



Universidad de Chile
Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas

REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DE LA ENZIMA METIONINA SULFOXIDO REDUCTASA A POR EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL FOXO3A.

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico
Romina Tamara Cataldo Orsini

Laboratorio de Nutrición Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile

Directores de Tesis:

Dra. Rebeca Aldunate Magalhaes.

Dr. Federico Leighton Puga

Laboratorio de Nutrición Molecular

Facultad de Ciencias Biológicas

Pontificia Universidad Católica de Chile

Profesor patrocinante:

Dr. Sergio Lobos Camus

Depto. de Bioquímica y Biología
Molecular

Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

Santiago 2007

Después de 7 años de haber estudiado Bioquímica,
Debo decir que he logrado comprender
El lenguaje coloquial de los científicos. He aquí unos ejemplos:

No por excesivamente salir del estado de aletargamiento circadiano que se produce en
mamíferos y en otros muchos taxones de animales no hay un adelantamiento
prematureo del alumbramiento, debido a la rotación terrestre, por nuestro astro rey.
(NO POR MUCHO MADRUGAR AMANECE MÁS TEMPRANO.)

En el último mes del solsticio de invierno intenta receptar con sus órganos sensoriales
el *Cannis sp.* la proyección de algún objeto debido al astro rey.
(EN FEBRERO BUSCA LA SOMBRA EL PERRO.)

AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros del Laboratorio de Nutrición molecular por recibirme con los brazos abiertos sin conocerme, partiendo por el Dr. Federico Leighton, director de este trabajo, quien a partir de una pequeña entrevista me aceptó como tesista inmediatamente.

Inmensos agradecimientos Rebeca Aldunate, también directora de este trabajo, quien me enseñó que la ciencia no resulta “a la primera” y que se debe recorrer caminos a veces largos y pedregosos para aprender a resolver esos problemas que no dejan progresar los experimentos. A mis compañeros de laboratorio: Carlos, Claudio, Druso, Luis y Pablo, también a mis compañeras que se fueron del laboratorio en el camino: Rosario y Marisol. Agradezco a todos ellos que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y por la simpatía y buena onda que existía, lo que hacía un agrado el llegar a trabajar.

A Austral Biotech, mi primer lugar de trabajo.

A mis profesores de la comisión: Sergio Lobos, Daniela Seelenfreund y María Antonieta Valenzuela, a quienes elegí por su gran calidad docente y personal.

Agradezco a mis padres, quienes siempre han estado apoyándome y me permitieron estudiar sin preocupaciones económicas, y que a partir de ellos, un dentista y una farmacéutico, nació esta bioquímica.

A mi hermano y mi enorme familia 2 abuelas, 5 tíos, 5 tías y a mis 14 pequeños primos.

A mis variados amigos: de Las Cruces, del colegio, de la universidad y de la vida.

Especiales agradecimientos a Rodrigo Lembach, quien escuchaba amorosamente todas mis alegrías y tristezas que me entregó esta tesis y siempre me mostró el vaso medio lleno de las cosas.

INDICE GENERAL

PALABRAS VARIAS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS GENERALES Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. MATERIALES Y METODOS	16
4.1 Materiales	16
4.1.1 Materiales y reactivos generales	17
4.1.2 Enzimas	17
4.1.3 Marcadores de peso molecular	17
4.1.4 Medios de cultivo celular	17
4.1.5 Material biológico	18
4.1.5.1 Bacterias	18
4.1.5.2 Vectores	18
4.1.5.3 Líneas celulares	18
1.5.4 Anticuerpos	19
4.2 Métodos.....	20
4.2.1 Cultivo y mantención de células	20
4.2.1.1 Cultivo de líneas celulares.....	20
4.2.1.2 Transfección transiente de líneas celulares	20

4.2.1.2.1	Transfección transiente de células HepG2.....	20
4.2.1.2.2	Transfección transiente de células Hek293.....	21
4.2.1.3	Bacterias competentes	21
4.2.1.4	Mantenimiento de cepas bacterianas	22
4.2.1.5	Transformación de cepas bacterianas	22
4.2.1.6	Evaluación de colonias positivas	22
4.2.2	Técnicas bioquímicas	23
4.2.2.1	Extractos celulares para western blot y para ensayo de actividad Msr.....	23
4.2.2.2	Extractos celulares para ensayo de luciferasa y β -galactosidasa.....	23
4.2.2.3	Cuantificación de proteínas en extractos celulares	24
4.2.2.4	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	24
4.2.2.5	Western blot	24
4.2.2.6	Ensayo de actividad para Msr.....	25
4.2.2.7	Ensayo de actividad Luciferasa	25
4.2.2.8	Ensayo de actividad β -galactosidasa.....	26
4.2.2.3	Inmunofluorescencia.....	26
4.2.3	Técnicas en Biología Molecular	27
4.2.3.1	Purificación de plasmidios recombinantes	27
4.2.3.2	Digestión de plasmidios recombinantes con enzimas de restricción	27
4.2.3.3	Electroforesis de ADN en gel de agarosa	27
4.2.3.4	Purificación de fragmentos de ADN	28
4.2.3.5	Obtención de fragmentos de ADN por PCR.....	28
4.2.3.5.1	Generalidades de la reacción de PCR	28
4.2.3.5.2	Obtención de distintos fragmentos de la región 5' no codificante de la MsrA	29
4.2.3.6	Extracción de ARN total de cultivos celulares	33
4.2.3.7	Obtención de ADNc por RT-PCR.....	33
4.2.3.7.1	Obtención de ADNc de FOXO3A	33
4.2.3.8	Ligación de fragmentos de ADN y plasmidios.....	34
4.2.4	Tratamientos de cultivos celulares.....	34
4.2.4.1	Tratamiento de cultivos celulares con resveratrol	35
4.2.4.2	Tratamiento de los cultivos con H ₂ O ₂	35

4.2.4.3 Tratamiento con Forskolin	35
4.2.4.4 Tratamiento con Wortmanina.....	35
4.2.5 Análisis estadístico de los datos	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Análisis de la región de 2000 pb ubicada río arriba del extremo 5' del inicio de la traducción de la MsrA	36
5.2 Obtención de ADNc de FOXO3A: Evaluación de su expresión y localización celular	40
5.3 Los fragmentos del promotor de la MsrA tienen una actividad distinta y son activados por FOXO3A.....	42
5.4 Mutación del sitio FOXO3A ubicado a -920 pb del promotor de la MsrA. Implicancias en su actividad.....	45
5.5 El fragmento p2000 responde a la acción conjunta de H ₂ O ₂ y resveratrol. En presencia de FOXO3A esta activación aumenta.....	47
6. DISCUSION.....	49
7. CONCLUSIONES.....	53
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las Metioninas de las proteínas son oxidadas a Metionina sulfóxido (MetO) por los EROS y la enzima MsrA reduce esta oxidación.....	5
Figura 2. La vía de la insulina/IGF-1R es conservada en distintas especies y es clave en la regulación del envejecimiento y la longevidad a través de FOXO.....	11
Figura 3. FOXO3A es el eje central de una vía regulatoria de la longevidad.....	13
Figura 4. Esquema de las distintas construcciones del promotor de la MsrA.....	32
Figura 5. Esquema de la región de 2000 pb ubicada en el extremo 5' río arriba del inicio de la traducción de la MsrA.....	38
Figura 6. Inmunofluorescencia indirecta de FOXO3A.....	41
Figura 7. Actividad de los distintos fragmentos del promotor de la MsrA.....	44
Figura 8. Análisis del sitio FOXO3A ubicado a -920 pb río arriba del inicio de la traducción de la MsrA.....	46
Figura 9. El promotor responde a estrés oxidativo y resveratrol de forma Independiente a la activación por FOXO3A.....	48

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Partidores utilizados.....	31
--	-----------

Tabla II. Factores transcripcionales involucrados en respuesta a estrés oxidativo y elementos TATA descritos en la región promotora de la MsrA humana.....	37
---	-----------

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
AMP: Adenosin monofosfato
AP-1: Proteína activadora 1
ARE: elemento de respuesta a antioxidantes
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ATP: adenosin trifosfato
BrEt. bromuro de etidio
BSA: albúmina de suero bovino
CBP: proteína que se une a CREB
CREB: proteína de unión a elementos de respuesta de AMP cíclico
Cys: cisteína
DEPC: di-etilpirocarbonato
DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: dimetilsulfóxido
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfatos
DE: desviación estandard
DO: densidad óptica
EDTA: ácido etilen-diamino-tetra-acético
ER: especies reactivas
EROS: especies reactivas oxidantes
FOXO: factores de transcripción Forkhead clase O
h: horas
IGF-1: factor de crecimiento tipo insulina 1
Kb: kilo bases
kDa: kilo Daltons
Lys: lisina
Met: metionina

MetO: metionina sulfóxido
MsrA: metionina sulfóxido reductasa A
min: minutos
NAD: nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
pb: pares de bases
PBS: tampón fosfato salino
PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa
PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKB: proteína kinasa B
PM: peso molecular
PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro
PPAR- γ : receptor activado para la proliferación de peroxisomas γ
PSA: persulfato de amonio
P53: Proteína de 53 KDa.
rpm: revoluciones por minuto
SDS: dodecil sulfato de sodio
seg: segundos
Ser: Serina
SFB: suero fetal bovino
Sirt: sirtuina
SOD: superóxido dismutasa
SP-1: Proteína de especificidad 1
TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
Tre: treonina
UTR: región no traducida del ARNm
UV: ultravioleta
WT: wild type

RESUMEN

El daño oxidativo en proteínas es considerado una de las principales consecuencias del envejecimiento celular y de enfermedades crónicas asociadas a la edad. La oxidación de metionina a metionina sulfóxido (MetO), a diferencia de otras modificaciones oxidativas, puede ser reparada por la enzima Metionina sulfóxido reductasa A (MsrA). Numerosos estudios muestran que la expresión de esta enzima se relaciona con resistencia a estrés oxidativo y longevidad, sin embargo se desconocen los mecanismos involucrados en su regulación.

El análisis de una región de 2000 pb del promotor de la MsrA, permitió identificar posibles sitios de reconocimiento de factores transcripcionales relacionados con respuesta a estrés oxidativo y longevidad, entre los cuales se identificaron dos sitios de unión a FOXO3A, factor descrito como regulador central de vías de longevidad y de respuestas frente a estrés oxidativo. Un análisis comparativo entre diferentes organismos permitió determinar que estas secuencias FOXO son conservadas en los promotores de enzimas homólogas a la MsrA, lo que sugiere fuertemente que este factor podría ser un regulador de esta enzima.

En este estudio se utilizaron líneas celulares transfectadas con el gen reportero luciferasa, acoplado a distintos fragmentos de la región 5' no codificante del gen *msrA* humano (2000, 1408 y 260 pb). Los resultados mostraron que en presencia de FOXO3A la actividad promotora de la MsrA aumenta significativamente, y que al mutar el sitio FOXO ubicado a -920 pb del inicio de la traducción de la MsrA, la activación por este factor transcripcional disminuye significativamente en un 50%.

Se evaluó también otros posibles estímulos externos que podrían activar al promotor de la MsrA. Para ello, cultivos celulares transfectados con la construcción de 2000 pb del promotor, fueron tratados conjuntamente con peróxido de hidrógeno y el antioxidante resveratrol, lo que produjo un aumento en la actividad del promotor, efecto independiente a la activación por FOXO3A.

SUMMARY

The transcription of the enzyme Methionine sulfoxide reductase A is regulated by the transcription factor FOXO3A

Oxidative damage, in particular the protein oxidative damage is considered one of the main consequences of cellular ageing and age-related chronic diseases. The oxidation of methionine to methionine sulphoxide (MetO) unlike other oxidative modifications can be repaired by the enzyme Methionine sulphoxide reductase A (MsrA). Numerous studies show that the expression of this enzyme is related with resistance to oxidative stress and life span, however the mechanisms involved in the regulation of this expression are unknown.

Analysis of the putative promoter region of the human MsrA, consisting of 2000 bp, allowed to identify different transcription factor recognition sites related with oxidative stress responses and longevity. Among these, two binding sites for FOXO3A, a binding factor recognized as a central regulator in longevity pathways and oxidative stress responses were identified. A comparative analysis between different organisms showed that these FOXO3A sequences are conserved in the promoters of homologous enzymes of MsrA, strongly suggesting that this factor could be a regulator of the enzyme.

In this study, cell lines were transfected with a luciferase reporter gene linked to different fragments of the 5' non coding region of the human *msrA* gene (2000, 1408, and 260 pb). The results showed that in the presence of FOXO3A, the promoter activity of MsrA increases significantly, and when the FOXO site located at -920 pb of the translation start site of the MsrA is mutated, the activation by this factor significantly decreased ed by 50%.

Other possible stimuli of the MsrA promoter were evaluated. Cellular cultures transfected with the previously described construction of 2000 pb, were treated with hydrogen peroxide and the antioxidant Resveratrol; an increase in the activity of the promoter was observed, independent from the activation by FOXO3A.

1. INTRODUCCION

1.1 Estrés oxidativo y su importancia biológica

En 1956, Denham Harman propone su “teoría del envejecimiento celular por radicales libres”, donde el planteamiento inicial establece que las causas del envejecimiento celular y de las enfermedades degenerativas son atribuibles a los efectos nocivos de los radicales libres sobre los diversos componentes celulares. En aquella época aún no existía la certeza sobre la producción de moléculas oxidantes en las células, por lo que su propuesta fue ampliamente debatida (3, 18).

Actualmente se sabe que producto de una amplia variedad de procesos en los sistemas biológicos, se generan diversas moléculas oxidantes, las cuales se agrupan como especies reactivas (ER) del nitrógeno, del cloro y del oxígeno (en conjunto se denominan especies reactivas oxidantes, EROS). Estas ER se producen de forma endógena en distintos niveles celulares, siendo los principales:

- A nivel de organelos involucrados en el metabolismo celular como mitocondrias y peroxisomas (18,19).

- A nivel de proteínas, como en el caso de las enzimas oxido nítrico sintetasa, NADPH oxidasa, lipooxigenasas, mieloperoxidasa, aquellas que poseen el grupo prostético hem y las enzimas que participan en las cadenas transportadoras de electrones (18).

Esta producción endógena de oxidantes varía según el tipo de célula a lo que se suman todos aquellos oxidantes producidos por agentes exógenos como diversos tipos de radiaciones, iones metálicos, solventes, material particulado, ozono, etc. (7). Todas las formas de vida se exponen permanentemente a estos agentes externos, y sumado a la producción interna de ER generan el fenómeno denominado **estrés oxidativo**, tema de gran relevancia biológica, cuya comprensión a través de todos los sistemas que participan se hace cada vez más importante.

¿Cómo se define estrés oxidativo? Según Matthew Whiteman y Barry Halliwell (13), se define como un **importante desbalance entre la producción de EROS y las defensas antioxidantes** (ya sea por aumento de los EROS o por disminución de las defensas antioxidantes). **Antioxidante** es un término que se aplica a cualquier sustancia que al estar presente en pequeñas concentraciones comparado con un sustrato oxidable cualquiera, es capaz de detener o prevenir la oxidación de ese sustrato. “Sustrato oxidable” se considera a cualquier tipo de molécula presente *in vivo* susceptible a oxidarse (13).

Daño oxidativo se denomina al daño producido en las biomoléculas causado directamente por el ataque de EROS en situaciones de estrés oxidativo (13). Como consecuencia del estrés oxidativo puede producirse tanto una **adaptación** de la célula o del organismo al aumentar los sistemas de defensa como también puede generarse **daño celular** sobre muchos o algún blanco biomolecular específico (pudiendo ser ADN, ARN, colesterol, lípidos, carbohidratos, proteínas, etc). Finalmente, si la célula no es capaz de recuperarse del daño generado, se producirá su muerte por apoptosis o necrosis. (13)

Las proteínas, por ser el mayor componente de los sistemas biológicos y por exhibir una amplia gama de oxidantes que reaccionan con ellas, son las macromoléculas más afectadas de todos los componentes biológicos (7). Aparte de ser blancos directos de las EROS, también sufren daño debido a procesos derivados de la oxidación de otras moléculas, como la conjugación con productos de peroxidación lipídica y la formación de productos glicosados avanzados, proceso denominado glicoxidación (7, 29). Los efectos biológicos del daño oxidativo sobre proteínas son:

- Fragmentación de la proteína por quiebre del enlace peptídico (4).
- Daño funcional, por ejemplo de receptores, enzimas, proteínas de transporte, etc., al alterar su estructura y causar cambios en su conformación (7).
- Disminución de su termoestabilidad, cambiando sus parámetros de actividad (4).
- Algunas proteínas oxidadas forman agregados y son resistentes a la acción de proteasas, promoviendo su acumulación (29).

- Puede contribuir secundariamente al daño de otras biomoléculas al inactivar, por ejemplo, enzimas que reparan y replican el ADN (13, 19).

Se ha descrito que las proteínas oxidadas son degradadas principalmente por dos sistemas enzimáticos: por el proteasoma en el citosol y en el núcleo, y por la proteasa Lon en la matriz mitocondrial (19, 29). El proteasoma es un complejo multienzimático de alto peso molecular presente en células eucariotas en el compartimiento nuclear y citosólico, que tiene un rol fundamental en el plegamiento de proteínas y en la degradación de estas moléculas oxidadas por un mecanismo independiente de ATP y de ubiquitina. Evidencias bibliográficas muestran que la función proteasomal se deteriora con la edad y en la senescencia celular, lo que explicaría en parte la acumulación de proteínas oxidadas (32).

1.2 Reparación de los residuos de metionina oxidados: ¿Un mecanismo para la mantención del balance redox celular?

El enlace peptídico y todos los residuos aminoacídicos libres o unidos formando péptidos, son blancos de oxidación. La oxidación de aminoácidos genera mayoritariamente derivados del grupo carbonilo, que en diversos estudios se utilizan como marcadores de daño oxidativo (4). Caso especial son los residuos de cisteína (Cys) y metionina (Met), que son los aminoácidos más susceptibles a la oxidación por las características del átomo de azufre. Esta oxidación puede ser producto de una interacción directa con el oxidante o de una transferencia radicalaria indirecta desde algún otro residuo oxidado dentro de la proteína (4, 7). La oxidación de Cys genera puentes disulfuro que son reducidos por el sistema enzimático glutaredoxina/ glutatión/ glutatión reductasa y por el sistema enzimático tioredoxina/ tioredoxina reductasa, siendo este último capaz de reducir también los ácidos sulfénicos de cisteína (29) La oxidación parcial de Met genera la mezcla de dos diastereoisómeros, R y S-Metionina sulfóxido (MetO), que también se pueden reducir debido a la acción de sistemas enzimáticos (19).

Existen diversos estudios que analizan los niveles de MetO en distintos tejidos y edades:

- En humanos se ha descrito un aumento en el tiempo de los niveles de MetO en proteínas del cristalino, llegando a ser dos tercios de las Met totales MetO en pacientes con cataratas (32) y en eritrocitos senescentes, los niveles de MetO son 50% a 60% mayores con respecto a eritrocitos jóvenes recién maduros (4, 34).

- Entre los 10 y 80 años de vida los niveles de MetO en el colágeno de la piel aumentan entre 3 y 4 veces (34).

- MetO está aumentada en el fluido pulmonar de fumadores y de pacientes con desórdenes inflamatorios (34).

- En ratas Fisher 344 los residuos de Met oxidada de la proteína calmodulina en el cerebro aumentan progresivamente con la edad, lo que se asocia con una pérdida en la función de esta proteína (7, 34). Estos resultados evidencian un aumento generalizado en el contenido de MetO de las proteínas proporcional a la edad, lo que sugiere que el fenómeno de envejecimiento está asociado con la acumulación de residuos de Met oxidados en las proteínas.

Dos enzimas reducen de manera estereoespecífica MetO libre o unida a proteínas: la enzima metionina sulfóxido reductasa (Msr) tipo B (MsrB) reduce específicamente R-MetO y la enzima metionina sulfóxido reductasa tipo A (MsrA) reduce al epímero S-MetO (figura 1). Ambas enzimas requieren de tiorredoxina para catalizar la reducción de MetO (34).

El concepto general es que ambas Msr intervienen en la longevidad de los organismos y principalmente les otorgan un papel protector frente al estrés oxidativo (figura 1A), idea avalada por muchos estudios de los cuales se desprenden dos hipótesis generales que intentan explicar el rol biológico de estas enzimas:

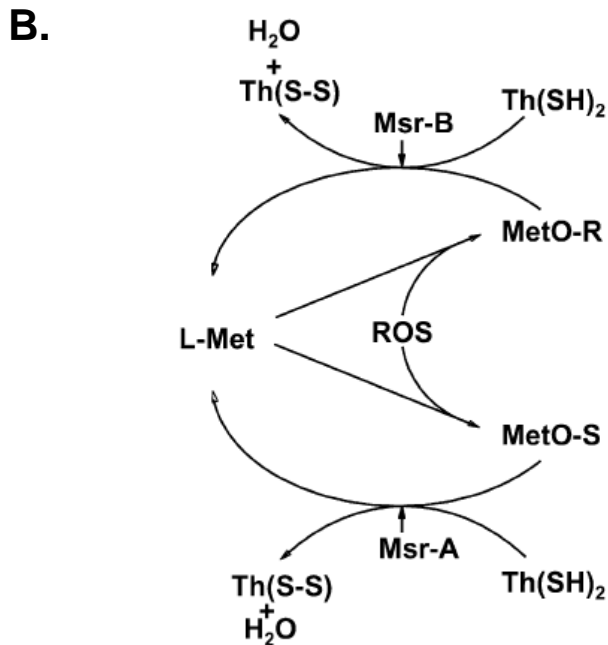
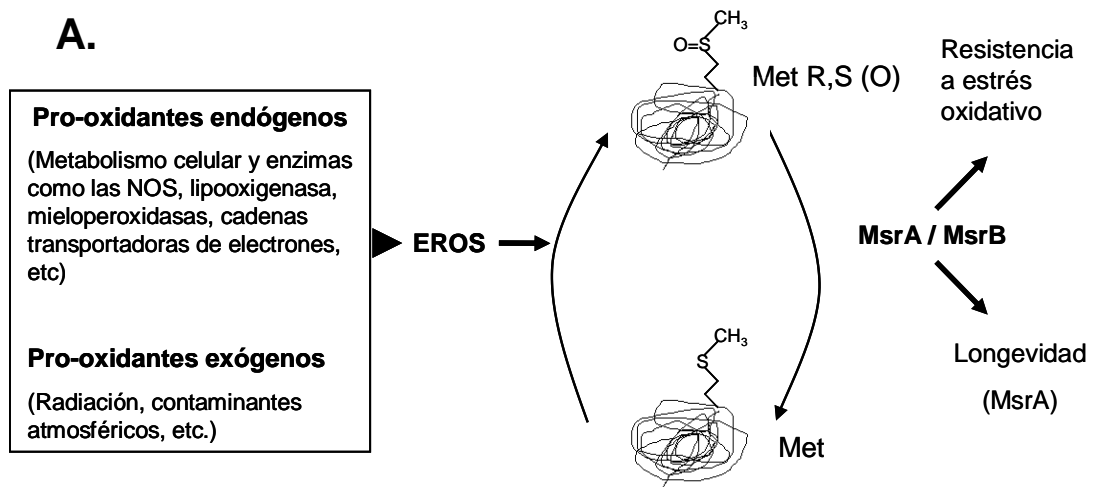


Figura 1. Oxidación de Met en las proteínas y su reparación por las enzimas Msr.

A. Las Met de las proteínas son oxidadas fácilmente a metionina sulfóxido (MetO) por los EROS y las enzimas MsrA y MsrB reparan este daño. Estudios sugieren que estas enzimas tendrían un papel muy importante en la resistencia a estrés oxidativo y en la longevidad de los diversos organismos. Adaptado de J. Mary et al (19) y B. Berlett et al (4).

B. La oxidación de Met genera los isómeros R- y S- MetO los cuales son reducidos por las enzimas MsrB y MsrA en forma estereo-específica. Estas reacciones dependen de tiorredoxina reducida Th(SH)_2 para recuperar la actividad de las enzimas. Obtenido de E. Stadtman et al (32).

1.- La hipótesis de reparación específica de proteínas que propone la existencia de algunas Met dentro de las proteínas que son críticas para su función y que las Msr evitarían la pérdida de su actividad al reparar estos residuos (14). Esta hipótesis involucraría a las Msr en la regulación de vías de señalización intracelulares específicas.

Un ejemplo de su función regulatoria está basado en estudios realizados en la calmodulina (CaM), una proteína que funciona como intérprete y sensor de las señales de calcio en todas las células y coordina el metabolismo energético participando en la movilización de reservas energéticas intracelulares a través de la activación de al menos 50 diferentes proteínas blanco. Cuando CaM tiene oxidados los residuos Met¹⁴⁴ o Met¹⁴⁵ sufre cambios conformacionales y queda en un estado auto inhibido, produciendo una baja en el metabolismo celular y un menor consumo de ATP, disminuyendo la generación de EROS. Este estudio sugiere un papel regulatorio de la MsrA, al poder revertir las Met oxidadas de CaM y reestablecer su actividad (5).

2.- La segunda hipótesis propone a las Msr como un sistema de depuración, donde la oxidación de algunos residuos de Met no alterarían de forma drástica la función de las proteínas, sino que estas Met actuarían como captadores de EROS, protegiendo a otros constituyentes celulares ya que las MetO pueden ser reparadas por las Msrs (14, 38).

Estos sistemas enzimáticos reductores de Met oxidadas pertenecen al grupo denominado “enzimas antioxidantes” que incluye varias isoformas de peroxiredoxinas, superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (Gpx). La existencia de este grupo antioxidante desde bacterias a mamíferos es una gran evidencia biológica de lo importante que es combatir y reparar los daños producidos por la generación de EROS (3).

1.3 Características de la MsrA: Su papel en la supervivencia y en la mantención del balance redox celular.

Las enzimas MsrA y MsrB están presentes en la mayoría de los seres vivos y pertenecen al grupo de los 500 genes más importantes para la vida. Los humanos poseen al menos tres genes *msrB*, uno de los cuales genera dos ARNm a través de *splicing* alternativo; para la MsrA existe un solo gen denominado *hmsrA* que se compone de 6 exones, cuyo producto genera dos enzimas con distinta ubicación intracelular: mitocondrial y citosólica (14). La existencia de un solo gen para la MsrA simplifica considerablemente su estudio.

Entre mamíferos la identidad de esta enzima a nivel de aminoácidos es de 90%, y si se compara con bacterias (MsrA de *E.coli*) el porcentaje de identidad llega a 70%. Estudios del mecanismo enzimático han determinado la importancia de tres residuos de Cys: uno en el sitio catalítico y los otros dos residuos vecinos a él, planteando un mecanismo donde la Cys catalítica ataca el S de la MetO, reduciéndolo a su estado natural en la Met, mientras que en la enzima se genera un intermediario Cys-ácido sulfénico que posteriormente se reduce al reaccionar con las Cys vecinas formando puentes disulfuro. Finalmente el enlace disulfuro es reducido por el sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH (figura 1B) (19).

A la fecha, existen diversos estudios que muestran evidencias sobre el papel de la MsrA en los sistemas vivientes. Estos antecedentes también sugieren que la expresión de esta enzima podría estar siendo regulada, sin embargo se desconocen los mecanismos. Los trabajos más destacados son:

- Por Northern Blot y por análisis de bases de datos virtuales (11) obtenidas a través de microarreglos, se cuantificó el nivel de transcrito de la MsrA en diversos tejidos humanos. Se observó que la cantidad de ARNm de la MsrA era variable entre los distintos tejidos, encontrándose mayor cantidad en aquellos correspondientes a órganos detoxificadores como el riñón, el hígado y en tercer lugar, el cerebro (11, 14).

En ratas, la actividad de la MsrA tiene el mismo patrón de expresión que los tejidos humanos (30). Se ha determinado también que la actividad de la MsrA en cerebros de pacientes con Alzheimer es significativamente menor que en individuos sanos, diferencias que resaltan en la zona del hipocampo y del giro dentado (28). Otros análisis determinaron que el nivel de expresión de esta enzima disminuye en diversas patologías, algunas de las cuales se relacionan con el envejecimiento como Parkinson, enfisema pulmonar (fumadores principalmente) y bronquitis (34).

- Se han realizado diversos estudios *in vitro* utilizando diferentes modelos. Por ejemplo, *S.cerevisiae* que sobreexpresan MsrA al ser crecidas en condiciones de estrés oxidativo, tienen una mayor tasa de supervivencia, mejor crecimiento y menores niveles de MetO que los controles. A su vez, los niveles MetO en los mutantes que no expresan MsrA tienen aún mayor diferencia con respecto a la cepa que sobreexpresa MsrA. En este mismo trabajo, linfocitos T humanos transfectados establemente con esta enzima presentan mayor resistencia a estrés oxidativo que los controles (22). En cultivos de células epiteliales de la retina, que tienen un alto nivel de expresión de MsrA, el silenciamiento de este gen produce un aumento en la sensibilidad de estas células al estrés oxidativo inducido por H₂O₂ (15) y se ha observado un aumento de la transcripción del ARNm de esta enzima cuando las células son sometidas a condiciones de estrés oxidativo inducido con peróxido de hidrógeno (33).

- Los estudios *in vivo* se centran principalmente en el papel de la MsrA sobre la longevidad bajo condiciones de estrés oxidativo. Ratones que carecen de la enzima MsrA (MsrA^{-/-}) y ratones WT fueron sometidos a condiciones de hiperoxia por 48 horas y los niveles de modificación y daño de proteínas en órganos como riñón y pulmón fueron 4 veces mayores en ratones MsrA^{-/-} que los WT, lo que implica que la ausencia de esta proteína genera un daño oxidativo generalizado y no un daño particular en los residuos de Met. En este mismo estudio, se evaluó el tiempo de vida de estos mutantes. Los ratones MsrA^{-/-} viven 10% menos que los WT bajo estrés oxidativo (hiperoxia) y 40% menos que el WT en condiciones normales (19). En el modelo *Drosophila*, aquellas que sobreexpresan MsrA en el sistema nervioso central tienen

una longevidad 70% mayor que los controles y al comparar la actividad física de ambos grupos a la misma edad, los mutantes tienen una mayor actividad. Luego de 24 horas bajo condiciones de estrés oxidativo inducido por el herbicida paraquat, entre un 60-70% del grupo control muere mientras que en los mutantes sólo un 10%. Esto sugiere que el aumento en la longevidad de los mutantes podría ser por la acción antioxidante de esta enzima y que la sobre expresión de ésta favorece la calidad de vida al tener los mutantes una mayor actividad física que los controles a la misma edad (31).

Un trabajo publicado recientemente caracterizó una probable región promotora de la MsrA humana utilizando líneas celulares, pero en este estudio sólo encontraron que células derivadas de carcinoma mamario poseen un represor que podría ser tejido específico sobre una región de 309pb ubicada sobre el extremo 5' UTR del gen de la MsrA (8).

Los antecedentes presentados sugieren que la MsrA tendría un papel fundamental en el mantenimiento del sistema redox celular al generar protección frente a estrés oxidativo, así como también la sobreexpresión o supresión de este gen en modelos animales afecta su expectativa de vida y el nivel de oxidación de diversas biomoléculas. Los resultados le otorgan una participación a la MsrA en el fenómeno de envejecimiento y en la generación de enfermedades degenerativas.

A pesar que las evidencias bibliográficas le otorgan a la MsrA una participación activa en el fenómeno de envejecimiento, se desconoce el mecanismo de regulación en la expresión de esta enzima. Es por esto que el desarrollo de esta tesis se enmarca en la búsqueda de factores moleculares que pudiesen estar controlando su expresión. El factor transcripcional FOXO3A surge como un fuerte candidato al ser el regulador maestro de la longevidad, el cual se conserva evolutivamente a través de diversos organismos, por lo que su posible papel como regulador de la MsrA sería muy significativo.

1.4 Vías de regulación en longevidad: FOXO, un gen maestro

Inicialmente se determinó en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* que la mutación de un solo gen producía un aumento significativo de la longevidad, efecto que posteriormente se reprodujo en *Drosophila* y en ratón. Esta mutación producía la pérdida de la función de alguno de los genes que codifican para componentes de la vía de señalización de la insulina/IGF-1, que regula el metabolismo, la reproducción y la longevidad (1, 12, 20).

En *C. elegans* la mutación del gen *daf-2*, homólogo al receptor de insulina/IGF-1R en mamíferos, produce un estado larvario denominado *dauer* que se caracteriza por tener mayor resistencia al estrés oxidativo y aumentar la esperanza de vida de estos gusanos. Este fenotipo se elimina completamente al anular el gen *daf-16* cuyo homólogo en mamíferos es FOXO, por lo que este factor transcripcional evolutivamente conservado fue posicionado como uno de los reguladores maestros que determinan la sobrevivencia y longevidad en los organismos eucariotas. (figura 2) (16).

Distintas vías transduccionales actúan sobre FOXO, pero la que ejerce una mayor regulación es la vía de la PI3K-PKB, conservada evolutivamente a través de las especies. En mamíferos, la unión de insulina/IGF-1 a su receptor de membrana activa distintas moléculas transductoras de señales. De ellas parece ser que la PI3K es crucial en la regulación de la homeostasis metabólica y en la protección de las células frente a la muerte. La PI3K reclutada y activada por el receptor reacciona con sustratos lipídicos generando PIP3 que actúa como segundo mensajero al unirse a proteínas que tienen dominios de unión a estos compuestos, activándolas por fosforilación. Una de estas proteínas blanco es la PKB (también llamada c-Akt) que al ser fosforilada por PIP3 se libera de la membrana plasmática translocándose desde el citosol al núcleo, donde fosforila a sus proteínas blanco en residuos de Ser/Tre ubicados dentro de motivos específicos reconocidos por esta quinasa. PKB fosforila a FOXO en al menos 3 de los 7 residuos de Ser/Tre que se han descrito como fosforilados en este factor

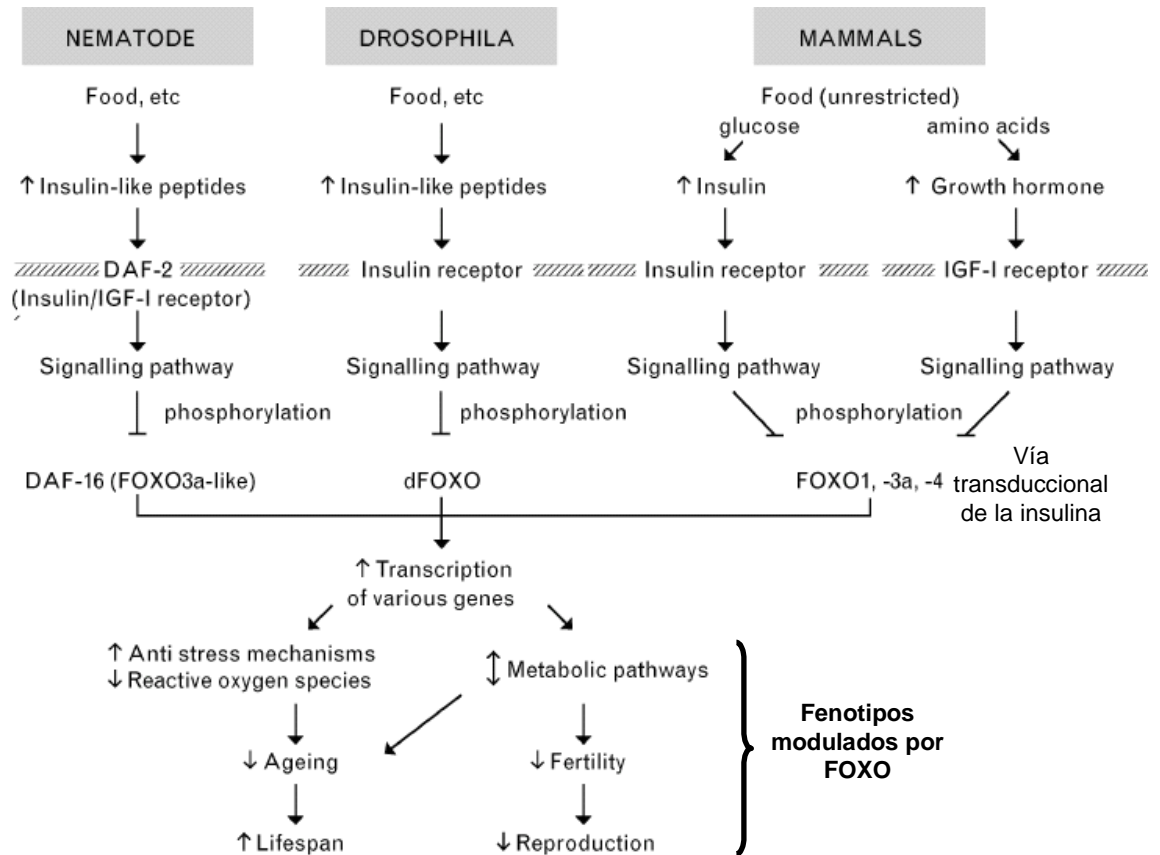


Figura 2. La vía de la insulina/IGF-1 R es conservada en distintas especies y regula el envejecimiento y la longevidad a través de FOXO. Los homólogos de Daf-16 activan la transcripción de diversos genes involucrados en resistencia a estrés oxidativo y metabolismo, entre otras funciones (20).

transcripcional. La fosforilación de FOXO por PKB inhibe su actividad transcripcional, pues induce su relocalización, desde el núcleo al citosol. (figura 3) (6, 20, 36).

Se ha identificado que FOXO tiene otros residuos de Ser/Thr que son fosforilados por otras quinasas, sin embargo se desconoce qué efecto ejercen en la actividad transcripcional de FOXO (36).

El factor transcripcional FOXO no sólo se regula a través de fosforilaciones, sino que también se ha descrito ciertos residuos de lisina que son acetilados y que aparentemente afectarían la unión de FOXO al ADN. También existen trabajos sobre la interacción de FOXO con otras proteínas nucleares, P300 y CBP, las cuales son co-activadoras al componer la maquinaria transcripcional necesaria para transcribir genes. Con respecto a la regulación de FOXO por acetilación, ha cobrado importancia la acción de una desacetilasa dependiente de NAD llamada sirtuina (Sirt) y que es activada específicamente por Resveratrol, un polifenol antioxidante que se encuentra particularmente en el vino. Sirt es conservada evolutivamente y está involucrada en el aumento de la longevidad de diversos modelos animales bajo condiciones de restricción calórica. Estudios demuestran que Sirt interactúa con FOXO particularmente en condiciones de estrés oxidativo, sin embargo existen trabajos contradictorios en sus resultados. Un trabajo postula que Sirt activa a FOXO y otro que reprime la actividad transcripcional de FOXO, por lo que hasta el momento se desconoce el efecto de la desacetilación de FOXO mediada por Sirt (12, 25, 37).

En mamíferos están descritos varios miembros de la familia FOXO: FOXO6, FOXO4, FOXO1 y FOXO3A (también denominado FKHLR1) que posee la mayor homología con DAF-16. Estudios demuestran que todos ellos reconocen y se unen al ADN específicamente en la secuencia 5'-TTGTTTAC-3' denominada DBE (DAF-16 binding element), y que cada uno reconoce distintas secuencias que flanquean el extremo 5' del DBE (10).

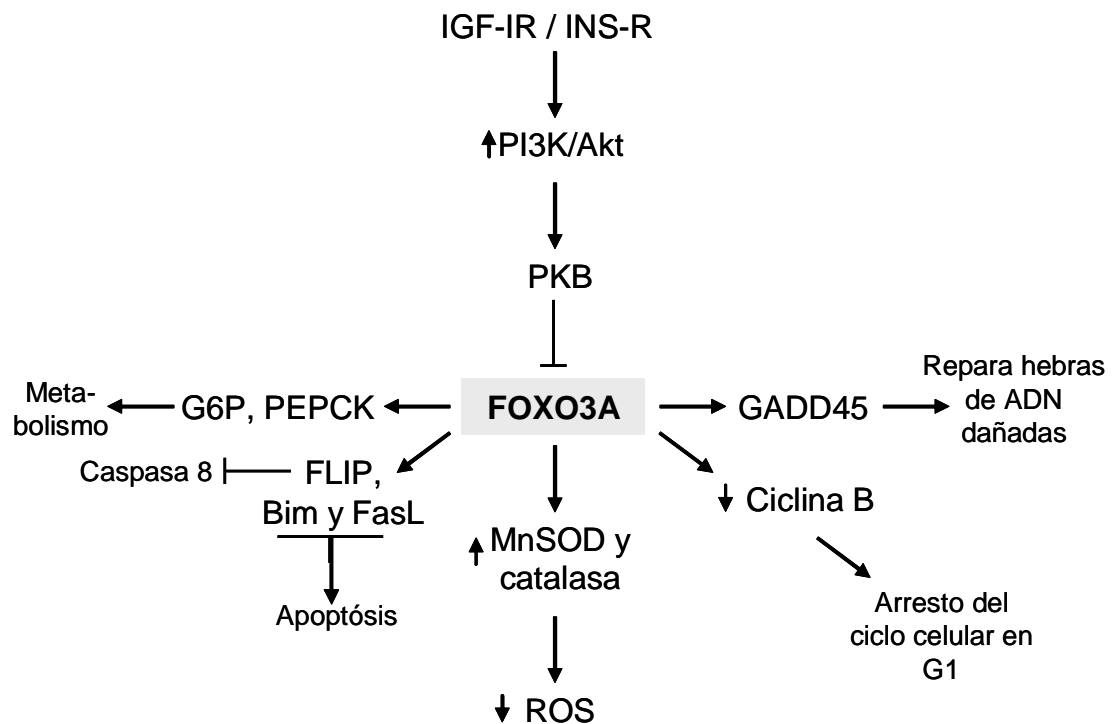


Figura 3: FOXO3A es el eje central de una vía reguladora de longevidad. FOXO3A es regulado principalmente por la vía de señalización de la insulina/receptor IGF-1, que al ser activada provoca la relocalización de FOXO3A desde el núcleo al citosol, inhibiendo su acción. Modula genes relacionados con el metabolismo, progresión del ciclo celular, apoptosis, reparadores y protectores frente a estrés oxidativo. Adaptado de Brian J. Morris. (20).

La familia FOXO regula varios genes (Figura 3) que están involucrados en apoptosis (FasL, Bim, TRAIL), progresión del ciclo celular (p27^{kip}, ciclinas B, D_{1/2}, G₂) y en el metabolismo (G6P, PEPCK y IGF-BP) (20, 36). Particularmente, FOXO3A además estimula la expresión de genes involucrados en la reparación de ADN (GADD45) (35) y de genes que participan en la respuesta frente a estrés oxidativo como catalasa (26) y MnSOD (17). Experimentos hechos bajo condiciones de estrés oxidativo inducido con H₂O₂ muestran que células que sobre expresan FOXO3A tienen un daño oxidativo menor que las control, sugiriendo que FOXO3A protege a las células del estrés oxidativo al estimular la expresión de genes antioxidantes como la MnSOD (17).

En resumen, los antecedentes indican que FOXO es el factor transcripcional clave en la regulación de la longevidad al activar genes antioxidantes y reparadores bajo condiciones de estrés oxidativo y al regular genes involucrados en el metabolismo celular. Su regulación es compleja al haber diversas cascadas de señalización que convergen sobre este factor transcripcional, regulando su actividad.

2. HIPOTESIS DE TRABAJO

El promotor de la enzima Metionina Sulfóxido Reductasa A (MsrA) es activado por el factor transcripcional FOXO3A

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el promotor de la MsrA y su interacción con el factor FOXO3A

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar posibles sitios de unión a factores transcripcionales, relacionados con estrés oxidativo, en el fragmento de 2000 pb río arriba del inicio de la traducción de la enzima MsrA. El estudio se enfocó en analizar probables secuencias de unión al factor FOXO3A.
- Estudiar si el factor FOXO3A interviene en la regulación transcripcional de la MsrA.
- Seleccionar los sitios importantes del promotor para la regulación por FOXO3A.
- Determinar si en condiciones de estrés oxidativo y resveratrol se activa el promotor de la MsrA.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Materiales y reactivos generales

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) se obtuvieron los siguientes reactivos: albúmina de suero de bovino (BSA), bromuro de etidio, dimetilsulfóxido (DMSO), o-Nitrofenil β -d-Galactopyranosido (ONPG), Trizma base, EDTA, Triton X-100, Tween-20, glicina, nitrito de sodio, inhibidores de proteasas (Pepstatina A, Leupeptina, Aprotinina, Bacitracina, Benzamidina), antibióticos streptomycina-penicilina, gelatina. De Merck (Darmstadt, Alemania) se obtuvieron: cloruro de sodio, cloruro de potasio, hidróxido de sodio, etanol, isopropanol, metanol, paraformaldehído, D-glucosa, ácido ortofosfórico, formamida, formaldehído 37%, ácido clorhídrico, cloruro de magnesio, sulfato de cobre y potasio, acetonitrilo, perhidrol (H₂O₂ 30%).

De Kodak (Rochester, NY, EUA): reactivos de revelado fotográfico.

De Invitrogen Corp (Carlsbad, CA, EUA) dATP, dGTP, dTTP, dCTP, Medio LB broth miller base, Agarosa ultra pura, TRIS, el reactivo Lipofectamine 2000™ para la transfección de líneas celulares, MgCl₂ grado PCR.

De Fuji (Japón): películas para revelado de western. De Dako (Carpintería, CA, EUA) fluoro mounting medium.

De Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA): tripsina 10X, bromuro de etidio, Optimem I reduced serum media, X-gal.

De Pierce (Rockford, IL, EUA): El sistema comercial BCA protein assay para medición de proteínas y el kit revelado quimioluminiscente ECL.

De PerkinElmer (Waltham, MASS, EUA) el sistema comercial para revelado quimioluminiscente (ECL) Western Lighting chemiluminescence reagent Plus.

De BioRad Laboratories (Hercules, CA, EUA) TEMED, De Calbiochem (La Jolla, CA, EUA):7-deacetyl Forskolin.

De Millipore (Bedford, MA EUA) se obtuvo la membrana de PVDF Immobilon-P para la transferencia de proteínas.

De W&Z, (Santiago, Chile) se obtuvo: acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de Amonio (APS), TEMED, β -mercaptoetanol, dodecil sulfato de sodio, bicarbonato de sodio, sacarosa, glicina, cloruro de calcio, PBS 10X, TBS 10X, NP-40, sodio fosfato monobásico y dibásico, EDTA sal sódica agua sin nucleasas (DEPC) y la solución de Chomczynski con fenol.

4.1.2 Enzimas

Las enzimas de restricción: BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI y XhoI se obtuvieron de Gibco BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA. Las enzimas ADN polimerasa Taq Platinum y Pfx ADN polimerasa Platinum de Invitrogen Corp junto con el tampón para reacción 10x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM) y los nucleótidos dATP, dTTP, dGTP, dCTP, y $MgCl_2$ 50 mM. La ligasa T4 y su solución 10X para realizar la ligación se obtuvo de Promega Corp (Madison, WI, EUA).

4.1.3 Marcadores de peso molecular

Los marcadores de peso molecular 1 Kb ADN ladder, para determinar tamaño de ADN doble hebra entre 12 Kb y 500 pb de Gibco BRL (Grand Island NY, EUA) y el ADN ladder de 100 pb para ADN doble hebra entre 1500 pb y 100 pb de New England Biolabs (EUA). El marcador de peso molecular para proteínas, utilizado para Western Blot fue el Prestained Protein Molecular Weight Marker de Fermentas (Hanover, MD, EUA) para discernir entre proteínas de 20 a 200 kDa.

4.1.4 Medios de cultivo celular

El medio de cultivo DMEM (Dulbecco Modified Eagle Media con HEPES y L-glutamina) para células eucarióticas que se utilizó fue obtenido de Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA) así como también el suero fetal de bovino y el agar para cultivo de bacterias en placa.

Como medio base de crecimiento de bacterias se utilizó el LB Lennox broth base de Invitrogen Corp (Carlsbad, CA, EUA)

4.1.5 Material Biológico

4.1.5.1 Bacterias

Se utilizaron bacterias competentes de las cepas *E.coli* XL1-blue y *E.coli* DH5 α para la transformación con los plasmidios de interés.

4.1.5.2 Vectores

Se utilizó el plasmidio pGemT-easy vector (Madison WI, EUA) para clonar productos PCR mayores a 1000 pb y TOPO-TA de Invitrogen Corp (Carlsbad, CA, EUA) para clonar productos PCR de tamaño menor a 1000 pb. Ambos plasmidios contienen resistencia a ampicilina.

El vector reportero pGL2-Basic (Madison WI, EUA) que contiene el cADN para luciferasa de luciérnaga se utilizó para evaluar la actividad de los distintos fragmentos del promotor de la MsrA.

Los vectores pcADN 3.1 y pcADN 3.1 myc-His de Invitrogen Corp (Carlsbad, CA, EUA) se utilizaron para sobreexpresar el factor de transcripción FOXO3A.

El vector comercial pSV- β -galactosidase (Madison WI, EUA) se utilizó como control interno para monitorear la eficiencia de transfección de los cultivos celulares. Este plasmidio tiene el promotor temprano y enhancer SV40 que dirigen la transcripción del gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa.

4.1.5.3 Líneas celulares

Células HepG2 (hepatoma humano), células Hek293 (embrionarias de riñón humano) y células HeLa (carcinoma cervicouterino) fueron obtenidas de la American Type Cell Collection (ATCC).

4.1.5.4 Anticuerpos

De Upstate Biotechnologies (NY, EUA) se obtuvo el anticuerpo policlonal de conejo Anti-MsrA. El anticuerpo anti-tubulina hecho en ratón se obtuvo de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA.)

El anticuerpo monoclonal Anti-myc fue facilitado gentilmente por la Dra. Marcela Bravo, Laboratorio de Inmunología Clínica y Reumatología, PUC.

El segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con el fluoróforo Alexa 546 se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). Los segundos anticuerpos anti-conejo-peroxidasa y anti-ratón-peroxidasa se obtuvieron de KCL (Gaithersburg, MD, EUA)

4.2 Métodos

4.2.1. Cultivo y mantención de células

4.2.1.1 Cultivo de líneas celulares.

Las células HeLa, HepG2 y Hek293 fueron crecidas en monocapas y mantenidas en placas de 60mm o 100mm de diámetro a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Como medio de crecimiento se utilizó el medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino, glucosa a una concentración de 4,5 gr/L (medio denominado alta glucosa) y con 100U/ml de penicilina, 0.1mg/ml de estreptomina. Las células fueron crecidas hasta alcanzar no más de 85% de confluencia, y para su amplificación y siembra fueron lavadas con PBS e incubadas con tripsina 1X por 5 min a 37°C. Posteriormente se centrifugaron a 3000 RPM por 3 min en 1 ml de medio. El número de células sembradas se hizo acorde al tipo de célula, al experimento y al tamaño de las placas.

4.2.1.2 Transfección transiente de líneas celulares

4.2.1.2.1 Transfección transiente de células HepG2

Para la transfección de líneas HepG2 se utilizó el reactivo Lipofectamine 2000 de Invitrogen Corp (Carlsbad, CA, EUA) según las recomendaciones del fabricante. 24 horas antes de la transfección, las células fueron sembradas en medio DMEM alta glucosa 10% suero sin antibióticos ni antimicóticos en placas de 24 pocillos con una superficie de 2 cm² a una densidad de 120000 cél/pocillo. Al momento de la transfección, las células se encontraban al 90% de confluencia y el medio de cultivo se cambió por DMEM alta glucosa sin antibióticos y sin suero. En cada pocillo se agregó un total de 0,8 µg de ADN plasmidial (como la transfección involucró a más de un plasmidio, se usó 0,4 µg del plasmidio pGL2-basic, 0,15 µg del plasmidio pcADN 3.1 y 0,15 µg del plasmidio pSV-β-galactosidasa). Para un pocillo, se diluyó 2 µl del reactivo Lipofectamine 2000 en 50 µl de Optimem I, se dejó incubar por 5 min y luego se mezcló con el ADN plasmidial previamente diluido en 50 µl. La mezcla cuyo volumen final fue de 100 µl se dejó incubar por 20 min a temperatura ambiente y luego se agregó sobre las células. Las células y el ADN plasmidial se incubaron por 6 horas a

37° C, 5% de CO₂ y 95% de O₂. Al cabo de este período el medio fue reemplazado por el medio DMEM alta glucosa 10% suero sin antibióticos y se incubó por toda la noche.

4.2.1.2.2 Transfección transiente de células HEK293

Para la transfección transiente de HEK293, se utilizó un protocolo modificado al descrito en 2.1.1.1, ya que debido al proceso de transfección, estas células pierden adherencia. 48 horas antes de la transfección, las células fueron sembradas en medio DMEM completo en placas de 6 pocillos con una superficie de 10 cm² a una densidad de 1.130.000 cél/pocillo. Al momento de la transfección, las células se encontraban al 90% de confluencia y el medio de cultivo fue cambiado por DMEM alta glucosa sin antibióticos y sin suero. En cada pocillo se agregó un total de 2µg de ADN plasmidial (se usó 1 µg del plasmidio pGL2-basic, 0,5 µg del plasmidio pcADN 3.1 y 0,5 µg del plasmidio pSV-β-galactosidasa). Para un pocillo, se diluyó 5 µl del reactivo Lipofectamine 2000 en 250 µl de Optimem I, se dejó incubar por 5 min y luego se mezcló con el ADN plasmidial previamente diluido en 250 µl. La mezcla cuyo volumen final fue de 500 µl se dejó incubar por 20 min a temperatura ambiente y luego se agregó sobre las células. Las células y el ADN plasmidial se incubaron por 5 horas a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de O₂. Al cabo de este período el medio se reemplazó por el medio DMEM alta glucosa 10% suero sin antibióticos y se incubó por toda la noche.

4.2.1.3 Bacterias competentes

Se generaron bacterias competentes de las cepas de *E.coli* XL1-blue y DH5α. Para ello, se crecieron 3ml de cultivo bacteriano toda la noche en LB sin ampicilina, con una agitación de 220 rpm, del cual se tomó 1 ml para inocular 200 ml de LB sin ampicilina. Las bacterias fueron crecidas hasta una OD 600 de 0.7 luego de lo cual se centrifugaron a 3000 rpm por 7 min a 4°C. El sedimento bacteriano fue resuspendido en 100 ml de CaCl₂ 75 mM esteril y frío, y se incubó a 4°C por 40 min. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 4°C y el sedimento se resuspendió en 20 ml de CaCl₂ 75 mM despacio, a lo cual se le agregó glicerol hasta un 14% del volumen final. Las bacterias competentes fueron alicuotadas y guardadas a -80°C hasta su uso.

4.2.1.4 Mantención de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas positivas para el plasmidio de interés fueron mantenidas congeladas a -80°C con glicerol al 40% o a 4°C en placas LB-agar 1,5% (LB= triptona 10 g/l, NaCl 5 g/l y extracto de levadura 5 g/l) conteniendo 100 mg/l de ampicilina. Para crecer estas bacterias, se inoculó un tubo de 15 ml que contenía 5ml de LB/Ampicilina con una colonia aislada de las placas o con 20 μl de la reserva congelada en glicerol. El inóculo se creció toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. Posteriormente, el plasmidio se purificó utilizando los sistemas comerciales señalados en la sección 2.3.1 siguiendo las recomendaciones del fabricante. La confirmación de la identidad del plasmidio se realizó por el análisis de los patrones de corte de enzimas de restricción correspondientes al fragmento subclonado o por secuenciación.

4.2.1.5 Transformación de cepas bacterianas

Para la transformación de las bacterias XL1-blue o DH5 α con los diferentes plasmidios de interés, se descongelaron 100 μl de células competentes en hielo y se mezclaron con la reacción de ligación. Se incubaron por 30 min en hielo. Luego se dio un pulso de calor a 42°C por 45 seg y se dejó reposar en hielo por 2 min. A la mezcla de transformación se le agregó 1 ml de medio de crecimiento LB y se incubó por 1 h a 37°C con agitación a 250 rpm. Finalmente, alícuotas de 50-100 μl de la mezcla se sembró en placas de Agar-LB-Ampicilina, las que se incubaron toda la noche a 37°C .

4.2.1.6 Evaluación de colonias positivas

La positividad de los clones fue confirmada mediante la selección directa de las colonias, donde parte de la colonia fue cultivada en 5 ml LB/ampicilina líquido en agitación por 12 horas. De cada colonia se tomó 1 ml, el cual se centrifugó y se obtuvo el sedimento bacteriano, que fue resuspendido en 300 μl de solución STETL (sacarosa 8%, Tritón X-100 al 5%, EDTA 50 mM pH 8.0, Tris 50 mM pH 8.0, 1 mg/ml lisozyma) y se aplicó un golpe de calor a 99°C por 90 seg. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 14000 rpm por 20 min, y el sobrenadante se precipitó con 1 volumen de isopropanol por 1 hora a -20°C . Finalmente se centrifugó a 14000 rpm 5 min a 4°C , se eliminó el

sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 50 µl de agua, para posteriormente verificar la positividad de las colonias mediante el corte con enzimas de restricción o reacción de PCR utilizando primers específicos.

4.2.2 Técnicas Bioquímicas

4.2.2.1 Extractos celulares para Western blot y para ensayo de actividad Msr

Las células fueron lavadas con el amortiguador fosfato salino pH 7,4 (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 1,4 mM y KH₂PO₄ 1,4 mM) (PBS) y luego se les agregó tampón de lisis que contiene Tris- HCl 50 mM (pH 7,4), 1% de NP-40, 0,25% de desoxicolato de Sodio, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, PMSF 1mM e inhibidores de proteasas, Pepstatina A, Aprotinina y Leupeptina a una concentración de 5 µg/ml.

La incubación de las células con el tampón de lisis se realizó en hielo por 10 min y con agitación, luego mediante el uso de un rastrillo celular se soltaron de la placa y se traspasaron a tubos Eppendorf. Para eliminar residuos celulares posteriores, el extracto se homogeneizó con jeringa de tuberculina 20 veces o fue sonificado por 3 pulsos de 50 watt de salida por 5 seg cada uno. Luego se centrifugó por 15 min a 14000 rpm a 4° C. Se descartó el precipitado y se guardó el sobrenadante para realizar los diferentes ensayos.

4.2.2.2 Extractos celulares para ensayo de actividad Luciferasa y β-galactosidasa.

Para estos ensayos enzimáticos, las células transfectadas fueron lisadas utilizando Reporter Lysis Tampón (RLB) de Promega Corp (Madison, WI, EUA), especialmente diseñado para no interferir en la medición de ambas enzimas. Para esto, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y luego se agregaron 100 µl de RLB para placas de 24 pocillos ó 180 µl de RLB para placas de 6 pocillos. Luego las placas fueron incubadas en hielo con agitación por 10 min y posteriormente mediante el uso de puntas amarillas dobladas o rastrillo celular, se soltaron las células de la placa y se traspasaron a Eppendorf, para eliminar residuos celulares. Los extractos celulares fueron guardados a -80°C hasta el momento de los ensayos.

4.2.2.3 Cuantificación de proteínas en extractos celulares

Se utilizó el método del ácido bicinónico, reactivo que forma un complejo colorimétrico con Cu^{1+} formado por la reducción alcalina de Cu^{2+} en presencia de proteínas. 1 a 5 μL de la muestra, previamente diluidos en PBS a un volumen final de 25 μL en pocillos de 0,32 cm^2 , fueron mezclados con 200 μL del reactivo de trabajo provisto por el fabricante. Después de mezclar, la placa de 96 pocillos fue incubada por 30 min a 37 °C. Se cuantificó la absorbancia a 562 nm de cada pocillo en un lector de ELISA Bio-Tek modelo Synergy HT y se determinó la concentración de proteínas totales sobre la base de una curva estándar construida con albúmina de suero bovino en un rango de 0,0625-2 mg/ml.

4.2.2.4 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Los geles de SDS-PAGE se utilizan para la separación de proteínas totales de los extractos celulares de los cultivos. El gel concentrador compuesto por acrilamida al 3%, Tris-HCl 0.125 M pH 6,8, SDS 0,1%, PSA 0.05% y Temed 0,15% y las proteínas fueron separadas en geles de 12% de acrilamida, Tris-HCl 0,38M pH 8,8, SDS 0,1%, PSA 0,05% y Temed 0,15%. Las proteínas se mezclaron con amortiguador de muestra Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 6%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol al 0,07%. Las muestras se hirvieron por 5-10min antes de ser depositadas en el gel, el cual se corrió por 1-2h en un campo eléctrico de 150V constante.

4.2.2.5 Western Blot

Transferencia: Las proteínas fraccionadas previamente por SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de Inmobilon de PVDF, utilizando una cámara de transferencia Bio-Rad modelo Mini-Protean® III Cell. La membrana debe ser activada previamente a la transferencia por 1min en metanol 100%. El traspaso se realizó a 4° C por 2 h a 300 mA constante en una solución amortiguadora que contenía Tris-HCl 25 mM pH 8,4, glicina 190 mM, SDS al 0,037% y metanol al 20%. La eficiencia del traspaso se determinó por el uso de estándares de peso molecular preteñidos.

Revelado de la reacción antígeno-anticuerpo: la membrana conteniendo las proteínas transferidas fue incubada por 2 h a temperatura ambiente en amortiguador de bloqueo TBST-Leche (Tris-HCl 20 mM pH 7,0, NaCl 0,1 M, Tween-20 al 0,05% y 5% de leche descremada) para bloquear los sitios inespecíficos. Luego se agregó en las diluciones adecuadas el primer anticuerpo específico (anti MsrA diluido 1:500) y se incubó en agitación por toda la noche a 4° C con agitación. Posteriormente la membrana se lavó 2 veces con agua y se incubó con el correspondiente segundo anticuerpo diluido 1:10.000 en el amortiguador TBST-leche y se incubó, por 2h a temperatura ambiente con agitación. Luego, la membrana fue lavada 2 veces con agua, 10 min con TBST y una hora en TBS con agitación. Este segundo anticuerpo estaba conjugado con peroxidasa y el revelado fue hecho con sustrato quimiolumincente ECL.

4.2.2.6 Ensayo de actividad para Msr.

La actividad de Msr se determinó mediante la detección del sustrato sintético dabsyl-MetO que se redujo a dabsyl-Met producto de la acción de esta enzima. El Dabsyl (4-dimetilaminoazobenzeno-4'sulfonil) obtenido de Pierce (Rockford, IL, EUA) tiene la capacidad de ser conjugado fácilmente con diversos aminoácidos y es detectado espectrofotométricamente a 462 nm. Para la reacción, se mezclan 200-300 µg de proteínas totales de extractos celulares en 15 mM HEPES pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 30 mM KCl, ditioeritrol 20 mM, dabsyl-MetO 0,7 mM y 10µM de dabsyl-Norleucina como estándar interno en un volumen final de 100 µl. La reacción se llevó a cabo con agitación suave a 37°C por 1 hora, luego las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm 10 min y al sobrenadante se agregaron 4 volúmenes de acetato de nitrilo para detener la reacción. Las muestras fueron llevadas a sequedad utilizando nitrógeno gaseoso y luego fueron resuspendidas en 100 µl de metanol, donde 30 µl fueron inyectados en el equipo HPLC Merck y separados por columna C18 de fase reversa.

4.2.2.7 Ensayo de actividad de la Luciferasa

Para cuantificar la expresión del gen reportador de la luciferasa en los cultivos, se utilizó el sistema comercial de Promega, Luciferase Assay System específico para células de mamíferos. De acuerdo con las recomendaciones del fabricante, todos los

reactivos y los extractos celulares se encontraban a temperatura ambiente. Se mezclaron 20 μ l de los extractos celulares con 100 μ l de la mezcla de reacción y se cuantificó la luminiscencia en un Luminómetro Berthold modelo Sirius, durante los 30 primeros seg de incubación a temperatura ambiente.

4.2.2.8 Ensayo de actividad para β -galactosidasa

Este ensayo se realizó en placas de 96 pocillos con un área de 0,32 cm² cada pocillo, donde se agregaron 45 μ l de muestra y 100 μ l de reactivo ONPG, 4 mg/ml en tampón Z (tampón fosfato 0,1M pH 7,4, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM), y la mezcla se incubó a 37°C entre 30-90 min, evitando que llegue a saturación. La reacción se detuvo agregando 55 μ l de Na₂CO₃ 1 M y se determinó la absorbancia a 405 nm de cada pocillo en un lector de ELISA Bio-Tek modelo Synergy HT.

4.2.2.9 Inmunofluorescencia

Para comprobar que FOXO3A se expresaba en el sistema utilizado, células Hela fueron sembradas sobre cubreobjetos y posteriormente transfectadas con el vector de expresión pcADN 3.1 myc-His que codifica para FOXO3A. Primeramente, las células fueron lavadas con el PBS-Ca/Mg (0,1 mM Calcio y 1 mM Magnesio) y luego se fijaron en paraformaldehído al 4% disuelto en PBS por 1 hora. Luego, la solución de fijación fue removida y se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS-Ca/Mg para retirar el paraformaldehído, a continuación las células se permeabilizaron con PBS 0,2% Tritón X-100 por 5 min y luego se bloqueó con PBS gelatina 0,2%, 2 veces por 5 min. Luego del bloqueo, los cubreobjetos fueron incubados con 30 μ l del líquido ascítico del híbrido que produce un anticuerpo anti-myc sobre parafilm y cámara húmeda por toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los cubreobjetos fueron lavados con PBS gelatina 0,2% tres veces por 5 min a temperatura ambiente, luego se incubó con el 2º anticuerpo anti-mouse Alexa 546 diluido 1:100 en PBS gelatina 0,2%, por 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente, se realizaron 6 lavados de 5 min cada uno con PBS gelatina 0,2% en oscuridad, y un último lavado con PBS por 5 min. Finalmente las células fueron guardadas a 4°C en el medio de montaje *fluoro mounting*

médium hasta ser observadas en un microscopio Nikon de fluorescencia, a un aumento de lente objetivo de 100X.

4.2.3 Técnicas de Biología Molecular

4.2.3.1 Purificación de plasmidios recombinantes

Las bacterias de la cepa XL-1blue o DH5 α que contenían los plasmidios de interés fueron crecidas en medio líquido LB, ampicilina (100 μ g/ml), a 37° C y bajo agitación de 185 rpm durante la noche. Para la purificación de plasmidios a pequeña escala (a partir de 5 ml de cultivo de bacterias), el procedimiento utilizado fue el recomendado por el proveedor del sistema comercial “E.Z.N.A.[®] Plasmid MiniPrep Kit”, basado en el método de la lisis alcalina. Este método permitió preparar entre 5 a 18 μ g de plasmidio, el que fue analizado con enzimas de restricción o por su directa secuenciación.

Para la purificación a mediana escala (a partir de 50 ml de cultivo de la cepa bacteriana transformada), el procedimiento utilizado fue el recomendado por el proveedor del sistema comercial “E.Z.N.A.[®] Plasmid MidiPrep kit”, también basado en el método de la lisis alcalina mencionado anteriormente. Con este método se obtienen alrededor de 4 μ g de plasmidio libre de ARN y cuya pureza permite su utilización en la transfección de cultivos de líneas celulares, para lo que se tuvo especial cuidado de resuspenderlos en agua estéril.

4.2.3.2 Digestión de los plasmidios recombinantes con enzimas de restricción

Para las digestiones, se incubó el ADN (0,2 a 1,0 μ g) con 1-10 unidades de enzima de restricción en un volumen final de 25-50 μ l durante 2 h a 37° C y en presencia de la solución de reacción recomendada por el fabricante de la enzima. Los fragmentos de ADN obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa.

4.2.3.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN o plasmidios recombinantes fueron separados mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa entre 0,8 a 1,5% (p/v) dependiendo del

tamaño del ADN. Los geles de agarosa se realizaron en amortiguador TBE 1x (Tris-HCl 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM; pH 8,8) y se agregó bromuro de etidio (BrEt) a una concentración final de 0,3 µg/ml. Las muestras se cargaron al gel en amortiguador de carga, donde ¼ de su volumen corresponde a glicerol 20% v/v; sarcosil 0,1% p/v; azul de bromofenol 0,1% p/v; EDTA 25 mM. Como amortiguador de corrida se utilizó TBE 1x. Normalmente se aplicó un campo eléctrico de 70V por 1 a 1.5h. Finalmente, se visualizaron los fragmentos de ADN en un transiluminador UV y se les tomó una fotografía utilizando una cámara digital Cannon de 5,0 megapíxeles.

4.2.3.4 Purificación de fragmentos de ADN

Para purificar fragmentos de ADN desde geles preparativos de agarosa, se utilizó el sistema comercial Rapid gel extraction system de Marlingen Bioscience, para lo cual se siguieron las recomendaciones del fabricante. Se extrae la banda de ADN de interés desde el gel de agarosa, el cual fue recuperado en agua estéril y posteriormente concentrado para lograr una concentración suficiente para la reacción de ligación.

4.2.3.5 Obtención de fragmentos de ADN por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

4.2.3.5.1 Generalidades de la reacción de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en repetidas reacciones de polimerización de una determinada zona de un ADN. Esta reacción es catalizada por la ADN polimerasa *Taq* de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* (en esta tesis se utilizó la variante denominada Platinum que posee un anticuerpo adherido a la enzima, la cual se activa después de someterla a 95°C por 5 min), mediante el uso de dos oligonucleótidos como partidores específicos, que son complementarios a un templado cualquiera de ADN, y que permiten el inicio de la reacción de polimerización.

Las reacciones se realizaron un termociclador de Perkin Elmer (GeneAmp PCR System, modelo 2400), en un volumen final de 25 µl y los componentes de la mezcla de reacción fueron los siguientes: templado de ADN, amortiguador de la ADN polimerasa Taq 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM); dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 0,2mM cada uno, MgCl₂ 1,5 mM, partidores 1,5 µM cada uno y 2,5 unidades de ADN

polimerasa taq. Los ciclos de PCR utilizados para la obtención de cada fragmento variaron dependiendo del Tm de cada partidor (temperatura óptima estimada para la hibridación del partidor con el ADN) y del largo del fragmento deseado.

Las secuencias y las Tm de los partidores utilizados en esta tesis se describen en la tabla I.

La estimación de la Tm de los partidores se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$Tm = [(C+G) \times 4] + [(T+A) \times 2]$$

Después de cada reacción, los productos se mantuvieron a 4°C hasta que fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa para comprobar su correspondencia de tamaño.

En la siguiente sección se describen las condiciones utilizadas para cada fragmento.

4.2.3.5.2 Obtención de distintos fragmentos de la región 5' no codificante de la MsrA

La figura 4 muestra las distintas construcciones del plásmido pGL2-Basic que tienen el gen reportero *luc* acoplado a tres diferentes segmentos del promotor

- hpromo MsrA 2000 pb: A partir de ADN genómico de neutrófilos y utilizando oligonucleótidos específicos que contenían sitios de restricción para las enzimas KpnI y HindIII, se amplificó por PCR el fragmento de 2017 pb ubicado río arriba del codón de inicio de la traducción de la MsrA. El fragmento obtenido fue posteriormente clonado en el vector pGemT-Easy Vector y analizado por secuenciación directa y para verificar la correcta amplificación. A partir de este vector que contiene el segmento de -2017 pb, obtenido por la Dra. Rebeca Aldunate, se realizaron las distintas construcciones del promotor.

- hpromo MsrA 1408 pb: A partir del fragmento hpromo MsrA 2000 pb clonado en el vector pGem-T, se obtuvo un fragmento de 1408 pb utilizando los partidores hpromoMsrA1408-XhoI y hpromoMsrA-HindIII mediante una reacción de PCR utilizando las siguientes condiciones: 95°C/ 5 min; 35 ciclos de 95°C/ 30 seg 60°C/30 seg 72°C/ 90 seg ; 72°C/ 10 min. El fragmento fue purificado y clonado en el vector pGem-t Easy Vector y analizado por secuenciación para verificar su correcta amplificación.

- hpromo MsrA 260 pb: A partir del fragmento hpromo MsrA 2000 pb clonado en el vector pGem-T, se obtuvo un fragmento de 260 pb utilizando los partidores hpromoMsrA260-BamHI y hpromoMsrA-HindIII mediante una reacción de PCR realizada en una solución salina que contiene DMSO para la óptima amplificación de fragmentos ricos en G-C que probablemente presenten estructura secundaria. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: 95°C/ 5 min; 35 ciclos de 95°C/ 30 seg 58°C/ 40 seg 72°C/ 30 seg ; 72°C/ 10 min.

El fragmento fue purificado y clonado en el vector TOPO-TA y analizado por secuenciación para verificar su correcta amplificación.

- hpromo MsrA 1408 FOXO Mut: El fragmento de 1408 pb con una mutación puntual en el sitio de unión del factor transcripcional FOXO3A (920 pb río arriba del ATG de inicio de la traducción), se obtuvo a través de la técnica "PCR overlapping extension", utilizando como templado el vector pGem promoMsrA 1408, y realizando dos amplificaciones con los partidores que contenían una mutación puntual en el sitio de unión de este factor transcripcional (Adenina -1120 se cambió por una Guanina). De estas amplificaciones se obtuvieron dos fragmentos:

468 pb, amplificado con los partidores hpromo MsrA 1408 y hpromoMsrA FOXO mut Antisense y 940 pb, amplificado con los partidores hpromoMsrA FOXO mut sense y hpromoMsrA 3' HindIII. La amplificación de ambos fragmentos se realizó en 30 ciclos de 95°C/ 30 seg 55°C/ 40 seg y 72°C/ 1 min. Los fragmentos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa para corroborar su tamaño y posteriormente fueron purificados. Ambos fragmentos tienen 32 pb en común que corresponden a los partidores que contenían la mutación, lo que permite una hibridación de ambos fragmentos en esta zona. Utilizando los fragmentos anteriormente purificados, que tienen 32 pb en común correspondiente a los partidores que contenían la mutación de manera que se produce una hibridación en esta zona, se realizó una amplificación del fragmento de 1408pb que contiene una mutación puntual en el sitio de unión del factor FOXO3A ubicado a -920 pb. La amplificación fue hecha en 20 ciclos de 95°C /30 seg 65°C/ 40 seg y 72°C/ 90 seg.

Tabla I. Partidores utilizados.

Partidor	Secuencia	Tm (°C)
hpromoMsrA 5' KpnI	5' CGTGGTACCCACCACTGAAGGCAAAAATGTT 3'	62
hpromoMsrA 3' HindIII	5' CGTAAGCTTGGGAGGGCGCCAGCCGAA 3'	64
hpromoMsrA1408	5' AGTGGTACCAGCAATCCTCCTGCCTCAG 3'	66
hpromoMsrA260	5' ATGGATCCGAGAGAACCTCAGGAACT 3'	78
hpromoMsrA FOXO mut sense	5' GTCCAGACCACATGAAGACAAAAGTGGTAACTA 3'	80
hpromoMsrA FOXO mut Antisense	5' TAGTTACCACTTTGTCTTCATGTGGTCTGGAC 3'	80
hFOXO3 A 5' BamHI	5' AGTGGATCCATGGCAGAGGCACCCGGCTT 3'	62
hFOXO3 A 3' XhoI	5' ATACTAGAGGCCTGGCACCCAGCTCTGA 3'	64

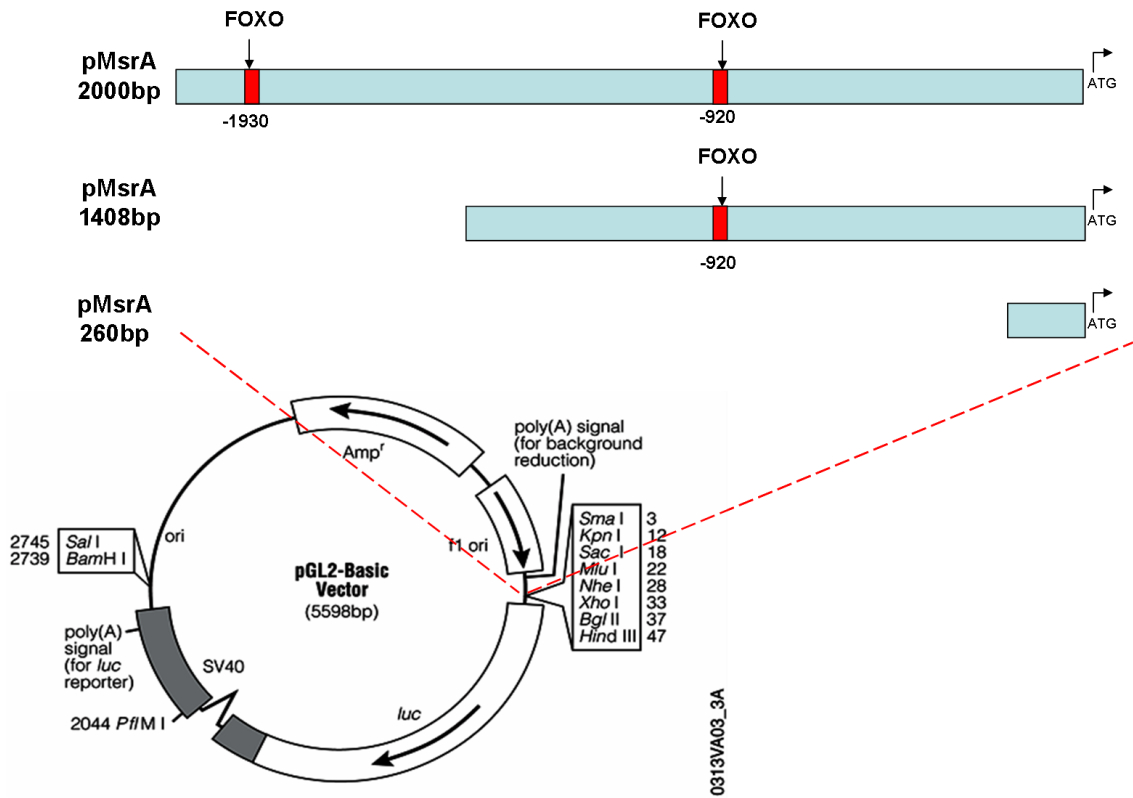


Figura 4. Esquema de las distintas construcciones del promotor de la MsrA humana. Estos tres fragmentos fueron generados por PCR utilizando partidores específicos y luego verificados por secuenciación. Posteriormente los fragmentos fueron clonados en el vector reportero para el gen de la luciferasa pGL2-Basic. En rojo se destacan los sitios de reconocimiento de FOXO3A y su ubicación respecto al ATG de inicio de la traducción de la MsrA.

4.2.3.6 Extracción de ARN total de cultivos celulares

Células cultivadas en placa de 60mm fueron lavadas con PBS 1X. Inmediatamente, la placa fue puesta en hielo y se le agregó 1ml de solución de Chomczynski con fenol. El contenido de la placa se trasladó a un tubo Eppendorf y se mantuvo por 10' en hielo. Para asegurar la lisis completa de las células, estas fueron pasadas 10 veces por jeringa de tuberculina y luego se agregó 200µl de cloroformo, se agitó y se mantuvo en hielo por otros 10'. Posteriormente se centrifugó a 12000g durante 15' a 4°C. La fase acuosa superior fue extraída y luego se precipitó con 500µl de isopropanol frío por toda la noche a -20°C. Finalmente, se centrifugó a 12000 durante 10' a 4°C y el precipitado resultante se lavó con 1ml etanol 75% en DEPC y centrifugado a 12000g durante 10' a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el ARN se resuspendió en agua DEPC a 65°C en un volumen de 30 µl. Las muestras fueron concentradas hasta obtener una concentración de al menos 1 µg/µl.

4.2.3.7 Obtención de ADNc por RT-PCR (reacción de transcripción inversa seguida de PCR)

Los ADNc de los genes de interés fueron obtenidos usando el sistema comercial de síntesis de ADNc "MLV Reverse transcriptase" de Invitrogen. Para obtener el ADNc se siguió el protocolo recomendado por el fabricante, donde se utilizaron 2 µg de ARN total extraído de los cultivos celulares, calentado a 65°C por 5 min y luego a 4°C para desnaturar el ARN con 200 ng de partidores aleatorios, amortiguador 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM), MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 0,5 mM cada uno, DTT 10 mM y 200 unidades de la enzima transcriptasa reversa. La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, a 37° C por 50 min. La reacción fue inactivada a 72°C por 15 min y los ADNc se guardaron a -20° C hasta su uso.

4.2.3.7.1 Obtención de ADNc de FOXO3A

El ADNc para FOXO3A se obtuvo a partir de ARN total obtenido de neutrófilos. Para ello se utilizaron los partidores específicos hFOXO3 A 5' BamHI y hFOXO3 A 3' XhoI, que poseen sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción BamHI y XhoI,

para su posterior identificación y clonamiento en un vector de expresión. Para ello, se utilizaron la Taq polimerasa Platinum y la polimerasa herculasa (Stratagene), amplificando en 5 ciclos de 94°C/30 seg 58°C/30 seg 72°C/2 min, más 25 ciclos de 94°C/30 seg 55°C/30 seg y 68°C/4 min. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa y se realizó una reamplificación del producto utilizando 4µl de la reacción de PCR previa. Posteriormente se realizó una ligación directa al vector pGem-T, tomando 3 µl de la reacción de reamplificación.

4.2.3.8 Ligación de fragmentos de ADN y plasmidios

La ligación entre el producto de PCR purificado y el plasmidio pGemT-Easy, se realizó mezclando cada uno en una relación molar aproximada de 3:1, utilizando la ADN ligasa T4 y el tampón de reacción, ambos obtenidos de Promega. Siguiendo las indicaciones del fabricante, la reacción fue realizada en un volumen final de 10 µl donde se utilizaron 50 a 100 ng de plasmidio, tampón de ligación 1X y 3 unidades de ADN ligasa T4. La reacción se incubó a 16° C por toda la noche y luego la mezcla de ligación completa se utilizó para la transformación de *E. coli* DH5α competentes (sección 2.1.5).

Se procedió de la misma manera para la ligación a los vectores pGL2-Basic, pcADN 3.1 y pcADN3.1 Myc-His, previa digestión de estos vectores y de los fragmentos ya secuenciados que se encontraban en los vectores de clonamiento con enzimas de restricción exclusivas, que permitieron la hibridación entre los vectores y los fragmentos. Para la ligación del producto PCR al vector de clonamiento TOPO-TA, se siguieron las recomendaciones del fabricante, realizando la reacción por 20 min a temperatura ambiente entre el vector y el fragmento en una solución salina adecuada. Inmediatamente después se utilizó la misma reacción para la transformación de *E. coli* competentes.

4.2.4 Tratamientos de cultivos celulares

Todos los tratamientos se realizaron 24 horas post-transfección en medio de cultivo DMEM alta glucosa sin antibióticos y sin suero, por un tiempo de 4 horas.

4.2.4.1 Tratamiento de los cultivos celulares con Resveratrol

Las células fueron tratadas en medio de cultivo con Resveratrol a una concentración final de 10 μM . El stock de resveratrol se encontraba a una concentración de 10mM en DMSO, el cual correspondía a un 0,1% del volumen final. La situación control contenía un mismo porcentaje del vehículo.

4.2.4.2 Tratamiento de los cultivos con H_2O_2

Previo al tratamiento, a partir de una solución de perhidrol (30% v/v) se realizó una solución stock de 100mM en PBS, la cual se utilizó para la preparación del tratamiento en medio de cultivo a una concentración final de H_2O_2 de 150 μM y 200 μM .

4.2.4.3 Tratamiento con Forskolin

El reactivo Forskolin (activador de la adenil ciclasa), fue resuspendido en DMSO a una concentración de 100mM. Este reactivo fue agregado al medio de cultivo a una concentración de 50 μM y al control se le agregó el vehículo DMSO.

4.2.4.4 Tratamiento con Wortmanina

Wortmanina es un inhibidor específico de la PI3K. Este reactivo se utilizó a una concentración de 150 nM a partir de un stock de 1,5 μM resuspendido en PBS.

4.2.5 Análisis estadístico de los datos

Los datos están expresados como la media \pm la desviación estándar (DE) estimada a partir de "n" ensayos independientes que involucran cultivos diferentes, cada uno en duplicado. Para la comparación entre los diferentes valores de las medias se utilizó la prueba de t-Student para datos pareados. Los valores de $p < 0,01$ fueron considerados como significativamente diferentes.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis de la región de 2000pb ubicada río arriba del extremo 5' del inicio de la traducción de la MsrA.

Utilizando la información disponible en la base de datos GeneBank sobre la secuencia del gen *msrA* humano (ID 4482) y la secuencia completa del cromosoma 8 donde se encuentra localizado este gen (Locus 8p 23.1, acceso NC_000008.9), se seleccionaron 2000 pb ubicadas río arriba del extremo 5' del ATG de inicio de la traducción de la MsrA, que podrían corresponder a la región promotora de la MsrA (se denominó p2000).

Utilizando el software MatInspector Release Professional 7.4.3 de Genomatix (23) se desarrolló un análisis sobre posibles sitios de unión de factores transcripcionales a esta secuencia. La matriz utilizada incluye todos los reportes de sitios consenso para la unión de factores transcripcionales descritos para vertebrados. Este software analiza dos parámetros:

- Similitud con la matriz: Se asigna el valor máximo de 1 cuando cada posición de la secuencia analizada se alinea perfectamente con los nucleótidos altamente conservados de la matriz.
- Similitud con el centro (core similarity): El valor máximo de 1 se asigna cuando las 4 posiciones mayormente conservadas de la matriz se alinean exactamente con la secuencia.

Se considera un valor mayor a 0,75 como criterio de selección para los sitios putativos de reconocimiento de los factores transcripcionales.

El análisis de p2000 arrojó 291 probables sitios de reconocimiento, dentro de los cuales 8 destacan por tener relación con respuestas frente a estrés oxidativo y otros 2 por ser elementos putativos TATA (Tabla II). La figura 5 contiene un esquema de los 8 sitios seleccionados como posibles reguladores de la MsrA.

Tabla II. Factores transcripcionales involucrados en respuesta a estrés oxidativo y elementos TATA identificados en la región promotora de la MsrA humana. En rojo, sitios de unión al factor transcripcional FOXO3A.

Familia/matriz	Opt.	Posición	Hebra	Sim core	Sim. matriz	Secuencia (en rojo valor de ci > 60) Mayúsculas: core de la secuencia
		Desde-hasta				
<u>FKHD/FKHRL1.01</u>	0.83	-1942 -1926	(+)	0.750	0.832	ttctgta ACG aaaaa
<u>FKHD/FKHRL1.01</u>	0.83	-930 -914	(+)	1.000	0.892	ca catgaaACA aagtg
<u>V\$P53F/P53.03</u>	0.92	-834 -814	(-)	0.828	0.930	ctgcca aatgggCAG Gtctg
<u>V\$AP1F/AP1.02</u>	0.87	-773 -763	(-)	1.000	0.900	ggt GAGT gact
<u>V\$CREB/CREB.02</u>	0.89	-490 -470	(-)	1.000	0.891	acattg tcaTGAC ggccatca
<u>V\$TPBF/TATA.02</u>	0.89	-468 -465	(+)	1.000	0.928	tcca TAAA aactgaca
V\$P53F/P53.03	0.92	-446 -426	(+)	0.828	0.934	gctggctgcaagg CAG Gtctt
<u>V\$TPBF/TATA.02</u>	0.89	-373 -357	(+)	1.000	0.910	aact TAAA atcaaacc
<u>V\$P53F/P53.01</u>	0.66	-302 -282	(-)	0.750	0.666	gaaCAAGTgcgctcctg tctg
<u>V\$PERO/PPARA.01</u>	0.70	-289 -267	(-)	0.807	0.709	aagtt ctcggacAGAG aacaagt
<u>V\$NRF1/NRF1.01</u>	0.78	-131 -115	(-)	0.750	0.843	gg cGGGCggg cgcgggg
<u>V\$SP1F/SP1.01</u>	0.88	-128 -114	(-)	1.000	0.913	gggc GGGCggg cgcg
<u>V\$SP1F/SP1.01</u>	0.88	-109 -95	(-)	1.000	0.887	cggg GGGCggc aggg
<u>V\$NRF1/NRF1.01</u>	0.78	-123 -107	(-)	1.000	0.792	ggg GCGCggg cgggcg

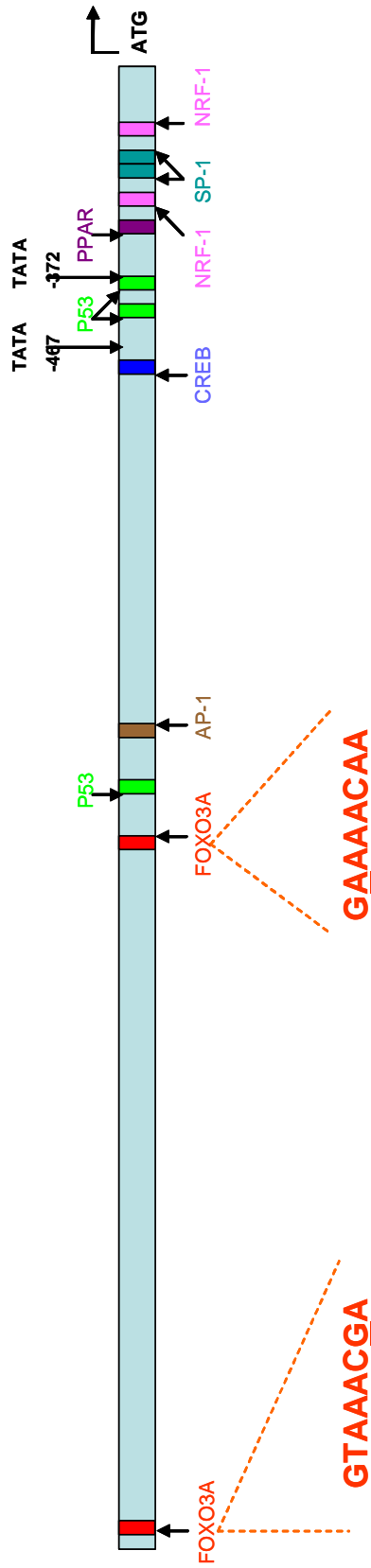


Figura 5. Esquema de la región de 2000bp ubicada en el extremo 5' río arriba del inicio de la traducción de la MsrA. La figura muestra los sitios de reconocimiento para la unión de factores transcripcionales relacionados con respuestas frente a estrés oxidativo y el elemento TATA, los cuales fueron determinados a través del programa MatInspector V2.2 disponible en la red en el sitio <http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector>. También se muestran los dos sitios identificados para la unión de FOXO3A, las bases nitrogenadas que son distintas al sitio consenso se muestran subrayadas.

Nrf1 es un factor transcripcional que se une a elementos de respuesta a antioxidantes (ARE, Antioxidant Response Element), denominados así porque son activados por diversos antioxidantes externos. Los ARE están presentes en regiones promotoras de diversos genes involucrados en la regulación del estado redox celular y en la protección del daño oxidativo. Entre ellos se encuentra un subgrupo de genes nucleares involucrados en la cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa (26).

Los factores P53, PPAR, SP-1 y AP-1 tienen amplia acción sobre genes involucrados en proliferación, diferenciación, inflamación, apoptosis y respuesta a estrés oxidativo. Estos factores son influenciados directamente por el estado redox intracelular y por citoquinas proinflamatorias; el estrés oxidativo genera un cambio en la regulación y expresión de estos genes, lo que es una característica distintiva del proceso de envejecimiento celular (18).

Se priorizó el estudio de FOXO3A por encontrarse en una encrucijada regulatoria del metabolismo, la longevidad y la respuesta a estrés oxidativo conservada en distintos organismos. Además, un análisis comparativo de probables regiones promotoras de la MsrA en diferentes organismos nos mostró que todas estas secuencias presentan dos sitios de reconocimiento para la unión del factor transcripcional FOXO3A (2).

5.2 Obtención de ADNc de FOXO3A: Evaluación de su expresión y localización celular.

A partir de la información disponible en el GeneBank del ARNm del gen FKHLR1 humano (FOXO3A, número de acceso AF032886) se diseñaron partidores específicos (Tabla 1) para amplificar 2020 pb correspondientes al ADNc que codifica a este factor transcripcional. Luego de la obtención de este fragmento y su posterior secuenciación, se determinó que el ADN clonado correspondía a la secuencia que codifica para FOXO3A, por lo que se procedió a clonarlo en dos vectores de expresión, construcciones que se denominaron pcDNA3.1 FOXO y pcDNA3.1 FOXO/myc-His.

Para evaluar si FOXO3A era sobreexpresado en células transfectadas con estas construcciones, se realizó una inmunofluorescencia utilizando como primer anticuerpo un monoclonal anti-myc y un segundo anticuerpo conjugado con un fluoróforo que se excita a 546 nm. Previamente, las células permanecieron en DMEM sin suero por 4 horas.

La figura 6.A corresponde células HeLa transfectadas con el plasmidio vacío (control). La imagen fue tomada a una apertura de lente mucho mayor que en la figura 5.B, de lo contrario no sería posible observar la unión inespecífica de los anticuerpos. La imagen 6.B corresponde a la misma línea celular transfectada con el vector que sobreexpresa FOXO3A.

Al comparar ambas imágenes, las células que sobreexpresan FOXO3A muestran una fluorescencia considerablemente mayor que la imagen control. La fluorescencia de las células transfectadas con FOXO3A es más intensa en la zona nuclear, lo que permitió concluir que este factor transcripcional se sobreexpresa.

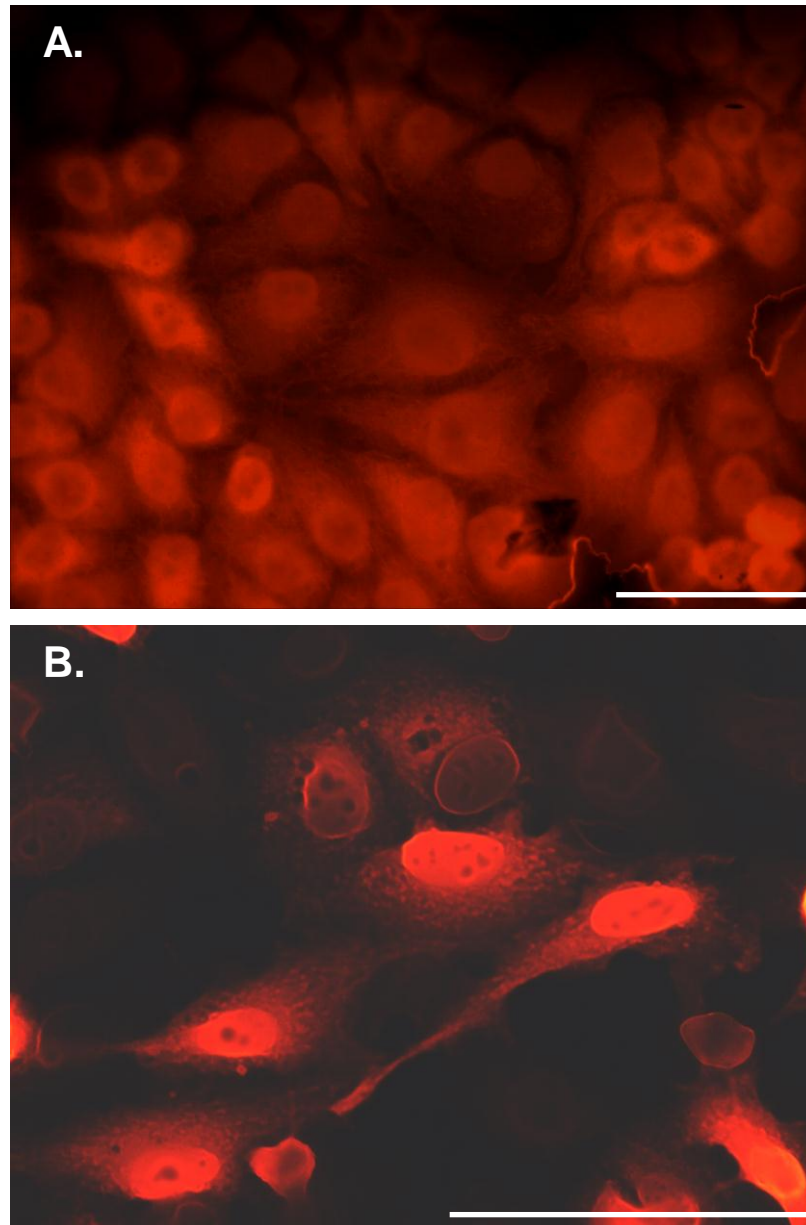


Figura 6. Inmunofluorescencia indirecta de FOXO3A. Células HeLa fueron transfectadas con el vector pcDNA3.1 Myc-His. que contenía el ADNc de FOXO y luego evaluadas con anticuerpo anti-myc y un segundo anticuerpo conjugado con el fluoróforo Alexa 546. La barra corresponde a 10 μ m.

A. Células transfectadas con el vector. La fluorescencia se debe a la unión inespecífica del segundo anticuerpo.

B. Células transfectadas con FOXO3A. La fluorescencia es considerablemente mayor que en el control, y su localización es preferencialmente nuclear.

5.3 Los fragmentos del promotor de la MsrA tienen una actividad distinta y son activados por FOXO3A.

Tal como se describe en la figura 5, en la región promotora de la MsrA se identificaron dos putativos sitios de reconocimiento del factor transcripcional FOXO3A. Para determinar su relevancia, se diseñaron tres construcciones plasmidiales que tenían el gen reportero *luc* acoplado a tres diferentes segmentos del promotor (figura 4).

Rt6

Para estudiar la actividad de los fragmentos de 2000, 1408 y 260 pb, células embrionarias de riñón (HEK293) fueron transfectadas con estas construcciones en presencia o ausencia de FOXO3A y estimuladas 24 horas post-transfección con medio de cultivo DMEM sin suero por 4 horas. Las células fueron lisadas y se cuantificó la actividad luciferasa y β -galactosidasa.

Para cada punto, la actividad del promotor se cuantificó de la siguiente manera:

Actividad Luciferasa (como unidades arbitrarias de luminiscencia)

Actividad β -galactosidasa (como absorbancia)

En cada experimento, al promedio de los valores correspondientes a la transfección hecha con el fragmento de 2000 pb sin FOXO y con medio de cultivo sin suero (control), se le asignó arbitrariamente el valor de 1, valor que se utilizó para normalizar el resto de los puntos.

El gráfico de la figura 7.A muestra la actividad de los distintos fragmentos del promotor de la MsrA, El fragmento de 260 pb descrito como el extremo 5' UTR tiene una disminución significativa en su actividad con respecto a los otros dos. Al comparar los fragmentos de 2000 y 1408 pb no se observan diferencias significativas, indicando que las 600 pb eliminadas del extremo 5' del fragmento de 2000 pb no influyen en la actividad basal del promotor.

En presencia de FOXO3A (figura 7.B), la actividad de las construcciones de 2000 y 1408 pb aumentan más de 10 veces respecto a la actividad basal, indicando que el sitio de unión a este factor transcripcional ubicado a -920 pb del ATG de inicio de la traducción de la MsrA sería relevante en la regulación del promotor por FOXO3A. Para el fragmento de 260 pb se observó una activación significativa, pero su magnitud es un 50% menor que para los otros fragmentos.

En conclusión, en células HEK293 de riñón, órgano donde se ha visto una mayor expresión de la enzima MsrA (11), FOXO3A activa significativamente a los distintos fragmentos evaluados, y se observa que el sitio de reconocimiento de FOXO3A ubicado a -920 en la región promotora de la MsrA sería relevante.

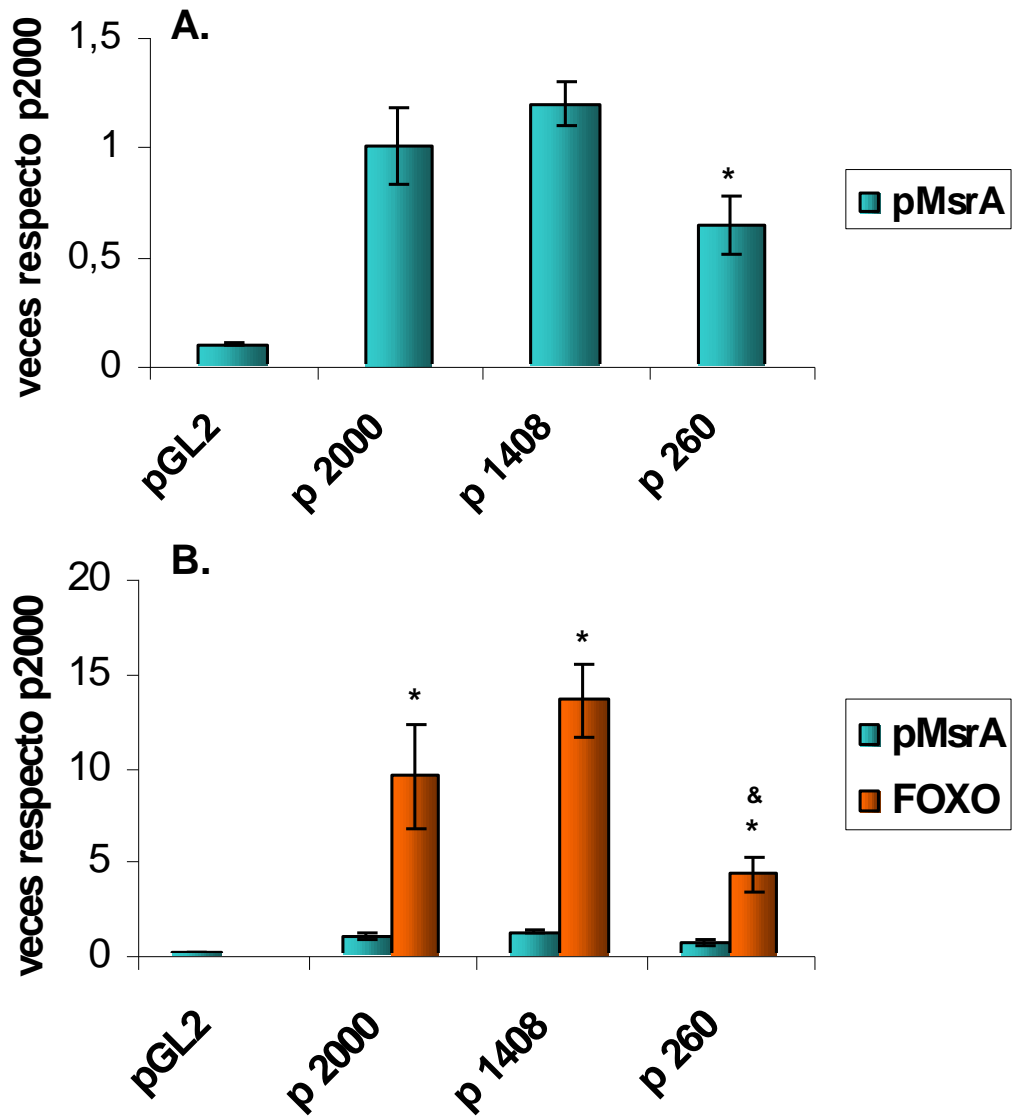


Figura 7. Actividad de los distintos fragmentos del promotor de la MsrA.

Células HEK293 fueron transfectadas con las distintas construcciones plasmidiales. Los resultados se expresaron como el promedio \pm DE de $n=3$ experimentos independientes cada uno en duplicado. *Diferencias significativas con un $p<0,01$ respecto a p2000 sin FOXO3A. & Diferencia significativa con un $p<0,0.1$ respecto a p2000 y p1408 transfectadas con FOXO

A. Las 600 pb eliminadas del extremo 5' del fragmento de 2000pb no influyen en la actividad basal del promotor y el fragmento de 260 pb correspondiente al extremo 5' UTR de la MsrA disminuye significativamente su actividad respecto a p2000 y p1408.

B. En presencia de FOXO3A la actividad de p2000 y p1408 aumenta 10 veces respecto al basal y p260 también es activado pero en una magnitud significativamente menor que los fragmentos anteriores.

5.4 Mutación del sitio FOXO3A ubicado a -920 pb del promotor de la MsrA. Implicancias en su actividad.

Para determinar si la activación de la región promotora de la MsrA por acción de FOXO3A era por interacción directa con su sitio de reconocimiento ubicado -920 pb del ATG de inicio de la traducción, se realizó una mutación sitio dirigida de 1 base nitrogenada (figura 8.A).

Para descartar el hecho que la introducción de algún segmento de ADN en el vector pGL2-basic pudiese alterar su actividad basal, se utilizó un nuevo control denominado pMsrA Smal-pGL2 que se obtuvo de la digestión del fragmento pMsrA260-pGL2 con la enzima de restricción Smal, quedando sólo un fragmento de 34 pb del promotor.

Las transfecciones se realizaron en células HEK293 en las mismas condiciones descritas en el punto 3, al igual que el tratamiento de datos. A diferencia del punto anterior, en este experimento el valor arbitrario de 1 se le asignó a la transfección realizada con pMsrA Smal-pGL2 en ausencia de FOXO3A.

En la figura 8.B se encuentra graficada la actividad promotora de los distintos fragmentos. El fragmento pMsrA Smal-pGL2 no presenta diferencias respecto a la actividad registrada por el vector pGL2-Basic (datos no mostrados).

El análisis del fragmento 1408 mutado (p1408-FOXO Mut) muestra que en ausencia de FOXO3A, no existe cambio en su actividad al comparar con el fragmento p1408 original. Cuando FOXO3A está presente, la actividad del fragmento p1408-FOXOMut aumenta significativamente respecto a su actividad registrada sin este factor transcripcional. Al comparar el efecto que ejerce FOXO3A sobre los fragmentos p1408 y p1408-FOXOMut, se observa que el aumento de la actividad del mutante es significativamente menor que el aumento de la actividad registrada para p1408. Esto indica que el sitio de consenso para la unión a FOXO3A ubicado a -920 pb río arriba del inicio de la traducción, sería relevante para la regulación que el factor transcripcional FOXO3A ejerce sobre el promotor de la MsrA.

A.

1. FOXO consenso: **GTAACAA**

2. FOXO -920 bp : **GAAACAA**

3. FOXO mutado: **GAAGACAA**

B.

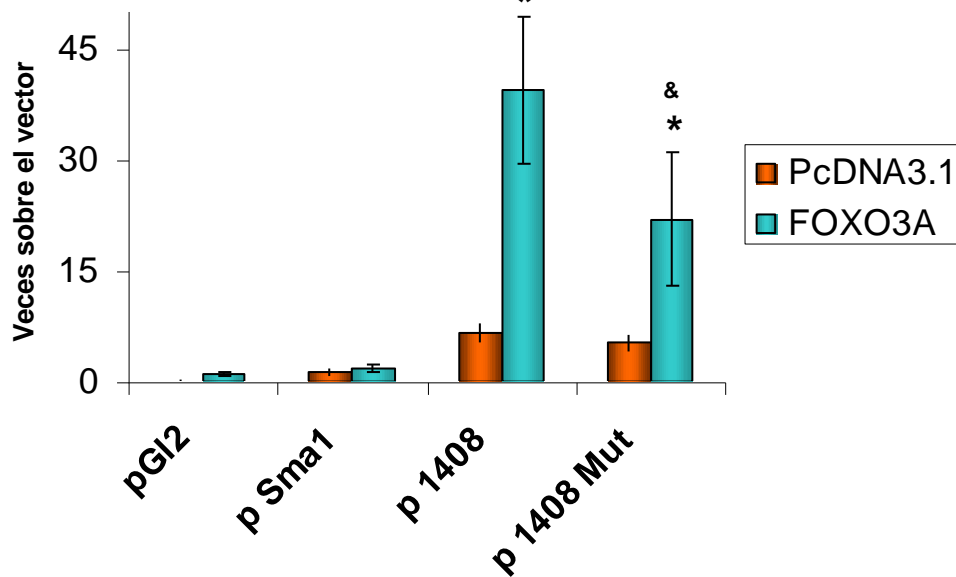


Figura 8. Análisis del sitio FOXO3A ubicado a -920bp río arriba del inicio de la traducción de la MsrA.

A. 1. Secuencia nucleotídica descrita como consenso para la unión del factor FOXO3A.

2. Secuencia de unión de FOXO3A al promotor de la MsrA ubicado a -920. La base nitrogenada subrayada es distinta a la descrita para el sitio consenso.

3. Secuencia mutada del sitio de reconocimiento de FOXO3A ubicado a -920. La base nitrogenada subrayada corresponde a la mutación realizada.

B. Transfección de células HEK293 con fragmento p1408 y p1408-FOXOMut.. Datos expresados como promedio \pm DE de $n=3$ experimentos independientes, cada uno en duplicado. En presencia de FOXO3A, la actividad de p1408 y p1408-FOXOMut aumentó significativamente ($*p<0.01$) respecto a la actividad de ambos fragmentos registrada en ausencia de FOXO. Sin embargo, la comparar la actividad de ambos fragmentos en presencia de FOXO, la activación de p1408-FOXOMut es significativamente menor que la del fragmento p1408 ($*p<0,0$). Esto indica que el sitio consenso ubicado a -920 bp es importante para la regulación de la MsrA por el factor transcripcional FOXO3A.

5.5 El fragmento p2000 responde a la acción conjunta de H₂O₂ y resveratrol. En presencia de FOXO3A esta activación aumenta.

Para este experimento se utilizó la línea celular HepG2 derivada de hepatoma humano. La transfección se realizó con el fragmento p2000 en pGL2 en presencia o ausencia de FOXO3A. Luego de 24 horas post-transfección, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM sin suero con H₂O₂ a dos concentraciones y/o resveratrol 10µM, lo que se mantuvo por un tiempo de 4 horas, luego de lo cual las células fueron lisadas y se cuantificó las actividades de la luciferasa y β-galactosidasa.

El gráfico de la figura 9 muestra los valores obtenidos para cada tratamiento en presencia o ausencia de FOXO3A. La actividad de p2000 bajo Resveratrol 10 µM y H₂O₂ 150 µM mostró un aumento significativo de 2,5 veces respecto al control sin FOXO3A. En presencia de FOXO3A, el tratamiento conjunto con estos dos compuestos aumentó significativamente la actividad de p2000, 5,9 veces respecto al control sin FOXO3A.

Al comparar la actividad de p2000 bajo el tratamiento de Resveratrol 10 µM y H₂O₂ 150 µM con y sin FOXO3A, el aumento de la actividad debido a la acción de FOXO3A es significativa.

Estos datos muestran que el promotor se activa en presencia de Resveratrol/H₂O₂, y que bajo estas mismas condiciones, FOXO3A activa al promotor por sobre el aumento inducido por Resveratrol/H₂O₂. Esto podría deberse a la activación de FOXO3A endógeno o a la participación de otra vía de señalización que actuaría sobre el promotor de la MsrA en forma independiente a la vía FOXO3A.

No hubo diferencias en presencia de suero (datos no mostrados) ni tampoco en los tratamientos sólo con resveratrol o sólo con H₂O₂.

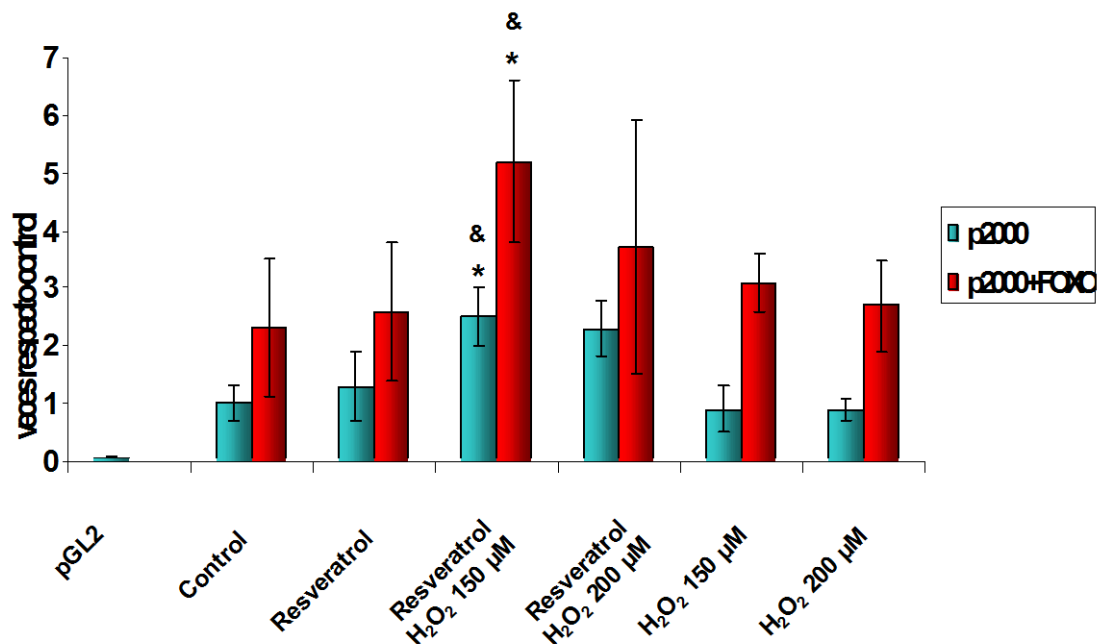


Figura 9. El promotor responde a estrés oxidativo y Resveratrol de forma independiente a la activación por FOXO3A. Células HepG2 fueron transfectadas con p2000 pGL2 con o sin FOXO bajo distintos tratamiento por 4 horas. Los datos están expresados como el promedio \pm DE de n=4 mediciones. * Diferencias significativas con un $p < 0,01$ respecto al control.

& Diferencias significativas con un $p < 0,01$ entre ambas condiciones.

Bajo el tratamiento conjunto de resveratrol 10 μM y H_2O_2 150 μM , p2000 aumentó significativamente 2.5 veces respecto a p2000 control. Bajo el mismo tratamiento en presencia de FOXO3A, tuvo un aumento de 5.9 veces respecto al control p2000+FOXO y sin tratamientos.

Al comparar la actividad de p2000 bajo el tratamiento de resveratrol 10 μM y H_2O_2 150 μM con y sin FOXO3A, el aumento de la actividad debido a la acción de FOXO3A es significativa.

Estos datos muestran que el promotor se activa en presencia de resveratrol/ H_2O_2 , y que bajo estas condiciones, FOXO3A activa al promotor por sobre el aumento inducido por resveratrol/ H_2O_2 . Estos resultados podrían deberse a la activación de FOXO3A endógeno o a la participación de otra vía de señalización que actuaría sobre la MsrA en forma independiente a la vía FOXO3A..

6. DISCUSION

Durante el envejecimiento se observa una acumulación de numerosas enzimas cuya actividad disminuye, debido a modificaciones oxidativas de las proteínas (4, 19, 29). Se ha visto que la oxidación específica de algunos residuos de Met en proteínas, como por ejemplo calmodulina altera su función; en otras proteínas esta oxidación favorece su agregación. (34).

La oxidación generalizada de diversas moléculas biológicas contribuye de manera importante al desarrollo de diversas enfermedades relacionadas al proceso de envejecimiento. En cerebro de pacientes con Alzheimer, y en distintos tipos de tejidos de enfermos con diabetes, cáncer, aterosclerosis, hipercolesterolemia y otros tipos de enfermedades neurodegenerativas, se ha descrito un aumento de daño oxidativo en una gran variedad de biomoléculas (4, 13, 24, 34).

Numerosas evidencias llevan a concluir que es imprescindible que existan mecanismos protectores y reparadores a nivel celular que “combatan” la agresión oxidativa (los denominados sistemas antioxidantes). Múltiples estudios avalan la teoría que atribuye al estrés oxidativo un papel clave en el desarrollo de diversas patologías, especialmente en el proceso de envejecimiento. (13)

Se está estudiando la enzima MsrA siendo estudiada con mucho interés por ser una de las escasas enzimas capaces de reparar el daño producido por el estrés oxidativo sobre las proteínas, que siendo un componente molecular mayor de los sistemas biológicos, las hace ser un blanco frecuente del ataque por diversas especies oxidantes.

Este interés se ve reflejado en la elaboración y posterior análisis fenotípico de diversos modelos de animales knock-out para la MsrA, lo que entregó valiosa información sobre el rol biológico de esta enzima en la mantención de la composición y función de

proteínas, y del papel que juega en la determinación de la longevidad en distintas especies (21, 31).

A pesar del papel biológico que juega la MsrA, los mecanismos involucrados en la regulación de su expresión son aún desconocidos. Los únicos antecedentes que existen sobre la regulación de la MsrA son en respuesta a estrés oxidativo en células de la retina (33) y el efecto de un represor que se une al promotor de la MsrA en células derivadas de carcinoma mamario (8). No hay estudios que vinculan a alguna vía de señalización que actúe sobre esta enzima.

Este estudio propone al factor transcripcional FOXO3A como un factor que actuaría sobre el promotor de la MsrA. Este factor se encuentra al final de la compleja y bastante estudiada vía de señalización de la insulina/ receptor IGF-1, altamente conservada en distintas especies (20). El papel de esta vía es fundamental en la determinación de la longevidad de los individuos y afecta a una gran variedad de procesos celulares. Investigaciones preliminares han descubierto, mediante análisis genéticos, moleculares y bioquímicos, que en el nemátodo *C. elegans* la MsrA estaría regulada por la vía de tipo insulina (DAF-2/DAF-16), siendo esta regulación dependiente de la activación de Daf-16 (FOXO) (2).

Los antecedentes sobre las modificaciones químicas que deben ocurrir para la activación de FOXO3A no son claros, encontrándose en la literatura resultados contradictorios. Lo que sí está claro es que esas modificaciones implican fosforilaciones y acetilaciones, a lo que se suma una gran variedad de proteínas activadoras y represoras que estarían interactuando con FOXO3A (36), sumándose aún más variables al mecanismo por el cual este factor transcripcional estaría regulando a la MsrA.

El análisis realizado del comportamiento de los distintos fragmentos del promotor de la MsrA, a través de construcciones del promotor que van hasta las 2000 pb río arriba del ATG de inicio de la traducción donde se incluyen dos sitios putativos para la unión de FOXO3A; un fragmento de 1408 pb con sólo un sitio consenso para este factor

transcripcional y un fragmento denominado p1408FOXO-Mut que tiene este sitio FOXO3A ubicado a -920 pb mutado el extremo 5' del gen de la MsrA humana, reveló la importancia de esta secuencia en la regulación del promotor de la enzima MsrA humana por el factor transcripcional FOXO3A.

Los resultados obtenidos muestran que el fragmento de p260 (correspondiente al extremo 5' UTR), se activa en presencia de FOXO3A, pese a que no presenta sitios consenso de reconocimiento. Esta activación podría deberse a una unión inespecífica o la interacción de FOXO3A con algún otro factor que podrían estar actuando sobre esta región. Esto se explica con los datos obtenidos para el fragmento p1408-Mut que contiene una mutación puntual en el sitio FOXO3A consenso ubicado a -920 pb, ya que en presencia de este factor transcripcional, p1408-Mut se activa en una magnitud semejante a la activación de p260, y al comparar el mutante con el fragmento original (p1408) la activación por FOXO disminuye significativamente.

En esta tesis se observó también la respuesta del promotor de la MsrA a tratamientos de estrés oxidativo y resveratrol.

Resveratrol es un antioxidante de origen vegetal particularmente presente en el vino, que actúa sobre la enzima sirtuina, incrementando su actividad (20). Esta enzima está ligada directamente al aumento de longevidad de los organismos en condiciones de restricción calórica (12,20). Se ha descrito que esta enzima, una desacetilasa dependiente de NAD, afecta la función de varios genes y vías. Entre estos puede mencionarse la represión de PPAR- γ y la supresión de la función de la proteína P53, retardando la muerte innecesaria de la célula por apoptosis al prolongar el tiempo disponible para reparar el daño generado al interior de la célula (20). Caso aparte son los antecedentes sobre la interacción entre sirtuina y FOXO3A, los cuales reportan que Sir2 activa la MnSOD y p27^{Kip1} a través de FOXO3A disminuyendo el daño oxidativo, sin embargo, aún no está bien descrita la relación entre ambos. (20)

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con resveratrol 10 μ M y H₂O₂ 150 μ M activa al promotor 2,5 veces sobre el nivel basal, y en presencia de FOXO3A,

bajo el mismo tratamiento, se produce un aumento de casi 6 veces en la actividad promotora, resultados que podrían deberse a la activación de FOXO3A endógeno de la línea celular utilizada o también, estos resultados sugieren la existencia de una vía de activación de la MsrA distinta a la realizada por FOXO3A en el promotor de la MsrA.

Este fue un estudio preliminar y netamente enfocado al estudio de la actividad del promotor de esta enzima, lo que se debería complementar con otros experimentos para determinar si existe una interacción efectiva entre el promotor y FOXO3A a través de un EMSA (electrophoretic mobility shift assay), donde se podría medir la afinidad de este factor transcripcional por el sitio ubicado a -920 pb.

En esta tesis, también queda planteada una posible vía regulatoria del promotor de la MsrA que sería activada por estrés y resveratrol, para lo cual se debe eliminar una posible acción endógena de FOXO3A, utilizando ARN interferente ó alguna línea celular mutante que careciera de este factor transcripcional.

7. CONCLUSIONES

- En el promotor putativo de la MsrA, se identificaron 8 sitios de unión a factores transcripcionales relacionados con estrés oxidativo. Entre ellos, se eligió FOXO3A para un estudio de mayor profundidad.
- El Factor transcripcional FOXO3A aumenta la actividad promotora de la MsrA
- La mutación en el promotor del sitio FOXO3A ubicado a -920 pb del ATG de inicio de la traducción de la MsrA, disminuye la activación del promotor en presencia de FOXO3A, indicando que este sitio consenso es importante para la regulación del promotor a través de FOXO3A.
- Tratamientos conjuntos de Resveratrol y H₂O₂ activan al promotor de la MsrA. Este efecto podría deberse a la activación de FOXO3A endógeno o por la activación de otra vía reguladora de la MsrA.

8. REFERENCIAS

1. Accili, D., Arden, K. FOXOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation and transformation. *Cell*. 117: 421-426 2004.
2. Aldunate, R., Vásquez, L., Minniti, A. 2006. La vía reguladora del metabolismo y longevidad Daf-2/Daf-16 modula la expresión de la enzima Metionina Sulfóxido reductasa A (MsrA) en *C. elegans*. En: XX Reunión anual de la Sociedad de biología de Chile: 8 al 12 de octubre de 2006. Gran hotel Pucón, Pucón, Chile.pp.s.p.
3. Balaban, R., Nemoto, S., Finkel, T. Mitochondria, oxidants and ageing. *Cell* 120: 483-495 2005.
4. Berlett, B.S., Stadtman E.R. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 272: 20313-20316 1997.
5. Bigelow, D., Squier, T.C. Redox modulation of cellular signalling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* 1703: 121-134 2005.
6. Burguering, B., Fops, G. Cell cycle and death control: long live forkheads. *Trends Biochem. Sci.* 27 (7): 352-360 2002.
7. Davis, MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta*. 1703: 93-109 2005.
8. De Luca, A., Sacchetta, P., Di Ilio, C., Favalaro, B. Identification and analysis of the promoter region of the human methionine sulphoxide reductase A gene. *Biochem. J.* 393: 321-329 2006.
9. Dhakshinamoorthy, S., Long, DJ., Jaiswal AK. Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr. Top. Cell. Regul.* 36: 201-216 2000.
10. Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I., Mori, N. (2000) Identification of the differential patterns of mRNAs and consensus sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem. J.* 349: 629-634
11. GeneNote. Whole genome expression profiles in normal human tissues. [en línea] http://bioinfo2.weizmann.ac.il/cgi-bin/genenote/home_page.pl [consulta: 2 de octubre de 2006]
12. Giannakou, M., Partridge, L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol.* 14 (8): 408-412 2004.
13. Halliwell, B., Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Br J Pharmacol.* 142(2): 231-255 2004.
14. Hansel, A., Heinemann, SH., Hoshi, T. Heterogeneity and function of mammalian MSRs: enzymes for repair, protection and regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1703 :239-247 2005.

15. Kantarow, M., Hawse, J., Cowell, T., Benhamed, S., Pizarro G., Reddy, V., Hejtmancik J. Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress. . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 9654-9659 2004.
16. Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabiang, RA. *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. Nature. 366: 461-464 1993.
17. Kops, G., Dansen, T., Polderman P., Wirtz, K., Saarloos I., Coffey, P., Huang, T., Bos, J., Medema, R., Burgering, B. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. Nature 419: 316-320 2002.
18. Lavrovsky, Y., Chatterjee, B., Clark, R.A., Roy, A.K. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, ageing and age related diseases. Exp. Gerontol. 35: 521-532 2000.
19. Mary, J., Vouquier, S., Picot, C., Perichon, M., Petropoulos, I., Friguet, B. Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. Exp. Gerontol 39: 1117-1123 2004.
20. Morris, B.J. A forkhead in the road to longevity: the molecular basis of lifespan becomes clearer. J. Hypertens. 23: 1285-1309 2005.
21. Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W., Requena, J., Berlett, B., Stadtman, E. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 12920-12925 2001.
22. Moskovitz, J., Flescher, E., Berlett, B., Azares, J., Poston, M., Stadtman E. Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 14071-14075 1998.
23. MatInspector Release Professional 7.4.3 de Genomatix [en línea] <http://www.genomatix.de/products/MatInspector/MatInspector2.html> [consulta: 25 de agosto de 2005]
24. Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L.F., Muñoz, F.J., Ruiz, F., Leighton, F., Inestrosa, N.C. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. Prog. Neurobiol. 62 (6): 633-648 2000
25. Motta, M.C., Divecha, N., Lemieux, M., Kamel, C., Chen, D., Gu, W., Bultsma, Y., McBurney, M., Guarente, L. Mammalian sirt1 represses Forkhead transcription Factors. Cell. 116: 551-563 2004.
26. Nemoto, S., Finkel T. Redox regulation of Forkhead proteins through p66shc-dependent signaling pathway. Science. 295: 2450-2452 2002.
27. Nguyen, T., Sherratt, P.J., Pickett, C.B. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 43 :223-260 2002.
28. Prasad Gabbita, S., Aksenov, M., Lovell, M., Markesbery, W. Decrease in peptide Methionine Sulfoxide reductase in Alzheimer's Disease Brain. J. Neurochem 73: 1660-1666 1999.

29. Petropoulos, I., Friguet B. Protein maintenance in aging and replicative senescence: a role for the peptide methionine sulfoxide reductases. *Biochim. Biophys. Acta.*1703: 261-266 2005.
30. Petropoulos, I., Mary, J., Perichon, M., Friguet B. Rat peptide methionine sulphoxide reductase: cloning of the cADN, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during ageing. *Biochem. J.* 355: 819-825 2001.
31. Ruan, H., Tang, X., Chen, M., Joiner, M., Sun, G., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S., Iverson, L., Wu, C., Hoshi, T. High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 2748-2753 2002.
32. Shringarpure, R., Grune, T., Melhase, J., Davies, K.J. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J. Biol. Chem* 278 (1): 311-318 2003.
33. Sreekumar, P., Kannan, R., Yaung, J., Spee, C.K., Ryan, S.J., Hinton, D.R. Protection from oxidative stress by methionine sulfoxide reductases in RPE cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 245-253 2005.
34. Stadtman, E.R., Van Remmen, H., Richardson, A., Wehr, N., Levine, R.L. Methionine oxidation and aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1703: 135-140 2005.
35. Tran, H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, A.J., Distefano, P.S., Chiang, L.W., Greberg, M.E. ADN repair pathway stimulated by the Forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 296: 530-534 2002.
36. Van der Heide, L.P., Hoekman, M., Smidt, M. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem. J.* 380: 297-309 2004.
37. Van der Horst, A., Tertoolen, L., M. de Vries-Smits, L., Frye, R., Medema, R., Burgering, B. FOXO4 Is Acetylated upon Peroxide Stress and Deacetylated by the Longevity Protein hSir2/*SIRT1*. *J. Biol. Chem* 279 (28): 28873-28879 2004.
38. Weissbach, W., Resnick, L., Brot, N. Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta.* 1703: 203-212 2005.