de la PEPCK demostró que no existe correlación entre la unión de las proteínas HNF3 al mismo y la habilidad del elemento para conferir la respuesta (Allander y col, 1997; Hall y col, 2000). De todos modos, para el caso particular de ALAS, todavía queda abierta la posibilidad de que la insulina cause el reemplazo de los factores unidos por otros que den un patrón de bandas de retardo similar.

Tomando en cuenta todos los resultados obtenidos, podemos sugerir que la insulina mediante eventos de fosforilación/defosforilación podría alterar el balance de cargas negativas que modificaría las interacciones entre DNA-proteínas o proteínas entre sí necesarias para la expresión basal de ALAS. El hecho que el fragmento ALIRE II no fuera suficiente para dar la respuesta total a la hormona y la necesidad de la presencia de los 117 pb que constituyen ALIRE para lograr la máxima inhibición podría indicar que la insulina interrumpe una interacción entre factores que se unen a sitios adyacentes presentes en ALIRE I y II que se necesita para una correcta expresión del gen. La presencia de sitios vecinos en la región promotora de ALAS entre -469 a -354 para NF1 y HNF3 abre la posibilidad de que cambios en el estado de fosforilación en uno o ambos factores interrumpan la interacción que pudiera existir entre ambos coreguladores. Ortiz y colaboradores han descripto que la interacción entre NF1 y TTF-2 (factor de transcripción tiroideo 2), otro miembro de la familia "forkhead", es necesaria para la correcta regulación

hormonal del gen de la tiroperoxidasa. Una interacción similar se observó entre NF1 y HNF3 β en el gen de la albúmina en hígado (Sato y Di Lauro, 1996). Recientemente, Chaya y colaboradores (2001) reportaron la existencia de un complejo integrado por HNF3, NF1 y la histona H3 en el “enhancer” de la albúmina en la cromatina hepática nativa. La interacción entre factores de estas familias podría explicarse en los casos donde el sitio de NF1 estuviera enmascarado dentro de la estructura de la cromatina. La presencia de un factor “forkhead” desestabilizaría la cromatina y transformaría en accesible el sitio para que los NFI ejerzan la transactivación.

Los EMSAs ofrecen la posibilidad de observar la formación de complejos entre proteínas nucleares y oligonucleótidos portando secuencias de elementos presentes en el DNA, sin embargo distan de representar el escenario real que los factores de transcripción encuentran en el contexto de la cromatina nativa dentro del promotor. Como no hemos analizado la estructura de la cromatina del promotor de ALAS, una potencial participación de los HNF3 en la reorganización de la misma podría ser un posible parámetro para evaluar dentro de esta regulación que podría resultar crucial para dilucidarla por completo.

Podemos postular también, que modificaciones postraduccionales de HNF3 y/o NF1 podrían inducir el reclutamiento hacia el promotor de una proteína aún no identificada responsable de mediar la represión hormonal o permitir la competencia antagónica de algún factor que presente sitios en *cis* cercanos. En el caso del gen de la aldolasa B, HNF3 antagoniza la transactivación transcripcional mediada por HNF1 (Gregori y col, 1994).

Recientemente se han descrito nuevos mecanismos empleados por los factores “forkhead” para reprimir la transcripción. La proteína “forkhead”, factor nuclear de miocitos beta (MNF-beta), forma un complejo de corepresión con miembros de la familia mSin3b que estaría involucrado en la coordinación de la proliferación y diferenciación celular de precursores miogénicos (Yang y col, 2000). Park y Waxman (2001) detectaron un nuevo mecanismo empleado en el gen del citocromo P450 en hígado de ratas hembra, donde el HNF3 β inhibe la activación del factor STAT5. El HNF3 β suprime las fosforilaciones en tirosina inducidas por la hormona de crecimiento en STAT5, lo que implica una disminución en la afinidad por el DNA y consecuente pérdida de actividad. Un posible mecanismo de este intrigante efecto podría ser la inducción de una fosfatasa de tirosinas.

También es concebible pensar, que una estricta regulación hormonal sea mediada por diferentes mecanismos que dependen de múltiples factores tales como el tipo celular, el

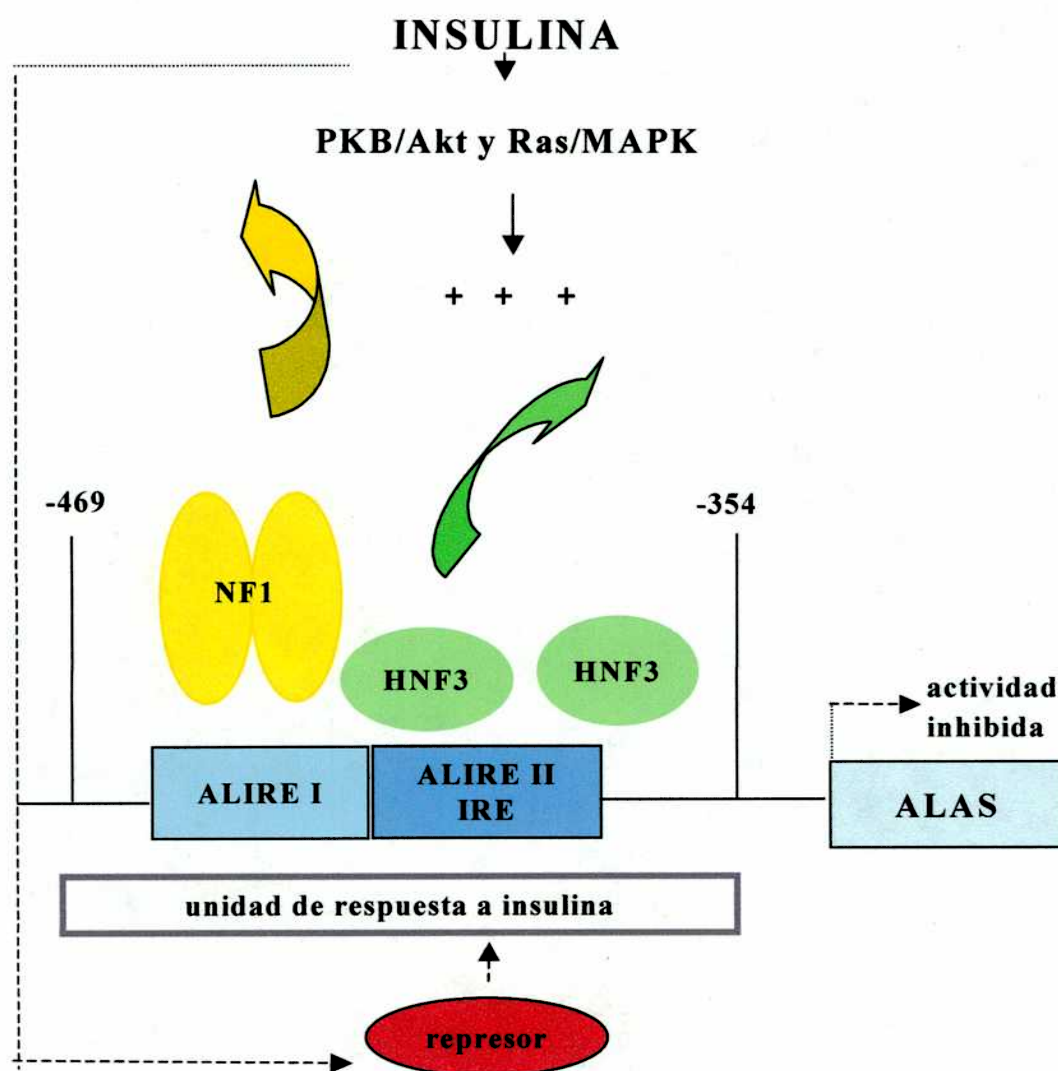
gen, los inductores, etc. Esto pudo observarse por ejemplo en los genes de la PEPCK y la IGFBP-1 donde, a pesar de la similitud entre la arquitectura de los promotores, se pudo comprobar que la insulina emplea diferentes caminos para regular la expresión basal y la inducida por glucocorticoides en cada gen (Yeagley y col, 2001). Poder dilucidar completamente las vías de transducción de señales, los factores y elementos que emplea la insulina para ejercer su acción sobre ALAS podrá aportar numerosos beneficios para paliar enfermedades donde la hormona ha perdido su habilidad para regular la transcripción.

6. Modelo propuesto para describir el mecanismo empleado por la insulina para regular la transcripción de ALAS

Por último proponemos un modelo donde describimos el mecanismo, posiblemente empleado por la insulina, para regular la transcripción de ALAS. En la línea celular HepG2 la insulina, luego de unirse al receptor, da inicio a la propagación de su señal a través de las vías Ras/MAPK y PI3K/PKB. Mediante la participación de quinasas y fosfatasa este evento culminaría alterando el balance de cargas presentes en dominios proteicos involucrados en la interacción factores de transcripción/DNA. En nuestro esquema, cambios postraduccionales en miembros de las familias HNF3 y/o NF1 podrían ser responsables de mediar la respuesta final. La fosforilación disminuiría la capacidad de estos para unirse al DNA, lo que se vería reflejado en una marcada reducción de la actividad transcripcional y la disponibilidad de sitios para un eventual represor.

Varias evidencias ofrecen la posibilidad de pensar que sitios, basalmente ocupados, queden disponibles y resulten funcionales para algún represor. En primer lugar la importancia tanto de la orientación de la región que confiere respuesta a insulina como de la integridad de la secuencia GTTTTG en esta regulación. En segundo término, los resultados obtenidos al transfectar células con construcciones portando delecciones 5' seriadas del promotor. Las delecciones realizadas a lo largo de la zona comprendida entre -469 y -75 no alteraron la actividad transcripcional, mientras que las delecciones efectuadas río abajo de -354 perdieron la capacidad de responder a la insulina. Esto indica que los sitios funcionales para factores de transcripción presentes en la región -469/-75 no serían relevantes para la expresión basal y sí los presentes río abajo de -75. El análisis *in silico* del promotor reveló la existencia de sitios con alta homología para NF1 en la posición -21 y para los HNF3 en las posiciones -19 y -10. De los resultados obtenidos

empleando oligonucleótidos consenso para NF1 y HNF3 podemos concluir que estos elementos proximales son funcionales y cruciales para la expresión basal ya que este tratamiento redujo marcadamente la actividad promotora de transcripción del gen de fusión ALAS/CAT. Es concebible pensar entonces, que otra proteína, aún no identificada, podría participar en la represión hormonal, ya que, si la insulina solamente produjera el despegado de los HNF3 y los NF1, observaríamos el mismo efecto tanto al desplazar los factores de sus sitios como al eliminar los elementos del promotor.

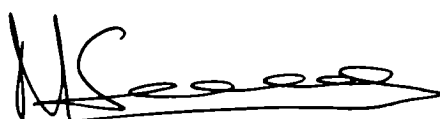


Esquema del mecanismo propuesto para la regulación transcripcional de ALAS por insulina en células HepG2

Por último, la falta de correlación entre el “binding” y la habilidad de ALIREmut II para conferir respuesta a insulina es otra evidencia que apoya esta hipótesis. De todo lo expuesto, podemos sugerir que la insulina ocasiona una pérdida en la capacidad que presentan los HNF3 y los NF1 para unirse al DNA, dejando de este modo sitios, en la zona -469/-354, disponibles para algún represor. La eliminación de esta zona del promotor ocasiona la pérdida de sensibilidad a la insulina. La acción de la hormona sobre factores que actúan en la región remanente del promotor de ALAS ya no sería suficiente para lograr la represión y resultaría irrelevante para la transcripción basal.



Eduardo T. Cánepa
Profesor Adjunto
FCEyN-UBA



Mario Elion Scassa

Bibliografía

- Adachi M, Fukuda M, and Nishida E (1999) Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO* **18**: 5347-5358.
- Alessi DR, Ancejelkovic M, Caudwell FB, Cron P, Morrice N, Cohen P, and Hemmings BA (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.***15**: 6541-6551.
- Alessi DR, and Cohen P (1998) Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 55-62.
- Alessi DR, and Downes CP (1998) The role of PI3-kinase in insulin action. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**: 151-164.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley D, and Saltiel R (1995) PD098059 Is a specific inhibitor of the activation of Mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem* **270**: 27489-27494.
- Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gallney P, Reese C, MacDougall CN, and Harbison D (1997) Phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK-1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr. Biol.* **7**: 776-789.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PRJ, Reese CB, and Cohen P (1997) Characterization of 3-phosphoinositide dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* **7**: 261-269
- Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, and Avruch J (1998) 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70S6 kinase *in vivo* and *in vitro*. *Curr. Biol.* **8**: 69-81.
- Allander SV, Durham SK, Scheimann AO, Wasserman RM, Suwanichkul A, Powe DR (1997) hepatic nuclear factor 3 and high mobility group I/Y proteins bind the insulin response element of the insulin-like growth factor binding protein-1 promoter. *Endocrinology* **138**: 4291-4300.
- Amoui M, Craddock BP, Todd Miller W (2001) Differential phosphorylation of IRS-1 by insulin and insulin-like growth factor I receptors in Chinese hamster ovary cells. *J. Endocrinology* **171**: 153-162

- Andersson C, Bylejo I, Litner F (1999) Effects of diabetes mellitus on patients with acute intermittent porphyria *J. Inter Med.* **245**: 193-197.
- Andrews N, and Faller DV (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **19**: 2499
- Antonetti DA, Algenstaedt P, and Kahn CR (1996) Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol. Cell. Biol* **15**: 2195-2203.
- Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavas D, and Zhang XF (2001) Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAPkinase cascade. *Recent Prog. Horm. Res.* **56**: 127-155
- Balendran A, Biondi RM, Cheung PCF, Casamayor A, Deak M, and Alessi DR. (2000) A 3-Phosphoinositide dependent protein kinase (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase C ξ (PKC ξ) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *J. Biol. Chem.* **275**: 20806-20813.
- Band CJ, and Posner B I (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase and p70s6k are required for insulin but not bisperoxovanadium 1,10-phenanthroline (bpV(phen)) inhibition of insulin-like growth factor binding protein 1 gene expression. Evidence for MEK-independent activation of mitogen-activated protein kinase by bpV(phen). *J. Biol. Chem.* **272**: 138-145.
- Barthel A, Schmoll D, Kruger KD, Bahrenberg G, Walther R, Roth RA, Joost HG (2001) Differential regulation of endogenous glucose 6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxikinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 897-902
- Bevan P (2001) Insulin Signalling. *J. Cell Sci.* **114**: 1429-1430
- Birnboim HC, and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for scravening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **1**: 1513-1523
- Bishop D F, Henderson A S and Astrin K H, (1990) Human delta-aminolevulinate synthase: asignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid sppecific gene to the X chromosome. *Genomics* **7**: 207-214

- Bois Joyeux B, Danan JL (1994) Members of the CAAT/enhancer binding protein, hepatocyte nuclear factor-1 and nuclear factor-1 families can differentially modulate the activation of the α -fetoprotein promoter and enhancer. *Biochem J.* **301**: 49-55.
- Boshart M, Kuppel M, Schmidt A, SchutzG, and Luckow B (1992) Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene* **110**: 129-130
- Bottomley SS (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.
- Bradford 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 IA, and May BK (1993) Identidfication of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinate synthase from rat. *J. Biol. Chem.* **268**: 1109-1117.
- Branch AD (1997) A good antisense molecule is hard to find *TiBS* **23**: 45-50.
- Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, Burgering BM (2001) Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol Cell Biol.* **10**: 3534-3546.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Jun P, Hu L, AndersonMJ, Arden KC, Blenis and Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-858.
- Cahill CM, Tzivion G, Nasrin N, Ogg S, Dore J, Ruvkun G, Alexander-Bridges M (2001) Phosphatidylinositol-3 kinase signaling inhibts DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3 dependent and 14-3-3 independent pathways. *J. Biol. Chem.* **20**: 13402-13410.
- Calcinaro F, Basta G, Lisi P, Cruciani C, Pietropaolo M, Santeusanio I, Falorni A Jr, Calafiore R (1989) Insulin resistance in porphyria cutanea tarda. *J. Endocrinol. Invest.* **12**: 393-399
- Cánepa ET, Llambías EBC, and Grinstein M (1989) Studies on regulatory mechanisms of heme biosynthesis in hepatocytes from normal and experimental-diabetic rats. Role of insulin. *Biochem. Cell Biol.* **68**: 914-921

- Cardinaux J-R, Chapel S, Wahli W (1994) Complex organization of CTF/NF-1, C/EBP and HNF3 binding sites within the promoter of the liver specific vitellogenin gene J. Biol. Chem. **269**: 32947-32956.
- Chang L and Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature **410**: 37-40.
- Chao TSO, Foster DA, Rapp UR, and Rich Rosner M (1994) Differential requirements for activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors, phorbol esters, and calcium. J. Biol. Chem. **269**: 7337-7341
- Chaudry AZ, Vitullo AD, Gronostajski RM (1998) Nuclear factor 1-mediated repression of the mouse mammary tumor virus promoter is abrogated by the p300/CBP and SRC-1. J. Biol. Chem **274**: 7072-7081.
- ChayaD, Hayamizu T, Bustin M and Zaret K (2001) Transcription factor FoxA (HNF3) on a nucleosome at an enhancer complex in liver chromatin J. Biol. Chem **274**: 44385-44389.
- Cheatham B, Monfar M, Chou M and Blenis J (1995) Activation of p70/85 S6 kinases in interleukin 2 responsive lymphoid cells is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and inhibited by cyclic AMP. Mol. Cell Biol. **4**: 1821-1825.
- 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.
- Chen RH, Juo PC, Curran T, and Blenis J (1996) Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. Oncogene **12**: 1493-1502.
- Chomczynski P, and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem **162**: 156-159
- Chung J, Gramer TC, Lemon KP, Kaslauskas A, and Blenis J (1994) PDGF and insulin dependent p70^{S6k} activation mediated by phosphatidylinositol-3 kinase. Nature **370**: 71-75.
- Clark k, Halay E, Lai E and Burley S (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. Nature **364**: 412-420.
- Cohen P, Alessi DR, and Cross DA (1997) PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? FEBS **410**: 3-10.

- Cohen GB, Ren R, and Baltimore D (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **80**: 933-945.
- Collier PJ, Jin J, and Woocgell JR (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J.* **335**: 1-13.
- Conboy JG, Cox AD, Bottomley SS, Bawden MJ, and May BK (1992) Human erythroid 5-aminolevulinate synthase. *J. Biol. Chem* **267**: 18753-18758.
- Cooke DW and Lane MD (1999) The transcription factor nuclear factor 1 mediates repression of the GLUT4 promoter by insulin. *J. Biol. Chem* **274**: 12917-12924.
- Corbalan-García S, Yang SS, Degenhardt KR, and Bar-Sagi D (1996) Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human SOS1 that regulate interaction with Grb2. *Mol. Cell Biol* **16**: 5674-5682.
- Cox AD, García A M, Westwick JK, Kowalczyk JJ, Lewis MD, Brenner, DA, and Der CJ (1994) The CAAX peptidomimetic compound B581 specifically blocks farnesylated, but not geranylgeranylated or myristylated, oncogenic ras signaling and transformation. *J. Biol. Chem.* **269**: 19203-19206.
- Cox TC, Bawden MJ, Martin A, and May BK (1991). Human erythroid 5-aminolevulinate synthase: promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA. *EMBO J.* **10**: 1891-1902.
- Cox TC, Bottomley SS, Wiley JS, Bawden MJ, Matthews CS, and May BK (1994) X-linked pyridoxine-responsive sideroblastic anemia due to a Thr388 to Ser substitution in erythroid 5-aminolevulinate synthase. *N. Engl. J. Med* **330**: 675-679.
- Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, and Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**: 785-789.
- Cross DAE, Watt PW, Shaw M, Kay JVD, Downes CP, Holder JC, and Cohen P (1997) Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue. *FEBS Lett* **406**: 211-215.
- Cutler RE, Stephens RM, Saracino MR, Morrison DK (1998) Autoregulation of the Raf serine/threonine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **95**: 9214-9219.

- Dang A, Frost JA, and Cobb M (1998) The MEK1 proline-rich insert is required for efficient activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1 and ERK2 in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 19909-19913.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu HA, Gotoh Y, and Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**: 231-241.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. (2000) Specificity of action and mechanism of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* **351**: 95-105
- De Meyts P, Christoffersen CT, Tornquist H, and Seedorf K (1996) Insulin receptors and insulin action. *Diabetes* **3**: 369-377.
- DeFabianiE, Crestani M, Marrapodi M, Pinelli A, Golfieri V, and Gall G (2000) Identification and characterization of *cis*-acting elements conferring insulin responsiveness on hamster cholesterol 7 α -hydroxylase gene promotor. *Biocem. J.* **347**: 147154.
- DeMatteis F, and Marks GS (1996) Cytochrome P450 and its interactions with the heme biosynthetic pathway. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **74**: 1-8.
- Denouel-Galy A, Douville EM, Warne PH, Papin C, Laugier D, Calothy G, Downward J, Eychene A (1998) Murine KSR interacts with MEK and inhibits Ras induced transformation. *Curr. Biol* **8**: 46-55.
- Denton RM, and Tavare JM (1995) Does mitogen-activated protein kinase have a role in insulin action? The cases for and against. *Eur. J. Biochem* **227**: 597-611.
- Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, and Rider MH (1997) Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J. Biol. Chem.* **272**: 17269-17275.
- Dockworth BC and Cantley LC (1997) Conditional inhibition of the mitogen activated proein kinase cascade by wortmannin: dependence on signal strength. *J. Biol. Chem* **272**: 27665-27670.
- Dogra SC and May BK (1996) Phenobarbital-induced activation of CYP2H1 and 5-aminolevulinate synthase genes in chick embryo hepatocytes is blocked by an inhibitor of protein phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **327**: 271-278.

- Dogra SC, Hahn CN, and May BK (1993) Superinduction by cycloheximide of cytochrome P450H1 and 5-aminolevulinate synthase gene transcription in chick embryo liver Arch. Biochem. Biophys. **300**: 531-534.
- Downward J (1997) Regulating S6 kinase. Nature **371**: 378-379.
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges A J, and Saltiel AR (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 7686-7689.
- Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, and Stoffel M (1998) Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. Science **281**: 692-695.
- Eck MJ, Dhe-Paganon S, Trub T, Nolte RT, and Shoelson SE (1996) Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. Cell **85**: 695-705.
- Elder GH (1993) Molecular genetics of disorders of haem biosynthesis. J. Clin. Pathol. **46**: 977-981.
- Evans MJ and Scarpulla RC (1989) Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome C promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. J. Biol. Chem. **264**: 14361-14368.
- Ferrari S, Pearson RB, Siegmann M, Kozma SC, and Thomas G (1993) The immunosuppressant rapamycin induces inactivation of p70s6k through dephosphorylation of a novel set of sites. J. Biol. Chem. **268**: 16091-16094.
- Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN (1995) The protein kinase encoded by the Akt protooncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. Cell **81**: 727-736.
- Fridman DA, Rameh LE, and Cantley LC (1999) Phosphoinositide binding contains: embracing 3-phosphate. Cell **97**: 817-820.
- Fry JR, Jones CA, Webkin P, and Bridges JW (1976) The enzymic isolation of adult rat hepatocytes in a functional and viable state. Anal Biochem. **71**: 341-350.
- Fucini RV, Okada S, and Pessin J (1999) Insulin induced desensitization of extracellular signal regulated kinase activation results from an inhibition of Raf activity independent of Ras activation and dissociation of the Grb2-SOS complex J. Biol. Chem. **274**: 118651-118658.

- Gabbay RA, Sutherland C, Gnudi L, Kahn BB, O'Brien R O, Granner DK, and Flier JS (1996) Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression does not require activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**: 1890-1897.
- Garabedian MJ, Labaer J, Liu W, and Thomas JR (1992) Analysis of protein-DNA interactions. *Gene Transcription. A practical approach*: 253.
- Garrington TP and Johnson GL (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol* **11**: 211-218.
- Giono L, Varone C and Cánepa E (2001) 5-aminolevulinate synthase gene promotor contains two cAMP-response element (CRE)-like sites that confer positive and negative responsiveness to CRE-binding protein (CREB) *Biochem. J* **353**: 307-316
- Gregori C, Kahn A, and Pichard L (1993) Competition between transcription factors HNF1 and HNF3, an alternative cell-specific activation by DBP and C/EBP contribute to the regulation of the liver-specific aldolase-B promoter. *Nucleic Acid Res.* **21**: 897-903.
- Goalstone ML, and Draznin B (1998) What does insulin do to Ras? *Cell Signal* **5**: 297-301.
- Goerz G and Korda S (1977) Porphyria cutanea tarda (PCT) and diabetes mellitus. *Z. Haut.* **52**: 1165-1174.
- Goldberg EM, Gaut CC, and Bunn HF (1991) Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and post transcriptional events. *Blood* **77**: 271-277.
- Gong J, Kay CJ, Barber MJ, and Ferreira GC (1996) Mutations at a glycine loop in aminolevulinate synthase affect pyridoxal phosphate cofactor binding and catalysis. *Biochemistry* **35**: 14109-14117.
- Gregori C, Kahn A, and Pichard AL (1994) Activity of the rat liver-specific aldolase B promoter is restrained by HNF3. *Nucleic Acids Res.* **22**: 1242-1246.
- Gronostajski RM (2000) Roles of the NF1/CTF gene family in transcription and development *Gene* **249**: 31-45.
- Gu W, and Roeder RG (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**: 595-606.

- Guo S, Cichy SB, He X, Yang Q, Ragland M, Gosh AK, Johnson PF, and Unterman TG (2001) Insulin suppresses transactivation by CAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta). Signaling to p300/CREB-binding protein by protein kinase B disrupts interaction with the major activation domain of C/EBP beta. *J. Biol. Chem* **276**: 8516-8523.
- Hall RK, and Granner DK (1999) Insulin regulates expression of metabolic genes through divergent signaling pathways. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **10**: 119-133.
- Hall RK, Yamasaki T, Kucera T, Waltner-Law M, O'Brien R, and Granner DK (2000) Regulation of Phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression by insulin. *J. Biol. Chem* **275**: 30169-30175.
- Hanson RW, and Reshef L (1997) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 581-611
- Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, Panayatou G, Ruiz Larrea F, Thompson A, Totty N (1992) Phosphatidylinositol 3 kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* **70**: 419-429.
- Hu Q, Klippe IA, Muslin AJ, Fantl WJ, and Williams LT (1995) Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science* **268**: 100-102.
- Hung C and Penning TM (1999) Members of the nuclear factor 1 transcription factor family regulate rat 3 α -hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase (3 α -HSD/DD AKR1C9) gene expression: A member of the aldo-keto reductase superfamily. *Mol. Endo.* **13**: 1704-1717.
- Imae M, Inoue Y, Fu Z, Kato H and Noguchi T (2000) Gene expression of the three members of hepatocyte nuclear factor-3 is differentially regulated by nutritional and hormonal factors. *J. Endocrinol* **167**: 1-5.
- Imagawa M, Sakaue R, Tanabe A, Osada S, Nishihara T (2000) Two nuclear localization signals are required for nuclear translocation of nuclear factor1-A, *FEBS Lett* **484**: 118-124.
- Inukai K, Funaki M, Ogihara T, Katagiri H, Kanda A, Anai M, Fukushima Y, Hosaka T, Suzuki M, Shin B, Takata K, Yasaki Y, Kikuchi M, Oka Y, and Asano T. (1997) p85 α gene generates three isoforms of regulatory subunit for

Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase), p50 α , p55 α , and p85 α , with different PI3-Kinase activity elevating responses to insulin. *J. Biol. Chem* **272**: 7873-7872.

- Jackson DA, Rowader KE, Stevens K, Jiang C, Milos P, Zaret KS (1993) Modulation of liver-specific transcription by interactions between hepatocyte nuclear factor 3 and nuclear factor 1 binding DNA in close apposition *Mol. Cell Biol.* **4**: 2401-2410.
- James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJ, Holmes AB, and Alessi DR (1996) Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate without subsequent activation. *Biochem J.* **315**: 709-713.
- Jordan PM, and Shemin D (1972) Delta-aminolevulinic acid synthase. En *The enzymes*, 3^o De, vol 7 p.g. 339-356. Academic Press, New York.
- Kaestner KH (2000) The hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3 or FOXA) family in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab* **7**: 281-285.
- Kaestner KH, Knochel Wand Martinez D (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* **14**: 142-146.
- Kahn CR, 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 RA, and Nordmann Y (1989) The porphyrias in "The metabolic basis of inherited diseases" (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and ValleD, Eds.) pp 1305-1365 Mc Graw-Hill Inc. NY.
- Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, and Nordmann Y (1995) The porphyrias in the metabolic and molecular basis of inherited diseases pp. 2103-2159, 7th. Ed., Mc Graw-Hill Inc. NY.
- Kashida K, Shimomura I, Kondo H, Kuriyama H, Makino Y, Nishizawa H, Maeda N, Matsuda M, Ouchi N, Kihara S, Kurachi Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (2001) Genomic structure and insulin mediated repression of the aquaporin adipose(AQPap), adipose specific glycerol channel. *J. Biol. Chem.* **276**: 36251-36560.
- Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR (1983) Insulin stimulates the phosphorylation of the 95000 dalton β -beta subunit of its own receptor. *Science* **215**: 185-187.
- Kaufman E, Knochel W (1996) Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* **57**: 3-20.

- Kim SJ and Kahn (1994) Insulin stimulates phosphorylation of c-Jun, c-Fos and Fos-related proteins in cultured adipocytes *J. Biol. Chem* **269**: 11887-11892.
- Kim HJ 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.
- Kohn AD, Takeuchi F, Roth RA (1996) Akt, a pleckstrin homology-containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **271**: 21920-6.
- Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interaction. *Biochem J.* **351**: 289-305.
- Koller E, Garde W and Monia B (2000) Elucidating cell signaling mechanisms using antisense technology. *Tibs.* **21**: 142-148.
- Kramer MF, Gunaratne P, and Ferreira GC (2000) Transcriptional regulation of the murine erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase gene. *Gene* **247**: 153-166.
- Kruse U, Sippel AE (1994) The gene for transcription factor nuclear factor-1 give rise to corresponding splice variants between vertebrate species. *J. Mol. Biol* **238**: 860-865.
- Kruse U, Sippel AE (1994) Transcriptional factor nuclear factor 1 proteins form stable homodimers and heterodimers. *FEBS Lett.* **348**: 46-50
- Kuhne MR, Zhao Z, Rowles J, LavanBE, Shen SH, Fischer EH, and Lienhard GE (1994) Dephosphorylation of insulin receptor substrate 1 by the tyrosine phosphatase PTP2C *J. Biol. Chem* **269**: 15833-15837.
- Kumar A, Venkatesh V, Planer B, Feinstein S and Ballard P (1997) Phorbol ester down-regulation of lung surfactant protein B gene expression by cytoplasmic trapping of thyroid transcription factor-1 and hepatocyte nuclear factor 3. *J. Biol. Chem* **272**: 20764-20773.
- Kusari AB, Byon J, Bandyopadhyay, Kenner K, and Kusari J (1997) Insulin-induced Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 (MKP-1) attenuates insulin-stimulated MAP kinase activity: a mechanism for the feed back inhibition of insulin signaling. *Mol Endocrino* **11**: 1532-1543.
- Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T₄ *Nature* **227**: 680-685.

- Lai E, Clark KL, Burley SK, and Darnell J (1993) Hepatocyte nuclear factor3/forkhead or “winged helix” proteins: A family of transcription factors of diverse biologic function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 10421-10423.
- Leahy P, Crawford DR, Grossman G, Gronostajski RM, Hanson RW (1999) CREB binding protein coordinates the function of multiple transcription factors including nuclear factor 1 to regulate phosphoenolpyruvate carboxikinase gene transcription. *J. Biol. Chem* **274**: 8813-8822.
- Leonardson G (1997) Characterization of the rat tissue-type plasminogen activator gene promoter. Identification of a TAAT containing promoter element. *Science* **242**: 69-71.
- Li J, Lee GI, Van Doren SR, Walker JC (2000) The FHA domain mediates phosphoprotein interactions. *J. Cell Sci.* **113** Pt 23: 4143-4149
- Li WW, Dammerman MM, Smith JD, Metzger S, Breslow JL, and Leff T (1995) Common genetic variation in the promoter of the human apo CIII gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia. *J. Clin. Invest.* **96**: 2601-2605.
- Liao J, Barthel A, Nakatani K, Roth RA (1998) Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J. Biol. Chem.* **273**: 27320-27324.
- Luckov B and Schultz G (1987) CAT constructions with multiple unique restriction sites for functional analysis of eukariotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acid Res.* **15**: 490.
- Maguire DJ, Day AR, Borthwick IA, Srivastava G, Wigley PL, May BK, and Elliott WH (1986) Nucleotide sequence of the chicken 5-aminolevulinate synthase gene. *Nucleic Acids Res.* **14**: 1379-1391.
- Marais R, Light Y, Mason C, Paterson H, OlsonMF, and Marshall CJ. (1998) Requirement of Ras-GTP complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science* **280**: 109-112.
- Marais R, Light Y, Paterson H, Mason CS, Marshall CJ (1997) Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic Ras and tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **272**: 4378-4383.
- Marshall CJ (1996) Ras effectors. *Curr. Op. Cell Biol.* **8**:197-204.

- Marte BM and Downward J (1997) PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Tibs* **22**:355-358.
- May BK, Dogra SC, Sadlon TJ, Bhasker CR, Cox TC, and Bottomley SS (1995) Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates. *Prog. Nucleic. Acids Res. Mol. Biol.* **51**: 1-51.
- Mayer BJ and Eck MJ (1995) SH3 domains. Minding your p's and q's. *Curr. Biol* **5**: 364-367.
- McKnight SL, and Kingsbury R (1982) Transcriptional control signals of a eukaryotic protein coding gene. *Science* **217**: 316-24
- McMaster GK, and Carmichael GG (1977) Analysis of single and double stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gel by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 4835-4838.
- McPherson CE, Shim E-Y, Friedman DS and Zaret KS (1993) An active tissue-specific enhancer and bound transcription factors existing in a precisely positioned nucleosomal array. *Cell* **75**: 387-398.
- Mendez R, Kollmorgen G, White MF, and Rhoads RE 1997 Requirement of protein kinase C zeta for stimulation of protein synthesis by insulin. *Mol Cell Biol.* **17**: 5184-5192.
- Messina JL, Chatterjee AK, Strapko HT, and Weinstock RS (1992) Short and long term effects of insulin on tyrosine aminotransferase gene expression. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**: 56-62.
- Misawa H , Yamaguchi M (2000) Intracellular signaling factors-enhanced hepatic nuclear protein binding to TTGGC sequence in the rat regucalcin gene promotor: involvement of protein phosphorylation *Biochem. Biophys. Res. Commun* **279**: 275-281.
- Miyazaki M, Mars WM, Runge D, Kim TH, Bowen WC, Michalopoulos GK (1998) Phenobarbital suppresses growth and accelerates restoration of differentiation markers of primary culture rat hepatocytes in the chemically defined hepatocyte growth medium containing hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Exp.Cell Res* **15**: 445-457.
- Moore MR and Hift RJ (1997) Biochemistry of porphyrias. *Int. J. Biochem.* **25**: 1353-1368.

- Morrison D, and Cutler Jr R (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Op. Cell Biol.* **9**: 174-179.
- Myers MG, Sun XJ, and White MF (1994) The IRS-1 signalling system. *Tibs* **19**: 289-293.
- Nakae J, Barr V and Accili D (2000) Differential regulation of gene expression by insulin and IGF1 receptors correlates with phosphorylation of a single amino acid residue in the forkhead transcription factor FKHR. *EMBO* **19**: 989-996.
- Nakae J, Park B and Accili D 1999 Insulin stimulates phosphorylation of forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a wortmannin sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* **274**: 15982-15985.
- Nakajima T, Fukamizu A, Takahashi J, Gage F, Fisher T, Blenis J, and Montminy MR (1996) The signal-dependent coactivator CBP is a nuclear target for p90_{rsk}. *Cell* **86**: 465-474.
- Nebreda A and Gavin AC(1999) Cell survival demands some Rsk. *Science* **286**: 1309-1310.
- Newton R, Stevens D, Hart I, Lindsay M, Adcock I and Barnes P (1997) Superinduction of COX-2 mRNA by cycloheximide and interleukin-1 beta involves increased transcription and correlates with NF-kappaB and JNK activation *FEBS Lett* **418**: 135-138.
- Nickol JM, Lee KL, and Kenney FT (1978) Changes in hepatic level of tyrosine amino transferase messenger mRNA during induction with hydrocortisone. *J. Biol. Chem.* **253**: 4009-4015.
- Nitsch D, and Schutz G (1993) The distal enhancer implicated in the developmental regulation of the tyrosine aminotransferase gene is bound by liver-specific and ubiquitous factors. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4494-4504.
- O'Brien RM, and Granner DK (1991) Regulation of gene expression by insulin. *Biochem J.* **278**: 609-619.
- O'Brien RM, and Granner DK (1996) Regulation of gene expression by insulin. *Physiol. Rev.* **76**: 1109-1161.
- O'Brien RM, Lucas PC, Yamasaki EL, Noisin EL and Granner DK (1994) Potencial convergence of insulin and cAMP signal transduction systems at the

phosphoenolpyruvate carboxikinase (PEPCK) gene promoter through CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). J. Biol. Chem. **269**: 30419-30428.

- O'Brien RM, Noisin EL, Suwanichkul A, Yamasaki EL, Lucas PC, Wang JC and Granner DK (1995) Hepatic nuclear factor-3 and hormone-regulated expression of the phosphoenolpyruvate carboxikinase and insulin like growth factor binding protein 1 genes. Mol. Cell Biol **15**: 1747-1758.
- O'Neil T, Craparo A, Gustafson T (1994) Characterization of an interaction between insulin receptor substrate 1 and the insulin receptor by using the two-hybrid system. Mol. Cell Biol **14**: 6433-6442.
- Ortiz L, Aza-Blanc P, Zannini M, Cato A and Santisteban P (1999) The interaction between the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 and the constitutive factor CTF/NF-1 is required for efficient hormonal regulation of the thyroperoxidase gene transcription. J. Biol. Chem. **274**: 15213-15221.
- Osada S, Ikeda T, Xu M, Nishimira T and Imagawa M (1997) Identification of the transcriptional repression domain of nuclear factor 1 A. Biochem. Biophys. Res. Commun **238**: 744-747.
- Osada S, Matsubara T, Daimon S, Terazu Y, Xu M, Nishimira T and Imagawa M (1999) Expression, DNA-binding specificity and transcriptional regulation of nuclear factor 1 family proteins from rat. Biochem J. **342**: 189-198.
- Osawa H, Sutherland C, Brooks Robey R, Printz RL, and Granner DK (1996) Analysis of the signaling pathway involved in the regulation of hexokinase II gene transcription by insulin. J. Biol. Chem. **271**: 16690-16694.
- Pani L, Overdier DG, Porcella A, Qian X, Lai E, and Costa RH (1992) Hepatocyte nuclear factor 3 β contains two transcriptional activation domains, one of which is novel and conserved with the *Drosophila* fork head protein. Mol. Cell Biol. **12**: 3723-3732.
- Park B, Kido J and Accili D (1999) Differential signaling of insulin and IGF1 receptors to glycogen synthesis in murine hepatocytes. Biochemistry **38**: 7517-7523.
- Park SH and Waxman DJ (2001) Inhibitory crosstalk between STAT5 and liver nuclear factor HNF3 β . Impacts on the regulation of growth factor hormone pulse stimulated, male specific liver cytochrome P-450 gene expression. J. Biol. Chem **276**: 43031-43039.

- Patel S, Lochhead PA, Rena G, Sutherland C (2001) Antagonistic effects of phorbol esters on insulin regulation of insulin like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) but not glucose-6-phosphatase gene expression. *Biochem J.* **359**: 611-619
- Pawson T, Olivier P, Rozakis-Adcock M, McGlade J, and Henkemeyer M (1993) Proteins with SH2 and SH3 domains couple receptor tyrosine kinases to intracellular signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **340**: 279-285.
- Person W, Wood R, Zhang T and Miller W (1997) Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics* **46**: 24-36.
- Poteet-Smith C, Smith J, Lannigan D, Freed T, and Sturgill T (1999) Generation of constitutive active p90 ribosomal kinase *in vivo*. *J. Biol. Chem* **274**: 22135-22138.
- Powell DR, Allander SV, Scheiman AO, Wasserman RM, Durban SK and Suwanichkul A (1995) Multiple proteins bind the insulin response element in the human IGFBP-1 promoter. *Prog. Growth Factor Res.* **6**: 93-101..
- Prujin GJM, van Driel W, van Mittenburg RT, and van der Vliet PC (1987) Promoter and enhancer elements containing a conserved sequence motif are recognized by nuclear factor III *EMBO J.* **6**: 3771-3778.
- Qian X and Costa RH (1995) Analysis of hepatocyte nuclear factor 3 beta protein domains required for transcriptional activation and nuclear targeting. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1184-1191.
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E 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.
- Quinn PG, Wong TW, Magnuson MA, Shabb JB, and Granner DK (1988) Identification of basal and cyclicAMP regulatory elements in the promoter of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell Biol* **8**: 3467-3475.
- Rahmsdorf HJ, and Herrlich P (1990) Regulation of gene expression by tumor promoters *Pharmacol. Ther* **48**: 157-188.
- Rameh LE and Cantley LC (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* **274**: 8347-8350.

- Richards SA, Fu J, Romanelli A, Shimamura A, and Blenis J (1999) Ribosomal S6 kinase (RSK1) activation requires signals dependent on and independent of the MAP kinase ERK. *Curr. Biol.* **9**: 810-820.
- Rickles RJ, Botfield MC, Zhou X-M, Henry PA, Brugge JS and Zoller MJ (1995) Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10909-10913.
- Riddle RD, Yamamoto M and Engel JE (1989) Expression of delta-aminolevulinate synthase in avian cells: separate genes encode erythroid specific and non specific isozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 792-796.
- Roberts AG and Elder GH (2001) Alternative splicing and tissue-specific transcription of human and rodent ubiquitous 5-aminolevulinate synthase (ALAS1) genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1518**: 95-105.
- Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry M J, Waterfield MD, and Downward J (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**: 527-532.
- Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, and Downward J (1996) Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J* **15**: 2442-2451.
- Rommel C, Clarke BA, Zimmerman S, Nunez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD and Glass DJ (1999) Differentiation stage specific inhibition of the Raf MEK ERK pathway by Akt. *Science* **286**: 1738-1741.
- Roncino CM, Carvalho E, Wesslad C and Smith UP (1999) Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin but not okadaic acid in adipocytes from subjects with Type II diabetes. *Diabetes* **42**: 819-825.
- Roux J, Pictet R and Grange T (1995) Hepatocyte nuclear factor 3 determines the amplitude of the glucocorticoid response of the rat tyrosine aminotransferase gene. *DNA Cell Biol.* **14**: 385-396.
- Rupp R, Kruse U, Multhaup G, Gobel U, Beyreuther K, Sippel AE (1990) Chicken NF-1/TGGCA proteins are encoded by at least three independent genes: NF1A, NF1B and NF1C with homologues in the human genome. *Nucleic Acids Res.* **18**: 2607-2616.

- Sadlon TJ, Dell'Oso T, Surinya KH, and May BK (1999) Regulation of erythroid 5-aminolevulinate synthase expression during erythropoiesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**: 1153-1167.
- Sajjan MP, Standaert ML, Bandyopadhyay G, Quom MJ, Burke TR, and Farese RV (1999) Protein kinase C- ξ and phosphoinositide-dependent protein kinase-1 are required for insulin-induced activation of ERK in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **274**: 30495-30500.
- Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saltiel AR and Pessin J (2002) Insulin signaling pathways in time and space. *Trends in Cell Biol.* **12**: 65-71
- Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jaquot AH, and Allis CD (1999) Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor activated phosphorylation of histone H3. *Science* **285**: 886-891.
- Sato K and Di Lauro R (1996) Hepatocyte nuclear factor 3 beta participates in the transcriptional regulation of the thyroperoxidase promoter. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **220**: 86-93
- Scassa ME, Guberman AS, Varone C L, and Cánepa ET (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/Mitogen activated protein kinase signaling pathways are required for the regulation of 5-aminolevulinate synthase gene expression by insulin. *Exp. Cell Res.* **271**: 201-213.
- Scassa ME, Varone C L, Montero L, and Cánepa ET (1998) Insulin inhibits δ -aminolevulinate synthase gene expression in rat hepatocytes and human hepatoma cells. *Exp. Cell Res.* **244**: 460-469.
- Schaefer HJ and Weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinase: Specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol* **19**: 2435-2444.
- Seed B, and Sheen JY (1998) A simple phase extraction assay for chloramphenicol acetyltransferase activity. *Gene* **67**: 272-277.
- Seger R, and Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* **9**: 726-735.

- Senger K, Merika M, Agalioti T, Yie J, Escalante C, Chen G, Aggarwal A, and Thanos D (2000) Gene repression by coactivator repulsion. *Mol. Cell* **6**: 931-937.
- Sheperd PR, Withers DJ, and Siccle K (1998) Phosphoinositide-3-kinase :the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* **333**: 471-490
- Shields JM, Pruitt K,McFall A, Shaub and Der CJ (2000) Understanding Ras:'it ain't over til it's over'. *Trends in Cell Biol.* **10**: 147-154.
- Songyang Z, Carraway KL, Eck MJ, Harrison, Feldman RA, Mohammadi M, Schlessinger J, Hubbard SR, Smith DP, and Eng C (1995) Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* **373**: 536-539.
- Srivastava G, Hansen AJ, Bawden MJ and May BK (1990) Hemin administration to rats reduces levels of hepatic mRNAs for phenobarbitone-inducible enzymes. *Mol Pharmacol.* **38**: 486-493.
- Stein CA, Cheng YC (1993) Antisense oligonucleotides as therapeutic agents-is the bullet really magical? *Science* **261**: 1004-1012.
- Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Endjument-Bromage H,Painter GF, Holmes AB, Gallney PR, Reese CB, McCormick F,and Tempst (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B.*Science* **279**: 710-714.
- Stokoe D, Stephens L, Copeland T, Gaffney PRJ, Reese CB, Painter GF (1997) Dual role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in the action of protein kinase B. *Science* **277**: 567-570.
- Streeper RS, Eaton EM, Ebert DH, Chapman SC, Svitek CA, and O'Brien RM (1998) Hepatocyte nuclear factor-1 acts as an accesory factor to enhance the inhibitory action of insulin on mouse glucose 6-phosphatase gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 9208-9213.
- Sudol M (1998) From Src homology domains to other signaling modules: proposal of the "protein recognition code". *Oncogene* **17**: 1469-1474.
- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, and White MF (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**: 73-77.
- Surinya KH, Cox TC, and May BK (1997) Transcriptional regulation of the human erythroid 5-aminolevulinate synthase gene. *J. Biol. Chem.***272**: 26585-26594.

- Sutherland C, O'Brien R and Granner DK (1995) Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/85 ribosomal S6 protein kinase is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxikinase (PEPCK) gene expression by insulin. *J. Biol. Chem.* **270**: 15501-15506.
- Suwanickul A, Morris S, and Powell D (1993) Identification of an insulin-responsive element in the promoter of the human gene for insulin-like growth factor binding protein 1. *J. Biol. Chem.* **268**: 17063-17068.
- Takano A, Usui I, Haruta T, Kawahara J, Uno T, Iwata M, and Kobayashi M (2001) Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Mol. Cell Biol.* **21**: 5050-5062.
- Tijian R and Maniatis T (1994) Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* **77**: 5-8.
- Tilghman S, Hanson R, Reshef L, Hopgood M, and Ballard F (1974). Rapid of translatable messenger RNA of phosphoenolpyruvate carboxikinase 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.
- Tzivion G, Luo Z, Avruch J (1998) A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* **394**: 88-92.
- Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, Pictet R, Tischler E, Rutter W, and Goodman H (1977) Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* **196**: 1313-1319.
- Vallet V, Antoine B, Chafey P, Vandewalle A and Kahn A (1995) Overproduction of truncated hepatocyte nuclear factor 3 protein inhibits expression of liver-specific genes in hepatoma cells. *Mol. Cell Biol.* **15**: 5453-5460.
- Van der Kaay J, Batty IH, Cross DAE, Watt PW, and Downes CP (1997). A novel, rapid, and highly sensitive mass assay for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃) and its application to measure insulin-stimulated PtdIns(3,4,5)P₃ production in rat skeletal muscle in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**: 5477-5481

- Varone CL, and Cánepa ET (1997) Evidence that protein kinase C is involved in δ -aminolevulinate synthase expression in rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **341**: 259-266.
- Varone CL, Giono LE, Ochoa A, Zakin MM, and Cánepa ET (1999) Transcriptional regulation of 5-aminolevulinate synthase by phenobarbital and cAMP-dependent protein kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**: 261-270.
- Virkamäki A, Ueki K, and Kahn CR (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **103**: 931-943.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, and Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**: 5241-5248.
- Vries-Smits AMM, Burgering BMTh, Leeners SJ, Marshall CJ, and Bos JL (1992) Involvement of p21^{ras} in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* **357**: 602-604.
- Wagle A, Jivraj S, Garlock GL and Stapleton SR (1998) Insulin regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression is rapamycin-sensitive and requires phosphatidyl-inositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **273**: 14968-14974.
- Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, and Williams R (2000) Structural determinants of Phosphoinositide 3. Kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell* **6**: 909-919.
- Walker KS, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P, Alessi DR (1998) Activation of PKB β and PKB γ isoforms by insulin *in vivo* and PDK1 *in vitro*: comparison with PKB α . *Biochem. J.* **331**: 299-308.
- Wang JC, Stromstedt PE, O'Brien RM, and Granner DK (1996) The phosphoenolpyruvate carboxykinase gene glucocorticoid response unit: identification of the functional domains of accessory factors HNF3 beta (hepatic nuclear factor-3 beta) and HNF4 and the necessity of proper alignment of their cognate binding sites. *Mol Endocrinol* **10**: 794-800
- Welsh GI, Foulstone EJ, Young SW, Tavaré JM, and Proud CG (1994) Wortmannin inhibits the effect of insulin and serum on the activities of glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase. *Biochem J.* **303**: 15-20.

- White M and Kahn CR (1994) The insulin signaling system. *J. Biol. Chem* **269**:1-4
- White MF (1998) The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol.Cell Biochem.* **182**: 3-11.
- Whitehead JP, Clark SF, Urso B, and James DE (2000) Signalling through the insulin receptor. *Curr. Opin Cell. Biol* **12**: 222-228.
- Williams CP, Postic C, Robin D, Robin P, Parrinello J, Shelton K, Printz RL., Magnuson MA, Granner DK, Forest C, and Chalkley R (1999) Isolation and characterization of the mouse cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene: evidence for tissue-specific hypersensitive sites. *Mol. Cell Endocrinol.* **148**: 67-77.
- Wymann MP, Pirola L (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**: 127-150.
- Xing J, Ginty DD, and Greenberg ME 1996 Coupling of the Ras-MAPK pathway to gene activation by Rsk2, a growth factor regulated CREB-kinase. *Science* **273**: 959-963.
- Yamada K, Tanaka T, Noguchi 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**: 917-921
- Yamamori B, Kuroda S, Shimizu K, Fukui K, Ohtsuka T, Takai Y (1995) Purification of a Ras-dependent mitogen-activated protein kinase kinase from bovine brain cytosol and its identification as a complex of B-Raf and 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.* **270**: 11723-11726.
- 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.
- Yamauchi K, Holt K, and Pessin JE (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase functions upstream of Ras and Raf in mediating insulin stimulation of c-fos transcription. *J. Biol. Chem.* **268**: 14597-14600.
- Yang Q, Kong Y, Rothermel B, Garry DJ, Basel Duby R, Williams RS (2000) The winged helix/forkhead protein myocyte nuclear factor beta forms a co-repressor complex with mammalian sin3B. *Biochem. J.* **345**: 335-343.

- Yannick M and Barouki R (1998) Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. *J. Biol. Chem* **273**: 26969-26976.
- Yeagley D, Agati J and Quinn P (1998) A tripartite array of transcription factor binding sites mediates cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription and its inhibition by insulin. *J. Biol. Chem* **273**: 18743-18750
- **Yeagley D, Moll J, Vinson Ch, and Quinn P** (2000) Characterization of elements mediating regulation of phosphoenolpyruvatecarboxykinase gene transcription by Protein kinase A and insulin. *J.Biol.Chem* **275**: 17814-17820.
- Yenus L, Makati K, Smith-Hall J, Ishibashi O, Myers M, and White M (1996) The plekstrin homology domain is the principle link between the insulin receptor and IRS-1. *J. Biol. Chem* **271**: 24300-24306.
- Yomogida K, Yamamoto M, Yamagami T, Fujita H, and Hayashi N (1993) Structure and expression of the gene encoding rat non specific form δ -aminolevulinate synthase *J.Biochem.* **113**: 364-371.
- YongShim E, Woodcock C and Zaret K (1998) Nucleosome positioning by the winged helix transcription factor HNF3. *Genes Dev.* **12**: 5-10.
- Zhang J, Ou J, Bashmakov Y, Horton JD, Brown MS, Goldstein JI (2001) Insulin inhibits transcription of IRS-2 gene in rat liver through a response element (IRE) that resembles IREs of other insulin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 3756-3761.
- Zhao Y, Bjorbaek C, and Moller DE (1996) Regulation and interaction of pp90 (rsk) isoforms of mitogen activated protein kinases. *J. Biol. Chem* **272**: 29773-29779.
- Zhinck R, Cahill M, Kracht M, Sachsenmaier C, Hipkind R, and Nordheim A (1995) Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1 *Mol. Cell Biol.* **15**: 4930-4938