

UCH-FC
MAG-BMCN
0481
C.1

**INFLUENCIA DE LAS METALOTIONEÍNAS 1 Y 2
EN EL PROCESO DE ADAPTACIÓN A COBRE Y
ESTRÉS TÉRMICO EN FIBROBLASTOS
EMBRIONARIOS DE RATÓN**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**



Magíster en Ciencias Biológicas

con Mención en Biología Celular, Molecular y Neurociencias

Facultad De Ciencias

Por

Felipe Alberto Olivares Vera

Octubre, 2008

Director de Tesis: Doctor Mauricio González Canales

2550888

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

FELIPE ALBERTO OLIVARES VERA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 25 de Septiembre de 2008.


Director de Tesis:
Dr. Mauricio González

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marco Tulio Nuñez

Dr. Cecilia Vergara

Mauricio González
.....
Marco Tulio Nuñez
.....
C. Vergara
.....



Gracias quiero dar al divino Laberinto de las causas...
(Jorge Luis Borges, Otro poema de los dones)

Gracias

Por el saber

Por el amor

Por todos aquellos que me han dado el uno y el otro

Por un segundo

O una vida

Porque el conocimiento y el amor hacen la sabiduría...



ÍNDICE DE CONTENIDOS



AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
1. El cobre como nutriente.....	1
2. El cobre como agente tóxico.....	1
3. La homeostasis de cobre.....	2
4. La metalotioneína.....	4
5. La regulación transcripcional de Mt.....	5
6. Vínculos entre estrés térmico, ubiquitinación y metabolismo de metales.....	7
7. Hipótesis.....	10
8. Objetivo General.....	10
9. Objetivos Específicos.....	10



MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
1. MATERIALES.....	12
1.1. Líneas Celulares.....	12
1.2. Partidores.....	12
1.3. Sales y Reactivos.....	13
2. MÉTODOS.....	14
2.1. Cultivo y tratamiento de líneas celulares.....	14
2.1.1. Mantenión de líneas celulares en cultivo.....	14
2.1.2. Conteo por tinción con azul tripán.....	15
2.1.3. Almacenamiento de líneas celulares.....	15
2.1.4. Tratamientos con cobre y temperatura.....	15
2.2. Procedimientos generales.....	17
2.2.1. Cuantificación de metales.....	17
2.2.2. Cuantificación de proteínas.....	18
2.2.3. Estimación de la viabilidad celular (MTT).....	18
2.2.4. Cuantificación de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (DCF-DA).....	19
2.3. Procedimientos de biología molecular.....	19
2.3.1. Electroforesis.....	19
2.3.2. Cuantificación de DNA y RNA.....	20
2.3.3. Extracción de RNA total.....	21
2.3.4. Síntesis de cDNAs.....	22



2.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
2.3.6. Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa....	23
2.3.7. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).....	23
2.4. Análisis Bioinformático.....	26
2.4.1. Análisis de regiones promotoras.....	26
RESULTADOS.....	27
1. Expresión génica en fibroblastos expuestos a cobre.....	27
1.1. Selección de genes a analizar.....	27
1.2. Análisis de regiones promotoras.....	29
1.3. Extracción de RNAs y síntesis de cDNAs.....	33
1.4. Generación de estándares para qPCR.....	36
1.5. Optimización de las condiciones de reacción de qPCR.....	37
1.6. Identificación de genes de referencia.....	39
1.7. Cuantificación por qPCR de la abundancia de transcritos en fibroblastos expuestos a cobre.....	41
2. Efecto de temperatura y cobre sobre fibroblastos mt+ y mt-.....	49
2.1. Viabilidad.....	50
2.2. Abundancia de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno.....	53
2.3. Cuantificación de hspca y hspala.....	56
2.4. Acumulación de cobre y cuantificación de mt1.....	59



DISCUSIÓN.....	62
1. Características de la metodología empleada.....	63
2. Viabilidad en fibroblastos mt+ y mt-.....	66
3. Participación de la metalotioneína en el metabolismo redox.....	67
4. Participación de proteínas de estrés térmico en el metabolismo redox.....	68
5. El cobre y la ubiquitinación.....	69
6. Mecanismos de regulación transcripcional potencialmente mediados por metalotioneína.....	70
7. La metalotioneína y el estrés térmico en la acumulación intracelular de cobre....	73
CONCLUSIONES.....	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores empleados en la amplificación y cuantificación de los genes analizados.....	13
Tabla 2. Condiciones de reacción de PCR y qPCR utilizadas para la amplificación de genes de interés.....	25
Tabla 3. Genes seleccionados para análisis de abundancia por qPCR.....	29
Tabla 4. Variabilidad en la cuantificación de los transcritos de actina, g3pdh y rplp0.....	40
Tabla 5. Comparación de microarreglos y qPCR para fibroblastos mt+ y mt- expuestos a Cu:His 50 μ M por 48 horas.....	47
Tabla 6. Comparación de microarreglos, macroarreglos y qPCR para fibroblastos mt+ y mt- expuestos a Cu:His 50 μ M por 48 horas.....	47



ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1. Análisis de regiones promotoras.....	32
Figura 2. Verificación de la calidad de los RNAs y cDNAs.....	35
Figura 3. Vista parcial de la colección de estándares para PCR.....	36
Figura 4. Efecto de la concentración de magnesio en la amplificación por qPCR.....	39
Figura 5. Cuantificación por qPCR de transcritos vinculados a metabolismo de metales en fibroblastos mt+ y mt- expuestos a cobre.....	44
Figura 6. Cuantificación por qPCR de transcritos para proteínas de estrés térmico en fibroblastos mt+ y mt- expuestos a cobre.....	45
Figura 7. Cuantificación por qPCR de transcritos para proteínas del sistema de ubiquitinación en fibroblastos mt+ y mt- expuestos a cobre.....	46
Figura 8. Resumen de la estrategia experimental.....	50
Figura 9. Viabilidad en fibroblastos mt+ y mt- en condiciones de exceso de cobre y alzas de temperatura.....	52
Figura 10. Especies reactivas de nitrógeno y oxígeno en fibroblastos mt+ y mt- sometidos a niveles suprafisiológicos de cobre y alzas de temperatura.....	55
Figura 11. Abundancia relativa de hspca y hspala en fibroblastos mt+ y mt- en condiciones de exceso de cobre y alzas de temperatura.....	58
Figura 12. Contenido intracelular de cobre y abundancia relativa de mt1 en fibroblastos mt+ y mt- en condiciones de exceso de cobre y alzas de temperatura.....	61

Figura 13. Mecanismo propuesto para la regulación mediada por metalotioneína de la actividad de MTF-1 y HSF-176



LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometría de absorción atómica
Ace1	Factor de transcripción que une cobre 1
Aplp2	Proteína similar a la precursora del amiloide
App	Proteína precursora del amiloide
Atp7A	ATPasa de eflujo de cobre A
Atp7B	ATPasa de eflujo de cobre B
Atx1	Chaperona de cobre para Ccc2
BSA	Albúmina de suero fetal bovino
Ccc2	ATPasa transportadora de cobre
Ccs	Chaperona de cobre para la superóxido dismutasa
c-fos	Oncogen celular fos
Cox17	Proteína de ensamblaje de la citocromo C oxidasa
Cp	Ceruloplasmina
Ctr1	Transportador de cobre 1
Ctr2	Transportador de cobre 2
Ctr3	Transportador de cobre 3
Cu	Cobre
Cu:His	Complejo cobre -- histidina
Cu-cp	Cobre ceruloplasmínico
Cu-no cp	Cobre no ceruloplasmínico
Cup1	Cobre-tioneína 1
DCF	Diclorofluoresceína

DCF-DA	Diclorofluoresceína diacetato
DMEM	Medio Dulbecco modificado
DMSO	Dimetil sulfóxido
Dmt1	Transportador de metales divalentes 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótido trifosfatos
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
ESTs	Secuencias cortas expresadas
Fe	Hierro
Fet4	Transportador de membrana plasmática de Fe (II) de baja afinidad 4
FITC	Fluoresceína isotiocianato
Fre 1-7	Reductasas de hierro y cobre 1 a 7
G	Fuerza centrífuga relativa
G3pdh	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
Hah1	Homólogo humano de Atx1, chaperona de cobre para Atp7B
HBS	Tampón ácido etilendiamino tetra acético salino
HEPES	Ácido etilendiamino tetracético
HSE	Elemento de respuesta a estrés térmico
HSF-1	Factor de transcripción de estrés térmico 1
Hsp105	Proteína de estrés térmico 105
Hsp27	Proteína de estrés térmico 27
Hsp70	Proteína de estrés térmico 70
Hspa1a	Proteína de estrés térmico 1 ^a

Hspa8	Proteína de estrés térmico α 8
Hspca	Proteína de estrés térmico 90 alfa
Hsps	Proteínas de estrés térmico
Mdm2	Homólogo de ratón doble minuto 2; proteína de unión a p53
Mk	Menkes o Atp7A
MOPS	Ácido 3- [N-morfolino] propanosulfónico
MRE	Elemento de respuesta a metales
Mt	Metalotioneína
Mt1	Metalotioneína 1
Mt2	Metalotioneína 2
Mt3	Metalotioneína 3
Mt4	Metalotioneína 4
MTF-1	Factor de transcripción de metales 1
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
NRF-1	Factor nuclear respiratorio 1
NRF-2	Factor nuclear respiratorio 2
°C	Grados Celsius
p53	Supresor de tumores p53
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico

Rplp0	Proteína ácida ribosomal 0
rpm	Revoluciones por minuto
Sod1	Superóxido dismutasa 1
SP-1	Proteína de especificidad 1
βact	Beta actina
TAE	Tampón tris-acetato EDTA
TE	Tampón tris EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades enzimáticas
UAScup1	Secuencias activadoras río arriba del gen cobre-tioneína 1
Uba52	Proteína ribosomal de fusión ubiquitina A-52
Ubb	Ubiquitina b
Ubc	Ubiquitina c
USF-1	Factor de estimulación río arriba 1
USF-2	Factor de estimulación río arriba 1
Zn	Zinc
Znt1	Zinc Transporter 1

RESUMEN

El control de la homeostasis del cobre hace uso de mecanismos muy finos y altamente conservados desde levaduras hasta humanos. La esencialidad de este metal para los organismos eucariontes reside en el papel que juega en la transferencia de electrones a enzimas que cumplen funciones tan indispensables y dispares como la respiración celular y la síntesis de neurotransmisores. Es esta misma capacidad de transferir electrones al fluctuar entre 2 estados de oxidación, Cu^{+1} y Cu^{+2} , la que confiere al metal el poder de catalizar la formación de especies radicales libres y lo hace en potencia tóxico cuando sus niveles exceden los requeridos por la célula. El presente trabajo pretende explorar la posibilidad de que metalotioneína, proteína involucrada en el almacenamiento de cobre y zinc, esté además vinculada al establecimiento de la respuesta transcripcional que permite la adaptación a concentraciones de cobre supra fisiológicas y también a altas temperaturas. Con este objeto, fueron empleadas líneas celulares de fibroblastos de ratón silvestres y mutantes para metalotioneína.

Las observaciones aquí expuestas indican que, en el modelo celular utilizado, la ausencia de metalotioneína se correlaciona con marcadas diferencias en los patrones de abundancia de diversos genes vinculados al metabolismo de metales, el estrés oxidativo, el estrés térmico y el control apoptótico en condiciones de exceso de cobre y/o temperatura. El registro de parámetros fisiológicos como la abundancia de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno y el contenido intracelular de cobre también tuvo como resultado un notorio contraste en el comportamiento observado

entre ambas líneas celulares.

El conjunto de los resultados generados en el presente trabajo extiende las posibles funciones de metalotioneína más allá del metabolismo de cobre y zinc y la configuran, en un modelo celular mamífero, como un potencial componente de la red de regulación génica ligada a la adaptación celular a cobre y temperatura, rol que tiene un cierto paralelo con los mecanismos previamente descritos en levadura.

ABSTRACT

Control of copper homeostasis involves very fine and highly conserved mechanisms from yeast to humans. The essentiality of this metal in eukaryotic organisms relies on the role it plays in electron transfer to enzymes with widely diverse and important functions, such as cellular respiration and neurotransmitter synthesis. It is the same ability to exchange electrons by alternating between two oxidating states, Cu^{+1} and Cu^{+2} , what confers this metal the capacity to catalyze the formation of free radical species and making it potentially toxic when its levels exceed cellular requirements. The present work aims to explore the possibility that metallothionein, a protein involved in copper and zinc storage, is also linked to the establishment of a transcriptional response that allows adaptation to copper excess and also to supraphysiological temperatures. For this purpose, wild type and mutant metallothionein fibroblastic cell lines were employed.

The observations described here indicate that, in the cellular model utilized, the absence of metallothionein is correlated with marked differences in the abundance patterns of several genes involved in metal metabolism, oxidative stress, heat shock and apoptotic control in copper and/or temperature excess conditions. Physiological parameters such as the abundance of reactive nitrogen and oxygen species and intracellular copper content also showed a notable contrast in the behavior of both cell lines.

Taken together, the set of results generated in the present work extends the possible functions of metallothionein further from copper and zinc metabolism and

INTRODUCCIÓN

1. El cobre como nutriente

El cobre es un metal de transición indispensable para la ocurrencia de un amplio rango de procesos biológicos, entre los que se incluye la síntesis de neurotransmisores, la respiración celular y la defensa contra radicales libres. El cobre puede existir en estado oxidado, Cu^{+2} , o reducido, Cu^{+1} , y su rol en la facilitación de la transferencia de electrones en diversas enzimas da cuenta de su esencialidad para la vida de todos los organismos eucariontes y también de algunos procariontes (Uauy y col., 1998).

2. El cobre como agente tóxico

Pese a su condición de nutriente esencial, la acumulación de cobre por sobre los requerimientos celulares puede llegar a ser tóxica a raíz de la naturaleza redox activa de este metal, que facilita entonces la formación de radicales libres con el consiguiente daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las células cuentan con sofisticados mecanismos homeostáticos que les permiten manejar muy finamente la entrada, distribución, almacenamiento y salida del metal (Puig y col., 2002). El ostensible avance en la identificación y caracterización de las proteínas involucradas en esta red homeostática a través del modelo de *Saccharomyces cerevisiae* en los últimos 10 años ha posibilitado el desarrollo de una comprensión mucho más acabada del flujo de interacciones que implica la adaptación celular a la disponibilidad de este metal en el

medio. Actualmente, se sabe además que existe un enorme paralelo en los mecanismos propios del manejo del cobre en los organismos eucariontes, dado que la mayoría de los genes de la maquinaria homeostática de levadura se encuentran también conservados en mamíferos. Existen, sin embargo, diferencias que radican en la cantidad e identidad de los factores de transcripción encargados de regular la vía metabólica del metal. A continuación se describe brevemente la homeostasis de cobre en eucariontes, conforme al conocimiento acumulado a la fecha.

3. La homeostasis de cobre

En la sangre, el cobre se encuentra en más de un 90% en estado oxidado (Cu^{+2}), unido a una ferroxidasa llamada ceruloplasmina (Meyer y col., 2001), la que utiliza el cobre como cofactor. Otras proteínas que, en menor abundancia, ligan cobre en el plasma son la transcupreína y la albúmina (Linder y col., 1996), además de aminoácidos como glicina e histidina (Uauy y col., 1998). Existen en la célula dos transportadores que permiten el ingreso de cobre desde el plasma en la forma reducida (Cu^{+1}), estos son, Ctr1, transportador de alta afinidad y específico para cobre (Zhou y col., 1997), y Dmt1, compartido con metales bivalentes (Gunshin y col., 1997; Arredondo y col., 2003). En levaduras, esta función es ejecutada por Ctr1 y Ctr3, transportadores de alta afinidad por cobre, Ctr2, transportador de baja afinidad, y Fet4, compartido por cobre y hierro (Uauy y col., 1998). Para ingresar a la célula, por tanto, el cobre debe ser previamente reducido, y se postula que, en mamíferos, las metaloproteasas Steap (Ohgami y col., 2006), la

proteína precursora del amiloide, App, y su homóloga Aplp2 harían las veces de cobre-reductasa en el medio extracelular (Multhaup y col., 1996). Las responsables de la reducción del cobre en la membrana plasmática de levaduras forman parte de una familia codificada por los genes *frel-7* (Georgatsou y col., 1999).

En el interior de la célula existen proteínas con una gran afinidad por cobre que cumplen el rol de chaperonas y están encargadas de la destinación directa del metal a las cuproenzimas a través de interacciones par-específicas. El cobre libre es mantenido, mediante este control, en concentraciones menores a una molécula por célula (Rae y col., 1999). En mamíferos, las chaperonas descritas hasta ahora son: Ccs, específica para la cobre-zinc superóxido dismutasa, Hah1, que transfiere cobre a Atp7 A y B (también llamadas proteínas de Wilson y Menkes, respectivamente), y Cox17, que es la chaperona que interactúa con la citocromo c-oxidasa. Sus correspondientes homólogos en levadura son denominados Ccs, Atx1 y Cox17. Todas ellas presentan un motivo de unión a metal altamente conservado en eucariontes que permite la unión de un átomo de Cu^{+1} (Huffman y O'Halloran, 2001).

Una vez en la célula, el cobre puede ser alternativamente almacenado o conducido a la red del trans-Golgi. En este último caso, algunas apoenzimas sintetizadas en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi tales como (apo)ceruloplasmina, (apo)lisil oxidasa y (apo)tirosinasa son convertidas al estado de cuproenzimas. Es a través del transportador Atp7A, presente principalmente en células del epitelio intestinal, y de Atp7B, predominante en células hepáticas, que el cobre es translocado desde el

citoplasma a la red del trans-Golgi desde donde es transferido a proteínas o su exceso destinado al medio extracelular (Paynter y col., 1999; Yamaguchi y col., 2001). El homólogo Ccc2 desempeña igual función en levaduras (Yuan y col., 1995).

4. La metalotioneína

En lo que respecta al almacenamiento del metal en el interior de la célula, la metalotioneína, proteína citosólica presente tanto en levaduras como mamíferos (Uauy y col., 1998), ha sido descrita como un componente de suma relevancia, además de ser crucial en la supervivencia celular frente a la exposición a concentraciones de cobre fisiológicas y suprafisiológicas (Tapia y col., 2004), y estar también implicada en la respuesta antiinflamatoria y antioxidante, en el almacenamiento de zinc y la detoxificación de cobre, zinc y cadmio (Palmiter, 1998). A causa, en parte, de sus múltiples funciones, no se cuenta aún con una comprensión cabal de su rol biológico. Existen cuatro genes funcionales conocidos para metalotioneína, denominados Mt1, Mt2, Mt3 y Mt4, los que en humanos dan en conjunto origen a por lo menos 12 isoformas. Mientras que Mt3 es expresada sólo en el cerebro y Mt4 es específica de epitelio escamoso asociado a mucosa bucal, esófago e intestino grueso, Mt1 y Mt2 son ubicuas en los tejidos animales (Tapiero y col., 2003).

5. La regulación transcripcional de Mt

En mamíferos, la transcripción de genes como *mt* y el transportador de eflujo de zinc (*znt1*) es modulada por medio de secuencias reguladoras de tipo *cis* que responden a metales y reciben el nombre de MREs (Metal Response Elements) (Langmade y col., 2000). La unión de zinc a una proteína de múltiples dedos de zinc, el factor de transcripción de unión a MREs 1 ó MTF-1, determina la formación del complejo MRE/MTF-1, y con ello, la generación de una señal de estímulo de la transcripción (Samson y Gedamu, 1998). Experimentos *in vitro* indican que metalotioneína funciona como un donante de zinc para MTF-1 (Zhang y col., 2003). La presencia de elementos que regulan la expresión de los genes vinculados a la homeostasis del cobre resulta ser bastante más evidente en mamíferos que en levaduras, además de involucrar una serie de reguladores transcripcionales no relacionados con metales sino ligados a otros procesos celulares. Un ejemplo de ello es el gen de metalotioneína, que en *Saccharomyces cerevisiae* recibe el nombre de *cup1*. Su transcripción es inducida en forma cobre-dependiente a través del activador transcripcional *Ace1*, el que reconoce elementos denominados *UAScup1* duplicados en tandem en la región promotora del gen (Thiele y Hamer, 1986), y en forma cobre-independiente en respuesta a alzas de temperatura por medio del factor de transcripción HSF-1 (Heat Shock Factor 1), el que se une a secuencias llamadas HSEs (Heat Shock Elements), también situadas en dos copias río arriba del gen (Silar y col., 1991). El proceso de transcripción ocurre *in vivo* aún en ausencia de varios componentes de la maquinaria de transcripción basal de levadura

(LeBlanc y col., 2000). En contraste, en mamíferos los factores MTF-1, USF-1 (Upstream Stimulatory Factor 1), USF-2, SP-1 (Specificity Protein 1), NRF-2 (Nuclear Respiratory Factor 2) y la proteína c-fos han sido implicados como partícipes en la transcripción de mt, la cual se ve inducida en respuesta a un sinnúmero de metales (zinc, cobre, cadmio, mercurio, plata y bismuto), además de químicos, citoquinas y hormonas vinculados al daño oxidativo e inflamatorio (Coyle y col., 2002). Poco se conoce acerca del control, ya sea transcripcional, traduccional o post-traduccional, de otros elementos del metabolismo de cobre tales como Ctr1, Atp7a/b, Ccs y Sod1 , cuyas contrapartes en levadura cuentan con mecanismos de regulación bien caracterizados (De Freitas y col., 2003).

Trabajos previamente realizados en nuestro laboratorio (Tapia y col., 2004) señalan que fibroblastos murinos de una línea celular de genotipo silvestre modifican los niveles de transcritos para los genes ccs, sod1 y mt1 ante un aumento en el cobre disponible. Sin embargo, en una segunda línea celular cuyo genotipo difiere únicamente en la inserción de un codón de término cercano al inicio de la traducción en los genes que codifican para las metalotioneínas 1 y 2, los mensajeros para ccs, sod y mt1 presentan un patrón transcripcional completamente distinto frente a idénticas condiciones. Estos resultados indican que frente a un mismo factor externo, la presencia o ausencia de Mt determina una respuesta celular diferencial y sugieren por lo tanto un papel de Mt como parte de la maquinaria que regula la expresión de genes implicados en

el metabolismo del cobre o el manejo del estrés oxidativo. Una segunda línea de evidencia en esta dirección proviene de resultados publicados por Armendáriz y colaboradores (2006), donde un análisis de los datos de expresión global en las líneas mt⁺ y mt⁻ ya mencionadas conduce a la siguiente observación: en ausencia de metalotioneína, las células expuestas a cobre no registran un aumento de varios transcritos vinculados a mecanismos más generales de protección celular, como chaperonas de estrés térmico y ubiquitinación, que sí se incrementan en los fibroblastos silvestres frente al exceso del metal. Las siguientes líneas describen brevemente la naturaleza de estos dos últimos grupos de genes.

6. Vínculos entre el estrés térmico, la ubiquitinación y el metabolismo de metales

Las proteínas de estrés térmico o hsps (de Heat Shock Proteins) conforman una red de chaperonas que previenen la agregación y posibilitan el correcto plegamiento de proteínas nacientes o desnaturaladas, además de participar en la regulación apoptótica (Soti y col., 2005). Su expresión es activada en respuesta a una variedad de condiciones adversas entre las que se incluye el exceso de cobre y zinc (Urani y col., 2003), el estrés oxidativo y las temperaturas suprafiológicas (Winter y Jakob, 2004). El vínculo entre la homeostasis de metales y las hsps resulta particularmente interesante dada una serie de antecedentes como la sensibilidad del gen *cup1* de levadura a las alzas de temperatura (Silar y col., 1991), la ostensible estimulación del promotor de *mt1* frente a la

exposición simultánea con temperaturas suprafiológicas más cadmio o zinc (Saydam y col., 2003), y la recientemente descrita interacción entre MTF-1 y HSF-1, este último, factor de transcripción que dirige la expresión de diversas hsp (Uenishi y col., 2006). Las proteínas que presentan plegamientos anómalos no corregidos pueden ser dirigidas al sistema de ubiquitina-proteasoma, que conforma la principal vía de degradación de proteínas en la célula (Nandi y col., 2006). Este sistema es regulado casi totalmente por mecanismos de fosforilación que son activados por señales extracelulares (Gao y Karin, 2005). Uno de los pocos ejemplos existentes de la regulación transcripcional de esta vía de degradación es el del gen de la ubiquitina de pollo, que contiene en su promotor dos elementos HSE y cuya expresión es inducida rápida y transitoriamente por el estrés térmico (Bond y Schlesinger, 1986), con una vida media próxima a los 90 minutos. Ello hace entonces plausible plantear que la protección que brindan estos dos grupos de proteínas puede ser de suma utilidad para la célula al verse sometida a un exceso de cobre, posibilidad que encuentra apoyo en el reporte del aumento en los niveles de mensajero de hsp70 y ubiquitina en respuesta a la exposición a hierro en líneas neuronales de ratón (Uney y col., 1993).

El conocimiento disponible apunta entonces a que metalotioneína determina una respuesta celular diferencial ante la disponibilidad suprafiológica de cobre, donde los patrones de abundancia de diversos genes, no necesariamente vinculados al metabolismo de metales, se ven modificados en función de la presencia o ausencia de esta proteína. La evidencia indica también que existe, aunque difuso, un vínculo entre la homeostasis

de metales y el estrés térmico. El presente trabajo pretende evaluar si la carencia de Mt puede determinar una disrupción en el sistema conformado por las Hsps, y las eventuales repercusiones que ello tendría en la vía de degradación de la ubiquitinación y el estado fisiológico de la célula.

7. Hipótesis

La ausencia de metalotioneína no solo modifica la respuesta transcripcional de los componentes propios de la homeostasis de cobre frente a un exceso en la disponibilidad del metal, si no que también repercute en la capacidad de la célula para regular la abundancia de otros transcritos vinculados con mecanismos de protección celular frente al estrés térmico.

8. Objetivo General

Estudiar las consecuencias transcripcionales y fisiológicas que conlleva la ausencia de MT en células sometidas y no sometidas a situaciones de estrés térmico y concentraciones suprafisiológicas de cobre.

9. Objetivos Específicos

a. Generar una colección de productos de PCR purificado que permita la cuantificación por qPCR de genes vinculados con el metabolismo de cobre, estrés térmico y ubiquitinación en fibroblastos mt⁺ y mt⁻ expuestos a cobre.

12 genes de interés, relacionados con metabolismo de metales, estrés térmico y ubiquitinación, más 3 genes potencialmente útiles como elementos de normalización fueron seleccionados desde la literatura y una base de datos de expresión global en fibroblastos mt⁺ y mt⁻. Tras diseñar las correspondientes parejas de partidores y encontrar las condiciones óptimas para la cuantificación por qPCR de estos 15

transcritos, sus correspondientes patrones de abundancia fueron analizados en cDNAs provenientes de la exposición a 0, 50 y 100 μM de Cu:His de ambos tipos celulares.

b. Determinar, para ambas líneas celulares, las alteraciones temporales en la viabilidad, el contenido de cobre, especies reactivas de nitrógeno y oxígeno y patrones de abundancia de transcritos seleccionados en el objetivo anterior, en condiciones de exceso de cobre y temperatura.

Se confeccionó un protocolo que considera 3 tiempos para la exposición combinada e independiente de fibroblastos silvestres y mutantes para metalotioneína a golpes de calor (42 °C) y Cu:His 100 μM (0, 24 y 48 horas). En estas condiciones, se registró la variación de parámetros fisiológicos y la abundancia de mt1 y dos transcritos de estrés térmico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Líneas Celulares

Para el desarrollo del presente trabajo se hizo uso de dos líneas de fibroblastos de ratón inmortalizados por infección viral (Kelly y Palmiter, 1996). Ambas provienen de la progenie del cruce de una cepa de ratones mutantes para el gen de la ATPasa de eflujo de Menkes (Kelly y Palmiter, 1996), *atp7A*, localizado en el cromosoma X, con una segunda cepa de ratones mutantes para los genes que codifican las metalotioneínas 1 y 2 (Masters y col., 1996). Así se dió origen a las líneas celulares *mt+* y *mt-* utilizadas en esta tesis, las que fueron donadas amablemente por el Doctor Johnathan Gitlin de la Universidad de Washington. .

1.2. Partidores

Los partidores utilizados para PCR convencional y en tiempo real fueron sintetizados por Alpha DNA (Quebec, Canada). A excepción de los pares para actina (Schmittgen y Zakrajsek, 2000) y la chaperona de cobre para la superóxido dismutasa, *ccs* (Tapia y col., 2004), cuya secuencia proviene de los reportes mencionados, la totalidad de las parejas de partidores fue diseñada a través del Programa Primer Premier 3.0 (Primer Biosoft International). La siguiente tabla contiene las respectivas secuencias

sentido y antisentido de los partidores para cada uno de los genes de interés en dirección 5'→3', así como también el tamaño esperado para cada amplicón:

Gen	Partidor Sentido (5'→3')	Partidor Antisentido (5'→3')	Tamaño Amplicón (pb)
βact	tacgaccagaggcatacagggacaa	accaactgggacgacatggagaaga	214
g3pdh	accacagtccaatgccatcac	tccaccacctgttgctgta	452
rplp0	ggcgacctggaagtccaact	ccatcagcaccacagccttc	149
mtl	ccgtgggctgctccaaat	taggaagacgctgggttg	134
znt1	gaagtgatgccagtgatgt	gaccacgatcacggagcccaa	152
sod1	gaagcatggcgatgaaagc	actgatggacgtggaacc	156
ccs	tccttatccaagatcacag	cgaggaccaataacctga	222
hsp105	tgtctctggaagatgaacag	cactatctcaatggcactcac	136
hspca	ccctgaccattgtggataccg	gctcatcgtcgttatgcttcg	213
hspa8	gtttctaccagaggaagtgc	ctgatgtcttctgtgcttcg	424
hspa1a	tacttactccttagtttgc	attaacagggaagataaagcc	107
ubb	gggtggctattaattatcggtc	gcaagtggctagatgcagagt	73
ubc	ccaccaagaaggtaaacagg	cacaccaagaacaagcacaag	88
uba52	ccgactacaacatccagaaagag	acatgccaggatgaccacag	241
mdm2	gcagaagaaggcttggatgt	gatggtgggaatagtcgtc	148

Tabla 1. Partidores empleados en la amplificación y cuantificación de los genes analizados. En la tabla se incluyen las secuencias de los partidores utilizados tanto en la amplificación por PCR convencional como en la cuantificación de la abundancia relativa de transcritos por PCR en tiempo real para cada uno de los 15 genes analizados en esta tesis y la longitud en pares de bases (pb) de sus respectivos amplicones.

1.3. Sales y Reactivos

La totalidad de las sales y reactivos utilizados fue adquirida a los fabricantes Merck (New Jersey, EUA), Sigma (Illinois, EUA) y Winkler (Santiago, Chile).

2. MÉTODOS

2.1. Cultivo y tratamiento de líneas celulares

2.1.1. Mantención de líneas celulares en cultivo

Las líneas mt⁺ y mt⁻ fueron mantenidas en forma sistemática a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂, suplementadas con medio Dulbecco modificado (DMEM) con 10% (V/V) de suero fetal bovino, penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/mL), CuSO₄ 0,44 µM (Gibco BRL, Maryland, EUA), en placas circulares de 65 ó 100 mm de diámetro (Tapia y col., 2004). Al cabo de 2 a 3 días en la placa, cuando las células alcanzaban cerca de un 80% de confluencia, eran lavadas 2 ó 3 veces con una solución tampón de fosfato salino pH 7,4 (PBS) y recuperadas a través de una tripsinización suave con 0,05% tripsina y 5,3 mM EDTA · 4Na en PBS por alrededor de 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente eran centrifugadas a 800 G por 3 minutos, resuspendidas en 1 mL de PBS y nuevamente centrifugadas por otros 3 minutos a 800 G, para luego ser sembradas en una nueva placa con medio fresco a una densidad aproximada de 3000 células/cm² (2.1.2.).

2.1.2. Conteo por tinción con azul tripán

El número de células vivas en una determinada muestra fue determinado mediante el conteo en una cámara de NeuBauer de células teñidas con azul tripán

diluidas en una proporción 1:10 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Montana, EUA) (Armendáriz y col., 2006).

2.1.3. Almacenamiento de líneas celulares

Con el objeto de criopreservar las líneas de fibroblastos, las células fueron recuperadas desde placas de cultivo mediante el protocolo de tripsinización descrito en 2.1.1. y resuspendidas en DMEM con un 20% (V/V) de suero fetal bovino y un 10% (V/V) de dimetil sulfóxido (DMSO) en una concentración cercana a 10^6 fibroblastos/mL (ver 2.1.2.).

2.1.4. Tratamientos con cobre y temperatura

Ambas líneas celulares fueron sometidas a tratamientos con concentraciones de cobre y temperaturas suprafisiológicas. Las condiciones de cultivo descritas en 2.1.1 fueron usadas como estado de referencia o control. En esta situación, la concentración de cobre en el medio es de $0,44 \mu\text{M}$ (Tapia y col., 2004). Para las cuantificaciones por qPCR, que permitieron verificar los datos de expresión generados a partir de hibridaciones en macro y microarreglos (Tapia y col., 2004, Armendáriz y col., 2006), fibroblastos mt^+ y mt^- fueron sembrados a una densidad aproximada de $10,2 \times 10^3$ células/cm², y transcurridas 20 horas post-siembra, el medio nutritivo fue reemplazado ya fuera por medio fresco sin suplemento de cobre, o por medio con una dosis de 50 ó 100 μM de Cu-His (en proporción 1:10). Las células estuvieron expuestas a este medio

durante 48 horas. Un segundo tipo de tratamiento involucró la exposición de los fibroblastos a un exceso de cobre y/o temperatura (Figura 8). En este caso, ambas líneas celulares fueron también sembradas a una concentración aproximada de $10,2 \times 10^3$ células/cm², y al cabo de 20 horas el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco. Tras el cambio de medio, el total de placas fue agrupado en 8 lotes de igual número. 2 de estos lotes fueron expuestos a 42 °C por 90 minutos, antes de volver a 37 °C con las placas restantes. Finalizado este período de elevación de la temperatura, se suministró un suplemento de Cu:His 100 µM uno de los lotes sometidos a 42 °C y a otro de los mantenidos a 37 °C. Este protocolo de exposición a cobre y/o temperatura fue replicado con un desfase de 24 horas (44 horas post-siembra) en 3 de los lotes restantes, de forma que 69,5 horas después de haber sido sembradas, parte de las placas de fibroblastos mt+ y mt- hubiese estado expuesta a Cu:His 100 µM (placas que fueron denominadas respectivamente Cu24 ó Cu48, de acuerdo a las horas de exposición), otra parte sometida a 42 °C por 90 minutos 24 ó 48 horas atrás (las que recibieron el nombre de T24 ó T48), una tercera fracción, recibió tanto una carga de cobre como temperatura (llamadas CuT24 y CuT48), o hubiesen estado en condiciones normales de cultivo a lo largo de todo el experimento (designadas como Control). Una vez acabado el período de tratamiento, las células fueron procesadas, de acuerdo al protocolo pertinente, para aislar RNA (2.3.3.), cuantificar metales (2.2.1.), determinar la abundancia de especies reactivas de oxígeno (2.2.4.) o estimar viabilidad en un ensayo de MTT (2.2.3.) o azul tripán (2.1.2.).

2.2. Procedimientos generales

2.2.1. Cuantificación de metales

La cuantificación del contenido intracelular de cobre, hierro y zinc fue registrada en fibroblastos mt+ y mt- sembrados en placas de 6 pocillos sometidos a tratamientos con cobre (2.1.4.). El medio fue retirado y los fibroblastos ya tratados se lavaron 2 veces con PBS. Las células fueron posteriormente sometidas a tripsinización (2.1.3.), centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos y resuspendidas en 150 μ L de PBS. De este volumen, 50 μ L fueron destinados para cuantificar proteínas (2.2.2.) y los 100 μ L restantes (aproximadamente 8×10^5 células), resuspendidos en 1 mL de ácido nítrico 65% (v/v) en agua desionizada bi destilada. Esta resuspensión celular fue incubada por 16 horas a 65 °C, con el propósito de completar la lisis ácida (González y col., 1999). Para cuantificar el contenido intracelular de cobre y hierro se utilizó un espectrómetro de absorción atómica (AAS) con horno de grafito SIMMA 6100 (Perkin Elmer, Massachussets, EUA), cuyo límite de detección circunda las partes por billón (ppb). La abundancia de zinc, en cambio, fue estimada en un espectrómetro de absorción de llama (2280 Perkin Elmer, Massachussets, EUA) que tiene un límite del orden de partes por millón (ppm). A través de curvas de calibración con diluciones seriadas de estándares para cada metal (JT Baker, New Jersey, EUA), la lectura de cada muestra fue expresada en nmoles y posteriormente normalizada por miligramo de proteína (2.2.2.).

2.2.2. Cuantificación de proteínas

La abundancia de proteínas en distintas muestras fue cuantificada a través del método de Bradford (Bradford, 1976). $2-4 \times 10^5$ células fueron lisadas en NaOH 0,5 N, Tritón 0,1 % v/v (2.2.1.) o NaOH 0,1 N (2.2.4.) y diluidas en agua destilada y reactivo de Bradford en proporción 1:8:1. La cuantificación fue efectuada a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer MBA 2000 (Massachusetts, EUA), y la concentración de cada muestra fue interpolada por medio de una curva de calibración hecha con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) (Gibco BRL, Maryland, EUA).

2.2.3. Estimación de la viabilidad celular (MTT)

Las células tratadas en placas de 24 pocillos fueron lavadas con PBS e incubadas durante 1 hora a 37 °C en 300 μ L de medio DMEM suplementado con 5 mg/mL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Mossman y col., 1983). Una vez finalizado el período de incubación, el medio fue reemplazado por 200 μ L de isopropanol 70 % v/v HCl 0,04 M para permitir durante 15 minutos a temperatura ambiente la solubilización de la sal de formazán, producto de la metabolización mitocondrial de MTT. La abundancia de formazán en cada pocillo fue estimada por colorimetría, mediante el registro en un lector de Elisa Elx800 (Bio-tek Instruments, Vermont, EUA) de la diferencia en la absorción a 570 y 630 nm. Los valores obtenidos

se encuentran expresados como porcentaje del promedio de las muestras control.

2.2.4. Cuantificación de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (DCF-DA)

Los fibroblastos, en placas de 24 pocillos, fueron lavados con PBS e incubados a 37 °C por 20 minutos en 300 µL de tampón HBS salino suplementado con glucosa (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, glucosa 10 mM, pH 7,4) y DCF-DA 20 µM (Myhre y col., 2003). Luego el tampón fue retirado y las células fueron lavadas con PBS y lisadas en 200 µL de NaOH 0,1 N. El lisado se transfirió a una placa blanca de 96 pocillos con el objeto de registrar la fluorescencia a 480 nm de excitación y 520 nm de emisión en un fluorímetro Spectramax Gemini EM (Molecular Devices, California, EUA). Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia por miligramo de proteína (2.2.4.).

2.3. Procedimientos de biología molecular

Las técnicas de biología molecular fueron desarrolladas en forma acorde a los protocolos descritos en Ausubel y col., 1999.

2.3.1. Electroforesis

La electroforesis de muestras de DNA se efectuó en geles de agarosa al 1-1,5% p/v en TAE 1x (Acetato de Tris 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5), solución que además fue usada como tampón de electroforesis. Por otro lado, las electroforesis de RNA fueron

hechas en geles denaturantes de agarosa al 1,2% p/v en formaldehído 7% v/v MOPS 1X, donde el tampón electroforético utilizado fue también MOPS 1X (Sambrook y col., 1989). Para teñir los geles se usó bromuro de etidio al 0,1% v/v (Ausubel y col., 1999), lo que permitió que las bandas fuesen visibles en un transiluminador de luz ultravioleta (TFX 20.M, Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, Francia). La fotografía de cada gel fue capturada mediante una cámara Dc290 (Kodak, Nueva York, EUA) para análisis posteriores.

2.3.2. Cuantificación de DNA y RNA

La concentración de ácidos nucleicos en muestras de DNA de doble hebra y RNA fue determinada por medio de sondas fluorescentes: Picogreen para DNA y Ribogreen para RNA (Invitrogen, California, EUA). Cada muestra fue diluida en tampón TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) entre 200 y 2000 veces, y el fluoróforo correspondiente fue agregado en una proporción de 1:400. La fluorescencia emitida a 520 nm se registró en un fluorímetro Spectramax Gemini Em (Molecular Devices, California, EUA) tras excitar la muestra a una longitud de onda de 480 (Picogreen) o 485 nm (Ribogreen). Junto con las muestras se incluyó una curva de calibración confeccionada con diluciones seriadas de DNA o RNA de concentración conocida, lo que permitió transformar las lecturas de fluorescencia a concentración de ácidos nucleicos. Para cuantificar DNA de hebra simple, se registró en un espectrofotómetro MBA 2000 (Perkin Elmer, Massachussets, EUA) la absorbancia de las muestras a 260

nm en una cubeta de cuarzo. Del mismo modo, la calidad de las muestras de RNA fue también verificada mediante el registro de la absorbancia a 240, 260 y 280 nm.

2.3.3. Extracción de RNA total

Los fibroblastos sometidos a los tratamientos descritos en 2.1.4. fueron tripsinizados y centrifugados de acuerdo al protocolo establecido en la sección 2.1.1. A continuación fueron resuspendidos en 1 mL de Tri Reagent (Ambion, Texas, EUA) y sometidos a ruptura mecánica con jeringas para insulina de 1 mL (BD Ultra-Fine, Nueva Jersey, EUA). Esta resuspensión fue incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente, mezclada con 0,2 mL de cloroformo, incubada por otros 15 minutos y centrifugada a 12000 G, 4 °C, por 15 minutos. El sobrenadante resultante, que contenía el RNA, fue transferido a un nuevo tubo, mezclado con 500 µL de isopropanol, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugado por 8 minutos a 12000 G y 4 °C. El pellet fue resuspendido en etanol 75% v/v y centrifugado a 7500 G, 4 °C, por 5 minutos. Finalmente, los restos de etanol se evaporaron incubando las muestras a 37 °C y los RNAs se resuspendieron en 30 µL de agua libre de nucleasas. La integridad del RNA fue verificada por electroforesis en geles denaturantes de agarosa (2.3.1.) y la pureza de cada muestra fue evaluada al registrar razón entre las absorbancias a longitudes de onda de 260/280 nm (relación entre ácidos nucleicos y proteínas) y 260/240 nm (relación entre ácidos nucleicos y fenoles) en un espectrofotómetro MBA 2000 (Perkin Elmer, Illinois, EUA).

2.3.4. Síntesis de cDNAs

Para sintetizar cDNAs de hebra simple se utilizó como templado 2 μg de RNA total, el que junto con 0,5 μg de oligodT de entre 12 y 15 bases (Promega, Wisconsin, EUA) fue denaturado a 70 °C por 5 minutos. Posteriormente, 200 unidades de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Wisconsin, EUA) y DNTPs a una concentración de 12,5 μM (Invitrogen California, EUA) fueron añadidos a la reacción, que fue incubada por 90 minutos a 42 °C y finalmente detenida al inactivar la enzima a 70 °C por 15 minutos. Los cDNAs fueron a continuación cuantificados por espectrofotometría (2.3.2.) y diluidos a una concentración de 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para su uso en reacciones de PCR (2.3.5.) y qPCR (2.3.7.). Con el objeto de ratificar que cada cDNA permitiese detectar la presencia de transcritos por PCR (2.3.5.), el producto de cada síntesis a una reacción donde se buscaba amplificar, con los respectivos partidores, los amplicones de mt1 y g3pdh.

2.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los distintos transcritos de los genes de interés enumerados en la Tabla 1 fue efectuada en una mezcla de 8-25 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de cDNA templado, dNTPs 10 mM, MgCl_2 50 mM, 10 mM de cada partidor y 0,1 unidades/ μL de Taq polimerasa (producida en nuestro laboratorio), en un volumen final de 25 (prueba cDNAs, 2.3.4.) ó 50 μL (purificación de estándares para qPCR, 2.3.6.). Las reacciones fueron incubadas

en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Massachusetts, EUA). El protocolo de amplificación constó de: a) un paso de denaturación inicial a 94 °C por 2 minutos, b) 25 a 35 ciclos de amplificación divididos en: 1) denaturación, 94 °C por 30 segundos, 2) asociación de los partidores, por 30 segundos a la temperatura correspondiente a cada pareja de partidores incluida en la Tabla 2 y 3) extensión, 72 °C por 60 segundos, y c) extensión final, 72 °C durante 5 minutos. La presencia de amplicones como producto de esta reacción fue ratificada por electroforesis en geles de agarosa (2.3.1.).

2.3.6. Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa

Los amplicones correspondientes a cada uno de los transcritos de interés incluidos en la Tabla 1 fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1-1,5 % (2.3.1.). Las bandas electroforéticas de cada producto de PCR fueron cortadas y purificadas por medio del sistema Quick Gel Extraction (Invitrogen California, EUA), que permite disolver la agarosa y purificar en una columna, mediante centrifugación, los ácidos nucleicos. Cada DNA purificado fue resuspendido en 40 µL de TE para su posterior utilización como sustrato de las curvas de calibración de qPCR (2.3.7.) y cuantificado por fluorimetría (2.3.2.)

2.3.7. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

Cada una de las parejas de partidores cuya secuencia se incluye en la Tabla 1 fue utilizada para cuantificar la abundancia del transcrito correspondiente en muestras de

cDNA, por medio del sistema SybrGreen (Invitrogen California, EUA), en un termociclador Light Cycler Instrument con capilares de vidrio (Roche, Basilea, Suiza). Mientras que las concentraciones de cDNA (20 ng/ μ L), partidores (0,5 μ M), BSA (50 μ g/mL) y Sybergreen (1,5 U DNA Polimerasa Taq, 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 200 μ M dG,A,CTPs, 400 μ M dUTP, 1 U UDG) en un volumen final de 10 μ L se mantuvieron fijas en todas las reacciones, la concentración de $MgCl_2$ fue ajustada para cada pareja de partidores de modo de obtener la máxima fluorescencia en el menor número de ciclos de amplificación. La Tabla 2 detalla las concentraciones finales de $MgCl_2$ y la temperatura de asociación de los partidores empleados en la amplificación de cada transcrito. El protocolo de amplificación fue ingresado al termociclador a través del programa Light Cycler v3.5 (Roche, Basel, Suiza) y se desglosa en: a) activación, 90 °C por 3 minutos, 70 °C por 2 minutos, b) amplificación, 35-40 ciclos de: 1) denaturación, 95 °C por 10 segundos, 2) asociación de los partidores, por 10 segundos a la temperatura correspondiente para cada amplicón incluida en la Tabla 2, 3) extensión, por 15 segundos a 72 °C, 4) registro de la fluorescencia y c) curva de denaturación, donde la temperatura fue incrementada a una tasa de 0.1 °C/segundo a desde la temperatura de asociación de los partidores hasta 99 °C. Este último paso permitió visualizar la presencia o ausencia de productos inespecíficos en la reacción, punto que fue posteriormente confirmado por medio de la electroforesis de una fracción tomada al azar de las muestras amplificadas. En cada ronda de amplificación se incluyó un control negativo (sin DNA) y diluciones seriadas de amplicón purificado y cuantificado (2.3.6.),

que permitieron la confección de una curva de calibración mediante la cual se interpoló la concentración de transcrito en las muestras problema.

Gen	Temperatura de Asociación (°C)	Concentración Final de MgCl ₂ (mM)
<i>βact</i>	66	4,5
<i>g3pdh</i>	62	6,0
<i>rplp0</i>	64	3,0
<i>mt1</i>	58	3,0
<i>znt1</i>	66	3,0
<i>sod1</i>	58	4,0
<i>ccs</i>	58	5,0
<i>hsp105</i>	62	3,0
<i>hspca</i>	64	5,0
<i>hspa8</i>	64	5,0
<i>hspa1a</i>	66	6,0
<i>ubb</i>	66	5,0
<i>ubc</i>	64	6,0
<i>uba52</i>	66	4,0
<i>mdm2</i>	60	4,0

Tabla 2. Condiciones de reacción de PCR y qPCR utilizadas para la amplificación de genes de interés. La tabla detalla la temperatura de asociación utilizada para amplificar cada uno de los transcritos de interés para el presente trabajo tanto en reacciones de PCR convencional como cuantitativo y las concentraciones de MgCl₂ optimizadas para qPCR particulares de cada caso.

2.4. Análisis Bioinformático

2.4.1. Análisis de regiones promotoras

La región correspondiente a 2000 pares de bases río arriba del inicio de traducción de los genes de interés fueron obtenidas desde la sección referente al genoma de ratón en la página del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>). El sitio de inicio de la transcripción no fue considerado debido a que fueron detectadas discrepancias en su asignación en la base de datos. La identificación de potenciales sitios de unión para MTF-1 y HSF-1 fue realizada mediante los programas MEME (Multiple Expectation-maximization for Motif Elicitation) y MAST (Motif Alignment Search Tool) (Bailey y col., 1997). MEME fue entrenado para reconocer secuencias tipo MRE mediante el ingreso de la región río arriba del gen mt1 (código de acceso: NM_013602), y secuencias tipo MRE con las regiones río arriba de los genes hspca y hsp105 (códigos NM_010480 y NM_013559, respectivamente). El programa fue configurado para detectar ventanas de un tamaño mínimo de 5 nucleótidos y un máximo indefinido. El consenso obtenido fue empleado para detectar a través de MAST la presencia de secuencias que tuviesen el mismo patrón nucleotídico en las 12 regiones promotoras pertenecientes a los genes analizados.

RESULTADOS

1. Expresión génica en fibroblastos expuestos a cobre

1.1. Selección de genes a analizar

Los resultados expuestos en Tapia y col. (2004) y Armendariz y col. (2006) describen un total de 282 transcritos que, como se señaló en la introducción, parecen ser activados en respuesta a un exceso de cobre en los fibroblastos mt+ y mt-. Estos dos artículos conformaron la base para generar una lista de genes que podrían conferir protección a una célula frente a cargas suprafisiológicas de cobre, genes cuyos cambios de abundancia fuesen analizados mediante qPCR con el objeto de confirmar las respuestas previamente descritas en condiciones de exceso del metal. Los criterios de inclusión estuvieron basados en gran medida en el número de publicaciones asociadas a cada gen y la importancia asignada a su producto génico en la capacidad para conferir resistencia frente a inductores de estrés tales como metales o agentes oxidantes. En algunos casos, también se consideró el nivel de conocimiento disponible respecto a sus mecanismos de regulación transcripcional. La Tabla 3, que describe los 12 genes seleccionados, incluye además 3 potenciales genes de expresión invariable o “housekeepings”, tradicionalmente utilizados como elementos de referencia para la normalización de datos de qPCR. Estos son, actina (Bact, Schmittgen y Zakrajsek, 2000),

gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (g3pdh, Schmittgen y Zakrajsek, 2000) y la proteína acídica ribosomal 0 (rplp0, Dheda y col., 2004). Los resultados de la cuantificación de los respectivos mensajeros por qPCR permitirán, en primera instancia, establecer los patrones de respuesta de cada transcrito en los fibroblastos mt⁺ y mt⁻ y determinar si existen diferencias en los niveles de abundancia entre líneas celulares, y en adición, validar los resultados de otros estudios donde fueron utilizadas técnicas de menor fidelidad (macro y microarreglos), los que además utilizaron solo réplicas técnicas para analizar la expresión génica del mismo modelo experimental (Armendáriz y col., 2006, Tapia y col., 2004).

Gen	Descripción	Inducción por cobre
β act	Elemento de referencia	-
g3pdh	Elemento de referencia	-
rplp0	Elemento de referencia	-
mt1	Almacenamiento de cobre y zinc	Tapia y col., 2004
znt1	Transportador de eflujo de zinc	?
sod1	Superóxido \rightarrow Peróxido (cofactor Cu)	Tapia y col., 2004
ccs	Transfiere el cobre a Sod1	Tapia y col., 2004
hsp105	Regula la actividad de hspal α /hspa8	armendáriz y col., 2006
hspca	Chaperona involucrada en plegamiento proteico y el secuestro de proteínas dañadas	Armendáriz y col., 2006
hspa8	Se une a proteínas nacientes para facilitar su plegamiento	Armendáriz y col., 2006
hspal α	Previene la agregación y media el plegamiento de proteínas	Armendariz y col., 2006
ubb	Ubiquitina	?
ubc	Ubiquitina	Armendariz y col., 2006
uba52	Ubiquitina	Armendariz y col., 2006
mdm2	Ubiquitin ligasa que tiene como blanco a p53	Armendariz y col., 2006

Tabla 3. Genes seleccionados para análisis de abundancia por qPCR. La tabla presenta el símbolo identificador de cada uno de los genes seleccionados para los análisis de expresión en fibroblastos mt+ y mt- expuestos a cobre, junto con una breve reseña de la función de sus respectivos productos génicos y una referencia, si corresponde, de un estudio donde previamente ha sido reportado un aumento en la abundancia del transcrito en respuesta a un exceso de cobre. El guión (-) indica que el gen ha sido previamente utilizado como normalizador, mientras que el signo de interrogación (?) señala que se desconocen reportes que describan la respuesta transcripcional del gen en cuestión frente a cobre.

1.2. Análisis de regiones promotoras

A fin de reconocer potenciales sitios de unión para los factores de transcripción MTF-1 y HSF-1 en las regiones promotoras de los genes seleccionados y profundizar en las posibles interpretaciones de los resultados de cuantificación de sus respectivos mensajeros, fueron empleados conjuntamente los programas MEME (Multiple Expectation-maximization for Motif Elicitation) y MAST (Motif Alignment Search Tool) (Bailey y col., 1997). El primero permite el reconocimiento de “secuencias sobre

representadas”, es decir, secuencias de nucleótidos que difieren estadísticamente del ruido general de la región promotora y cuya presencia difícilmente puede ser atribuida al azar. La generación de patrones consenso que identificasen a estas regiones permitió, a través de MAST, detectar nuevos potenciales sitios de unión que cumplieren con las características del patrón original. Debido a ciertas discrepancias detectadas en la base de datos de NCBI en la asignación del origen de la transcripción, las regiones a analizar fueron capturadas desde el inicio de la traducción, en una ventana arbitraria de 2000 pares de bases río arriba. El programa MEME fue entrenado para detectar la presencia de secuencias tipo MRE a través de la región río arriba del gen de *mt1*, lo que, en concordancia con la literatura (Stuart y col., 1984), arrojó como resultado la presencia de 4 sitios tipo TGCRNC, 3 en la hebra + y 1 en la hebra – (Figura 1). La búsqueda de este patrón en el resto de las regiones promotoras de los genes en la Tabla 3 permitió la identificación de 2 regiones tipo MRE para *znt1*, también previamente descritas (Palmiter y Findley, 1995), lo que sirvió como control positivo de la capacidad de detección del sistema. Además fueron encontrados 2 sitios únicos río en la región río arriba de los genes *mdm2* y *hsp105*, respectivamente. Aunque los genes blanco de MTF-1 suelen presentar más de un sitio MRE en su región promotora, secuencias sintéticas con una sola repetición del consenso aún conservan la capacidad de unirse *in vitro* a este factor de transcripción (Searle, 1990), lo que deja abierta la posibilidad de que MTF-1 esté involucrado en la regulación transcripcional de *hsp105* y *mdm2*. El entrenamiento de MEME para detectar regiones tipo HSE (repeticiones del patrón nGAAnnCTTn) con

hspca y hsp105 y la posterior búsqueda del consenso a través de MAST (Figura 1) sólo entregó como resultado la identificación de regiones previamente reportadas río arriba de los genes hsp105 (Yasuda y col., 1999), hspca (Dale y col., 1997), hspal_a (Perry y col., 1994) y hspa₈ (Wilke y col., 2000). Mediante las mencionadas herramientas, no fue posible detectar ningún potencial sitio de unión más allá de 700 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la traducción.

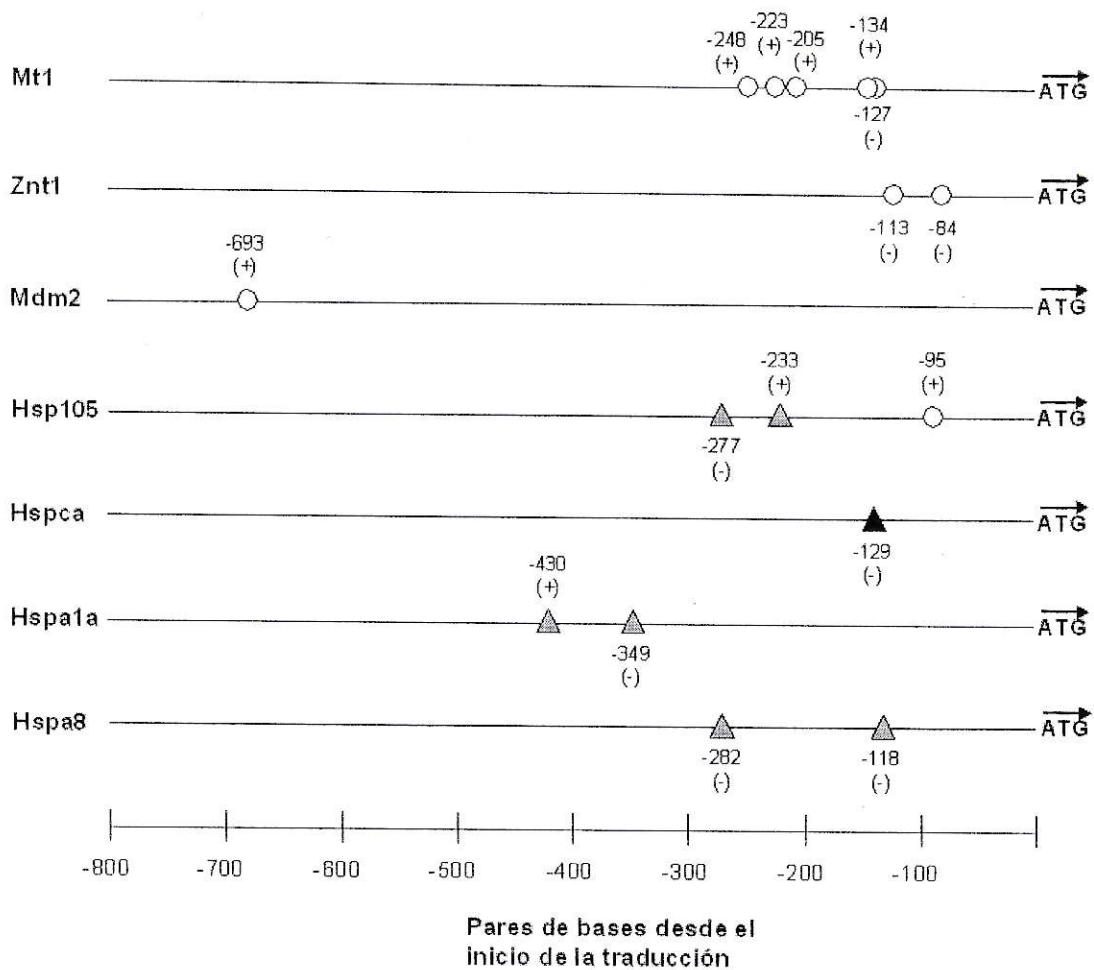


Figura 1. Análisis de regiones promotoras. El esquema ilustra los potenciales sitios de unión detectados a través de los programas MEME y MAST para MTF-1 y HSF-1, en los 800 pares de bases río arriba del inicio de la traducción de los genes *mt1*, *znt1*, *mdm2*, *hsp105*, *hspca*, *hspa1a* y *hspa8*. Los números sobre o bajo cada símbolo indican la distancia del sitio en pares de bases desde el codón ATG. (+) y (-) representan la localización del sitio en la hebra + ó -. ○: MRE (TGCRNC), ▲: HSE 4x (2 repeticiones de nGAAnnTTCn), ▲: HSE 6x (3 repeticiones de nGAAnnTTCn).

1.3. Extracción de RNAs y síntesis de cDNAs

Para posibilitar el análisis de la expresión génica en fibroblastos mt⁺ y mt⁻ sometidos a cobre por sobre los niveles fisiológicos, ambas líneas celulares fueron expuestas durante 48 horas a 50 y 100 μ M de Cu:His. Estos tratamientos fueron realizados en triplicado, y se incluyó además un grupo control, al que no le fue suministrado suplemento de Cu:His. El RNA de estos fibroblastos fue aislado y utilizado como sustrato para la síntesis de cDNA. Dada la distorsión que podía arrastrar en posteriores análisis el emplear RNAs parcialmente degradados o contaminados, cada una de las muestras fue sometida a diversos controles que permitiesen asegurar su adecuada calidad. En primera instancia, la electroforesis en geles denaturantes de agarosa permitió verificar la presencia de los RNAs ribosomales 28S y 18S, evidenciada en dos bandas bien definidas, y una tercera banda de menor tamaño correspondiente al 5S. La relación entre las intensidades de las bandas 28S y 18S debe estar entre 1,5-2,5:1 (Sambrook y Russell, 2001). El panel A de la Figura 2 presenta la separación electroforética de RNAs de fibroblastos mt⁺ y mt⁻ que cumplen las características mencionadas. Otro criterio de entrada radicó en las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/240 nm, cuyos valores dependen de la abundancia de proteínas y fenoles, respectivamente, contaminantes que pueden interferir con la actividad de la transcriptasa reversa en la síntesis de cDNA. Para el cociente 260/280 nm el rango de tolerancia es de entre 1,8 y 2,1, mientras que para 260/240 nm se permiten índices entre 1,7 y 1,9 (Sambrook y col., 1989). Las lecturas para estos dos

cuocientes, obtenidas para el mismo grupo de muestras del panel A, se detallan en el panel B en conjunto con la masa total de RNA extraído en cada caso, y según se aprecia, las fluctuaciones de ambos valores son acordes con los límites descritos. A continuación cada uno de los RNAs fue sometido a una reacción de transcripción reversa. A fin de verificar la capacidad de detectar la presencia de algunos de los transcritos de interés en los cDNAs de hebra simple así generados, se efectuaron reacciones de PCR con partidores específicos para g3pdh y mt1 en cada una de las muestras de cDNA. El panel C de la Figura 2 presenta las bandas electroforéticas de estos amplicones.

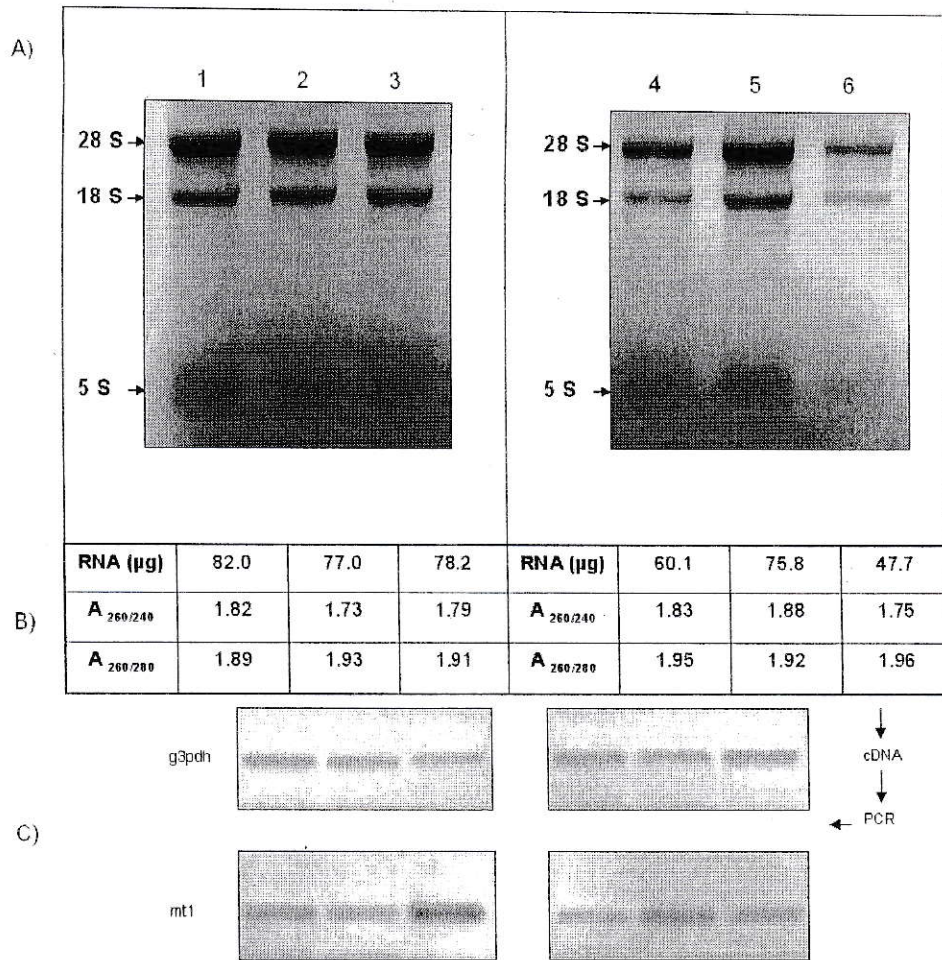


Figura 2. Verificación de la calidad de los RNAs y cDNAs. El panel A presenta la electroforesis en un gel denaturante de agarosa al 1,5% de RNAs extraídos desde fibroblastos mt+ (carriles 1, 2 y 3) y mt- (carriles 4, 5 y 6). El panel B detalla la cantidad de RNA total (μg) producto de cada extracción, además de las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/240 nm. El panel C presenta las bandas electroforéticas de amplicones para g3pdh y mt1 generados a partir de cDNAs de diferentes concentraciones, provenientes de los RNAs extraídos.

1.4. Generación de estándares para qPCR

Con el objeto de posibilitar la cuantificación de los transcritos enumerados en la Tabla 3 en muestras de cDNAs de fibroblastos mt+ y mt- expuestos a concentraciones suprafisiológicas de cobre, los mencionados cDNAs fueron sometidos a una reacción de PCR con partidores específicos para cada uno de los genes de interés. Cada uno de los amplicones fue separado electroforéticamente en geles de agarosa al 1-1,5%, aislado a través de una columna de purificación y posteriormente cuantificado por fluorimetría. A lo largo de este proceso fue posible además ratificar el tamaño predicho de cada amplicón. Como resultado, se obtuvo una colección de 15 productos de PCR de alta pureza y concentración conocida, de la que se muestra un ejemplo representativo en la Figura 3.

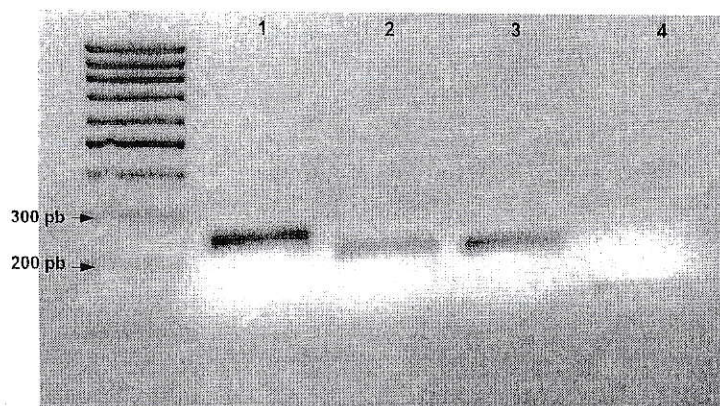


Figura 3. Vista parcial de la colección de estándares para qPCR. Electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% de productos de PCR aislados mediante columnas de purificación. Carril PM: marcador de peso molecular, carril 1: uba52, carril 2: actina, Carril 3: hsp105, Carril 4:rplp0.

1.5. Optimización de las condiciones de reacción de qPCR

El empleo de la técnica de qPCR puede involucrar el ajuste de diversas condiciones, tales como la concentración de partidores, el tiempo y temperatura de asociación de los partidores y la concentración de magnesio, con el objeto de poder amplificar el transcrito de interés y hacerlo en ausencia de productos secundarios de amplificación. Gracias a ello, es posible cuantificar fidedignamente la abundancia de moléculas de DNA presentes en una proporción infinitesimal de una mezcla compleja de ácidos nucleicos. El sistema empleado (Sybrgreen I, Invitrogen) demostró ser especialmente sensible a las concentraciones de magnesio presentes en la reacción. Ello obligó a encontrar la cantidad óptima de magnesio a utilizar para cuantificar cada uno de los transcritos que se encuentran en la Tabla 3. La Figura 4 ilustra los resultados de pruebas de amplificación de 2 estándares purificados, amplicones de los transcritos *mdm2* (panel A) y *znt1* (panel B). Queda en evidencia que el grado de sensibilidad a las concentraciones de este elemento varía entre pares de partidores. El caso de *znt1* es particularmente dramático, dado que las dosis mínimas (3 y 4 mM) no posibilitan la generación de productos de amplificación (representada en la figura como un aumento de la fluorescencia en el eje Y), mientras que la dosis máxima (6 mM) la inhibe en gran medida. Por ello resultó indispensable repetir este procedimiento para cada uno de los 15 genes cuya abundancia fue determinada en el presente trabajo, a fin de encontrar la concentración de magnesio que produjese la amplificación más temprana y la saturación más tardía.

Un segundo punto de control radicó en la verificación de la ausencia de amplicones inespecíficos, evidenciada en la presencia de un máximo único en la curva de denaturación arrojada por el programa que proporciona la interfaz de control del termociclador (Lightcycler v3.5, Roche) y la inspección visual de la corrida electroforética de los productos de qPCR (datos no mostrados). Cuando se hizo necesario, la aparición de especies de esta clase fue evitada al elevar la temperatura de asociación de los partidores.

El ajuste de estas condiciones redundó en la obtención de curvas de amplificación donde la eficiencia de la reacción fluctuó entre 1,83 y 2,07, calculada a través de la fórmula $E_r = 10^{-1/m}$, donde m es la pendiente de la curva de calibración. La eficiencia representa el factor en el que aumenta el número de copias del amplicón durante la fase exponencial de la reacción de PCR y debiese ser, por tanto, cercana a un valor de 2 (panel C: *mdm2*, panel D: *znt1*). La tolerancia establecida en la literatura está en el rango de 1,8 – 2,1 (Gallup y Ackermann, 2006), lo cual corrobora la validez de los resultados obtenidos en los análisis cuantitativos efectuados en el presente trabajo.

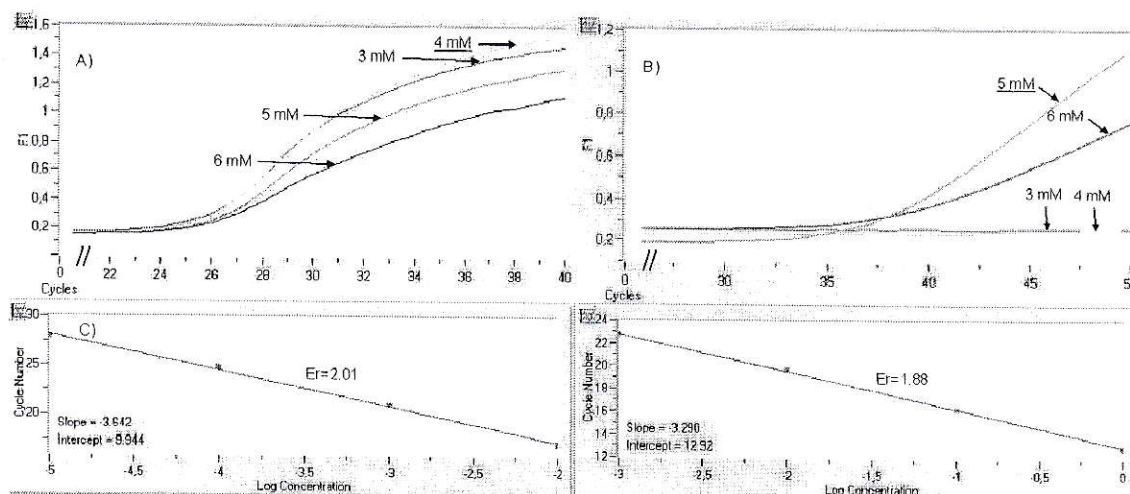


Figura 4. Efecto de la concentración de magnesio en la amplificación por qPCR. Los paneles A, B, C y D corresponden a una captura de la gráfica ofrecida por el programa que controla el termociclador de qPCR (Lightcycler v3.5, Roche). A (*mdm2*) y B (*znt1*) representan la cinética de amplificación 1 pg de producto de PCR purificado a distintas concentraciones de MgCl₂, indicadas en la figura. El valor subrayado corresponde al seleccionado como más adecuado para análisis posteriores. El eje X, rotulado como *Cycles*, indica el número de ciclos. En Y (F1) se encuentran los valores de fluorescencia. C (*mdm2*) y D (*znt1*) grafican las curvas de calibración obtenidas con 1000-0.01 fg de sustrato (producto de PCR purificado) bajo las concentraciones de magnesio seleccionadas. El eje X representa el logaritmo de la concentración de sustrato y el Y, el número de ciclos. Se indican los valores de la pendiente de la recta (*slope*), el intercepto (*Intercept*) y la eficiencia de la reacción (*Er*).

1.6. Identificación de genes de referencia

La cuantificación de la abundancia de determinados transcritos mediante qPCR involucra una serie de potenciales fuentes de error experimental, tales como la existencia de diferencias en la cantidad de RNA utilizado para la transcripción reversa, o en la eficiencia de esta reacción, las que aunque son controladas, no son dominadas por completo. Ello dificulta la comparación directa de las mediciones entre una y otra muestra, inconveniente que es tradicionalmente superado a través del uso de una referencia contra la cual se establece el comportamiento relativo de cada medida. Esta referencia corresponde a un transcrito en teoría “invariante”, es decir, cuya abundancia

no se ve alterada frente a los tratamientos que involucra el diseño experimental en particular. Para identificar un transcrito que pudiese entonces servir de referencia para las mediciones de qPCR propuestas, fueron registrados los niveles actina, g3pdh y rplp0, genes previamente utilizados como elementos de normalización en estudios de expresión génica en células eucariontes (Schmittgen y Zakrajsek, 2000, Dheda y col., 2004). La Tabla 4 detalla el grado de variabilidad en la abundancia de estos 3 transcritos en 18 cDNAs de fibroblastos mt⁺ y mt⁻ tratados con 0, 50 y 100 μ M de Cu:His. Los valores de la media de las veces de cambio respecto al promedio y coeficiente de variación observados para actina, los menores del grupo, indican que este transcrito es quien presenta las fluctuaciones más sutiles en las condiciones estudiadas, y en consecuencia, fue utilizado como elemento de referencia para la normalización de la cuantificación de los genes de interés.

Gen	Media de las veces de cambio respecto al promedio	Coefficiente de variación
β act	1.50	0.25
g3pdh	2.06	0.56
rplp0	1.61	0.38

Tabla 4. Variabilidad en las cuantificación de los transcritos de actina, g3pdh y rplp0. La tabla presenta la media de las veces de cambio y el respectivo coeficiente de variación, calculado como el cociente entre la desviación estándar y la media, de la cuantificación por qPCR de los transcritos de actina, g3pdh y rplp0 en 18 muestras cDNAs provenientes de fibroblastos silvestres y mutantes para mt tratados con 0, 50 y 100 μ M de Cu-His.

1.7. Cuantificación por qPCR de la abundancia de transcritos en fibroblastos expuestos a cobre

Las Figuras 5, 6 y 7 resumen los resultados de la cuantificación de los transcritos analizados en el presente trabajo, clasificados en las categorías de metabolismo de metales/estrés oxidativo, estrés térmico y ubiquitinación. El análisis por qPCR se efectuó en 18 muestras de cDNA, provenientes de la exposición durante 48 horas a 0, 50 y 100 μM de Cu:His, en tres réplicas biológicas por línea celular. Los valores de abundancia de cada transcrito fueron interpolados, mediante la inclusión de una curva de calibración generada con el correspondiente producto de PCR purificado, y normalizados en función de los niveles de transcrito de actina determinados en cada muestra.

Los paneles A, B y C de la Figura 5 muestran que en la línea silvestre el promedio de la abundancia relativa de *mt1*, *sod1* y *ccs* aumentó en forma correlativa a la cantidad de cobre suministrada en el medio de cultivo. La abundancia de estos tres genes difiere significativamente entre las células expuestas a Cu:His 100 μM y las células mantenidas sin suplemento de cobre (T de Student, $p < 0,05$), con valores de veces de cambio de 2,22, 1,43 y 1,64, respectivamente. El análisis estadístico establece además que, para esta dosis de cobre, la abundancia relativa de *mt1* y *sod1* es significativamente mayor (2,67 y 2,65 veces, respectivamente) en los fibroblastos silvestres respecto a los mutantes (T de Student, $p < 0,05$). En la línea *mt-* los niveles de estos 3 transcritos no exhibieron cambios significativos de abundancia. Por el contrario, *znt1* (panel D) registró un incremento estadísticamente relevante, aunque distinto en magnitud (T de

Student, $p < 0,05$), en las dos líneas celulares, tanto con 50 (mt+: 4,29 veces, mt-: 2,01 veces) como 100 μM de Cu:His (mt+: 3,89 veces, mt-: 2,88 veces).

La abundancia de hsp105, hspca y hspa1a, paneles B, C y D de la Figura 6) también registró en los fibroblastos mt+ un alza al aumentar la dosis de cobre. Los valores promedio de abundancia relativa de estos 3 transcritos para la exposición a Cu:His 100 μM fueron, respectivamente, 2,71, 1,63 y 2,14 veces mayores que el control, y de acuerdo a la prueba de T de Student ($p < 0,05$), estadísticamente diferentes. Ninguno de estos transcritos presentó cambios significativos frente a los tratamientos con cobre en los fibroblastos mt-. El contraste entre líneas celulares indica que en los fibroblastos silvestres la abundancia relativa de hsp105 (panel B) y hspca (panel C) fue, a una dosis de Cu:His 100 μM , significativamente mayor a la de la contraparte mutante (2,02 y 1,83 veces, respectivamente). En cambio, los niveles observados de hspa1a (panel D) fueron significativamente menores en los fibroblastos mt+ en todas las concentraciones de cobre estudiadas (T de Student, $p < 0,05$). Esta situación se invirtió para hspa8 (panel A), transcrito que, pese a no presentar ninguna alteración significativa con los tratamientos de cobre en ninguna de las líneas celulares, arrojó una abundancia 10 veces más alta en los fibroblastos mt+ no tratados con cobre, y 6,17 veces mayor, respecto a la línea mt-, para el tratamiento con 50 μM de Cu:His, ambas diferencias de relevancia estadística de acuerdo a la prueba de T de Student ($p > 0,05$).

La Figura 7 muestra, en la línea silvestre expuesta a cobre, un aumento en el promedio de la abundancia relativa de ubb y ubc (paneles A y B). Este aumento no

marca una diferencia estadística, sin embargo, entre los niveles de transcrito de los fibroblastos tratados y control (T de Student, $p > 0,05$). No obstante, la abundancia relativa de ubb y ubc a una concentración de Cu:His de 100 μM difiere (T de Student, $p > 0,05$) entre los fibroblastos mt+ y mt- (respectivamente, 1,50 y 12,3 veces mayor en la línea silvestre). Por otra parte, mdm2 (panel D) registró un alza significativa (T de Student, $p > 0,05$) en los fibroblastos silvestres expuestos a 100 μM de Cu:His (2,06 veces) y, al igual que ubb y ubc, no presentó variaciones significativas en la línea mutante. La cuantificación de uba52 (panel C) no mostró diferencias significativas en los niveles de este transcrito ni en respuesta a cobre en ninguna de las dos líneas celulares, ni tampoco entre ellas, de acuerdo a la prueba de T de Student.

En conjunto, los resultados expuestos permiten corroborar la presencia y ausencia de cambios de abundancia de transcritos que fueron analizados previamente en reportes que emplearon macroarreglos (Tapia y col., 2004) o microarreglos (Armendáriz y col., 2006) para estas mismas líneas celulares expuestas a cobre. El comportamiento de otros 2 transcritos, ubb y znt1, no había sido descrito en condiciones de exceso del metal. El análisis comparado de los datos obtenidos en esta tesis y los trabajos precedentes se resume en las Tablas 5 y 6, donde se observa una correspondencia de un 67% de los datos para Cu:His 50 μM , y 69% para Cu:His 100 μM . Pese a la diferencia de cerca de la tercera parte en las tendencias registradas, los cambios observados refuerzan la idea de que la célula, en ausencia de metalotioneína, sufre una alteración en la capacidad de regular los niveles de transcritos asociados a diversos mecanismos de

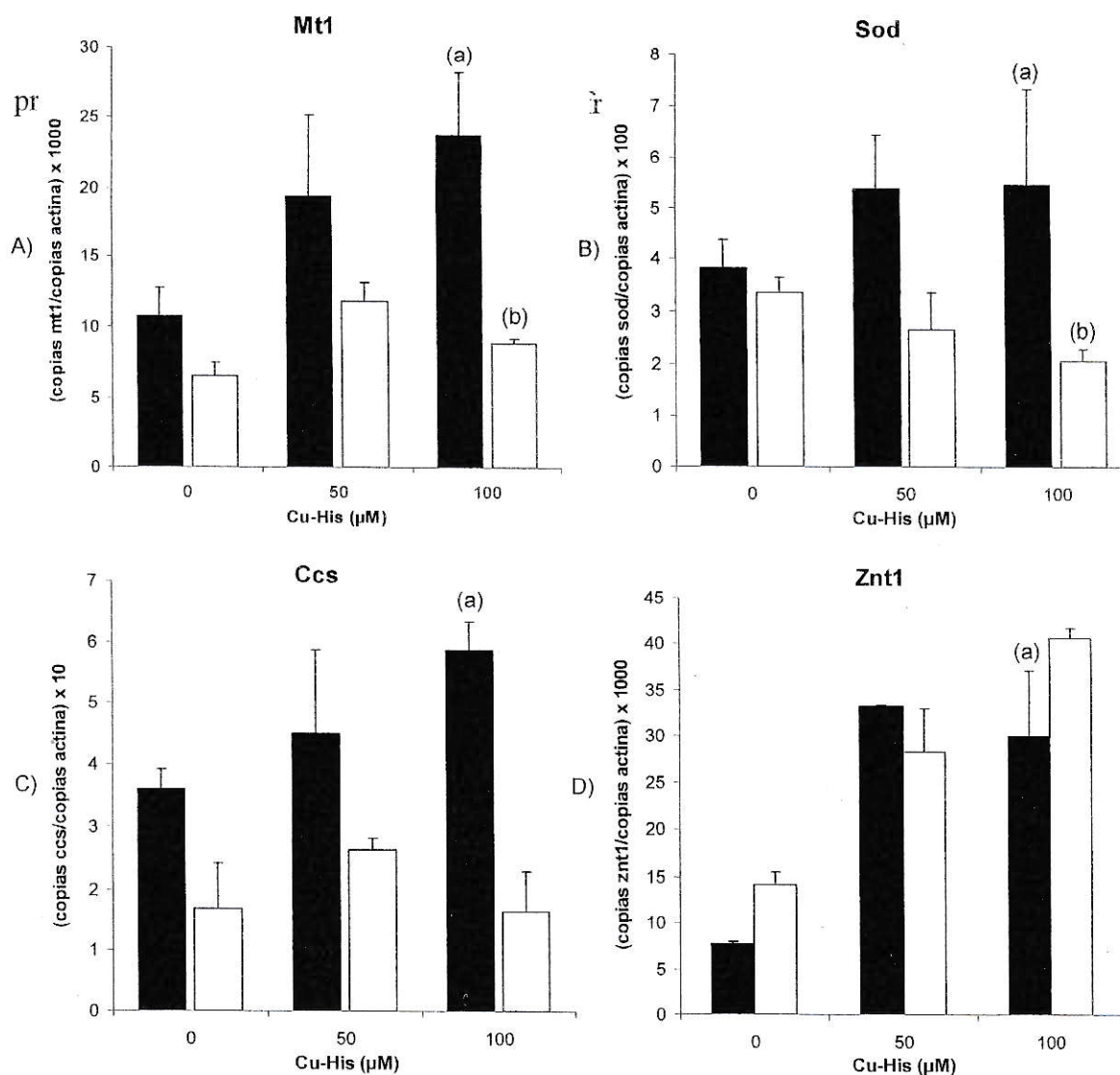


Figura 5. qPCR para transcritos vinculados a metabolismo de metales en fibroblastos *mt+* y *mt-* expuestos a cobre. En los paneles A, B, C y D se presenta, respectivamente, la abundancia de los transcritos *mt1*, *sod1*, *ccs* y *znt1*, normalizada respecto a la abundancia del transcrito de actina en cDNAs provenientes de fibroblastos mutantes (□) y silvestres (■) cultivados durante 48 horas en presencia de medio suplementado con Cu:His 0, 50 ó 100 μM. Los valores presentados corresponden al promedio de 2-3 réplicas biológicas y el error estándar respectivo. La letra a indica que el valor es estadísticamente diferente al registrado para el control (sin Cu:His) de la misma línea celular, y la letra b, que el valor en la línea mutante es estadísticamente diferente al de la línea silvestre frente a igual dosis de Cu según la prueba de T ($p < 0,05$).

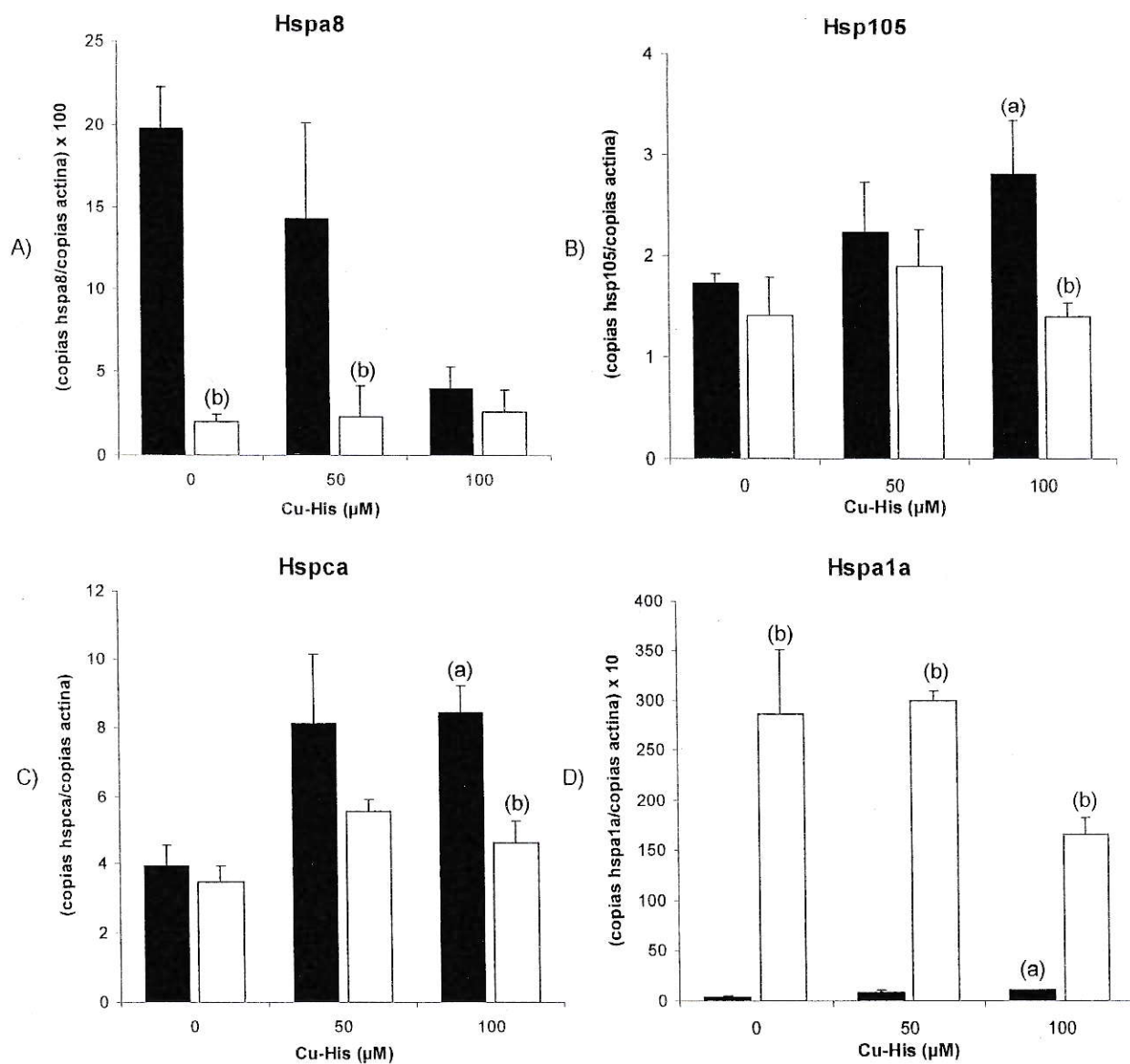


Figura 6. Cuantificación por qPCR de transcritos para proteínas de estrés térmico en fibroblastos *mt+* y *mt-* expuestos a cobre. Los transcritos de los genes *hspa8*, *hsp105*, *hspca* y *hspa1a*, en los paneles A, B, C y D, respectivamente, fueron cuantificados por qPCR en tiempo real en fibroblastos mutantes (□) y silvestres (■) cultivados durante 48 horas en presencia de medio suplementado con Cu:His 0, 50 ó 100 μM. Se presentan los valores promedio de 2-3 réplicas biológicas normalizados por la abundancia del transcrito de actina en cada muestra y el respectivo error estándar. La letra a indica que el valor es estadísticamente diferente al registrado para el control (sin Cu:His) de la misma línea celular, y la letra b, que el valor en la línea mutante es estadísticamente diferente al de la línea silvestre frente a igual dosis de Cu según la prueba de T ($p < 0,05$).

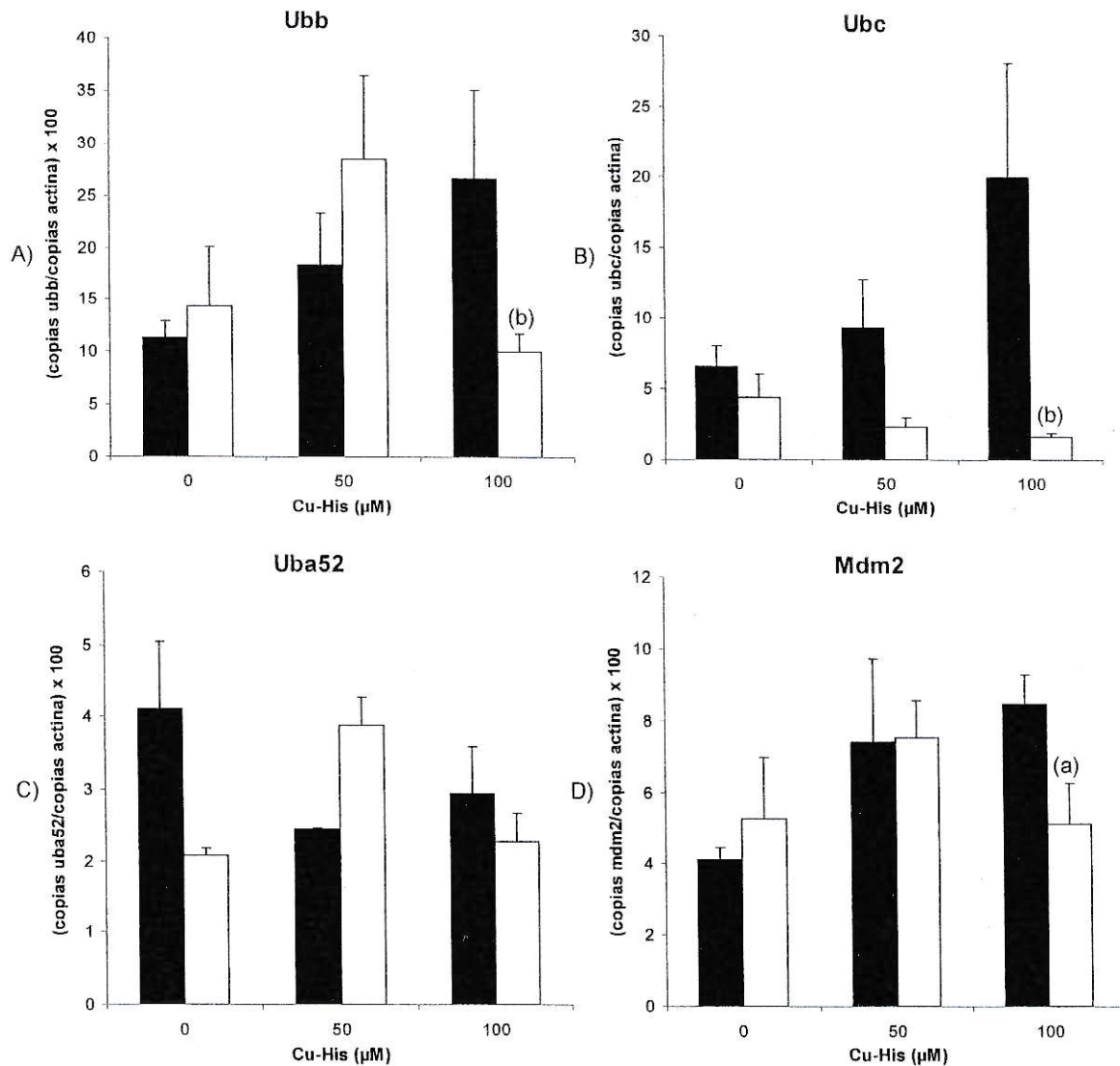


Figura 7. Cuantificación por qPCR de transcritos para proteínas del sistema de ubiquitinación en fibroblastos *mt+* y *mt-* expuestos a cobre. Los transcritos de los genes *ubb*, *ubc*, *uba52* y *mdm2*, respectivamente en los paneles A, B, C y D, fueron cuantificados por qPCR en tiempo real en fibroblastos mutantes (□) y silvestres (■) cultivados durante 48 horas en presencia de medio suplementado con Cu:His 0, 50 ó 100 μM . Se presentan los valores promedio de 2-3 réplicas biológicas normalizados por la abundancia del transcrito de actina en cada muestra y el respectivo error estándar. La letra a indica que el valor es estadísticamente diferente al registrado para el control (sin Cu:His) de la misma línea celular, y la letra b, que el valor en la línea mutante es estadísticamente diferente al de la línea silvestre frente a igual dosis de Cu según la prueba de T ($p < 0,05$).

Cu-His 50 μ M

	mt+		mt-	
	Arreglo	qPCR	Arreglo	qPCR
hspa8	↑	sc	sc	sc
hspa1a	↑	sc	sc	sc
hspca	↑	sc	sc	sc
hsp105	↑	sc	sc	sc
ubc	sc	sc	sc	sc
uba52	sc	sc	sc	sc
mdm2	sc	sc	sc	sc
fbx011	sc	sc	sc	sc

Tabla 5. Comparación de los análisis de microarreglos y qPCR para fibroblastos mt+ y mt- expuestos a Cu:His 50 μ M por 48 horas. La tabla resume la tendencia de los cambios en los niveles de abundancia registrados para 8 transcritos comunes entre los microarreglos de Armendáriz y col., 2006, donde se emplearon triplicados técnicos (réplicas de las mediciones) para identificar diferencias significativas mediante el análisis de valores fuera de tendencia (Loguinov y col., 2004), y el presente trabajo, que utilizó la prueba de T de Student para el contraste de triplicados biológicos (réplicas experimentales). ↑: aumento en la abundancia del transcrito, sc: sin cambio.

Cu-His 100 μ M

	mt+		mt-	
	Arreglos	qPCR	Arreglos	qPCR
mt1	↑(24h)	↑	↓(24h)	sc
sod1	↑(24h)	↑	↓(24h)	sc
ccs	↑(24h)	↑	↓(24h)	sc
hspa8	↑	sc	sc	sc
hspa1a	↑	↑	↑	sc
hspea	↑	↑	sc	sc
hsp105	↑	↑	sc	sc
ube	↑	sc	sc	sc
uba52	↑	sc	↑	sc
mdm2	↑	↑	sc	sc
fbxo11	↑	sc	sc	sc

Tabla 6. Comparación de los análisis de microarreglos, macroarreglos y qPCR para fibroblastos mt+ y mt- expuestos a Cu:His 100 μ M por 24 ó 48 horas. La tabla presenta las variaciones positivas (↑), negativas (↓) o la ausencia de cambio (sc) en los niveles de 11 transcritos cuya expresión fue analizada en fibroblastos silvestres y mutantes con 24 horas (24h) (Tapia y col., 2004) ó 48 horas (Armendáriz y col., 2006 y el presente trabajo) de exposición a Cu:His 100 μ M. Los resultados de Tapia y col. provienen de macroarreglos sin réplicas experimentales ni biológicas, mientras que en Armendáriz y col. fueron usados microarrays con 3 réplicas técnicas y un análisis de valores fuera de tendencia. El presente trabajo empleó 3 réplicas biológicas, qPCR y el análisis de T de Student.

2. Efecto de temperatura y cobre sobre fibroblastos *mt+* y *mt-*

En vista de los resultados expuestos, y con el objeto de probar la hipótesis de que la ausencia de metalotioneína no altera solo la capacidad de la célula para almacenar en forma segura el cobre intracelular y responder transcripcionalmente a concentraciones suprafisiológicas de cobre, si no también a otras condiciones que ponen en riesgo la integridad celular, se decidió registrar la viabilidad, la acumulación de cobre, la abundancia de especies reactivas y las variaciones en los niveles de 3 transcritos seleccionados (*mt1*, *hspca* y *hspa1a*) en condiciones de exceso de cobre y temperatura en el modelo de fibroblastos mutantes y silvestres para metalotioneína. El diseño experimental, que involucra una serie temporal de 0, 24 y 48 horas, está esquematizado en la Figura 8. Fibroblastos *mt+* y *mt-* fueron expuestos a un pulso inicial de temperatura de 42 °C durante 90 minutos, inmediatamente devueltos a 37 °C y cultivados en presencia (CuT) o ausencia (T) de Cu:His 100 µM por 24 ó 48 horas, para su subsecuente recolección. Un tercer grupo (Cu) recibió el suplemento de Cu:His 100 µM 24 ó 48 horas antes del término, mientras que el grupo control (C) permaneció en condiciones normales de cultivo.

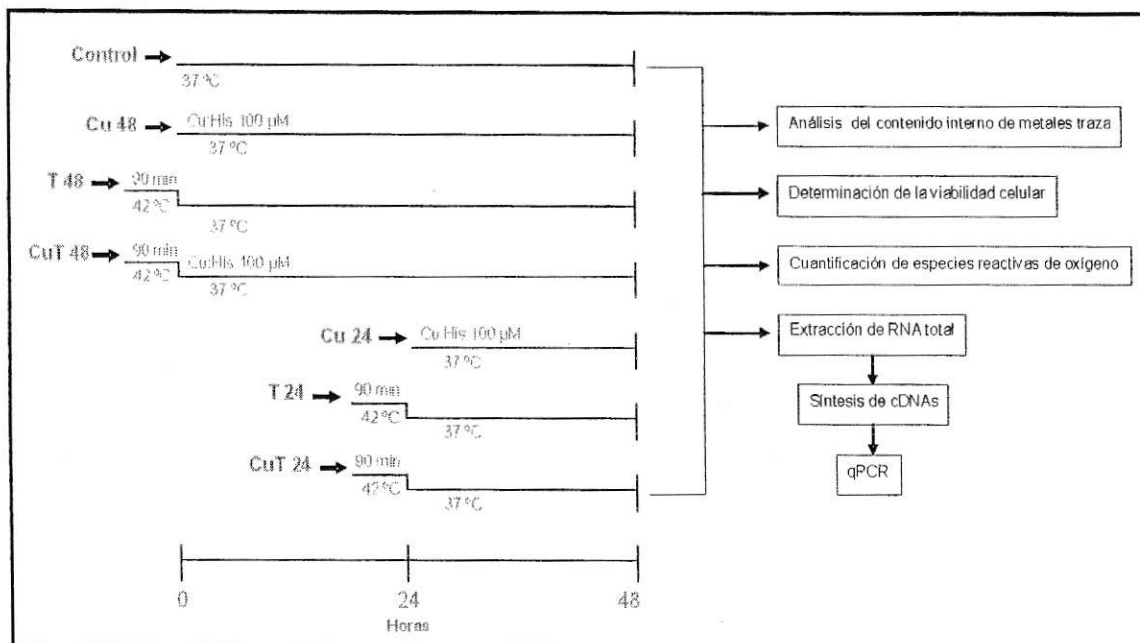


Figura 8. Resumen de la estrategia experimental. Fibroblastos silvestres y mutantes para metalotioneína fueron expuestos a pulsos de temperatura (42° C, 90 min) y exceso de cobre (Cu:His 100 µM por 24 ó 48 horas) en forma separada (Cu, T) o combinada (CuT). Se incluyó un grupo control que permaneció en condiciones estándares de cultivo (C). Una vez concluido el período de tratamiento, los fibroblastos fueron sometidos a los protocolos correspondientes para generar información respecto a la viabilidad, la abundancia de especies reactivas, el contenido de cobre y la cuantificación de transcritos por qPCR.

2.1. Viabilidad

El efecto del suministro de cobre y temperatura por sobre de los niveles fisiológicos en la viabilidad de los fibroblastos *mt+* y *mt-* fue analizado a través del ensayo de MTT (Figura 9, paneles A, B y C). El comportamiento descrito por ambas líneas celulares resultó ser equivalente frente a todas las variables en juego. Mientras que el cobre marcó un detrimento estadísticamente significativo (T de Student, $p < 0,05$) de entre un 12 a 15% (en *mt+* y *mt-*, respectivamente) en la actividad mitocondrial registradas tras 48 horas de exposición a cobre, el pulso de temperatura incidió

positivamente en el registro de MTT a las 24 horas post-tratamiento, momento en que se determinó un incremento cercano a un 25% respecto al control. Este efecto dejó de ser evidente a las 48 horas, donde el valor promedio de la cuantificación de MTT no fue estadísticamente diferente de acuerdo a la prueba de T de Student ($p > 0,05$). El tratamiento conjunto con cobre y temperatura combinó también estas observaciones: tras 24 horas la cuantificación de MTT resultó ser significativamente más alta (18-13%) que la del tiempo 0, mientras que al cabo de 48 horas se registró una disminución de 15% (mt+) y 12% (mt-), de relevancia estadística según la prueba de T de Student ($p < 0,05$). El conteo de células mediante la tinción con azul tripán (paneles D, E y F) no permitió, sin embargo, confirmar estos cambios, y el análisis estadístico de los grupos de datos obtenidos no arrojó ninguna diferencia significativa de acuerdo a la prueba de T de Student. Las posibles razones que pueden explicar esta disparidad serán expuestas en la sección de Discusión del presente trabajo.

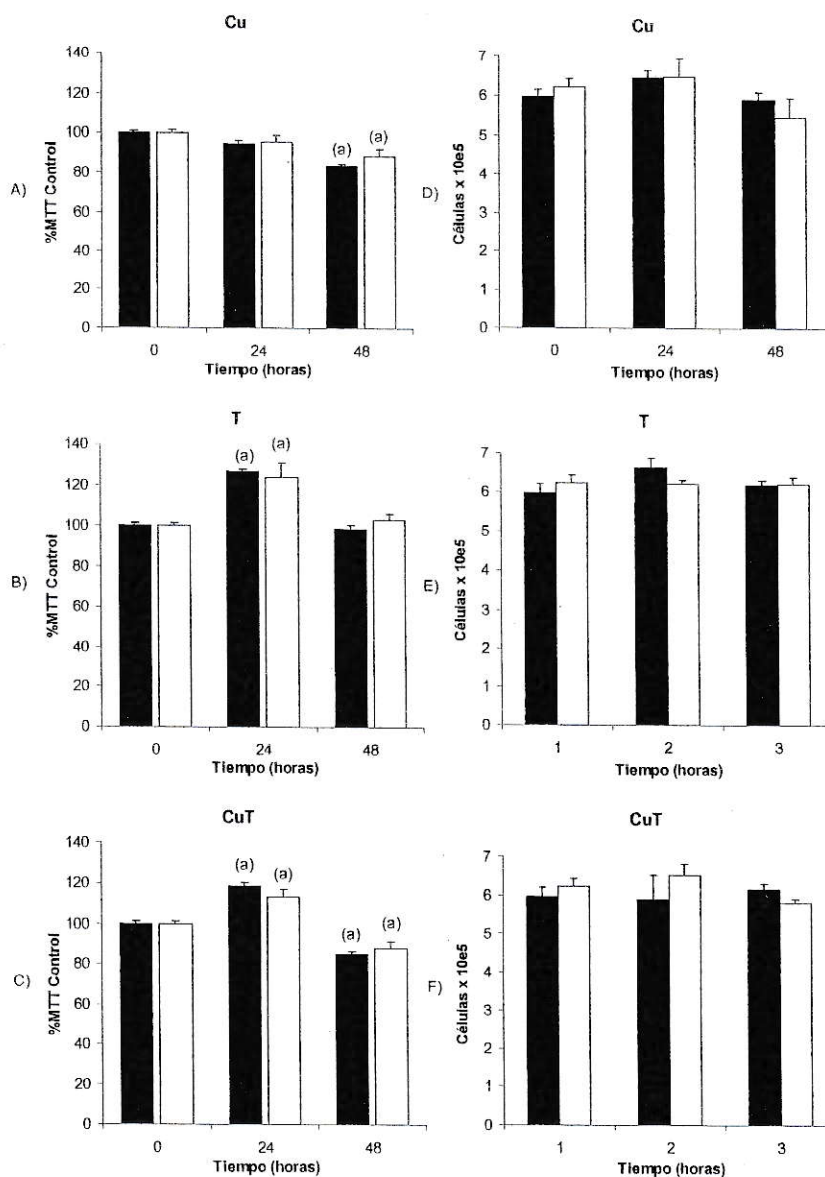


Figura 9. Viabilidad en fibroblastos mt+ y mt- en condiciones de exceso de cobre y alzas de temperatura. Células silvestres y mutantes para metalotioneína fueron expuestas a concentraciones suprafisiológicas de cobre (Cu) y, combinada (CuT) o independientemente (T), a pulsos de temperatura (Figura 16). Los paneles A, B y C representan la cuantificación de la viabilidad celular en las condiciones mencionadas por medio del ensayo colorimétrico de MTT. Para cada línea celular, los valores son expresados porcentualmente en relación al promedio de la lecturas correspondientes a las muestras control. Los paneles D, E y F corresponden al registro del número de células a través de la tinción con azul tripán y su posterior conteo. En ambos paneles, las barras grafican el promedio de 3 réplicas biológicas y su respectivo error estándar. La letra **a** indica que el valor es estadísticamente diferente al registrado para el control (sin Cu:His) de la misma línea celular, y la letra **b**, que el valor en la línea mutante es estadísticamente diferente al de la línea silvestre frente igual dosis de Cu según la prueba de T ($p < 0,05$).

2.2. Abundancia de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno

El nivel de especies reactivas al interior de los fibroblastos fue estimado por medio del fluoróforo diclorofluoresceína – diacetato (DCF-DA), compuesto que, en sistemas biológicos, es sensible a la presencia de ONOO^- , H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$ (Myhre y col., 2003). La cuantificación de la abundancia de especies reactivas mediante el uso del fluoróforo DCF-DA, detallada en la Figura 10, arrojó resultado con un patrón común de cambios en ambas líneas celulares. No obstante, los fibroblastos mt- se distinguen de su contraparte silvestre por los mayores niveles de fluorescencia registrados en forma independiente de la variable establecida – diferencias que estuvieron en el rango de 25-60% y que, acorde a la prueba de T de Student fueron en todos los casos de relevancia estadística ($p < 0.05$). El suministro de cobre (panel A) provocó un aumento significativo en la fluorescencia (T de Student, $p < 0,05$), el que se acrecentó a lo largo del tiempo (mt+:19-26%, mt-:8-14%). En forma opuesta, la temperatura (panel B) provocó una disminución, también significativa (T de Student, $p < 0,05$), en la cuantificación de DCF, que resultó ser estadísticamente más acentuada a las 24 (mt+:65%, mt-:63%) que a las 48 horas (mt+:40%, mt-: 44%). La combinación de cobre y temperatura describió esta misma tendencia, con un detrimento a las 24 horas de 59 (mt+)- 55% (mt-), y de 35 (mt+) -45% (mt-) a las 48 horas. El análisis en conjunto de los resultados obtenidos en ambas líneas celulares indica que, mientras la dosis de Cu:His 100 μM aumentó moderadamente ($< 30\%$) la abundancia de especies reactivas en los fibroblastos en cultivo, la exposición a temperatura tuvo el efecto contrario y con una magnitud más

pronunciada: la reducción en los niveles de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno fue de aproximadamente 2 veces respecto a la condición control. Se observó además que el efecto de la exposición a cobre junto al pulso de temperatura generó cambios en los niveles de especies reactivas cuyo valor fue cercano a la suma aritmética del efecto de ambas variables en forma independiente. Cabe también destacar que en todas las condiciones estudiadas, incluyendo la condición control, se registró un nivel más alto de fluorescencia en los fibroblastos mutantes. Las células mt- parecen entonces tener, incluso bajo una situación normal de cultivo, una carga mayor de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno.

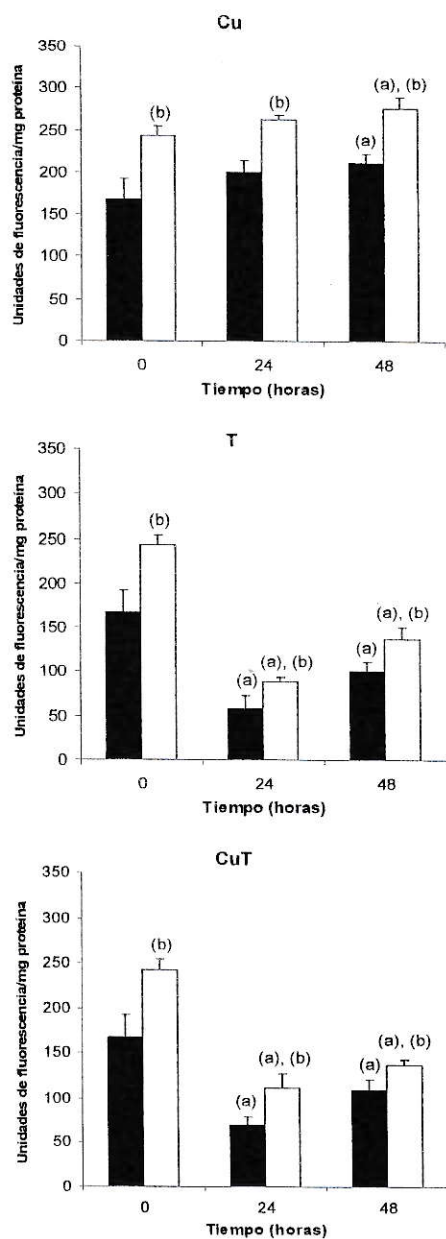


Figura 10. Especies reactivas en células mt+ y mt- sometidos a niveles suprafiológicos de cobre y alzas de temperatura. Fibroblastos silvestres y mutantes para metalotioneína fueron expuestos a Cu:His 100 μ M y pulsos de temperatura en forma independiente (Cu, T) o combinada (CuT) de acuerdo a lo descrito en la Figura 16. La abundancia de especies reactivas fue determinada a través del registro de la fluorescencia emitida tras la incubación con el compuesto DCF-DA. Los valores presentados están normalizados conforme a la abundancia de proteínas en cada muestra, y se presenta el promedio de 4 réplicas biológicas más el respectivo error estándar. La letra **a** indica que el valor es estadísticamente diferente al registrado para el control (sin Cu:His) de la misma línea celular, y la letra **b**, que el valor en la línea mutante es estadísticamente diferente al de la línea silvestre frente igual dosis de Cu según la prueba de T ($p < 0,05$).

2.3. Cuantificación de hspca y hspala

Por medio de la técnica de qPCR se cuantificó la abundancia de los transcritos que codifican para las proteínas de estrés térmico Hspca y Hspala, miembros, respectivamente, de las familias Hsp90 y Hsp70. Los niveles de abundancia del transcrito de actina en condiciones de exceso de cobre y elevación de temperatura presentaron variaciones comparables a las descritas en la Tabla 4 para ambas líneas celulares (datos no mostrados), por lo que los correspondientes valores en cada muestra fueron utilizados como elemento de referencia para normalizar los datos de qPCR. Los paneles A, B y C de la Figura 11 describen el comportamiento de hspca frente a las condiciones de exceso de cobre y alzas de temperatura. Se observó un aumento significativo en la línea silvestre (T de Student, $p < 0,05$) en los niveles de este transcrito a las 24 horas de exposición con Cu:His 100 μM (2,9 veces por sobre el control). La temperatura provocó también a las 24 horas un alza transitoria pero significativa (5,2 veces, T de Student, $p < 0,05$) en la abundancia de hspca, la que a las 48 horas decayó 7,2 veces respecto al control y llegó incluso a ser significativamente menor que la abundancia promedio registrada en las células mt- de acuerdo a la prueba de T (13.8 veces, $p < 0,05$). La ausencia de fluctuaciones de relevancia estadística en la línea mutante frente a cobre y pulsos de temperatura fue revertida al combinar ambas variables, que sí produjeron, a las 24 horas, un incremento (1,5 veces) estadísticamente significativo (T de Student, $p < 0,05$). Del mismo modo, en los fibroastos silvestres el aumento en este punto fue de 3,2 veces. Ninguno de estos cambios se sostuvo como

relevante a las 48 horas de acuerdo a la prueba de T de Student.

Los niveles de hspa1a en la línea mutante no fueron alterados con ninguno de los tratamientos proporcionados; sin embargo, se mantuvieron invariablemente elevados respecto a los registrados en la línea silvestre. Estas diferencias estuvieron en el rango de 9 a 57 veces y fueron, según la prueba de T ($p < 0,05$), de importancia estadística. En la línea silvestre, el cobre determinó el incremento de 2,53 veces en la abundancia promedio del transcrito a las 48 horas de exposición. En cambio, la temperatura no provocó alteraciones que pudiesen ser tomadas en consideración de acuerdo a la prueba de T ($p < 0,05$). Combinados, el cobre y los pulsos de temperatura generaron un aumento en la abundancia del transcrito de hspa1a de 2,9 (24 horas) y 4,5 veces (48 horas) respecto al control, ambas variaciones corroboradas por la prueba de T ($p < 0,05$). Los resultados generados presentan entonces marcadas diferencias en los patrones de abundancia de estos dos genes de estrés térmico en los fibroblastos mt+ y mt-.

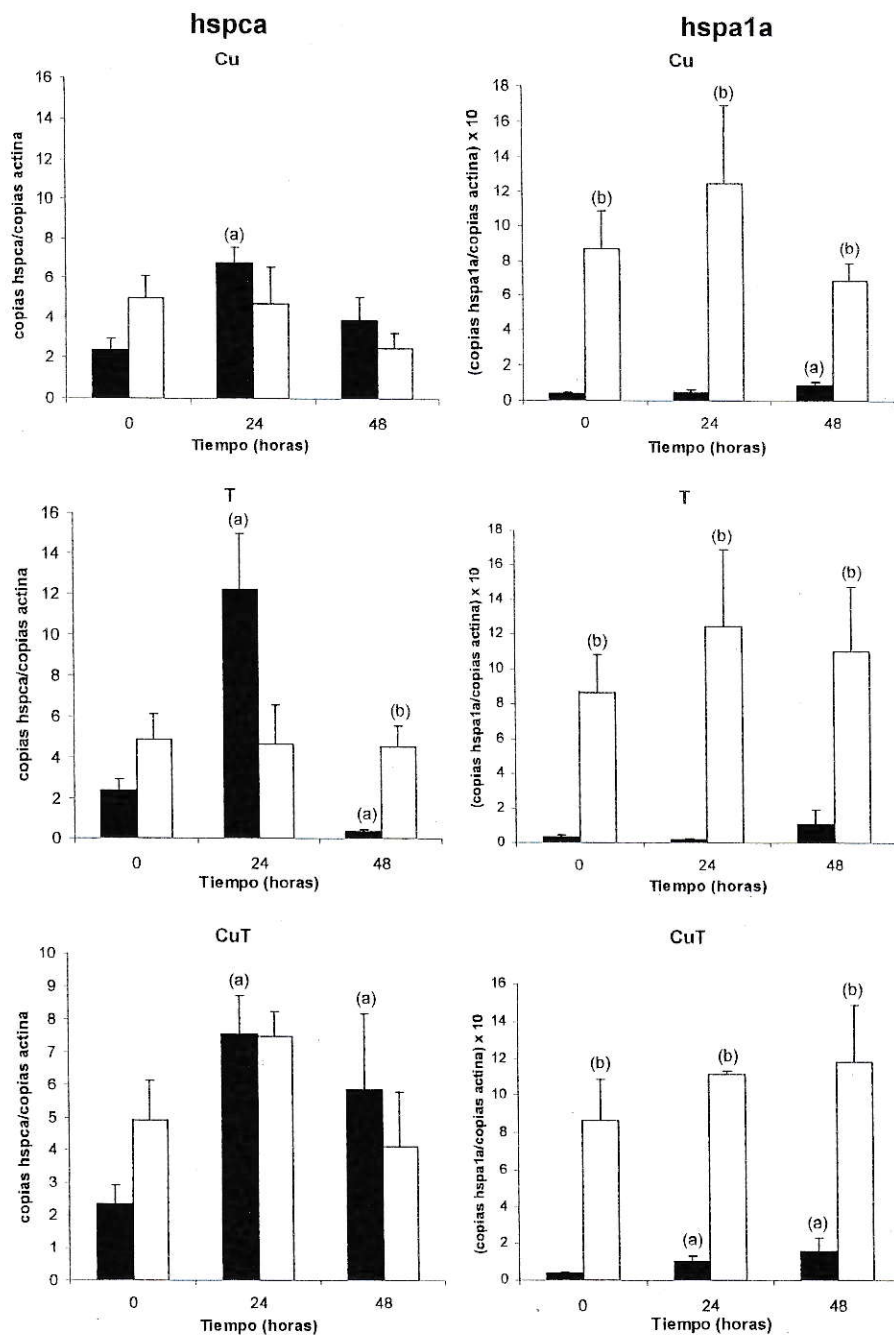


Figura 11. Abundancia relativa de hspca y hspa1a en fibroblastos mt+ y mt- en condiciones de exceso de cobre y alzas de temperatura. Células silvestres y mutantes para metalotioneína fueron expuestos a concentraciones suprafiológicas de cobre (Cu) y, combinada (CuT) o independientemente (T), a pulsos de temperatura (Figura 16). Los paneles A, B y C grafican la abundancia, determinada por qPCR, de hspca, y los paneles D, E y F, la de hspa1a, ambas normalizadas de acuerdo a la abundancia del transcrito de actina. Se presenta el promedio de 3 réplicas biológicas más el respectivo error estándar. La letra **a** indica que el valor es estadísticamente diferente al registrado para el control (sin Cu:His) de la misma línea celular, y la letra **b**, que el valor en la línea mutante es estadísticamente diferente al de la línea silvestre frente igual dosis de Cu según la prueba de T ($p < 0,05$).

2.4. Acumulación de cobre y cuantificación de mt1

La determinación del contenido intracelular de cobre en los fibroblastos mt⁺ y mt⁻ se encuentra ilustrada en los paneles A, B y C de la Figura 12. Según es posible apreciar, el suministro de cobre provocó en la línea silvestre un incremento paulatino en el promedio del contenido intracelular del metal (24h: 2,5 veces, 48h: 3,7 veces), que alcanzó niveles significativos a las 48 horas de exposición (T de Student, $p < 0,05$). Los fibroblastos mt⁻ no se vieron afectados por la presencia de cobre en este respecto. La temperatura, por otro lado, sí determinó un detrimento en el contenido del metal en ambas líneas celulares, corroborado como estadísticamente significativo a las 24 (42,9 veces) y 48 horas (11,3 veces) en la línea mutante, y a las 48 horas (8,4 veces) en la línea silvestre (T de Student, $p < 0,05$). Simultáneamente administrados, cobre y temperatura no modificaron los niveles de cobre en los fibroblastos mutantes, pero sí lo hicieron en los fibroblastos mt⁺ donde se observó un aumento de 5,5 veces a las 24 horas, y 5,1 veces a las 48 horas, ambas variaciones significativas acorde a la prueba de T ($p < 0,05$).

Los paneles D, E y F de la Figura 12 grafican la cuantificación por qPCR de la abundancia de mt1. Los fibroblastos mt⁻ no mostraron cambios en la abundancia del mensajero ni en presencia de Cu:His 100 μ M, ni frente a un pulsos de temperatura, ni ante la combinación de ambas variables. Por el contrario, la línea silvestre aumentó en forma significativa (T de Student, $p < 0,05$) los niveles del transcrito de mt1 a las 48 horas (1,6 veces), los que fueron considerablemente mayores (2,4 veces, T de Student, $p < 0,05$) a los detectados en la línea mutante. Los pulsos de temperatura provocaron a las 48

horas una disminución significativa (6,9 veces) en la abundancia promedio de mt1 (T de Student, $p < 0,05$). Esta disminución también marcó una diferencia entre ambas líneas celulares en los niveles de mt1 a las 48 horas (T de Student, $p < 0,05$). Cobre y temperatura combinados provocaron un alza significativa (6,5 veces) de mt1 a las 48 horas de tratamiento (T de Student, $p < 0,05$). La abundancia de mt1 a este tiempo también fue significativamente mayor (6,3 veces) a la registrada en los fibroblastos mutantes (T de Student, $p < 0,05$). Las diferencias observadas en la acumulación de cobre y la abundancia de mt1 en los fibroblastos mt+ y mt- sugieren que, pese a que en la línea silvestre el incremento intracelular de cobre observado bajo la exposición a cobre y temperatura antecede al aumento de mt1, la presencia de metalotioneína es aún necesaria para posibilitar la sobrecarga del metal.

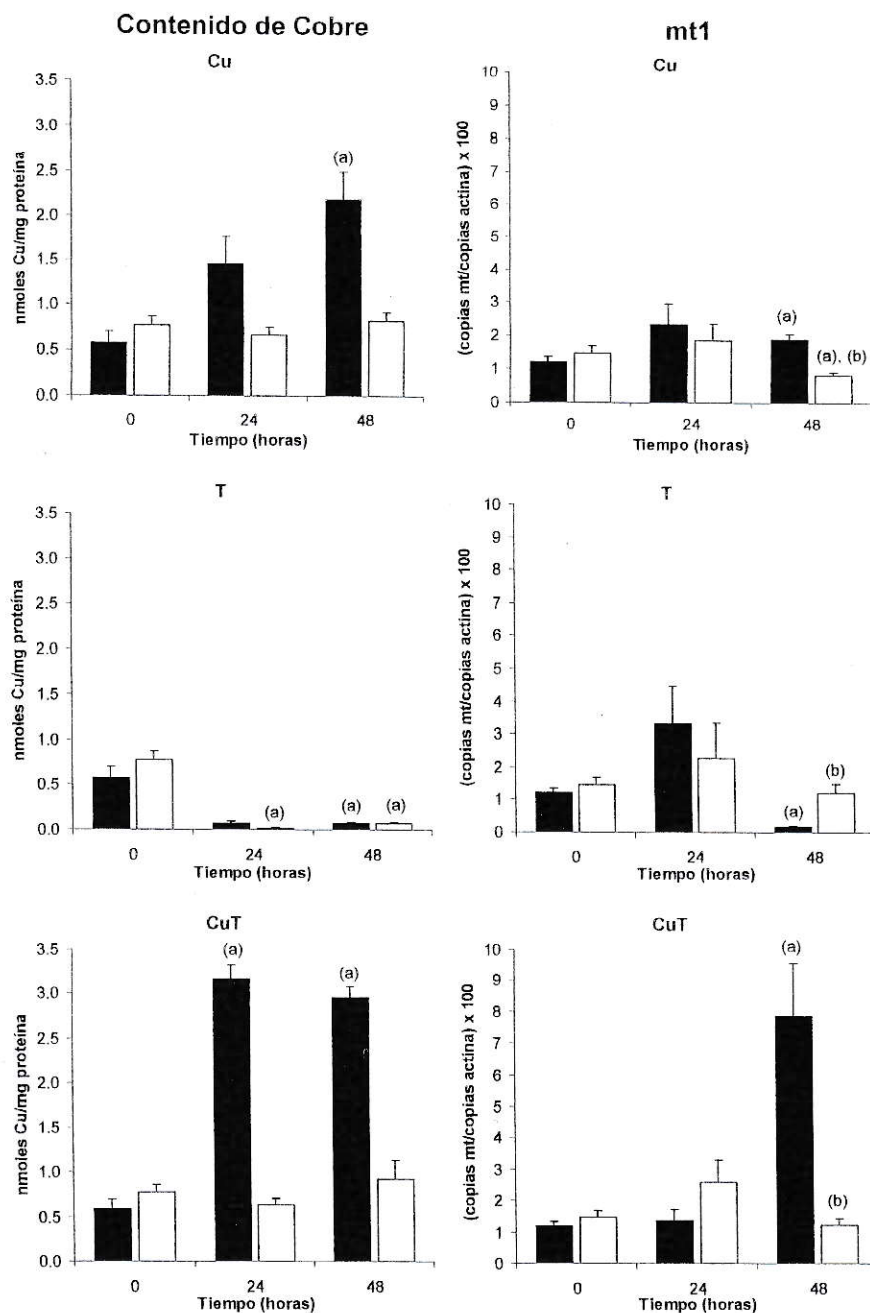


Figura 12. Contenido intracelular de cobre y abundancia relativa de mt1 en fibroblastos mt+ y mt- en condiciones de exceso de cobre y alzas de temperatura. Fibroblastos silvestres y mutantes para metalotioneína fueron expuestas a Cu:His 100 μ M y pulsos de temperatura en forma independiente (Cu, T) o combinada (CuT) de acuerdo a lo descrito en la Figura 16. El contenido de cobre, en los paneles A, B y C, fue estimado por AAS y normalizado en relación a la abundancia de proteínas de cada muestra. Los paneles D, E y F presentan la cuantificación de mt1 relativa a la abundancia del transcrito de actina, determinada mediante qPCR. Se presenta el promedio de 3 réplicas biológicas más el respectivo error estándar. La letra a indica que el valor es estadísticamente diferente al registrado para el control (en la Figura, Cu-His 0 μ M) de la misma línea celular, y la letra b, que el valor en la línea mutante es estadísticamente diferente al de la línea silvestre frente igual dosis de Cu según la prueba de T ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Pese a que el principal rol asignado a metalotioneína obedece a la regulación homeostática de los niveles de cobre y zinc al interior de la célula, su participación ha sido también invocada en una amplia gama de situaciones que ponen en riesgo la integridad celular, ajenas al metabolismo de metales traza. Entre ellas se cuenta, por ejemplo, el estrés oxidativo, la radiación ultravioleta y la respuesta anti-inflamatoria (Palmiter y col., 1998, Wang y col., 2004). El presente trabajo buscó, en un modelo celular mamífero, dilucidar la influencia de esta proteína en la respuesta transcripcional de genes propios del metabolismo de metales y otros vinculados a mecanismos de protección celular, a fin de probar que la ausencia de Mt repercute no solo en el proceso de adaptación a un exceso en la disponibilidad de metales, si no también en una situación en apariencia tan dispar como el estrés térmico. La conexión entre ambas respuestas transcripcionales emerge como hipótesis a partir de un análisis exhaustivo de los datos de microarreglos globales (Armendáriz y col., 2006). A continuación se discuten entonces diversos aspectos referentes a la metodología y resultados obtenidos.

1. Características de la metodología empleada

En el desarrollo de esta tesis resultó fundamental el modelo celular de fibroblastos murinos mutantes y silvestres para las metalotioneínas 1 y 2, generados por Palmiter y colaboradores (Kelly y Palmiter, 1996). Cabe señalar, sin embargo, que el carácter indiferenciado de estas líneas celulares hace plausible la presencia de Mt3 y Mt4, proteínas propias, respectivamente, de tejido neuronal y escamoso. (Tapiero y col., 2003). Esta posibilidad permanece a la fecha sin descartar, y dado que se desconoce el grado de similitud o divergencia en las funciones de la familia de las Mt, constituye un factor a considerar a la hora de interpretar los resultados de este trabajo y sus precedentes.

El análisis de viabilidad reveló la existencia de diferencias significativas en los valores de MTT entre controles y células tratadas con cobre, temperatura y cobre/temperatura para ambas líneas celulares, diferencias que fueron discrepantes con los análisis efectuados por el método del azul tripán. Cabe la posibilidad de que esta discordancia tenga en parte su origen en una menor sensibilidad del conteo con azul tripán, o bien en la alteración de la actividad mitocondrial a raíz de los tratamientos suministrados, lo que incidiría en la cuantificación del ensayo de MTT. En efecto, el cobre ha sido descrito como un inhibidor de la actividad deshidrogenasa mitocondrial en células de neuroblastoma humano (Arciello y col., 2005). Otros reportes señalan que el metabolismo mitocondrial puede verse acelerado al aumentar la temperatura (Abele y col., 2002). Teniendo esto en mente, la visión conciliatoria de los datos recolectados a

través de ambas metodologías apunta a que los efectos del cobre y la temperatura en la viabilidad de las líneas celulares empleadas son pocos o ninguno, lo que por lo menos permite asegurar que pese a que la temperatura, y en un grado aún mayor, el suministro de cobre utilizado están muy por sobre los niveles fisiológicos, los resultados de este estudio parecen reflejar la respuesta fisiológica de células no especializadas en el manejo de cobre a un desafío dentro del rango de control homeostático, y no la exposición a un elemento o elementos altamente citotóxicos.

El diseño experimental de las condiciones de cultivo tuvo como objetivo posibilitar la administración de los tratamientos previamente descritos, en especial aquellos protocolos que involucraban distintos períodos de exposición a cobre o calor, de forma tal que el espacio de tiempo existente entre la siembra y la recolección de las células fuese siempre idéntico. Es por ello que las distintas variables fueron suministradas no al inicio, en forma simultánea, si no con la anticipación necesaria para poder ejecutar los correspondientes protocolos de medición a un mismo tiempo final. Ello permitió eliminar variaciones en el grado de confluencia que las células alcanzaron al momento de ser recolectadas. Se incorporó además la abundancia de proteínas y del transcrito que codifica para actina como elementos de referencia para normalizar valores a comparar entre diferentes muestras. El transcrito de actina fue seleccionado como gen normalizador para las condiciones experimentales expuestas a raíz de la escasa variabilidad que presentó en un grupo de 18 cDNAs de fibroblastos sometidos a concentraciones crecientes de cobre (Tabla 4), variabilidad que fue posteriormente

mantenida en 42 cDNAs de fibroblastos expuestos a condiciones de exceso de cobre y temperatura. El incremento en la abundancia relativa de *mt1* observado en la línea silvestre en presencia de Cu:His 100 μ M (Figura 5) fue considerado como un control positivo de la exposición a cobre (Urani y col., 2003, Tapia y col., 2004) y permitió también corroborar la validez de la utilización del transcrito de actina como elemento de referencia.

El análisis de los patrones de cambio en la abundancia de los distintos transcritos de interés fue llevado a cabo mediante la técnica de qPCR, método reconocido por su exactitud y sensibilidad para cuantificar ácidos nucleicos en un amplio rango de concentraciones (Lekanne y col., 2002), razón por la que es normalmente utilizado a la hora de validar datos originados a partir de micro o macroarreglos. Se consideró en este análisis el incluir réplicas biológicas (experimentales) y no técnicas (vale decir, réplicas de las mediciones), dada la baja variabilidad previamente observada en la cuantificación de las últimas y el valor agregado en la información suministrada por las primeras. Los resultados obtenidos indican que existe un grado de congruencia cercano al 70 % entre los resultados generados en la presente tesis y los reportados por Armendariz y col., 2006, y por Tapia y col., 2004 (Tablas 5 y 6), pese a que en estos últimos trabajos no fueron empleadas réplicas biológicas y se recurrió a distintas metodologías experimentales (micro o macroarreglos) y otros criterios de normalización y análisis estadísticos. Es necesario señalar que una limitación común a todos estos métodos es que permiten tener sólo una imagen indirecta de la expresión génica, ya que lo que

realmente estiman es la abundancia de transcritos, que a su vez es resultado del balance entre la transcripción y degradación de los mensajeros. El alto grado de correlación observado sugiere que los cambios transcripcionales asociados a la exposición a cobre constituyen una respuesta biológicamente robusta y apoya la posibilidad de estudiar un número mayor de transcritos que en los experimentos de microarreglos mostraron un comportamiento diferencial en respuesta al metal.

2. Viabilidad en fibroblastos mt+ y mt-

A pesar de las aparentes discrepancias en los ensayos de viabilidad generados por la tinción con azul tripán y el ensayo de MTT, discutidas en el punto 1, las observaciones efectuadas a través de estos métodos concordaron en que no existían diferencias entre la resistencia de los fibroblastos silvestres y mutantes a los distintos tratamientos con cobre y temperatura. Tal como queda señalado en Tapia y col., 2004, la distinción en la resistencia al exceso de cobre entre las líneas mt+ y mt- es demasiado sutil para ser explicada en términos de viabilidad, y solo queda en evidencia al ser presentada en función del contenido intracelular de cobre. Es por ello que la imposibilidad de distinguir el genotipo mutante a través del fenotipo de la resistencia al metal no era en absoluto inesperada, como tampoco fue extraño que el exceso de temperatura, suministrado independiente o conjuntamente con cobre no marcara una diferencia entre la viabilidad de ambos tipos de fibroblastos. Cabe destacar además que una observación colateral del proceso de selección de genes fue el encuentro de una marcada diferencia

en el número de genes apoptóticos publicados en Armendariz y col. (2006) entre fibroblastos silvestres y mutantes: 5 transcritos en fibroblastos mt- contra 2 en fibroblastos mt+. Ello está en concordancia con estudios que indican que el desplazamiento del equilibrio del sistema apoptótico hacia la muerte celular frente a condiciones de toxicidad es más acentuado en ausencia de metalotioneína (Kondo y col., 1997, Jia y col., 2004). La cuantificación de la abundancia de mdm2, que presentó un potencial sitio de unión a MTF-1 y cuyo producto génico regula a través de la ubiquitinación la actividad del factor pro-apoptótico p53 (Hosokawa y col., 1998), también apuntó en esta dirección – la dosis de Cu:His 100 μ M provocó un incremento en los niveles del transcrito sólo en la línea silvestre.

3. Participación de la metalotioneína en el metabolismo redox

Tal vez el resultado más llamativo arrojado por la cuantificación de especies reactivas fue la predominancia observada de compuestos de este tipo en los fibroblastos que carecen de Mt, incluso bajo condiciones normales de cultivo (37 °C, sin suplemento de cobre). Es interesante que el aumento en el nivel de especies redox se correlacione con la pérdida de metalotioneína, ya que se postula que los átomos de cisteína que en esta proteína permiten la unión de iones metálicos también podrían contribuir a la captura de radicales libres mediante la oxidación de los correspondientes grupos sulfuro (Palmiter y col., 1998, Colangelo y col., 2004). De este modo, los resultados expuestos sugieren que la Mt no solo es necesaria para el almacenamiento de cobre y un manejo

seguro del contenido intracelular del metal, sino que también podría ser requerida para mantener una adecuada capacidad de secuestro de especies reactivas.

4. Participación de proteínas de estrés térmico en el metabolismo redox

Los resultados obtenidos por Broome y col. en ratones transgénicos que sobre producen Hsp1a (2006) sugieren que esta proteína protege contra el daño oxidativo a través de una vía de acción que aún no ha sido caracterizada. Las variaciones en los niveles de abundancia del correspondiente transcrito (Figura 6), que en las células mt llegaron a incrementarse más de 25 veces por sobre el valor observado en los fibroblastos silvestres, indican que es factible que el aumento en la abundancia de hsp1a y otras posibles proteínas que puedan suplir o complementar las funciones de Mt obedezca a un mecanismo que busca compensar la ausencia de metalotioneína.

Un segundo punto a destacar radica en la disminución ocasionada por los pulsos de temperatura en la abundancia de especies reactivas. Selsby y Dodd (2005) observaron un efecto similar en tejido muscular de ratas que habían sido inmovilizadas durante 8 días. En este experimento, las ratas que fueron sometidas a elevaciones transitorias de temperatura presentaron niveles menores de marcadores de daño oxidativo que las que no lo fueron. La ausencia de cambios en la actividad de diversas enzimas antioxidantes, entre ellas, glutatión reductasa, les llevó a plantear que la administración de calor confería protección por medio de la inducción de proteínas de estrés térmico. Previamente (1999), Preville y col. habían detectado un aumento en los niveles de

G6pdh, glutatión, glutatión transferasa y glutatión reductasa en fibroblastos de ratón transfectados para sobre producir Hsp27. Pese a que la cuantificación de hsp27 por qPCR fue originalmente considerada en el presente trabajo, el empleo de dos diferentes parejas de partidores no permitió confirmar la presencia del transcrito en los cDNAs analizados. Los resultados aquí expuestos apuntan a que, en una línea celular donde la regulación de los niveles de al menos cuatro transcritos asociados a proteínas de estrés térmico se encuentra alterada, un incremento en la temperatura aún posibilita la reducción de las especies reactivas presentes. Cómo ello ocurre, en vista de las aparentes contradicciones y vacíos en la información existente, es una pregunta que merece sin duda un estudio más acabado.

5. El cobre y la ubiquitinación

Contra lo predicho por la base de datos de expresión global de fibroblastos mt+ y mt- sometidos a concentraciones suprafisiológicas de cobre (Armendariz y col., 2006), no fueron observadas diferencias estadísticas en las variaciones de la abundancia de uba52 y ubc, ni tampoco de ubb, todos genes que dan origen al péptido ubiquitina. Pese a que la tendencia de los promedios sugiere un aumento paulatino de ubb y ubc a concentraciones crecientes de cobre, cuyos niveles resultaron ser significativamente mayores en los fibroblastos silvestres expuestos a Cu:His 100 μ M respecto a la línea mutante, resulta difícil sopesar la relevancia biológica de la cuantificación de estos tres transcritos. La explicación más plausible probablemente guarda relación con el hecho de

que los trabajos que previamente han reportado incrementos en la abundancia de mensajeros de esta naturaleza lo han hecho en espacios de unas pocas horas (Uney y col., 1993) y señalan incluso que estos cambios son sumamente rápidos y de corta duración (Bond y Schlesinger, 1993). Ello explicaría la alta variabilidad en las mediciones realizadas, y deja abierta la posibilidad de que, a raíz de los elevados niveles de especies reactivas y la deficiencia en la regulación de transcritos vinculados a proteínas con actividad chaperona, la potencialmente mayor abundancia de proteínas defectuosas en la línea mutante provoque diferencias en la producción de ubiquitina que se hagan notorias en períodos más estrechos de tiempo.

6. Mecanismos de regulación transcripcional potencialmente mediados por metalotioneína

Una posible explicación para las diferencias que fueron registradas en la cuantificación de los transcritos de interés en las líneas mt+ y mt- bajo las distintas condiciones estudiadas tiene su base en las observaciones realizadas por Zhang y col. (2003), Stitt y col. (2006) y Uenishi y col. (2006). Los primeros señalaron que, en un sistema *in vitro*, la presencia de metalotioneína unida a zinc es absolutamente necesaria para posibilitar la transcripción vía MTF-1 de un gen reportero bajo el control de secuencias tipo MRE. La necesidad que tiene MTF-1 de ligar zinc para poder unirse al DNA permite suponer que Mt es quien posibilita al interior de la célula la transferencia del ión a este factor de transcripción, y que de este modo podría modular su actividad. El segundo grupo reportó que la carencia de Mt, que normalmente se moviliza al núcleo en

condiciones de estrés, causa una pronunciada disminución en la migración de MTF-1 al núcleo. Ello podría ser consecuencia de la ausencia de quien normalmente cede el zinc al factor de transcripción, o constituir un segundo mecanismo a través del cual Mt regula a MTF-1. En tercer lugar, Uenishi y colaboradores (Uenishi y col., 2006) detectaron la unión de MTF-1 al complejo HSF-1/HSE y observaron anomalías en la inducción de hspa1a en líneas celulares que sobre expresaban MTF-1. En conjunto, estas evidencias apuntan a que la actividad de MTF-1 podría estar alterada en los fibroblastos mt-, lo que a su vez incidiría en la correcta función de HSF-1. Los elevados niveles registrados para hspa1a en la línea mutante, así como la invariabilidad de hspa1a, hspca y hsp105 (que presentó un potencial sitio de unión a MTF-1) frente a cobre o temperatura, todas ellas blanco de HSF-1, son compatibles con este modelo, ilustrado en la Figura 13. La menor abundancia de hspa8 en la línea mutante también puede interpretarse como parte de esta cadena: otro de los elementos que parece controlar la actividad de HSF-1 es precisamente el producto génico de este transcrito, el que de acuerdo a Ahn y col. (2005) es un regulador positivo del mencionado factor de transcripción. El detrimento en los niveles de hspa8, que pese a la presencia de elementos tipo HSE en su región promotora ha sido descrito como pobremente inducible ante condiciones de estrés (Wilke y col., 2000), bien puede explicarse en la línea mutante como un intento por compensar la falencia en la actividad represora de MTF-1. El modelo propuesto en la Figura 13 también explica la ausencia de cambios en los niveles de mt1 en los fibroblastos mutantes, dado que MTF-1 se configura como pieza clave en la regulación

transcripcional del gen de metalotioneína 1 (Coyle y col., 2002). Sin embargo, el incremento registrado en *znt1*, otro blanco bien caracterizado de MTF-1 cuya expresión había sido descrita únicamente en presencia de zinc (Langmade y col., 2000), en fibroblastos silvestres y mutantes expuestos a cobre puede parecer en primera instancia como una observación que invalida el modelo propuesto. Una explicación conciliatoria tiene apoyo en la evidencia de que la expresión de *gclc*, gen que codifica para la subunidad catalítica de la glutamil cistein ligasa y que también contiene en su región promotora sitios de unión a MTF-1, puede ser inducida incluso en ausencia del mentado factor de transcripción (Lichtlen y col., 2001). Ello podría ocurrir, por ejemplo, a través una región distal, alejada alrededor de 3100 pares de bases del sitio de inicio de la transcripción en el gen humano, que contiene sitios de unión de respuesta antioxidante (AREs) modulados mediante NRF-1 (Myhrstad y col., 2001). Si el cobre entonces regula la transcripción de este transportador de eflujo a través de la misma vía que lo hace zinc, como es el caso de metalotioneína, es una pregunta que permanece abierta.

La complejidad de las regiones promotoras en mamíferos también permite especular por qué los niveles de *sod1* y *ccs* no aumentan cuando la línea *mt-* es expuesta a un exceso de cobre: en sistemas *in vitro*, se ha reportado la transferencia de zinc desde metalotioneína a otros factores de transcripción con estructuras de dedos de zinc, tales como Sp1, TFIIIA, el receptor de estrógenos y Tramtrack (Zhang y col., 2003). Aunque MTF-1 no está involucrado en la transcripción de *sod1* y *ccs*, se ignora a la fecha qué mecanismos modulan la expresión de los mencionados transcritos, y una posibilidad a

considerar es que la carencia de metalotioneína afecte no solo la actividad de MTF-1 y HSF-1, si no también de otros factores de transcripción que podrían controlar a estos u otros genes.

7. La metalotioneína y el estrés térmico en la acumulación intracelular de cobre

Trabajos previos (Tapia y col., 2004) han reportado que, en las líneas celulares utilizadas la concentración intracelular de cobre, hierro y zinc en condiciones normales de cultivo resulta ser independiente de la presencia de Mt. No obstante, en el presente trabajo fue posible detectar bajo estas mismas condiciones marcadas diferencias en la abundancia los transcritos hspa1a, hspa8 y especies reactivas, lo que, como se discute en los puntos 3 y 6, apunta a la asociación de metalotioneína con funciones que van más allá de la captura de metales y la configuran como un posible regulador de la actividad de factores de transcripción y el metabolismo redox.

Saydam y col. publicaron en 2003 observaciones donde la exposición conjunta de células eucariontes a concentraciones de cadmio y zinc por encima del rango fisiológico y pulsos breves de temperatura parecía estimular simultáneamente la acumulación intracelular de estos metales y una notoria activación del promotor de mt1. Ambas variables sobrepasaron con creces los niveles alcanzados en la sola presencia del exceso de cadmio o zinc. La sobre expresión de HSF-1 en una línea transfectada y expuesta a una sobre disponibilidad de estos elementos tampoco pudo equiparar las magnitudes registradas en la estimulación del promotor de mt1 ni la abundancia de

cadmio o zinc en la célula, resultados que apuntaban a la inducción de un gen blanco de MTF-1 mediada por calor y metales en forma HSF-1 independiente. Los autores sugirieron que era esta hiperestimulación en la transcripción de metalotioneína lo que permitía a la célula acumular metales en elevadas cantidades. Los resultados aquí descritos obtenidos con células expuestas a cobre y alzas de temperatura permiten afirmar que, por el contrario, el aumento en los niveles de mt1 es precedido por un alza de 5,5 veces en el contenido interno del metal en la línea silvestre (Figura 12). Pese a que el incremento intracelular de cobre antecede al de mt1, la ausencia de cambios en los fibroblastos mutantes sugiere que la presencia de metalotioneína es aún necesaria para posibilitar la sobrecarga del metal. A la inversa, en ausencia del suministro de cobre la temperatura provocó una disminución en la abundancia intracelular de este elemento en ambas líneas celulares. El detrimento en mt1, en cambio, fue observado exclusivamente en los fibroblastos mt+. Ante un aumento en la temperatura, la acumulación de cobre puede tomar entonces diferentes direcciones en función de la concentración extracelular del metal. Selvaraj y col. (2003) encontraron que, en líneas celulares de *Drosophila melanogaster*, MTF-1 está encargado no solo de enfrentar la sobrecarga de cobre si no también su deficiencia, de forma que es capaz de activar la transcripción de Ctr1b con el objeto de incrementar el ingreso de cobre a la célula. Esta observación permite plantear uno de tantos escenarios posibles, donde la temperatura podría estimular la salida de cobre desde la célula al modificar la actividad o afinidad de transportadores de eflujo como ATP7A o ATP7B. En un intento por compensar la

consiguiente deficiencia del metal, el detrimento en el contenido intracelular de cobre provocaría la activación - vía MTF-1 - de *ctrl* o algún otro componente de entrada desconocido que en mamíferos contenga sitios tipo MRE en su región promotora, lo que en última instancia conduciría a la inducción de *mt1*. Dado que la actividad de MTF-1 es hipotéticamente deficiente en los fibroblastos *mt-*, ello explicaría por qué pese a que la sobrecarga de cobre es anterior al aumento en *mt1*, la presencia de metalotioneína parece ser condición necesaria para posibilitar este incremento en el contenido intracelular del metal, además de establecer un interesante parangón con los mecanismos y propósitos que también en levadura dirigen la inducción del gen *cup1* bajo condiciones de estrés térmico (Silar y col., 1991).

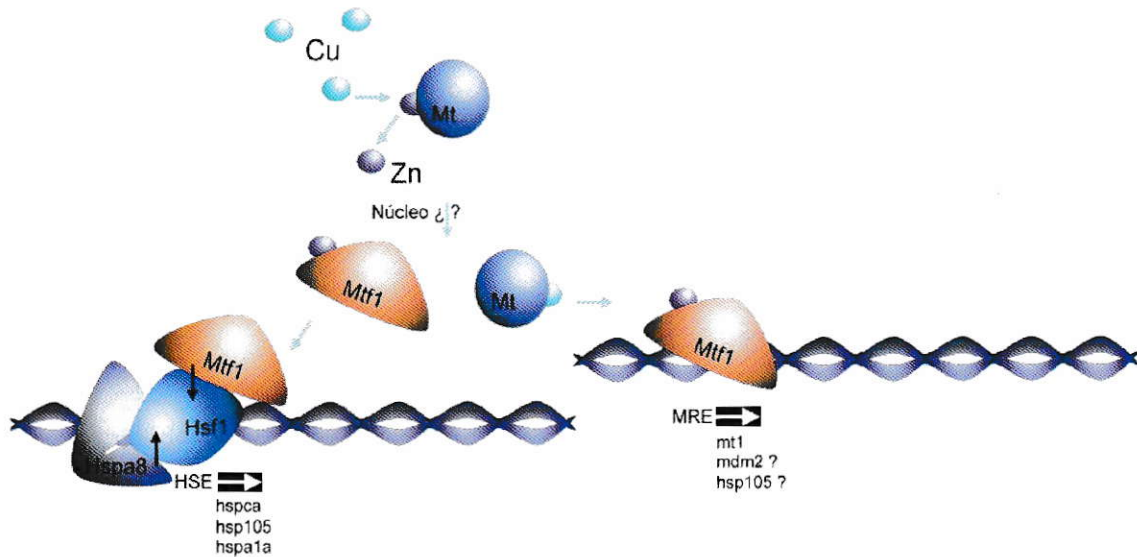


Figura 13. Mecanismo propuesto para la regulación mediada por metalotioneína de la actividad de MTF-1 y HSF-1. La figura describe la serie de pasos requeridos para activar la transcripción de genes blanco de MTF-1 y HSF-1 en una célula silvestre para metalotioneína. El exceso de cobre es capturado por Mt, y el zinc desplazado de la proteína es consiguientemente transferido a MTF-1, lo que posibilita la unión de este factor de transcripción a los sitios MRE. No es claro si a través de la transferencia de zinc u otro mecanismo Mt (que también se traslada al núcleo en condiciones de estrés) promueve la migración de MTF-1 al núcleo, pero cuando ello ocurre MTF-1 puede acoplarse a HSF-1 y reprimir su actividad. Esta función represora es opuesta al papel de Hspa8 como activador. Todos los puntos de control descritos en esta cadena se encontrarían desregulados en ausencia de Mt. La presencia de los componentes de la maquinaria de transcripción ha sido intencionalmente omitida con el objeto de simplificar la gráfica. Por esta misma razón, las escalas de tamaño y las relaciones estequiométricas entre cobre o zinc y Mt (que puede contener hasta 8 átomos de metal) o MTF-1 (que en realidad tiene 6 dedos de zinc) tampoco han sido representadas cabalmente.

CONCLUSIONES

La generación de una colección de 12 estándares para qPCR permitió cuantificar las modificaciones en la abundancia de transcritos ligados a procesos de ubiquitinación, estrés térmico y metabolismo de metales en fibroblastos *mt+* y *mt-* expuestos a concentraciones suprafisiológicas de cobre. Las diferencias observadas en los parámetros fisiológicos entre líneas celulares resultaron ser aún más acentuadas en términos transcripcionales, dado que todos, salvo 1 de los 9 transcritos cuya abundancia aumentó en respuesta al exceso de cobre en la línea silvestre permanecieron invariables en la línea mutante. Este análisis permitió identificar no solo divergencias en los cambios de abundancia del 89% de los transcritos que se vieron alterados en la línea silvestre, si no también detectar marcadas discrepancias en los niveles basales de *hspa1a* y *hspa8*, cuyos productos génicos son miembros de la familia Hsp70.

La exposición conjunta o independiente a condiciones de exceso de cobre y temperatura hizo evidente que la carencia de metalotioneína se correlaciona con diferencias en el comportamiento fisiológico y transcripcional de la célula, cambios que podrían ser explicados por una alteración en la actividad de los factores de transcripción MTF-1 y HSF-1. Ello extiende las posibles funciones de metalotioneína más allá del metabolismo de cobre y zinc y la configura en un modelo celular mamífero como un posible componente de la red de regulación génica activada por cobre y/o temperatura, rol que encuentra cierto paralelo en levadura.

Finalmente, es necesario señalar que el modelo propuesto en el presente trabajo (Figura 13) da espacio a una serie de hipótesis cuya validez amerita ser evaluada experimentalmente, y que podrían proporcionar una interesante óptica desde la cual juzgar el sentido de una proteína cuya función parece tener tantas diferentes aristas como es metalotioneína.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abele D., Heise K., Pörtner H., Puntarulo S. 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J Exp Biol.* 205(Pt 13):1831-41.
- Ahn S., Kim S., Yoon J., Vacratsis P. 2005. Heat-shock cognate is required for the activation of heat-shock factor 1 in mammalian cells. *Biochem. J.* 392 (Pt 1): 145-152.
- Arciello M., Rotilio G., Rossi L. 2005. Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327 (2): 454-459.
- Armendariz A., Olivares F., Pulgar R., Loguinov A., Cambiazo V., Vulpe C., González M. 2006. Gene expression profiling in wild-type and metallothionein mutant fibroblast cell lines. *Biol. Res.* 39 (1), 125-142.
- Arredondo M., Muñoz P., Mura C., Nuñez M. 2003. DMT1, a physiologically relevant apical Cu^{+1} transporter of intestinal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284 (6), C1525-C1530.
- Ausubel, F. Brent, R. Kingston, R. Moore, D., Seidman J., Smith J., Struhl K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition.* John Wiley and Sons Editions.
- Bailey T., Baker M., Elkan C.. 1997. An artificial intelligence approach to motif discovery in protein sequences: application to steroid dehydrogenases. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 62 (1): 29-44.
- Bond U., Schlesinger M. 1986. The chicken ubiquitin gene contains a heat shock promoter and expresses an unstable mRNA in heat-shocked cells. *Mol. Cell. Biol.* 6 (12), 4602-4610.
- 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.
- Broome C., Kayani A., Palomero J., Dillmann W., Mestril R., Jackson M., McArdle A. 2006. Effect of lifelong overexpression of HSP70 in skeletal muscle on age-related oxidative stress and adaptation after nondamaging contractile activity. *FASEB J.* 20 (9): 1549-51.

- Colangelo D., Mahboobi H., Viarengo A., Osella D. 2004. Protective effects of metallothioneins against oxidative stress evaluated on wild type and MT-null cell lines by means of flow cytometry. *Biometals*. 17: 365-370.
- Coyle P., Philcox J., Carey L., Rofe A. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*. 59(4):627-47.
- Dale E., Yang X., Moore S., Shyamala G. 1997. Murine 86-kDa heat shock protein gene and promoter. *Cell Stress Chaperones*. 2 (2): 87-93.
- De Freitas J, Wintz H, Kim JH, Poynton H, Fox T, Vulpe C. 2003. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals*. 16(1):185-97.
- Dheda K., Huggett J., Bustin S., Johnson M., Zumla A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*. 37 (1):112-119.
- Gallup J., Ackermann M. 2006. Addressing fluorogenic real-time qPCR inhibition using the novel custom Excel file system 'FocusField2-6GallupqPCRSet-upTool-001' to attain consistently high fidelity qPCR reactions. *Biol. Proced. Online*. 8: 87-152.
- Gao M., Karin M. 2005. Regulating the regulators: control of protein ubiquitination and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli. *Mol. Cell*. 19 (5): 581-593.
- Georgatsou E., Mavrogiannis L., Fragiadakis G., Alexandraki D. 1999. The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the Copper-modulated Mac1p activator *J. Biol. Chem*. 272 (21): 13786-13792.
- González M., Tapia L., Alvarado M., Tornero J., Fernández R. 1999. Intracellular determination of elements in mammalian cultured cells by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom*. 14 (5): 885-888.
- Gunshin H., Mackenzie B., Berger U., Gunshin Y., Romero M., Boron W., Nussberger S., Gollan J., Hediger M. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 388 (6641): 482-488.
- Hosokawa K., Aharoni D., Dantes A., Shaulian E., Schere-Levy C., Atzmon R., Kotsuji F., Oren M., Vlodavsky I., Amsterdam A. 1998. Modulation of Mdm2 expression and p53-induced apoptosis in immortalized human ovarian granulosa cells. *Endocrinology*. 139 (11): 4688-700.

- Huffman D., O'Halloran T. 2001. Function, structure and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 677-701.
- Jia G., Gu Y., Chen K., Lu Y., Yan L., Wang J., Su Y., Wu J. 2004. Protective role of metallothionein (I/II) against pathological damage and apoptosis induced by dimethylarsinic acid. *World J. Gastroenterol.* 10 (1): 91-95.
- Kelly E., Palmiter R. 1996. A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nat. Genet.* 13, 219-222.
- Kondo Y., Rusnak J., Hoyt D., Settineri C., Pitt B., Lazo J. 1997. Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol. Pharmacol.* 52 (2), 195-201.
- Langmade S., Ravindra R., Daniels P., Andrews G. 2000. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J. Biol. Chem.* 275 (44): 34803-9.
- Leblanc B., Benham C., Clark D. 2000. An initiation element in the yeast cup1 promoter is recognized by RNA polymerase II in the absence of TATA box binding protein if the DNA is negatively supercoiled. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 26 (20): 10745-10750.
- Lekanne Deprez R., Fijnvandraat A., Ruijter J., Moorman A. 2002. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal. Biochem.* 307 (1): 63-9.
- Lichtlen P, Wang Y, Belser T, Georgiev O, Certa U, Sack R, Schaffner W. 2001. Target gene search for the metal-responsive transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res.* 29 (7): 1514-23.
- Masters B., Kelly E., Quaife C., Brinster R., Palmiter R. 1996. Targeted disruption of metallothionein I and II genes induces sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (2): 584-588.
- Meyer L., Durkley A., Prohaska J., Harris Z. 2001. Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. *J. Biol. Chem.* 276 (39): 36857-36861.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65 (1-2): 55-63.
- Multhaup G., Schlicksupp A., Hesse L., Beher D., Ruppert T., Masters C., Beyreuther K. 1996. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper (II) to copper (I). *Science.* 271 (5254): 1406-1409.

- Myhre O., Andersen J., Aarnes H., Fonnum F. 2003. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* 65 (10): 1575-82.
- Myhrstad M., Husberg C., Murphy P., Nordstrom O., Blomhoff R., Moskaug J., Kolsto A. 2001. TCF11/Nrf1 overexpression increases the intracellular glutathione level and can transactivate the γ -glutamylcysteine synthetase (GCS) heavy subunit promoter. *Biochim Biophys Acta.* 1517 (2): 212-9.
- Nandi D., Tahiliani P., Kumar A., Chandu D. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci.* 31 (1): 137-155.
- Ohgami R., Campagna D., McDonald A., Fleming M. 2006. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood.* 108:1388-94.
- Palmiter R., Findley S. 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J.* 14 (4): 639-49.
- Palmiter R. 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 21;95(15):8428-30.
- Paynter J., Grimes A., Lockhart P., Mercer J. 1994. Expression of the Menkes homologue in mouse tissues lack of effect of copper on mRNA levels. *FEBS Lett.* 351 (2): 186-190.
- Perry M., Aujame L., Shtang S., Moran L. 1994. Structure and expression of an inducible HSP70-encoding gene from *Mus musculus*. *Gene.* 146 (2): 273-8.
- Preville X., Salvemini F., Giraud S., Chaufour S., Paul C., Stepien G., Ursini M., Arrigo A. 1999. Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. *Exp. Cell Res.* 247:61-78.
- Puig S., Thiele D. 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6(2): 171-180.
- Rae T., Schmidt P., Pufahl R., Culotta V., O'Halloran T. 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.* 284 (5415): 805-808.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sambrook, J., Russel, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Samson S., Gedamu L. 1998. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 59: 257-288.

Saydam N., Steiner F., Georgiev O., Schaffner W. 2003. Heat and heavy metal stress synergize to mediate transcriptional hyperactivation by metal-responsive transcription factor MTF-1. *J. Biol. Chem.* 278 (34): 31879-31883.

Schmittgen T., Zakrajsek B. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 46 (1-2): 69-81.

Searle P. 1990. Zinc dependent binding of a liver nuclear factor to metal response element MRE-a of the mouse metallothionein-I gene and variant sequences. *Nucleic Acids Res.* 18 (16): 4683-90.

Selsby J., Dodd S. 2005. Heat treatment reduces oxidative stress and protects muscle mass during immobilization. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289(1):R134-139.

Selvaraj A., Balamurugan K., Yepiskoposyan H., Zhou H., Egli D., Georgiev O., Thiele D., Schaffner W. 2005. *Genes Dev.* 15;19(8):891-6.

Silar P., Butler G., Thiele D. 1991. Heat Shock Transcription Factor Activates Transcription of the Yeast Metallothionein Gene. *Mol. Cell. Biol.* 11 (3): 1232-1238.

Soti C., Nagy E., Giricz Z., Vigh L., Csermely P., Ferdinandy P. 2005. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br. J. Pharmacol.* 146 (6): 769-780.

Stitt M., Wasserloos K., Tang X., Liu X., Pitt B., St Croix C. 2006. Nitric oxide-induced nuclear translocation of the metal responsive transcription factor, MTF-1 is mediated by zinc release from metallothionein. *Vascul. Pharmacol.* 44 (3): 149-155.

Stuart G., Searle P., Chen H., Brinster R., Palmiter R. 1984. A 12-base-pair DNA motif that is repeated several times in metallothionein gene promoters confers metal regulation to a heterologous gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81 (23): 7318-22.

Tapia L., González Agüero M., Cisternas M., Suazo M., Cambiazo V., Uauy R., González M. 2004. Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels. *Biochem. J.* 378 (Pt 2): 617-624.

Tapiero H., Townsend M., Tew K. 2003. Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and Metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.* 57 (9): 399-411.

Thiele D., Hamer D. 1986. Tandemly duplicated upstream control sequences mediate copper-induced transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* copper-metallothionein gene. *Mol. Cell. Biol.* 6 (4): 1158-1163.

Uauy R., Olivares M., Gonzalez M. 1998. Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clinical Nutrition.* 67: 952S-959S.

Uenishi R., Gong P., Suzuki K., Koizumi S. 2006. Cross talk of heat shock and heavy metal regulatory pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341 (4):1072-1077.

Uney J., Anderton B., Thomas S. 1993. Changes in heat shock protein 70 and ubiquitin mRNA levels in C1300 N2A mouse neuroblastoma cells following treatment with iron. *J. Neurochem.* 60 (2): 659-665.

Urani C, Calini V, Melchiorretto P, Morazzoni F, Canevali C, Camatini M. 2003. Different induction of metallothioneins and Hsp70 and presence of the membrane transporter ZnT-1 in HepG2 cells exposed to copper and zinc. *Toxicol. In Vitro.* 17 (5-6): 553-9.

Wang H., Li F., Zhang B., Lu X. 2004. Metallothionein-null mice exhibit reduced tolerance to ultraviolet B injury in vivo. *Clin. Exp. Dermatol.* 29 (1): 57-61.

Wilke N., Sganga M., Gayer G., Hsieh K., Miles M. 2000. Characterization of promoter elements mediating ethanol regulation of hsc70 gene transcription. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292 (1): 173-80.

Winter J., Jakob U. 2004. Beyond transcription – new mechanisms for the regulation of molecular chaperones. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39 (5-6): 297-317.

Yamaguchi Y., Heiny M., Gitlin J. 2001. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197(1), 271-277.

Yasuda K, Ishihara K, Nakashima K, Hatayama T. 1999. Genomic cloning and promoter analysis of the mouse 105-kDa heat shock protein (HSP105) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256 (1): 75-80.

Yuan D., Stearman R., Dancis A., Dunn T., Beeler T., Klausner R. 1995. The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (7): 2632:2636.

Zhang B., Georgiev O., Hagmann M., Gunes C., Cramer M., Faller P., Vasak M., Schaffner W. 2003. Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* 23 (23): 8471-85.

Zhou B., Gitschier J. 1997. *hctr1*: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (14): 7481-7486.