

JCH-FC  
Biotecnología  
6984  
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**EFFECTOS DEL COBRE SOBRE LOS NIVELES TRANSCRIPCIONALES DE GENES  
VINCULADOS AL METABOLISMO DEL COLESTEROL EN CELULAS HUMANAS**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

Ricardo Felipe Gutiérrez García

Agosto, 2013

Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Miriam Suazo Romo.  
Co-Director de Memoria de Título: Dr. Mauricio González Canales.  
Patrocinante: Dr. Marco Mendez Torres

Laboratorio de Nutrición Básica y Epidemiología Genética.  
INTA – Universidad de Chile.



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

**RICARDO FELIPE GUTIERREZ GARCIA**

**“EFECTOS DEL COBRE SOBRE LOS NIVELES TRANSCRIPCIONALES DE GENES VINCULADOS AL METABOLISMO DEL COLESTEROL EN CELULAS HUMANAS”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

*Dra. Miriam Suazo Romo*  
**Directora del Seminario de Título**

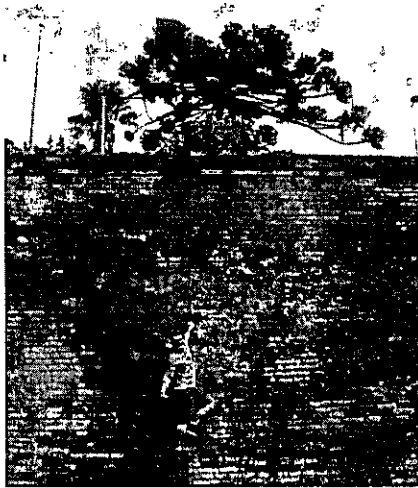
*Dr. Mauricio González Canales*  
**Co-Director del Seminario de Título**

*Dr. Marco Méndez Torres*  
**Prof. Patrocinante**

### **Comisión Revisora y Evaluadora**

*Dr. Elías Utreras Puratich*  
**Presidente**

*Dr. Alexander Vargas Milne*  
**Evaluador**



1

Ricardo Felipe Gutiérrez García es el menor de tres hermanos. Nació el 26 de diciembre del 85 y por lo mismo, todos los años recibe solo un regalo (Navidad-Cumpleaños). A pesar de esta tragedia, el destino le depararía una feliz y lluviosa infancia junto a sus hermanos Samuel y Paula en la pequeña

localidad de Nacimiento, provincia de los Ángeles, Octava región. Desde temprana edad Ricardo gustaba de jugar, comer y dormir. Gustos que con el tiempo no han cambiado mucho, excepto porque ahora, aun cuando no juega, su actividad laboral reporta una sensación similar a la de su infancia. Respecto a dormir y comer, sigue hasta el día de hoy realizándolos con avidez.

Quiero agradecer el apoyo incondicional de la Dra. Miriam Suazo. Por su paciencia y comprensión conmigo y mi compañero Cristóbal al inicio de nuestras respectivas unidades de investigación. Posteriormente en la realización del seminario agradezco su dedicación a pesar del tiempo y la lejanía. Por su compromiso incluso so pena de discusiones con otros académicos del instituto respecto del uso de ciertos equipos y por su generosidad como persona y profesional. Además quisiera agradecer a la Dra. Talía del Pozo quien me enseñó y guió en el trabajo realizado en el laboratorio. Por su rigurosidad y sentido crítico en el quehacer científico. Por la disposición hacia el trabajo y su comprensión en el error, además de su amabilidad como persona.

Finalmente quisiera agradecer a mis familiares; a mi Madre Silvia García por ser mi primera maestra, por su comprensión y apoyo. A mi Padre Samuel Gutiérrez por su apoyo y su esfuerzo desde el sacrificio. A mi hermano mayor Samuel, por su ejemplo y a mi hermana Paula por ser mi amiga y comadre. A Catalina por su amor y comprensión. A todos agradezco en lo mas profundo, gracias.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	1
El cobre, un nutriente esencial.....	1
Homeostasis de cobre en mamíferos.....	2
Regulación transcripcional de genes asociados a la homeostasis del cobre.....	5
Metabolismo celular de colesterol.....	6
Regulación transcripcional de genes asociados al metabolismo de lípidos.....	7
Interacción del cobre y la expresión de genes del metabolismo del colesterol.....	8
Hipótesis.....	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.....	9
1. MATERIALES.....	10
1.1. Líneas celulares.....	10
1.2. Partidores.....	10
2. MÉTODOS.....	11
2.1. Cultivo celular.....	11
2.1.1. Manejo de líneas celulares en cultivo.....	11
2.1.2. Extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs)..	12
2.1.3. Cultivo de monocitos derivados de PBMNCs.....	12
2.1.4. Almacenamiento de las líneas celulares.....	13
2.1.5. Tratamientos con Cu-His.....	13
2.2. Determinación de parámetros celulares.....	15
2.2.1. Cuantificación del contenido intracelular de cobre.....	15

2.2.2. Cuantificación de proteínas.....	15
2.2.3. Cuantificación de la viabilidad celular.....	16
2.3. Procedimientos de biología molecular.....	17
2.3.1. Electroforesis.....	17
2.3.2. Extracción de RNA total.....	17
2.3.3. Cuantificación RNA total.....	17
2.3.4. Digestión con DNAsa I.....	18
2.3.5. Síntesis de cDNAs.....	18
2.4. PCR Cuantitativo en tiempo real (q-RT PCR).....	19
2.5. Estadística.....	20
 RESULTADOS.....	 21
3. Medición de viabilidad celular y contenido intracelular de cobre y en Jurkat, THP-1 y HepG2.....	22
3.1. Viabilidad celular en Jurkat, THP-1 y HepG2 expuesta a concentraciones sub, iso y supra-fisiológico de Cu-His.....	22
3.2. Contenido intracelular de cobre en células Jurkat, THP-1 y HepG2 expuestas a concentraciones sub, iso y supra-fisiológicas de Cu-His .....	25
4. Efecto de la exposición cobre sobre la expresión génica.....	29
4.1. Determinación de calidad de RNA.....	29
4.2. Especificidad de amplificación de los genes cuantificados.....	31
5. Expresión génica cuantificada por PCR cuantitativo en tiempo real.....	32
5.1. Genes asociados a la homeostasis del cobre.....	32
5.2. Expresión génica de líneas celulares y cultivos primarios para células mononucleares.....	33
5.2.1. Expresión génica de metalotioneína 2A ( <i>mt2a</i> ).....	33

5.2.2. Expresión génica de la superóxido dismutasa Cu/Zn ( <i>sod1</i> ).....	35
5.2.3. Expresión génica de la chaperona de cobre de la superóxido dismutasa Cu/Zn ( <i>ccs</i> ).....	37
5.2.4. Expresión de genes vinculados a la homeostasis del cobre en Hepatocitos.....	39
5.3. Expresión de genes vinculados al metabolismo de lípidos en líneas celulares expuestas a cobre.....	40
5.3.1. Expresión relativa del receptor de lipoproteína de baja densidad ( <i>ldlr</i> )...41	
5.3.2. Expresión relativa de 3-hidroxy-3-metilglutaril CoA sintasa ( <i>hmgcs1</i> )....42	
5.3.3 Expresión relativa de la 3-hidroxy-3-metilglutaril-CoA reductasa ( <i>hmgcr</i> ).....	43
5.3.4 Expresión relativa del Farnesil Difosfato Farnesil Transferasa 1 ( <i>fdft1</i> )....45	
5.3.5 Expresión relativa de la sintasa de ácidos grasos ( <i>fasn</i> ).....	46
DISCUSIÓN.....	48
Fundamentos metodológicos.....	48
Viabilidad y sobrecarga de cobre.....	50
Efectos de la sobrecarga de cobre.....	52
Vía de transducción de señales y respuesta transcripcional.....	55
Cobre como regulador transcripcional de genes colesterogénicos.....	56
CONCLUSION.....	63
BIBLIOGRAFÍA .....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Partidores utilizados en este trabajo.....	10
Tabla 2: Tasa de cambio de la concentración de Cu respecto del control.....	26



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los tratamientos con Cu-His.....	14
Figura 2. Esquema del programa utilizado para qPCR.....	20
Figura 3: Viabilidad celular en tratamientos con Cu-His.....	24
Figura 4. Contenido intracelular de Cu.....	28
Figura 5: Determinación de la calidad y rendimiento del RNA total extraído.....	30
Figura 6: Especificidad de los genes a cuantificar.....	31
Figura 7. Expresión relativa del transcrito de <i>mt2a</i> en células mononucleares expuestas a Cu-His.....	34
Figura 8: Expresión relativa del transcrito <i>sod1</i> en células mononucleares expuestas a Cu-His.....	36
Figura 9: Expresión relativa del transcrito de <i>ccs</i> en células mononucleares expuestas a Cu-His.....	38
Figura 10. Expresión relativa de genes vinculados a la homeostasis del cobre en HepG2 expuestas a Cu-His.....	40
Figuras 11. Expresión relativa del receptor de lipoproteínas de baja densidad ( <i>ldlr</i> ) en líneas celulares humanas expuestas a Cu-His.....	42
Figuras 12: Expresión relativa de la enzima 3-hidroxy-3-metilglutaril CoA sintasa 1 ( <i>hmgcs1</i> ) en líneas celulares humanas expuestas a Cu-His.....	43
Figuras 13: Expresión relativa de la enzima 3-hidroxy-3-metilglutaril CoA reductasa ( <i>hmgcr</i> ) en líneas celulares humanas expuestas a Cu-His.....	44
Figuras 14. Expresión relativa de la enzima Farnesil Difosfato Farnesil Transferasa 1 ( <i>fdft1</i> ) en líneas celulares humanas expuestas a Cu-His.....	45
Figura 15. Expresión relativa de la sintasa de ácidos grasos ( <i>fasn</i> ) en líneas celulares humanas expuestas a Cu-His.....	47
Figura 16: Modelo de inducción de MT por metales distintos a zinc.....	53
Figura 17: Elementos regulatorias en <i>cis</i> para genes lipogénicos.....	57
Figura 18 : Elementos regulatorios en <i>cis</i> para los SREBPs.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

- % v/v porcentaje volumen / volumen  
21q22 región 22 del brazo q del cromosoma 21  
A Adenina, base nucleotídica  
AAS espectroscopia de absorción atómica  
acetil-CoA acetil coenzimo A, molécula generada en el metabolismo celular  
Ag plata  
AICAR 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl  
AKT proteína quinasa B (Protein Kinase B)  
AMPK quinasa activa por monofosfato de adenina (5' AMP-activated protein kinase)  
ANOVA análisis de la varianza (analysis of variance)  
AP-1 factor de transcripción (activator protein 1)  
ATP trifosfato de adenosina  
ATP7A transportador de eflujo cobre, ATPasa 7a  
ATP7B transportador de eflujo cobre, ATPasa 7b  
Bad proteína pro-apoptótica (Bcl-2-associated death promoter)  
C Citocina, base nucleotídica  
C/EBP factor de transcripción, (ccaat-enhancer-binding proteins)  
Cd Cadmio  
cDNA Ácido desoxirribonucleico complementario.  
Cp ceruloplasmina  
Cu Cobre.  
CuCl<sub>2</sub> Cloruro de cobre, sal  
Cu-His Complejo cobre-histidina.  
CuSO<sub>4</sub> Sulfato de cobre, sal  
DMEM Medio de cultivo celular Eagle modificado por Dulbecco.  
DMT1 transportador de Hierro (divalent metal transporter 1 )  
DNA Ácido desoxirribonucleico.  
EDTA ácido etilendiaminotetraacético  
Enz enzima  
Erg-1 factor de transcripción, (Early growth response protein 1)  
*fasn* gen codificante para la sintetasa de ácidos grasos (Fatty acid synthase)  
*fdft1* gen codificante para la farnesil difosfo farnesiltransferasa 1 (farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1)  
FoxO factor de transcripción (Forkhead box protein Os)  
G Guanina, base nucleotídica  
GLUT4 transportador de glucosa (glucose transporter type 4)  
GSK3 serina/treonina quinasa (glycogen synthase kinase 3)  
h Horas.

hCTR1 transportador de influjo de cobre (constitutive triple response 1 )  
 HDL lipoproteínas de alta densidad (High density lipoprotein)  
 HEK293 línea celular humana de riñón (Human Embryonic Kidney 293 )  
 HepG2 línea celular humana de hígado (liver hepatocellular cells G2)  
*hmgcr* gen codificante de la hidroximetilglutaril CoA-reductasa (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase)  
*hmgcs1* gen codificante de la hidroximetilglutaril CoA-sintetasa 1 (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA synthase 1)  
 IFN-beta interferón beta  
 KDa kilodalton  
 KO Knockout  
 LDL lipoproteínas de baja densidad (low density lipoprotein)  
*ldlr* gen codificante para el receptor de LDL (low density lipoprotein receptor)  
 LXR factor de transcripción ( liver X receptor)  
 MAPKs proteínas kinasas (Mitogen-Activated Protein Kinases)  
 MgCl2 Cloruro de magnesio, sal  
 min Minutos.  
 MOPS buffer, Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico  
 MRE Elementos de respuesta a metales.  
 mRNA Ácido ribonucleico mensajero.  
 MTF-1 factor de transcripción (metal-regulatory transcription factor-1)  
 MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
 NF-kappa B factor nuclear kappa beta (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)  
 NF-Y factor de transcripción (Nuclear transcription factor Y)  
 NPC1L1 proteína de transmembrana (Niemann-Pick C1-Like 1)  
 °C Grados Celsius.  
 PBMNCs células mononucleares de la sangre periférica  
 PBS Buffer fosfato salino.  
 PCR Reacción en cadena de la polimerasa.  
 pH medida de acidez o alcalinidad de una disolución  
 PI3K enzimas fosfatidilinositol 3-quinasa (Phosphoinositide 3-kinase)  
 PMA acetato de forbol miristato (phorbol-12-myristate-13-acetate)  
 PPAR receptores nucleares (peroxisome proliferator-activated receptors)  
 PTPs proteínas tirosina fosfatasa ( phosphotyrosine phosphatase)  
 qPCR PCR cuantitativo  
 RNA Ácido ribonucleico.  
 ROS especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)  
 rpm Revoluciones por minuto.  
 RT-MLV retrotranscritasa murina (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)  
 RXR receptor nuclear (receptor X retinoide)  
 s Segundos.

SCAP proteína de membrana (SREBP cleavage activating protein)  
Se Selenio  
SFB Suero fetal de bovino.  
SNPs polimorfismos de nucleótido simple (Single Nucleotide Polymorphism)  
T temperatura  
TAE buffer Tris, acetato y EDTA  
THP-1 línea celular humana derivada de monocitos  
Tm Temperatura de Melting.  
TNF-alfa Factor de necrosis tumoral (tumoral necrosis factor)  
U Unidades enzimáticas.  
 $\mu\text{M}$  Unidad de concentración (micromolar)  
UV ultravioleta  
Zn Zinc

## RESUMEN

El cobre es un micronutriente esencial y participa como cofactor en múltiples procesos fisiológicos. Existen múltiples estudios que vinculan al metabolismo de lípidos con modificaciones dietarias de cobre. En este contexto evaluamos los cambios transcripcionales en respuesta a la exposición a cobre a nivel fisiológico y supra-fisiológico (2, 20 y 100  $\mu\text{M}$ ) para genes vinculados a la biosíntesis de lípidos, en particular el colesterol. Las líneas celulares de linfocitos (Jurkat), monocitos (THP-1) y hepatocitos (HepG2) fueron expuestas a Cu-His por diversos tiempos de exposición (2-72 h). Parámetros celulares como la viabilidad y contenido interno de cobre fueron cuantificados por ensayos de reducción de MTT y espectroscopia de absorción atómica (AAS). Los genes *fasn*, *hmgcr*, *hmgcs1*, *fdft1*, *ldlr* entre otros, fueron cuantificados por qPCR. Los tres modelos celulares mostraron aumentos en el contenido interno de cobre respecto a las dosis expuestas y estas no afectaron mayormente la viabilidad celular. Para los genes cuantificados se observaron cambios significativos en genes vinculados a la biosíntesis de colesterol. Estos cambios en la abundancia relativa de los transcritos fueron mediados por la exposición a cobre a tiempo corto e independiente de la dosis. Finalmente se observaron cambios diferenciales entre las líneas celulares que participan directa o indirectamente en la homeostasis de cobre sugiriendo una regulación transcripcional tejido específica que puede modificar la síntesis de colesterol, mostrando una novedosa forma de regulación metabólica con posibles implicancias a nivel nutricional. Estos resultados debieran ser analizados a nivel metabólico, corroborando la vinculación del *status* de cobre y los cambios metabólicos inducidos.

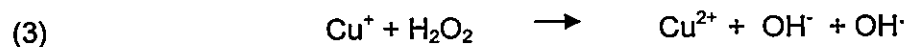
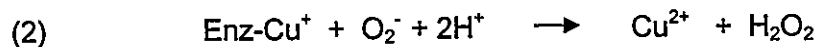
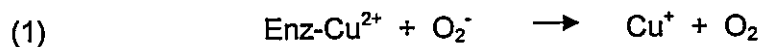
## ABSTRACT

Copper is an essential micronutrient, and participates as a cofactor in many physiological processes. There are many studies linking lipid metabolism to dietary modifications copper. In this context we evaluated the transcriptional changes in response to exposure to copper to iso- and supra-physiological level (2, 20 and 100  $\mu\text{M}$ ) for genes related to the biosynthesis of lipids, particularly cholesterol. Lymphocyte cell lines (Jurkat), monocytes (THP-1) and hepatocytes (HepG2) were exposed to Cu-His for various exposure times (2-72 h). Cellular parameters such as viability and internal copper content were quantified by MTT reduction assays and atomic absorption spectroscopy (AAS). *fasn*, *hmgcr*, *hmgcs1*, *fdft1* and *ldlr* among other genes were quantified by qPCR. The three cell models show increases in the internal contents of the exposed copper relative to dose and these mostly not affected cell viability. For genes quantified significant changes in genes linked to cholesterol biosynthesis. These changes in the relative abundance of transcripts were mediated by exposure to copper short and independent of dose. Finally observed differential changes among the cell lines that are involved directly or indirectly in the homeostasis of copper suggesting a specific tissue transcriptional regulation that can modify cholesterol synthesis, showing a novel form of metabolic regulation with possible implications at a nutritional level. These results should be analyzed at metabolic level, corroborating the connection of copper *status* and metabolic changes induced.

## INTRODUCCIÓN

### El cobre, un nutriente esencial.

El cobre (Cu) es un metal de transición, que se encuentra en concentración de traza en todos los sistemas biológicos. Debido a su configuración electrónica ( $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$ ) el cobre puede ceder electrones desde sus niveles energéticos 4s y 3d generando dos estados de oxidación; el ion cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) o ion cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ). Debido a esta capacidad redox, el cobre participa como cofactor enzimático en diversos procesos como la respiración celular (Citocromo oxidasa c), la biosíntesis de dopamina (Dopamina  $\beta$ -hidroxilasa) o la protección contra radicales libres (Superóxido dismutasa 1; SOD1) entre otros (Uauy y col., 1998; Harris, E. 2000; Kim y col., 2008). En este último proceso, la superóxido dismutasa 1 (SOD1 Cu/Zn), utiliza el cobre en la dismutación del ion superóxido producido en la respiración celular, mediante dos semi-reacciones (Ec.1) y (Ec. 2) (McCord & Fridovich, 1969). Por otra parte, el cobre libre puede participar en la formación de radicales hidroxilos (Ec. 3) mediante reacciones tipo Fenton, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) y finalmente el daño celular (Ferns y col., 1997).



Esta dualidad como catalizador y pro-oxidante, hacen del cobre un agente potencialmente tóxico. De esta forma, las proteínas que participan en la homeostasis celular son fundamentales en la regulación del contenido intracelular

de cobre evitando la sobrecarga o deficiencia (Uauy y col., 1998; Ferns y col., 1997; Peña y col., 1999; González y col., 2008).

### **Homeostasis de cobre en mamíferos.**

En humanos, existen mecanismos que regulan el contenido de Cu a nivel sistémico y celular. A nivel sistémico hay al menos dos puntos de regulación: 1) el aumento en la eficiencia de la absorción intestinal respecto a dietas bajas en Cu (aumenta en 23%) y 2) la excreción de Cu a nivel hepático en dietas altas en este metal. Así ambos procesos la absorción desde la dieta y la excreción hepática, median la adaptación a una dieta de Cu variable (Turnlund y col., 1998). Sin embargo, el paso del metal desde la dieta a las células es más complejo. Brevemente, luego de su absorción intestinal, el Cu es mayoritariamente acomplejado a albúmina y llevado al hígado a través de la circulación portal. Este paso es crucial en la homeostasis del Cu, debido a que el hígado es un órgano de relevancia fisiológica en la excreción del metal. Lo anterior se ejemplifica en pacientes con la enfermedad de Wilson (acumulación hepática de Cu por mal funcionamiento del transportador de salida ATP7B en la red trans-Golgi que evita su excreción), donde luego de un trasplante hepático la homeostasis del metal se normaliza (Tao & Gitlin 2003). En los hepatocitos el Cu es transferido a cuproenzimas y/o a la ceruloplasmina (Cp) que lo retornan a la circulación extra-hepática, mientras que el exceso de Cu en el hígado es excretado a la bilis (Dijkstra y col., 1966). Cerca del 80-90% del Cu absorbido está unido a Cp en el plasma, conformando así la fracción no disponible de Cu. El resto se encuentra acomplejado a la transcupreína, albúmina o aminoácidos y esta fracción representa el Cu biodisponible (Cartwright & Wintrobe 1964).



A nivel celular los elementos que participan en la homeostasis del Cu se pueden agrupar en: a) transportadores de ingreso o salida, b) de transporte interno, c) almacenamiento y d) cuproenzima.

Los principales transportadores que participan en la captación del Cu son hCTR1 y DMT1. hCTR1 es una proteína (190 aa) con tres dominios transmembrana de la familia CTRs (CTR1, 2 y 3) (Sharp 2003). Su expresión es ubicua y de alta afinidad por el Cu. Al sobre-expresar hCTR1 en células HEK293 ( $K_m$   $1,71 \pm 0,39 \mu M$ ) se determinó que el transporte de Cu es independiente de energía (inhibidores de ATP) y estimulado a pH ácido (5.5-6.5) y a altas concentraciones de potasio ( $K^+$ ) (Lee y col., 2002). La distribución de hCTR1 es dinámica. De esta forma altos niveles de Cu inducen la endocitosis de hCTR1 desde la membrana plasmática hacia las vesículas, disminuyendo la incorporación de Cu en exceso (Lutsenko, 2010). Por su parte, el transportador DMT1, puede incorporar Cu en la célula (Gunshin y col., 1997; Andrews, 1999; Arredondo y col., 2003). La incorporación de Cu por hCTR1 necesita de reductasas (de la membrana plasmática o en el medio) que cambien el estado de oxidación del Cu, que predominantemente se encuentra como  $Cu^{+2}$  a nivel extracelular. En mamíferos, las proteínas Steap (Ohgami, 2006) y APP (Ruiz y col., 1999) cumplen esta función previa a la incorporación.

Al interior de la célula, el Cu es distribuido a varias cupro-enzimas a través de sus respectivas chaperonas. Por ejemplo la chaperona CCS de la SOD1 Cu/Zn, además de transportar y entregar el Cu coordinado en sus residuos de cisteína, participa en la activación de la SOD1 (Culotta y col., 1997; Casareno y col., 1998). Por el contrario, se han reportado modelos (como en *C. elegans*) donde la activación de la SOD1 es independiente de la CCS (Jensen & Culotta, 2005). Por otro lado, la chaperona Cox17 interactúa proteína-proteína con la Citocromo C oxidasa (Glerum y col., 1996) y la HAH1 distribuyendo el Cu a las ATPasas tipo P: ATP7A y B (Hung y col., 1998; Hamza y col., 1999). Todas estas chaperonas

poseen dominios altamente conservados mediante los cuales coordinan la unión de átomos de Cu (Huffman & O'Halloran, 2001).

Las ATPasas ATP7A y ATP7B cuya expresión es tejido específico, poseen varios tipos de mutaciones, tales como; inserciones, deleciones, SNPs, etc, que impiden su correcto funcionamiento en la excreción celular de Cu y son causantes además de la enfermedad de Menkes y Wilson (Yuan y col., 1995). La ATPasa ATP7A se expresa en la cara basolateral de los enterocitos y su mal funcionamiento impide la absorción de Cu a nivel intestinal, generando problemas en el desarrollo fetal y disminuyendo la esperanza de vida (Vulpe y col., 1993). El transportador ATP7B se expresa en el hígado y su mal funcionamiento (mutación Q463N; población caucásica, Europa del este) provoca acumulación citoplasmática del Cu, imposibilitando su excreción a través de la red trans-Golgi (Ferenci, 2006; Lutsenko y col., 2007).

Finalmente, existe un grupo de proteínas llamadas metalotioneínas que participan directamente en la unión de Cu intracelular disminuyendo el Cu libre. Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular (5-7 KDa) ricas en cisteínas, que pueden unir átomos de Zn y/o Cu u otro metal en exceso (Tapiero y Tew, 2003; Tapia y col., 2004) y participan en la detoxificación celular por metales. Estas proteínas poseen elementos en cis de respuesta a metales (MRE) en sus regiones promotoras y en el modelo murino para la enfermedad de Wilson, caracterizado por una acumulación de Cu en el hígado, se ha observado su inducción (Huster y col., 2007). Al igual que las metalotioneínas, el glutatión es un tripéptido que une átomos de Cu (Freedman y col., 1989) y en conjunto ambas proteínas impiden la acumulación de Cu no-acomplejado, disminuyendo la concentración de Cu en las células (Rae y col., 1999).

## Regulación transcripcional de genes asociados a la homeostasis del cobre

Las proteínas que participan en la homeostasis del Cu, como los transportadores encargados del influjo y eflujo del metal, son regulados por mecanismos post-transcripcionales como la relocalización celular, degradación proteosomal, etc (Petris y col., 2003; Van den Berghe y col., 2010). Sin embargo, también hay ejemplos de regulación transcripcional para algunos de estos genes. El más estudiado es la regulación de la metalotioneína (MT). Esta proteína puede responder a una variada gama de estímulos, ya sea detoxificación de metales pesados (Cd, Ag, Se, Cu), hipoxia, inflamación, estrés oxidativo, factores de crecimiento (Dalton y col., 1996; Inoue y col., 2009; Murphy y col., 1999, Imbra & Karin, 1987) entre otros.

Desde los insectos a los mamíferos, la detoxificación de metales pesados está regulada por el factor de transcripción regulado por metales (MTF-1). Este factor de transcripción se une a los elementos de respuesta a metales (MREs) en el promotor de MT, siendo suficiente y necesario para inducir la expresión del mismo gen (Stuart y col., 1985; Westin & Schaffner, 1988). Los MREs son secuencias de consenso (5'-TGCRNC, donde R= A o G y N= A, T, C o G) ubicadas en el promotor y que actúan como elementos cis-reguladores. Sp1 es otro factor de transcripción que comparte con MTF-1 dominios estructurales tipo "dedos de zinc" y está ligado a la respuesta transcripcional del transportador hCtr1 en exposición a Cu (Song y col., 2008).

## Metabolismo celular del colesterol

El colesterol es un lípido constituyente de las membranas celulares, precursor de moléculas de importancia biológica tales como sales biliares y hormonas esteroidales. Dada su importancia, los organismos pueden sintetizarlo o adquirirlo mediante la dieta. En humanos su absorción ocurre a nivel intestinal y esta mediada por el transportador tipo 1 de Niemann-Pick C1 (NPC1L1) (Altmann y col., 2004), en donde el colesterol endocitado es acomplejado junto con otros lípidos en diferentes lipoproteínas (quilomicrones, VLDL, LDL y HDL) y enviado vía sanguínea a los tejidos. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL: Low Density Lipoproteins) son ricas en colesterol y apoB-100 (apolipoproteína). Estas lipoproteínas transportan el colesterol al tejido hepático y extra hepático, donde son endocitadas mediante el reconocimiento de apoB-100 por el receptor de LDL (rLDL) (Grummer & Carroll, 1988) y luego el colesterol pasa a formar parte del pool intracelular de colesterol.

El colesterol cumple funciones importantes como precursor o molécula estructural de las membranas biológicas. Adicionalmente en mamíferos existe síntesis endógena a partir de Acetil-CoA. En una primera etapa, tres moléculas de Acetil-CoA se condensan para la formación de mevalonato. Este paso es realizado por tres enzimas: tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa. Este último paso puede ser inhibido por análogos estructurales del mevalonato como las estatinas. Luego el mevalonato es convertido en isoprenos activos, donde la polimerización de seis unidades da lugar a una molécula lineal de treinta carbonos (escualeno). Finalmente, el escualeno es ciclado formando los cuatro anillos del núcleo esteroidal, además de otras modificaciones (Clayton, 1998).

## Regulación transcripcional de genes asociados al metabolismo de lípidos

En términos celulares, la acumulación de colesterol depende tanto de la biosíntesis como de la absorción intestinal. Ambos procesos poseen mecanismos de regulación transcripcional y post-transcripcional, evitando el exceso de colesterol intracelular (Goldstein & Brown, 1990). Las modificaciones post-transcripcionales, principalmente las fosforilaciones son inducidas por las hormonas insulina y glucagón. Así, estas hormonas inducen la activación (desfosforilación) e inactivación (fosforilación) de la enzima HMG-CoA reductasa, favoreciendo o inhibiendo la biosíntesis, respectivamente (Beg y col., 1978).

Además, la biosíntesis del colesterol está regulada transcripcionalmente por proteínas de unión a elementos regulatorios esteroideos (SREBP; sterol regulatory elements binding proteins). Los elementos regulatorios esteroideos (SRE; sterol regulatory elements), son secuencias consenso (5'-CACCMNAC-3' donde M= G o C y N= C o T) en el promotor de genes asociados al metabolismo de lípidos y estos son trans-activados por los SREBPs. Las modificaciones post-traduccionales de los SREBPs están reguladas por los niveles de colesterol endógeno (Horton, 2002) e insulina (Azzout-Marniche y col., 2000). De esta forma, la disminución de colesterol a nivel celular, induce la migración de esta proteína de membrana desde el retículo al Golgi y posteriormente su procesamiento proteolítico liberando el dominio de unión a ADN, translocándose al núcleo y activando la expresión de genes vinculados a la biosíntesis de colesterol y lípidos. Sin embargo, existen otros factores de transcripción que también participan en la regulación transcripcional de los genes lipídicos como PPAR alfa y gama, LXR y RXR (Andrew y col., 2004).

## **Interacción del cobre y la expresión de genes del metabolismo del colesterol**

El Cu induce la respuesta transcripcional de varios genes vinculados con la inflamación, estrés oxidativo, homeostasis de metales pesados, entre otros procesos (Dalton y col., 1996; Inoue y col., 2009; Murphy y col., 1999, Imbra & Karin, 1987). En particular, en el modelo murino para la enfermedad de Wilson, ratones KO para el gen ATP7B se caracterizan por la acumulación de Cu hepático, exhibiendo una inducción selectiva de genes vinculados a mecanismos de regulación del ciclo celular y en los hepatocitos provenientes de estos ratones se observa una disminución de la expresión de genes vinculados a la biosíntesis del colesterol (Huster y col., 2007). Estos cambios transcripcionales poseen un correlato fisiológico, ya que la concentración total de colesterol disminuye en un 30% (Huster y col., 2007). Por otro lado, en macrófagos humanos diferenciados a partir de monocitos, se observan aumentos en la expresión génica de los mismos genes en concentraciones bajas de Cu (0,2  $\mu$ M) (Svensson y col., 2003). Hasta el momento no se conoce con claridad el mecanismo celular que vincula al Cu con el colesterol y al parecer los cambios de expresión de los genes colesterogénicos inducidos por el Cu son dependientes del tipo celular como en el caso de los hepatocitos ATP7B ko o los macrófagos expuestos a Cu.

Por lo tanto, parece interesante estudiar el efecto de la sobrecarga inducida por suplementación en líneas celulares que participen de forma directa (hepatocitos) e indirecta (linfocitos y monocitos) en la mantención de los niveles fisiológicos del Cu y comparar la respuesta transcripcional en ambas líneas celulares en condiciones suprafisiológicas.

## **Hipótesis**

El aumento en la disponibilidad de cobre extracelular modifica el patrón de expresión de transcritos que codifican proteínas asociadas al metabolismo del colesterol y a la homeostasis de cobre en células humanas.

## **Objetivo general**

Evaluar los cambios en el patrón de abundancia relativa de transcritos asociados al metabolismo del colesterol y del Cu en líneas células humanas vinculadas directa (hepatocitos) e indirectamente (linfocitos y monocitos) en la homeostasis del metal, expuestas a concentraciones fisiológicas y supra fisiológicas de Cu.

## **Objetivos específicos**

- A.- Cuantificar el contenido intracelular de Cu en líneas celulares Jurkat, THP-1 y HepG2.
- B.- Determinar el efecto del tratamiento con Cu sobre la viabilidad celular.
- C.- Evaluar los cambios transcripcionales de los genes asociados al metabolismo de Cu y del colesterol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. MATERIALES

#### 1.1 Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron tres líneas celulares humanas: 1) Línea celular de linfocitos (Jurkat, ATCC® Number: TIB-152™); 2) monocitos (THP-1, ATCC® Number: TIB-202™) y 3) hepatocitos (HepG2, ATCC® Number: HB-8065™).

#### 1.2 Partidores

La amplificación por qPCR de las secuencias de interés fue realizada con partidores diseñados utilizando el programa Perlprimer v1.1.19 (Premier Biosoft International) y sintetizados por Alpha DNA (Québec, Canadá) e Integrated DNA Technology (Coralville, U.S.). Las parejas de partidores poseen temperaturas de melting ( $T_m$ ) que difieren en menos de 1° C, no forman dímeros de partidores ni auto-complemento de bases según las predicciones del programa. Se sintetizaron genes vinculados al metabolismo del colesterol, lípidos y homeostasis del cobre. Los partidores y su gen correspondiente se detallan en la tabla I.

**Tabla 1:**  
**Partidores utilizados en este trabajo.**

Gen	Acceso NCBI	Partidor sentido (5'→3')	Partidor antisentido (5'→3')	Tamaño Amplicon (bp)
<i>FASN</i>	NM_004104	CTACTTTGTGGTCTTCTCCTC	TTTCTCACAGATACGCTCC	99
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	NM_138711	CAACAGACAAATCACCATTTCGT	CCACCTCTTGCTCTGCT	110



<i>HMGC1</i>	NM_002130	CACATCTTCAGTATATGGTCCCT	AAACTCCAATTCTCTCCCT	84
<i>HMGC1</i>	NM_000859	GAGCAATAGGTCTTGGTGG	CAAATGCCTCCTTATCACTG	155
<i>FDFT1</i>	NM_004462	CTCAAGAGGTTTGGAGCAG	CTGAGTCTCGAAAGGTAGGT	147
<i>LDLR</i>	NM_000527	GCAACATCTACTGGACCGA	TACATGAAGCCATGAACAGGA	138
<i>CTR1</i>	NM_001859	TCAATACAGCTGGAGAAATGG	GGCATGGAATTGTAGCGA	121
<i>SREBP-1</i>	NM_004176	TCTGACACGCTTCTTCCT	CCATCCACGAAGAAACGG	131
<i>SREBP-2</i>	NM_004599	CTTCTGCCATTGCGAGAG	ACAGTAGCAGGTCACAGG	102
<i>MT2A</i>	NM_005953	GCTCCCAGATGTAAAGAACG	AAAGGAATATAGCAAACGGTCAC	150
<i>CCS</i>	NM_005125	GAATCACTTTAACCTGATGGAG	ACATCCCACACCTTCAGC	110
<i>SOD</i>	NM_000454	GTCCTCACTTTAATCCTCTATCCA	AGTCTCCAACATGCCTCTC	138
<i>ATP7A</i>	NM_000052	GCTCATAAGGTAAAGGTAGTGG	TGTTACTTTCAGCAGTTCCC	123
<i>RPLP0</i>	NM_005125.1	GGCGACCTGGAAGTCCAACCT	CCATCAGCACCACAGCCTTC	149

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Cultivo celular

#### 2.1.1. Manejo de líneas celulares en cultivo

Todas las líneas celulares utilizadas fueron mantenidas en similares condiciones de cultivo, en un incubador a temperatura (37°C) y presión de CO<sub>2</sub> (5%) constante. Para las líneas celulares Jurkat, THP-1 y HepG2 se utilizaron sus respectivos medio de cultivo (RPMI: Jurkat y THP-1 y MEM: HepG2), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) al 1%, utilizando placas de Petri de 96 mm o en frascos T25 (González y col., 1999).

#### 2.1.2. Extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs)

Para los cultivos primarios, las PBMNCs se extrajeron desde sangre de pacientes hombres entre 18-35 años, sin suplementación vitamínica. Se obtuvieron

a partir de sedimentación en gradientes de Ficoll-Histopaque (Sigma Diagnostic, St. Louis, MO) (Muñoz y col., 2005). Brevemente, 25 ml de sangre heparinizada fue diluida 1:1 en PBS. Luego se depositó suavemente sobre 10 ml de Histopaque® 1077 dejando una fase inferior de ficoll y superior de sangre. Se centrifugó a 12.000 g por 30 min y se rescató la interfase con los PBMNCs. El volumen obtenido se lavó con PBS (1:1), centrifugando a 12.000 g por 8 min y se eliminó el sobrenadante. Luego, se resuspendió en 1 ml de medio RPMI suplementado con antibióticos 3 % (estreptomomicina/penicilina).

### **2.1.3. Cultivo de monocitos derivados de PBMNCs.**

Debido al bajo número de monocitos presenten en la población de PBMNCs y para realizar los tratamientos con Cu, se juntaron varios pools de PBMNCs de varios pacientes (n=8) y se sembraron en placas en medio RPMI, suplementado con 10 % SFB y 3 % de antibióticos. Luego de 24 h se separaron los monocitos del resto de PBMNCs, retirando el medio y lavando dos veces con PBS. Finalmente, a los monocitos adheridos a la placa de cultivo se les agregó medio de cultivo fresco y posterior tratamiento con los complejos Cu-His en los diferentes tiempos y concentraciones que se verán más adelante.

#### 2.1.4. Congelamiento de las líneas celulares.

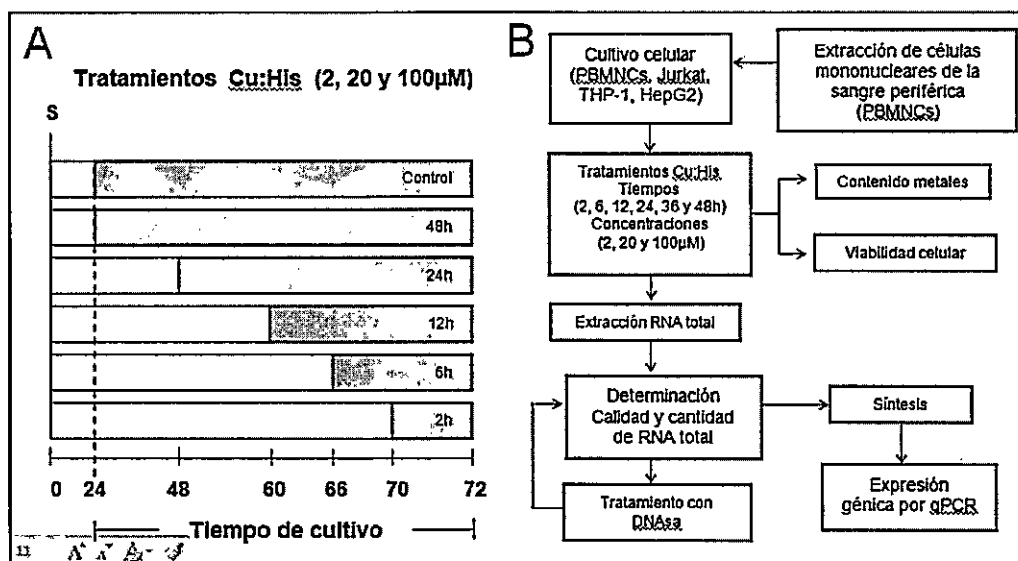
Todas las líneas celulares fueron almacenadas en alícuotas aproximadas de  $1 \times 10^6$  células congeladas en medio RPMI o MEM suplementado con 10% de SFB y 10 % de DMSO en criotubos de 1,8 ml a  $-80^\circ \text{C}$ .

#### 2.1.5. Tratamientos con Cu-His

En el medio de cultivo estándar utilizado (descrito en 2.1.1) la concentración de Cu fue de  $0,44 \mu\text{M}$  (Tapia y col., 2003). Para los tratamientos con Cu, el metal fue suplementado como complejo Cu-His (razón 1:10) a diferentes concentraciones ( $2$  y  $20 \mu\text{M}$ ) y tiempos ( $2$ ,  $6$ ,  $12$ ,  $24$  y  $48$  h). Para la línea celular hepática (HepG2) se realizaron tratamientos con  $100 \mu\text{M}$  de Cu-His, debido a que esta línea celular puede soportar una mayor carga del metal, sin afectar su viabilidad (Aston y col., 2000). Esta cualidad no es compartida por las líneas mononucleares, donde el rango de concentración utilizado es menor según literatura (Crutchley y col., 1995) y por lo tanto solo se usó  $2$  y  $20 \mu\text{M}$ .

El diseño experimental contempló tiempos de cultivos post-siembra constantes. Las células fueron sembradas al mismo tiempo, luego se aplicaron los tratamientos de forma regresiva como se muestra en la figura 1.





**Figura 1. Esquema de los tratamientos con Cu-His.**

El esquema en A, representa la estrategia experimental utilizada en este trabajo, indicando los tiempos de exposición de las células Jurkat, THP-1 y HepG2 en sus respectivos medio de cultivo suplementadas con 2, 20 y 100  $\mu\text{M}$  de Cu-His a diferentes tiempos de exposición (gris). Desde los tratamientos se tomaron alícuotas que fueron utilizadas para medir contenido intracelular de Cu, proteínas y RNA. Para la determinación de la abundancia relativa de los transcritos se realizaron los pasos descritos en B. Para cada uno de los tratamientos, el tiempo total de cultivo se mantuvo constante.

Las células fueron colectadas al finalizar el tiempo de cultivo con desfase de 30 min. Finalizada la exposición al metal, las células fueron centrifugadas a 2500 rpm por 3 min y el pellet se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  EDTA-PBS 1 mM. En tanto, para células adherentes como HepG2 se sembraron  $6 \times 10^4$  células y los tratamientos fueron aplicados en 80 % de confluencia, luego se siguió el mismo diseño experimental. La remoción de las células se realizó mediante un tratamiento con tripsina-EDTA 1 mM a 37° C por 3 a 5 min, previo a dos lavados con PBS. Las células fueron centrifugadas a 2500 rpm por 3 min y el pellet se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de EDTA-PBS 1mM.

Para todos los tratamientos y tipos celulares, se separaron alícuotas destinadas a la cuantificación de metales, proteínas y RNA. Una vez obtenido el pellet celular, este se resuspendió en EDTA-PBS 1 mM, de los cuales se separaron dos alícuotas, una para medición de metales y RNA. La alícuota destinada a medir metales se lavó dos veces con EDTA-PBS 1 mM y finalmente se resuspendió en

200  $\mu$ L de PBS de los cuales se separaron 25  $\mu$ L para cuantificar proteínas. La alícuota destinada a la extracción de RNA se centrifuga 2500 rpm por 5 min y se resuspendió en 1mL de Tri-reagen (Ambion).

## **2.2. Determinación de parámetros celulares.**

### **2.2.1. Cuantificación del contenido intracelular de cobre.**

Las células tratadas fueron recuperadas mediante centrifugación o tripsinización y lavadas en PBS como se indica en la sección 2.1.2. Las alícuotas fueron centrifugadas a 2.500 rpm por 5 min. El pellet de células fue resuspendido en 100  $\mu$ l de agua desionizada bidestilada y ácido nítrico (75 % v/v) (1:1) y luego incubadas a 65° C durante 16 h para completar la lisis ácida (González y col., 1999). El contenido intracelular de Cu fue cuantificado en un espectrómetro de absorción atómica (AAS) con horno de grafito (SIMMA 6100, Perkin Elmer). El contenido del metal se determinó por interpolación desde curvas de calibración generadas a partir de soluciones estándar de Cu (1000  $\mu$ g/mL, J.T Baker) y fueron corregidos por la concentración de proteínas de cada alícuota.

### **2.2.2. Cuantificación de proteínas.**

La cuantificación de proteínas se realizó con el reactivo de Bradford (BioRad). Desde la alícuota de metales, se separaron 25  $\mu$ L para cuantificar proteínas. Las muestras de proteínas se diluyeron en 800  $\mu$ L de agua destilada y se les agregó 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford (razón 4:1). Junto a cada grupo de proteínas se leyó una curva estándar que contiene concentraciones conocidas de albúmina de suero de bovino (BSA 0-12  $\mu$ g/ml) en la misma razón (4:1) agua

destilada-Bradford. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro (Biowave DNA WPA) midiendo a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteínas fue interpolada desde la curva estándar generada con BSA (Bradford, 1978).

### **2.2.3. Cuantificación de la viabilidad celular.**

El análisis de viabilidad celular se realizó en células expuestas a Cu bajo las condiciones señaladas en la sección 2.1.4, en placas de 6 pocillos a través de la cuantificación de un marcador de la actividad mitocondrial; MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Mosmann y col.,1983). Luego de los tratamientos con Cu las líneas celulares fueron lavadas una vez con PBS e incubadas en medio de cultivo fresco (RPMI o MEM dependiendo de la línea celular) con MTT (5 mg/ml) durante 45 min a 37° C. Luego se retiró el medio y se detuvo la reacción con isopropanol 70 % v/v y HCl 0,04 M, dejándolo 15 min a 37° C, permitiendo el lisado completo de las células. La obtención del formazán, compuesto producido por la reducción de enzimas mitocondriales e indicador de actividad mitocondrial y viabilidad fue registrado mediante la diferencia en la absorción a 630 nm y 570 nm en un lector de absorbancia en microplacas ELx800™ (Bio-Tek Instrument, VT, USA). Los valores de viabilidad obtenidos en el ensayo se expresaron como porcentaje respecto a los valores obtenidos en las muestras controles.

### **2.3. Procedimientos de biología molecular.**

Todos los procedimientos de biología molecular, entre los cuales se encuentran la electroforesis de DNA, extracción de RNA y síntesis de cDNA entre otros se realizaron como se describe en Ausubel y col., 1999.

#### **2.3.1. Electroforesis de DNA.**

La electroforesis para DNA se realizó en geles de agarosa al 3 % p/v en buffer TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM , EDTA 1 mM) mientras que las electroforesis para RNA se realizaron en geles denaturantes de agarosa al 1,5 % p/v (MOPS 10X, formaldehído al 37 % v/v, formamida desionizada 1X) en buffer MOPS 1X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio al 0,1 % v/v y las bandas fueron observadas en un trans-iluminador de luz ultravioleta (Vilber Lourmat). Los geles fueron posteriormente fotografiados con a una cámara Kodak Dc 290 para su registro y posterior análisis.

#### **2.3.2. Extracción de RNA total.**

El RNA total fue extraído desde las células tratadas y controles (ver sección 2.1.3.) homogeneizadas en Tri-Reagent® (Ambion) por contacto mecánico con jeringas para insulina de 1 ml (BD Plastipack®). 0,2 volúmenes de cloroformo fueron a agregados a esta mezcla, sometiéndola a agitación y centrifugación y recuperando el RNA en la fase acuosa superior, el que posteriormente fue precipitado con isopropanol mediante centrifugación. El pellet precipitado fue lavado con etanol 75 % v/v (diluido en agua libre de RNAsas) y precipitado por centrifugación. Finalmente, el RNA fue resuspendido en agua libre de nucleasas.

### **2.3.3. Cuantificación RNA total.**

La cuantificación del RNA total extraído, se determinó mediante densidad óptica en un espectrofotómetro (Biowave DNA WPA) a 260 nm, utilizando cubetas de cuarzo. Para determinar la pureza del RNA se utilizó la razón 260 nm/280 nm. La integridad del RNA fue verificada por electroforesis en geles denaturantes de agarosa, mientras que la calidad de la extracción se evaluó mediante diferentes métodos incluyendo parámetros espectrofotométricos, que miden la razón entre las absorbancias medidas a longitudes de onda de 260 y 240 nm (que representan la relación entre ácidos nucleicos y fenoles) y la razón entre las absorbancias medidas a longitudes de onda de 260 y 280 nm (que representan la relación entre ácidos nucleídos y proteínas en la muestra).

### **2.3.4. Digestión con DNAsa**

En el proceso de extracción el RNA puede ser co-extraído con DNA. Para evitar la amplificación de secuencias inespecíficas de DNA genómico por qPCR se realizaron digestiones con DNAsa. Se utilizaron 200U de DNAsa I (Turbo DNAsa-free, Ambion) con su respectivo buffer y adicionalmente se utilizaron 40U de un inhibidor de RNAsa (RNasin, Promega). La reacción se realizó por 20 min a 37° C.

### **2.3.5. Síntesis de cDNAs.**

La síntesis del cDNA de hebra simple se realizó usando como templado RNA total (1,5 µg). El RNA se incubó con 0,5 µg de partidor oligo dT (Promega), durante 5 min a 70° C para deshacer las estructuras secundarias del RNA y así permitir el alineamiento con el partidor. Además, 200 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y 12,5 µM de dNTP (Promega) se incluyeron en esta



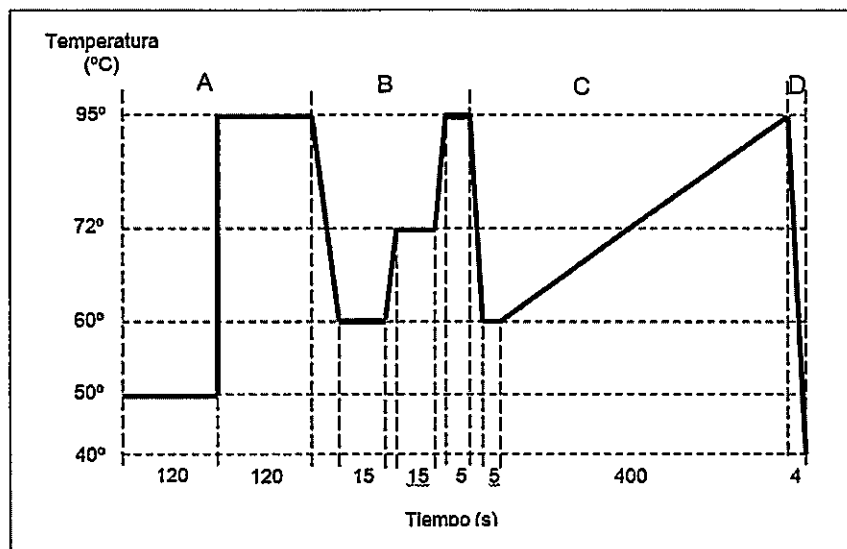
reacción y se incubó a 42° C durante 90 min para posteriormente proceder a inactivar la enzima a 70° C por 15 min. Finalmente, el cDNA fue guardado a -20° C, hasta el momento de su utilización.

#### 2.4. PCR Cuantitativo en tiempo real (q-RT PCR).

Para la cuantificación de la abundancia relativa de los transcritos analizados mediante PCR cuantitativo en tiempo real, se utilizó el kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG. Cada reacción de amplificación se realizó en capilares de vidrio (20 µL) utilizando 12 ng de cDNA, 2,5 µM de cada partidor, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 7,5 µL de SYBR Green mix en 15 µL de reacción. Las reacciones de PCR fueron realizadas en el termociclador Light Cycler Instrument (Roche) y el programa de amplificación se diseñó utilizando el software Light Cycler v.3.5 (Roche). Este programa consta de una fase de activación (A), amplificación (B), "melting" (C) y enfriamiento (D). La eficiencia de los partidores fue calculada con el software LinregPCR y la expresión relativa de los transcritos se calculó según la ecuación (Ec. 4).

$$(4) \quad \text{expresion relativa} = \left( \frac{(Ef_{HK})^{(Ct_{HK})}}{(Ef_x)^{(Ct_x)}} \right)$$

Donde,  $(Ef_{HK})$  y  $(Ef_x)$ , corresponden a las eficiencias del gen normalizador o Housekeeping y del gen de interés, respectivamente y los valores de  $(Ct_{HK})$  y  $(Ct_x)$  corresponden a los ciclos umbrales del normalizador y del gen de interés. El detalle del programa de qPCR se describe en la figura 2.



**Figura 2. Esquema del programa utilizado para qPCR.**

Fase de activación (A) a 50° C durante 120 s, luego 95° C por 120 s, y una fase de amplificación (B): 40 ciclos de amplificación; 15 s a 60° C, luego 15 s a 72° C y 5 s a 95° C. Finalmente, la fase "melting" (C) con 5 s a 60° C y luego un incremento de 0,1° C/s hasta los 95° C y luego de enfriamiento desde los 95° C hasta 40° C con 15° C/s. La fase de activación evita el funcionamiento de la polimerasa hasta los 95°; la fase de melting mide la fluorescencia a medida que sube la temperatura y es utilizada para determinar la especificidad de la amplificación.

## 2.5. Estadística.

El análisis estadístico fue realizado utilizando el software GraphPad Prism 4 (GraphPad, San Diego, CA). Se utilizó el test de análisis de varianza (ANOVA) de dos colas y un nivel de significancia de 0.05, para probar diferencias entre los grupos y luego se utilizó el test a posteriori de tukey. Los análisis se realizaron con un número muestral mayor o igual a tres, para todos los experimentos.

## RESULTADOS

En la literatura reciente existen algunos ejemplos del vínculo entre la homeostasis de Cu y el metabolismo de lípidos, en particular, del colesterol. Aun cuando esta asociación está descrita, no se conocen los mecanismos moleculares que sustentan este vínculo. Adicionalmente estos cambios son dependientes del tipo celular, ya que se han observado cambios transcripcionales diferenciales dependientes de Cu entre células hepáticas y células del sistema inmune. Sin embargo, las respuestas diferenciales no son comparables, ya que se tratan de hepatocitos de un modelo de ratón para la enfermedad de Wilson y macrófagos humanos diferenciados a partir de monocitos.

Sin reparar en estas diferencias, fue interesante abordar la pregunta de la respuesta transcripcional bajo un mismo estímulo, pero en dos tipos celulares que participan de forma directa e indirecta en la homeostasis del metal. Con el objeto de validar esta observación en líneas celulares humanas, se realizaron cultivos con líneas celulares de hepatocitos (HepG2), linfocitos (Jurkat) y monocitos (THP-1). Estas líneas fueron sometidas a distintas concentraciones de Cu; una concentración sub-fisiológica (2  $\mu\text{M}$ ), fisiológica plasmática (20  $\mu\text{M}$ ) y una supra-fisiológica (100  $\mu\text{M}$ ). Estos tratamientos fueron realizados bajo distintos tiempos de exposición permitiendo diferenciar cambios transcripcionales tempranos (2 y 6 hrs) o tardíos (12, 24, 48 y 72 h). De esta forma se pretendía estudiar cambios en la expresión génica inducidos por el aumento intracelular de Cu.

Adicionalmente se realizaron ensayos de carga y de parámetros fisiológicos como la viabilidad celular mediante MTT. El primero confirma los tratamientos suministrados a las células y el otro permite determinar el impacto en la sobrevivencia de los tratamientos de Cu. Luego de la exposición a Cu-His de las células, se realizaron separaciones de alícuotas destinadas a los parámetros ya mencionados.

### **3. Medición de viabilidad celular y contenido intracelular de cobre en Jurkat, THP-1 y HepG2**

#### **3.1. Viabilidad celular en Jurkat, THP-1 y HepG2 expuesta a concentraciones sub, iso y supra-fisiológico de Cu-His.**

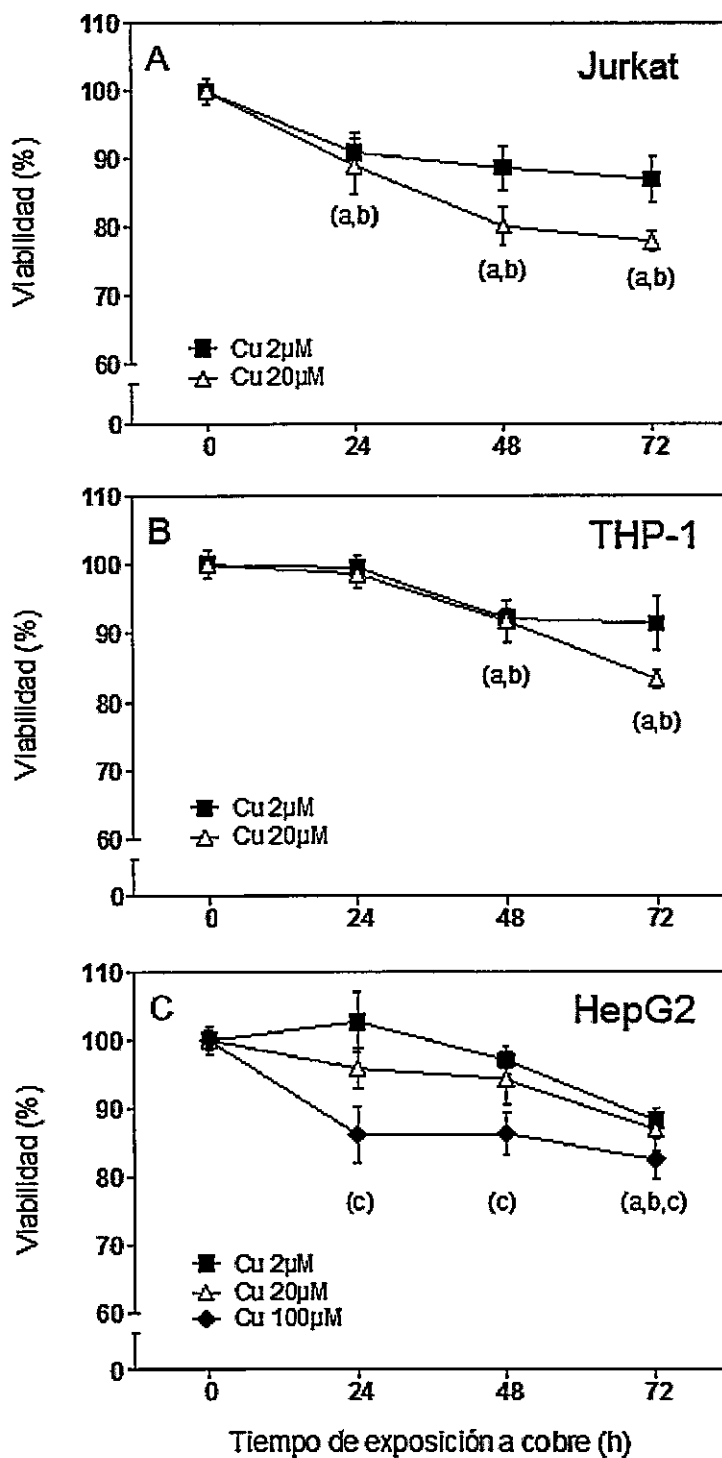
Los tratamientos con metales pesados son agresivos para cualquier tipo celular. Para determinar el grado de letalidad de nuestros tratamientos, realizamos estudios de viabilidad celular.

La viabilidad de estas células expuestas a Cu-His fue cuantificada mediante ensayos de reducción de MTT. Los valores de reducción fueron expresados en porcentaje de actividad, siendo el 100 % la actividad de reducción de MTT medida en las células no expuestas a Cu-His para cada línea celular.

En general, los tratamientos con Cu-His no afectaron la viabilidad celular (figura 3), reportando disminuciones en la sobrevivencia de las células menores al 20% para todas las líneas celulares en todos los tratamientos utilizados. Comparativamente, las células mononucleares son más sensibles a los tratamientos con Cu que los hepatocitos. Llegando a una disminución máxima en la viabilidad del 22 % en Jurkat sometido a 20  $\mu\text{M}$  por 72 h. Aunque los estudios de viabilidad celular se realizaron a tiempos largos (72 h), el análisis de la expresión génica se realizó a tiempos menores a 24 h de exposición. La viabilidad de todas las líneas celulares disminuyó en un 10 %, para los tratamientos de 20  $\mu\text{M}$  a las 24 h (Jurkat; 89 %, THP-1; 98 %, HepG2; 96 %), siendo menor la disminución de la viabilidad en células Jurkat. A las 24 h con un tratamiento cinco veces mayor de Cu (100  $\mu\text{M}$ ), la disminución de la viabilidad fue solo de un 14 % en células HepG2. Con estos resultados podemos asegurar que los tratamientos con Cu y los tiempos de exposición no afectan la

viabilidad celular en ninguna de las tres líneas celulares, generando solo una leve disminución en la sobrevivencia celular.

Por otra parte, a tiempos mayores a 24 h de exposición de tratamientos con Cu se observó que la línea celular Jurkat fue más sensible que los monocitos. Ya que la viabilidad en monocitos disminuyó significativamente en el segundo ciclo replicativo (48 h aprox). A ese tiempo de exposición, la viabilidad para tratamientos con 2 y 20  $\mu\text{M}$  de Cu en Jurkat se asemeja en rango (cerca al 80 %) a los tratamientos con 100  $\mu\text{M}$  de Cu en células HepG2.



**Figura 3: Viabilidad celular en tratamientos con Cu-His.**

La viabilidad celular para Jurkat (A), THP-1 (B) y HepG2 (C) con los valores promedio  $\pm$  DS determinados para tres réplicas biológicas en función del tiempo de exposición a Cu-His. La diferencias significativas respecto del control (a):  $P < 0,05$  para Cu 2  $\mu$ M, (b):  $P < 0,05$  para Cu 20  $\mu$ M, (c):  $P < 0,05$  para Cu 100  $\mu$ M, ANOVA de una vía y test post-hoc de Tukey).

### **3.2. Contenido intracelular de cobre en células Jurkat, THP-1 y HepG2 expuestas a concentraciones sub, iso y supra-fisiológicas de Cu-His.**

La oferta de Cu a nivel celular es variable y dependiente de la dieta. Aunque a nivel celular el Cu se necesita en concentraciones trazas, la deficiencia de este micronutriente estimula su incorporación. Por otra parte el exceso en la oferta de Cu regula mecanismos de relocalización y proteólisis de los transportadores de Cu. Así los mecanismos de entrada y salida regulan la concentración intracelular de Cu (Uauy y col., 1998).

Para validar nuestros tratamientos con Cu y asegurar una concentración intracelular mayor a la basal, cuantificamos la incorporación del metal en los distintos tipos celulares sometidos a varias concentraciones de Cu-His extracelular. Se ha reportado que la concentración plasmática de cobre es de 15-20  $\mu\text{M}$  (Linder y col., 1998). Aproximadamente un 90 % se encuentra unido a ceruloplasmina (Cu-Cp) y el 10 % restante está unido a albúmina o a algún aminoácido como glicina o histidina (Cu-NoCp), el cual es considerado como la fracción disponible para la utilización celular. Entonces, en condiciones fisiológicas el Cu-NoCp en el plasma (de 1,5-2  $\mu\text{M}$ ) es aproximadamente cinco veces mayor que la concentración de Cu en el medio de cultivo utilizado durante este estudio (0,4  $\mu\text{M}$ ). De esta forma definimos que la concentración sub-fisiológica a utilizar y fue de 2  $\mu\text{M}$  de Cu-His, mientras que la concentración fisiológica fue de 20  $\mu\text{M}$  y finalmente se utilizó una condición de exceso o supra-fisiológica fue de 100  $\mu\text{M}$  de Cu-His para el tratamiento de la línea celulares hepática. Como se comentó anteriormente esta última concentración no se utilizó con linfocitos y monocitos debido a que en la literatura se describen rangos menores para tratar a estas células (Svensson y col., 2003).

El análisis del contenido intracelular de Cu mediante espectrometría de absorción atómica mostro que la concentración de Cu aumentó en todas las líneas celulares en función del tiempo de exposición al metal. Sin embargo, éste aumento fue más acentuado en células HepG2 que en Jurkat y THP-1 (Tabla 2). Para los tratamientos con 20 y 100  $\mu\text{M}$  de Cu-His se observó un aumento progresivo de la concentración intracelular de Cu en el tiempo (6, 24 y 48 h), sin alcanzar un nivel de carga máxima a las 48h de exposición. Sin embargo, el tratamiento con 2  $\mu\text{M}$  de Cu-His logra mantener los niveles del metal entre 24 y 48 h, generando una concentración de carga estable y superior a la condición de partida. Por otro lado, la concentración basal de Cu intracelular calculado por AAS y normalizado por concentración de proteínas totales es mayor en hepatocitos que en mononucleares, siendo 12 y 0,5 nmoles/mg de proteína, respectivamente. Además, el aumento en la concentración intracelular de Cu respecto del control (tasa de cambio) en los hepatocitos fue siempre menor que en Jurkat y THP-1 (ver tabla 2)

**Tabla 2:**

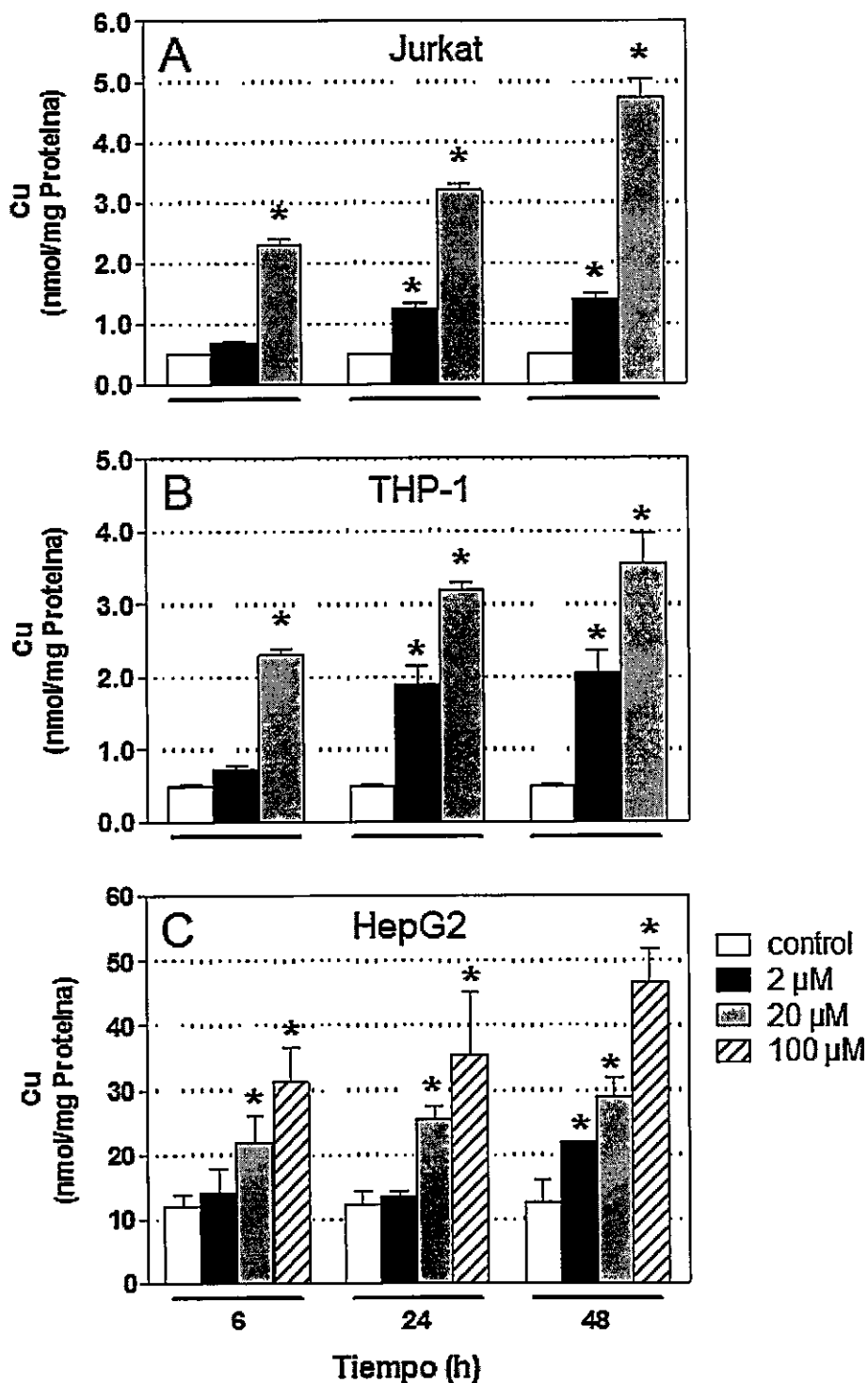
**Tasa de cambio de la concentración de Cu respecto del control.**

Tiempo (h)	Jurkat		THP-1		HepG2		
	2 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
6	1.4	4.6	1.5	4.6	1.2	1.8	2.6
24	2.5	6.4	3.8	6.4	1.1	2.1	2.9
48	2.8	9.5	4.1	7.1	1.7	2.3	3.7

Esto indicaría un mejor manejo de los mecanismos de incorporación y excreción de Cu en células HepG2, comparadas con células Jurkat y THP-1. Observándose en estas dos últimas líneas celulares Jurkat y THP-1 similares tasas de cambio en los tratamientos de 2 y 20  $\mu\text{M}$  a 6 y 24 h. Finalmente se observó una



mayor capacidad de carga en células Jurkat respecto a células THP-1. Donde la concentración máxima alcanzada fue de 4,7 nmoles de Cu/mg de proteína a las 48 h de exposición para el tratamiento de 20  $\mu$ M de Cu-His. Bajo las mismas condiciones THP-1 alcanzó los 3,6 nmoles de Cu/mg de proteína, como concentración máxima. Valores menores comparados con los 28,9 nmoles de Cu/mg de proteína de los hepatocitos bajo las mismas condiciones. Siendo los 46,5 nmoles de Cu/mg de proteína, la concentración intracelular máxima alcanzada en 48 h a 100  $\mu$ M de Cu-His en HepG2 (figura 4).



**Figura 4. Contenido intracelular de Cu.**

En A) se muestra el contenido intracelular de cobre para la línea linfocitaria humana (Jurkat). En B) para monocitos humanos (THP-1) y en C) hepatocitos humanos (HepG2). Los datos fueron normalizados por concentración de proteínas y cuantificado por espectroscopia de absorción atómica (AAS). Los resultados se grafican como promedio  $\pm$  DS y la diferencias significativas respecto del control ( $P < 0,05$  \* ANOVA de una vía y test post-hoc de Tukey) ( $n = 3$ ).

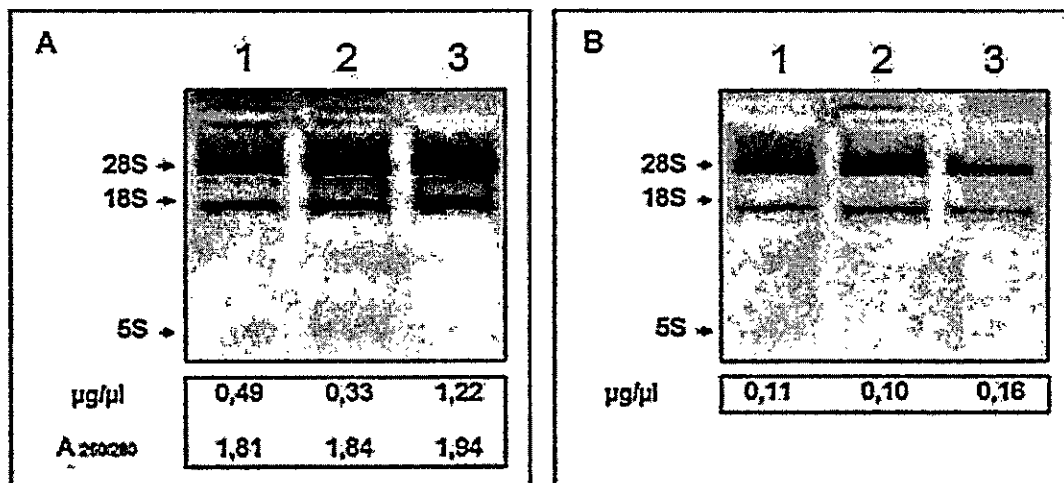
Estas observaciones muestran las diferencias fisiológicas entre las líneas celulares hepáticas y mononucleares de la sangre periférica. Donde las células HepG2 tienen una mayor capacidad de carga para el Cu suministrado que las células Jurkat y THP-1. Además, los cambios en la concentración intracelular de Cu en el tiempo son menores en Jurkat y THP-1 que las células HepG2. Esto nos indicaría que los hepatocitos pueden regular mejor los mecanismos de excreción celular de Cu, al poseer una mejor adaptación al exceso de Cu que linfocitos y monocitos.

#### **4. Efecto de la exposición cobre sobre la expresión génica.**

Una vez caracterizadas las líneas celulares en términos de su capacidad de carga y viabilidad, se estudió la respuesta transcripcional a la exposición de Cu. La metodología utilizada requería del cumplimiento de ciertos controles de calidad en la extracción y digestión con DNAsal del RNA y posterior síntesis de cDNA

##### **4.1 Determinación de calidad de RNA**

Para realizar una correcta medición de la expresión de un gen, es necesario, asegurar un RNA íntegro y una concentración suficiente en donde los mRNAs estén representados respecto al pool total de RNAs (ribosomales, transferencia y mensajeros) donde estos últimos son solo el 1% aproximado del RNA total extraído (Lodish y col., 2000). La cantidad de RNA se determinó mediante espectrofotometría a 260 nm y la calidad del RNA mediante la razón 260/280 nm, dando un parámetro de la pureza del RNA extraído. La calidad y cantidad de la extracción, donde la integridad del RNA extraído se verifica mediante geles denaturantes de agarosa al 1,5 % se ejemplifica en la figura 5.



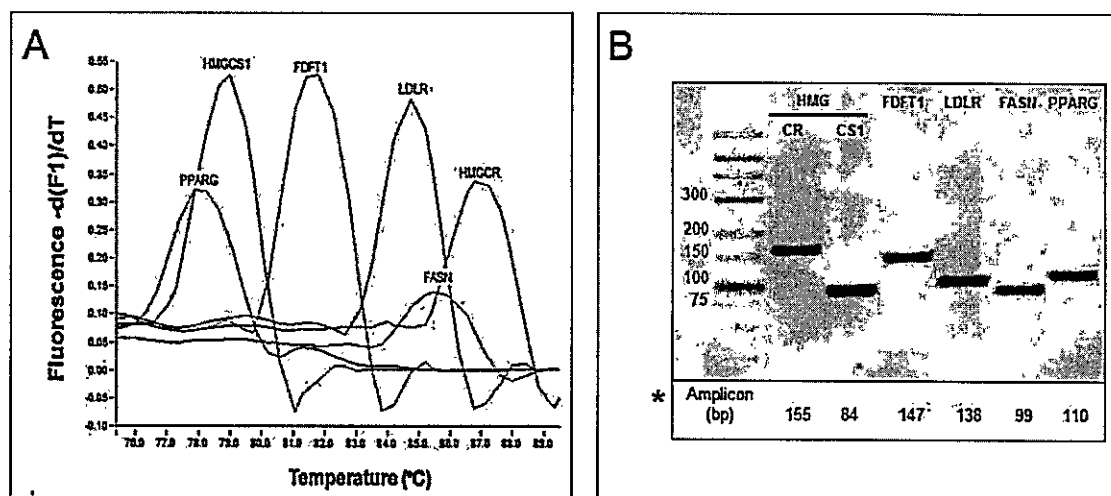
**Figura 5: Determinación de la calidad y rendimiento del RNA total extraído**

En A) se muestra gel denaturante al 1,5% de agarosa para las muestras 1,2 y 3. Abajo el detalle de su cuantificación (RNA total) y la determinación su pureza mediante la razón 260/280nm (>1.8) según datos de espectroscopia. En B) se observa las mismas muestras 1, 2 y 3 luego de la digestión con DNAsa I (evitando luego la amplificación de DNA genómico), la determinación del parámetro de calidad no se realiza luego de la digestión porque los componentes del buffer de la DNAsa I interfieren con una lectura correcta de la razón 260/280nm. Este procedimiento se realizó para todas las muestras (n=108).

En la figura 5A se muestra las bandas características 28S, 18S y 5S correspondientes a los RNAs ribosomales (más abundantes) y como la definición de las bandas marcadas con Bromuro de etidio dan cuenta de la ausencia de degradación del RNA extraído. Una vez cuantificados, las muestras son sometidas a degradación del DNA co-extraído, con 200 U de DNAsa I (Ambion) por 20 min a 37° C, nuevamente se realiza la medición de la concentración y la integridad de las muestras extraídas post-DNAsa (figura 5B). De esta forma el RNA total cumple con los requerimientos de calidad y cantidad para la posterior síntesis del cDNA a partir de los RNAs mensajero utilizando oligos de Timina para hibridar en las colas poliadeniladas y posterior síntesis con la transcriptasa inversa (RT-MVH, promega). Con estos pasos se cumple con los aspectos principales para un PCR cuantitativo (Udvardi y col., 2008).

## 4.2 Especificidad de amplificación de los genes cuantificados.

Además de sintetizar cDNA a partir de un RNA de calidad, es necesario asegurar la especificidad de los genes a cuantificar. Para esto se analizaron las curvas de melting en la cuantificación del gen y se determinó el largo (pares de bases; bp) del amplicon amplificado. Así se asegura la especificidad de los partidores y el largo predicho por el software utilizado para diseñar los partidores. (figura. 6)



**Figura 6: Especificidad de los genes a cuantificar**

En A) se observan las curvas de melting (curvas realizadas a partir de la medición de la fluorescencia a medida que aumenta la temperatura) para los seis genes a estudiar y el B) la resolución de un gel al 3% revisando los tamaños predichos (\*) por el programa al diseñar los partidores.

Se verificaron los genes relacionados con el metabolismo de lípidos. Los genes vinculados en la homeóstasis del Cu se analizaron con anterioridad al inicio del trabajo del seminario de título (Suazo y col., 2008).

Se reportó en la literatura la utilización del gen *rplp0* (ribosomal protein, large, P0) como gen normalizador o "Housekeeping" (De Cremoux y col., 2004. Dheda y col., 2004) para las líneas celulares Jurkat y THP-1. Por extensión, los cultivos

primarios de linfocitos también fueron normalizados por *rplp0*. Por último, para generar el mismo estándar de normalización se utilizó *rplp0* en HepG2.

## 5. Expresión génica cuantificada por PCR cuantitativo en tiempo real

### 5.1 Genes asociados a la homeostasis del cobre

Las determinaciones anteriores, sugieren que el tratamiento con Cu, genera una sobrecarga intracelular del metal, a su vez esta sobrecarga genera una determinada sobrevida (> 80 %). Además se comparó la respuesta a Cu, en líneas celulares pertenecientes al sistema inmunológico como linfocitos y monocitos y en la línea celular hepática (HepG2). Estas líneas celulares son relevantes en la incorporación y excreción de Cu las cuales mostraron una mayor capacidad de acumulación de Cu y menores efectos derivados de la sobrecarga.

Para el estudio de respuesta de las células inmunes ((linfocitos T (Jurkat) y monocitos (THP-1)), fue posible generar un co-relato mediante la exposición a Cu de células mononucleares de la sangre periférica (PBMNCs) y de monocitos de pacientes normales. Así podríamos corroborar o indicar la tendencia en términos de expresión génica vista en las líneas celulares. No fue posible realizar lo mismo con cultivos a partir de biopsias humanas de tejido hepático en pacientes normales.

Para determinar el efecto del tratamiento con Cu en la expresión génica, se midieron varios genes vinculados en la homeostasis de Cu. De todos los genes medidos (*atp7a*, *mt2a*, *ccs*, *sod1*, *ctr1*) se presentan los resultados más relevantes.

## **5.2 Expresión génica en líneas celulares y cultivos primarios de células mononucleares humanas.**

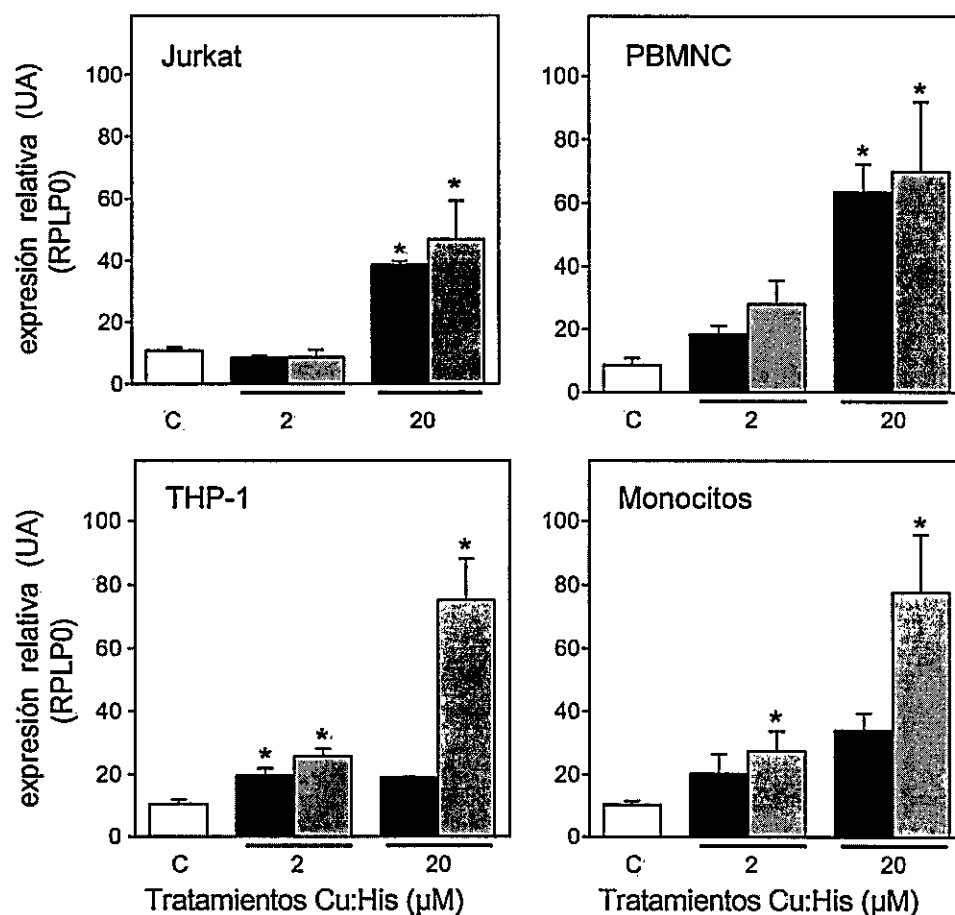
Se realizaron tratamientos de exposición a Cu en líneas celulares de células mononucleares. Ambas líneas (Jurkat; línea linfocitaria y THP-1; línea monocito) forman parte de la población de células mononucleares de la sangre periférica, utilizada comúnmente como tejido de fácil acceso en pacientes en la búsqueda de biomarcadores para diversas patologías y/o status de ciertos micronutrientes. Además se utilizaron células PBMNCs obtenidas de pacientes sanos (n=15) las cuales se sometieron a los mismos tratamientos de exposición a Cu y se estudió los cambios en la expresión génica de varios genes vinculados a la homeostasis del Cu.

### **5.2.1 Expresión génica de metalotioneína 2A (*mt2a*)**

Las metalotioneínas (MT) son proteínas de bajo peso molecular y ricas en cisteínas, las cuales poseen dominios de unión a metal. Estas proteínas son codificadas por una familia de genes localizados en el cromosoma 16q13, las cuales codifican 10 isoformas funcionales (Miles y col., 2000). La metalotioneína 2A, es la isoforma mas expresada en las células. La expresión del gen *mt2a* puede ser inducida por metales como Cd, Zn (Kita y col., 2006, Ebadi y col., 1996), interleuquina 1 (Cousins & Leinart, 1988), TNF-alfa y IFN-beta (Sciavolino & Vilcek, 1995) entre otros.

Los resultados muestran un aumento progresivo en la expresión de *mt2a* respecto a las dos concentraciones de Cu utilizadas, sin diferenciar entre una respuesta temprana (6 h) o tardía (24 h) en células Jurkat y PBMNCs (figura 7). Para las células THP-1 y los monocitos derivados de PBMNCs se observa una

mayor expresión de *mt2a* a tiempos largos (24 h), siendo esta diferencia significativa en células THP-1 y monocitos. Este aumento diferencial podría explicarse por los datos observados en los estudios de carga y viabilidad, donde las células THP-1 tenían similar dinámica de carga y una menor disminución en la viabilidad que las células Jurkat, siendo más resistente al tratamiento y/o mejor control de la toxicidad inducida por Cu. Adicionalmente y solo en los tratamientos efectuados en las líneas celulares THP-1 se observaron cambios significativos para 2 y 20  $\mu\text{M}$  de Cu a las 6 h de exposición (figura. 7).



**Figura 7. Expresión relativa del transcrito de *mt2a* en células mononucleares expuestas a Cu-His.**

En la gráfica se muestra la expresión relativa de *mt2a* para las líneas celulares Jurkat y THP-1 y su co-relato con cultivos primarios de células mononucleares de la sangre periférica (PBMNCs) y monocitos para tratamientos con Cu de 2 y 20  $\mu\text{M}$ , expuestas por 6 h (barras negras), 24 h (barras grises) y control (barra blanca). Los resultados se grafican como promedio  $\pm$  DS y la diferencias significativas respecto del control (P < 0,05 \* ANOVA una vía y test post-hoc de Tukey)

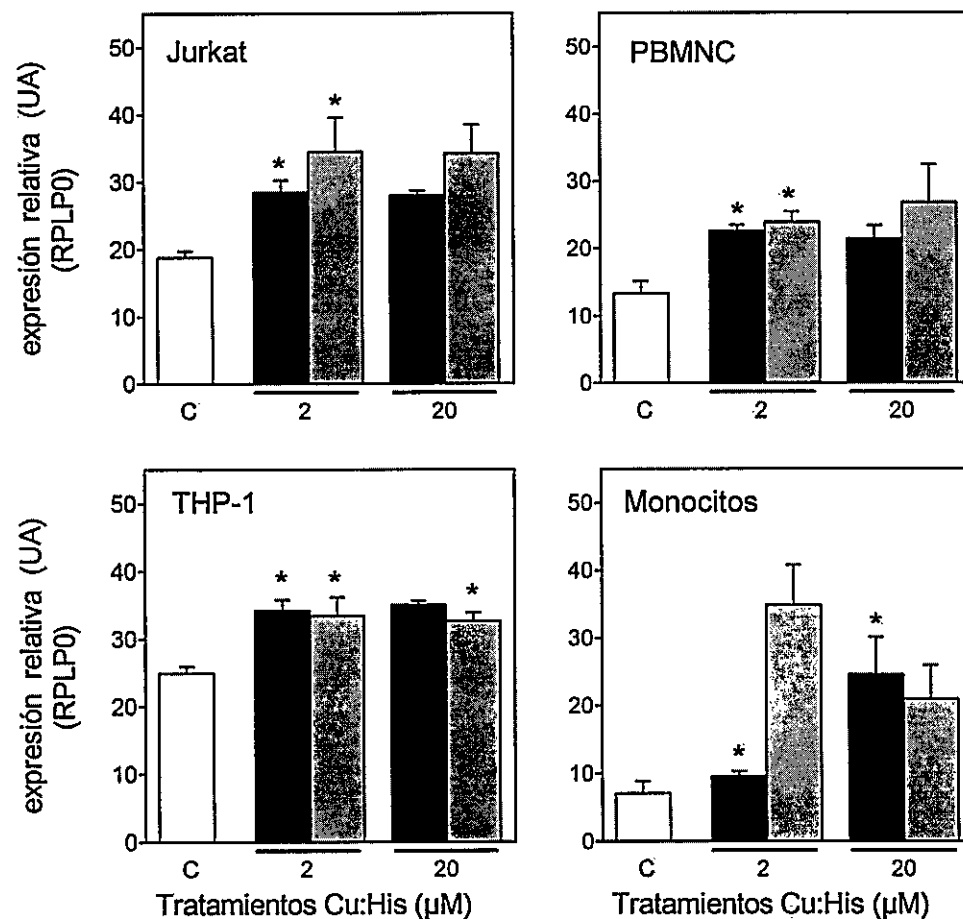


### 5.2.2 Expresión génica de la superóxido dismutasa Cu/ Zn (*sod1*)

La superóxido dismutasa Cu/Zn (*sod1*) participa en la respuesta celular al estrés oxidativo, localizado en el cromosoma 21q22, el gen *sod1* codifica para una de las tres enzimas que participan en la regulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS). En la literatura se han descrito varios sitios de unión en la parte proximal del promotor de *sod1* para NF-kappa B, AP-1, AP-2, Sp1 y C/EBP. El factor nuclear kappa B (NF- kappa B) es un factor de transcripción redox-sensible que puede inducir la expresión de *sod1* (Miao & St. Clair, 2009). Sin embargo, *sod1* a menudo se encuentra con altos niveles de expresión y es difícil de inducir, siendo considerado un gen normalizador en el estudio de expresión de los otros genes (*sod2* y *sod3*) (Minc y col., 1990).

Los resultados de expresión mostraron un aumento en la abundancia de *sod1* en las células Jurkat, THP-1 y PBMNCs a la 6 h sin observar diferencias respecto de las distintas concentraciones de Cu utilizadas (figura 8). Sin embargo, no se observó este aumento de expresión de *sod1* para tratamientos con 2 y 20  $\mu$ M de Cu a las 6 h en monocitos, esto puede depender del estado de diferenciación de los monocitos aislados desde sangre a las líneas THP-1, ya que esta última línea celular de monocitos no estaba diferenciada (no-adherentes).

La expresión inducida de *sod1* por Cu, no hace diferencia entre los tratamientos y es significativa solo a tiempos cortos, sin embargo a tiempos largos también se observa una tendencia al alza. Esto indicaría que la expresión de *sod1* es dependiente de la exposición a Cu y no a la dosis expuesta ni del tiempo de exposición a Cu, ya que la exposición a 6 o 24 h no hace diferencias en la expresión de *sod1* (figura 8).



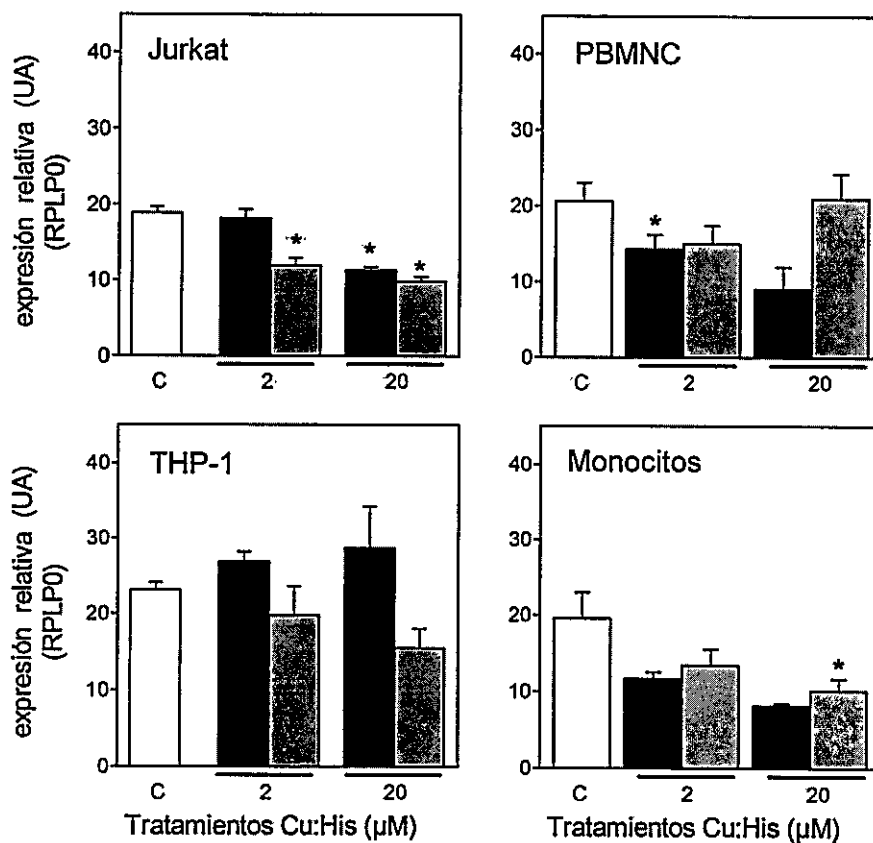
**Figura 8: Expresión relativa del transcrito de *sod1* en células mononucleares expuestas a Cu-His.**

En la gráfica se muestra la expresión relativa de *sod1* para las líneas celulares Jurkat y THP-1 y cultivos primarios de células mononucleares de la sangre periférica (PBMNCs) y monocitos para tratamientos con Cu de 2 y 20  $\mu\text{M}$ , expuestas por 6 h (barras negras), 24 h (barras grises) y control (Barra blanca). Los resultados se grafican como promedio  $\pm$  DS y la diferencias significativas respecto del control ( $P < 0,05$  \* ANOVA una vía y test post-hoc de Tukey)

### 5.2.3 Expresión génica de la chaperona de Cu de la superóxido dismutasa Cu/Zn (*ccs*)

La activación de la enzima SOD1 Cu/Zn depende de la incorporación de átomos de Cu y Zn, para esto se requiere de una proteína chaperona llamada CCS que une el Cu desde los transportadores de alta afinidad a Cu (CTR1) y lo transporta, participando en el proceso de activación. La proteína CCS participa en la activación de la cuproenzima SOD1, y ha sido estudiada como un biomarcador en el status de Cu en humanos (Suazo y col., 2008; Harvey & McArdle, 2008).

Nosotros encontramos que la exposición a Cu disminuye la expresión de *ccs* en células Jurkat, PBMNCs y monocitos en ambos tiempos de exposición (figura 9). En las células THP-1 no se observaron cambios significativos y el rango de expresión relativa del mRNA de *ccs*. Aunque este fue menor al observado en el cultivo primario de monocitos. Esta diferencia en la expresión basal de *ccs* podría ser explicado por el grado de diferenciación que tienen los monocitos. Curiosamente, la diferencia de expresión basal de *ccs* entre THP-1 y monocitos derivados de PBMNCs fue también observada para *sod1* gen vinculado con la respuesta celular contra el estrés oxidativo. Con los datos de expresión de ambos genes se podría explicar que el proceso de diferenciación de los monocitos induciría una disminución en la expresión del mRNA de *sod1* y un aumento en la expresión de *ccs*. La disminución en los niveles transcripcionales de *ccs* ya había sido reportada anteriormente en PBMNCs de pacientes suplementados con 10 mg de CuSO<sub>4</sub> diarios por dos meses validando así los datos observados *in vivo* (Suazo y col., 2008).

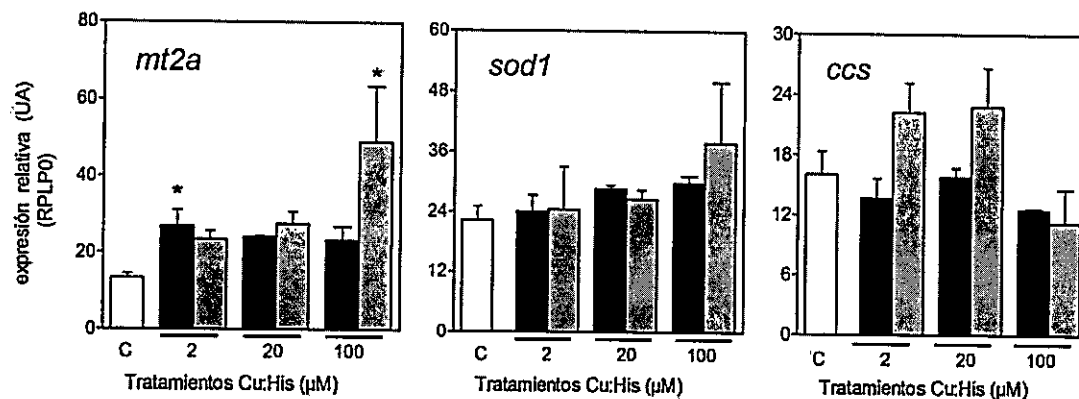


**Figura 9: Expresión relativa del transcrito de *ccs* en células mononucleares expuestas a Cu-His.**

En la gráfica se muestra la expresión relativa de *ccs* para las líneas celulares Jurkat y THP-1 y cultivos primarios de células mononucleares de la sangre periférica (PBMNCs) y monocitos para tratamientos con Cu de 2 y 20  $\mu\text{M}$ , expuestas por 6 h (barras negras), 24 h (barras grises) y control (barra blanca). Los resultados se grafican como promedio  $\pm$  DS y la diferencias significativas respecto del control ( $P < 0,05$  \* ANOVA una vía y test post-hoc de Tukey).

#### 5.2.4 Expresión de genes vinculados a la homeostasis del cobre en la línea celular de hepatocitos (HepG2).

Al igual que en las líneas mononucleares, fue necesario caracterizar la respuesta de la línea celular hepática, para esto se cuantificó la expresión relativa de los genes participantes de la homeostasis celular del cobre; *mt2a*, *sod1* y *ccs*. La exposición a cobre a tiempos cortos y largos generó un aumento en la expresión relativa de *mt2a*, dependiendo de la concentración de cobre, siendo significativa a las 24 h con 100  $\mu$ M de Cu-His. Además la mayoría de estos tratamientos con Cu aumenta hasta dos veces la expresión de *mt2a* (figura 10). Sin embargo, los niveles de mRNA basales de *mt2a* son menores en células HepG2 comparados con células mononucleares, mostrando una mayor respuesta inducida por cobre en estas últimas células. Este comportamiento era esperado debido a que el Cu intracelular induce la relocalización de elementos regulatorios como MTF-1 que promueve la expresión del transcrito de *mt2a*. Estos datos son apoyados por resultados previamente descritos sobre el aumento del transcrito y de la proteína MT2A (Arredondo y col., 2004; Song & Freedman, 2005; Muller y col., 2007). Para los niveles de *sod1* se observó la misma tendencia al aumento después del tratamiento con Cu respecto del control a ambos tiempos. No se encontró diferencias significativas, posiblemente debido a los altos niveles de transcrito y proteínas a nivel citoplasmático. Finalmente, para el mRNA de *ccs* no se observó diferencias significativas o tendencias con respecto al control. Los resultados se grafican en la figura 10.



**Figura 10. Expresión relativa de genes vinculados a la homeostasis del cobre en HepG2 expuestas a Cu-His.**

En los gráficos se muestra la expresión relativa de *mt2a*, *sod1* y *ccs* en la línea celular hepática HepG2 sometidas a distintos tratamientos con tiempos de exposición de 6h (barras negras), 24 h (barras grises) y control (barras blancas). Los resultados se grafican como promedio  $\pm$  DS y la diferencias significativas respecto del control ( $P < 0,05$  \* one way ANOVA y test post-hoc de Tukey) ( $n=3$ ).

### 5.3 Expresión de genes vinculados al metabolismo de lípidos en líneas celulares expuestas a Cu.

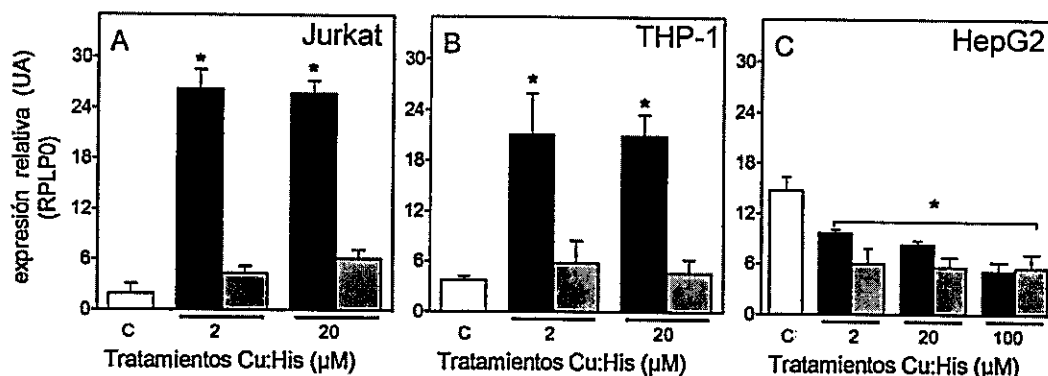
Luego de determinar los cambios de expresión génica de tres proteínas que participan en la homeostasis del Cu, se cuantificaron los cambios de expresión de genes vinculados al metabolismo de lípidos (*fasn*, *hmgcr*, *hmgcs1*, *fdft1* y *ldlr*) en las tres líneas celulares; Jurkat, THP-1 y HepG2. Adicionalmente, se midieron estos genes en los cultivos primarios de ambas líneas mononucleares, mostrando solo tendencias (datos no mostrados).

Con la intención de ver los cambios inducidos por la exposición a cobre en distintas líneas celulares distintas (hepática y no-hepáticas), se midió la expresión de genes vinculados al metabolismo de lípidos. En particular, se midió la expresión de genes que codifican para enzimas participantes en la biosíntesis del colesterol tales como; HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa y la escualeno sintasa. Además, se midió la expresión del receptor de las lipoproteínas de baja densidad

(*ldlr*) y la sintetasa de ácidos grasos (*fasn*). Por último, se midieron los factores de transcripción; PPAR $\gamma$ , SREBP1 y SREBP2, sin embargo debido a su baja expresión en estas líneas celulares, no se lograron cuantificar (datos no mostrados).

### 5.3.1 Expresión relativa del receptor de lipoproteína de baja densidad (*ldlr*).

El LDLR participa activamente en el reconocimiento y endocitosis de lipoproteínas. Se cuantificó la expresión relativa del gen *ldlr* en células Jurkat, THP-1 y HepG2 y se observó un aumento significativo en la expresión de *ldlr* a tiempos cortos (6 h) de exposición a Cu-His en líneas Jurkat y THP-1. Sin embargo, la expresión de *ldlr* en la línea hepática disminuyó en todos los tratamientos y para ambos tiempos de exposición a Cu (figura 11). Los niveles de *ldlr* aumentaron la expresión del receptor más de cinco veces al tratar con ambas concentraciones de cobre (2 y 20  $\mu$ M de Cu-His) en células Jurkat y THP-1. Por el contrario, estos niveles disminuyeron dos veces en HepG2 (figura 11). En las líneas mononucleares los cambios transcripcionales no depende del tratamiento utilizado y su aumento es temporal. En tanto, la respuesta transcripcional en la línea hepática si depende de la concentración a tiempos cortos, generándose una disminución creciente al aumentar la concentración de cobre. Sin embargo a tiempos largos la disminución en la expresión relativa no disminuye gradualmente. Los datos de expresión se muestran en las figura 11.



**Figura 11. Expresión relativa del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) en líneas celulares humanas expuestas a Cu-His.**

En la gráfica se muestra la expresión relativa del gen *ldlr* en Jurkat (A), THP-1 (B) y HepG2 (C) sometidas a distintos tratamientos con tiempos de exposición de 6h (barras negras), 24 h (barras grises) y control (barras blancas). Los resultados se grafican como promedio  $\pm$  DS y la diferencias significativas respecto del control ( $P < 0,05$  \* one way ANOVA y test post-hoc de Tukey), ( $n=3$ ).

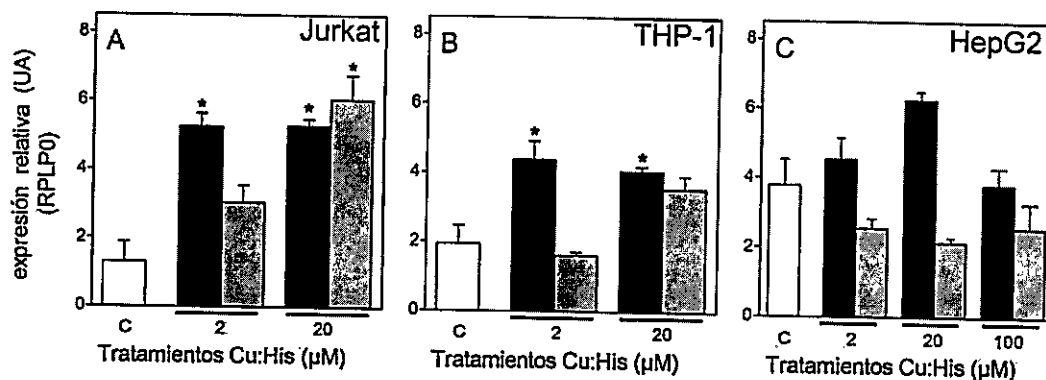
### 5.3.2 Expresión relativa de 3-hidroxy-3-metilglutaril CoA sintasa 1 (*hmgcs1*)

La *hmgcs1* es una enzima que participa en la formación del intermediario 3-hidroxy-3-metilglutaril CoA en la biosíntesis de colesterol (HMGCS1).

La expresión del gen se midió en las líneas mononucleares. A tiempos cortos, se observó un aumento significativo en la expresión del gen, que no depende del tratamiento. Por otro lado, La expresión de *hmgcs1* aumenta a tiempos largos en células Jurkat, mientras que en THP-1 solo se observa una tendencia al alza. Así mismo, la expresión en células HepG2 mostro una tendencia al alza para concentraciones inferiores a 100  $\mu$ M de Cu. Además, a tiempos largos se observa una disminución en la expresión relativa en todos los tratamientos (figura 12). Esta tendencia también se ve reflejada en la disminución de la expresión en forma temporal para cada tratamiento siendo siempre mayor la expresión a 6 h. Este fenómeno de temporalidad modifica la expresión dependiendo del tratamiento en células mononucleares. Se observó que en ambas líneas celulares tratadas con concentraciones sub-fisiológicas de Cu (2  $\mu$ M), la expresión génica de *hmgcs1*



aumenta a tiempos cortos aunque luego este aumento no se sostiene en el tiempo y la expresión disminuye casi a la mitad. Mientras que a concentraciones mayores de Cu (20 $\mu$ ) la expresión del gen no cambia a las 24 h (figura 12).



**Figuras 12: Expresión relativa de la enzima 3-hidroxy-3-metilglutaril CoA sintasa 1 en líneas celulares humanas expuestas a Cu-His.**

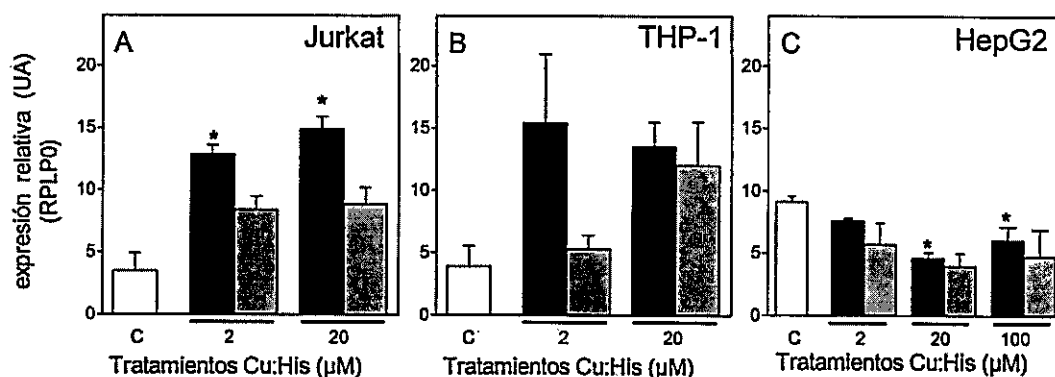
En la gráfica se muestra la expresión relativa del gen *hmgcs1* en Jurkat (A), THP-1 (B) y HepG2 (C) sometidas a distintos tratamientos con tiempos de exposición de 6h (barras negras), 24 h (barras grises) y control (barras blancas). Los resultados se grafican como promedio  $\pm$  DS y la diferencias significativas respecto del control (  $P < 0,05$  \* one way ANOVA y test post-hoc de Tukey), (n=3).

### 5.3.3 Expresión relativa de la 3-hidroxy-3-metilglutaril-CoA reductasa (*hmgcr*)

El paso siguiente a la síntesis del HMG-CoA es su reducción y formación del mevalonato, la enzima 3-hidroxy-3-metilglutaril CoA reductasa realiza este paso clave en la biosíntesis de colesterol. La producción de mevalonato puede ser inhibida competitivamente con estatinas (Nelson & Cox 2005) y además de ser regulada post-transcripcionalmente (Nelson & Cox 2005).

La expresión de *hmgcr* aumentó significativamente a las 6 h en células Jurkat, tendencia que se repite en células THP-1. Sin embargo, la expresión decae a las 24 h de exposición para ambas líneas celulares. En células Jurkat la expresión del gen (figure 13) disminuye para ambas dosis de Cu expuestas (2 y 20  $\mu$ M), en células THP-1 se observa una disminución en la respuesta para el tratamiento con 2  $\mu$ M de

Cu a las 24 h. Contrario a este cambio, en células HepG2 la expresión de este gen disminuye significativamente con tratamientos de 20 y 100  $\mu\text{M}$  de Cu a tiempos cortos. La respuesta transcripcional de células Jurkat y THP-1 es similar respecto de su temporalidad, contrario a lo observado en células HepG2 donde el efecto del tiempo de exposición no condiciona los niveles de expresión.



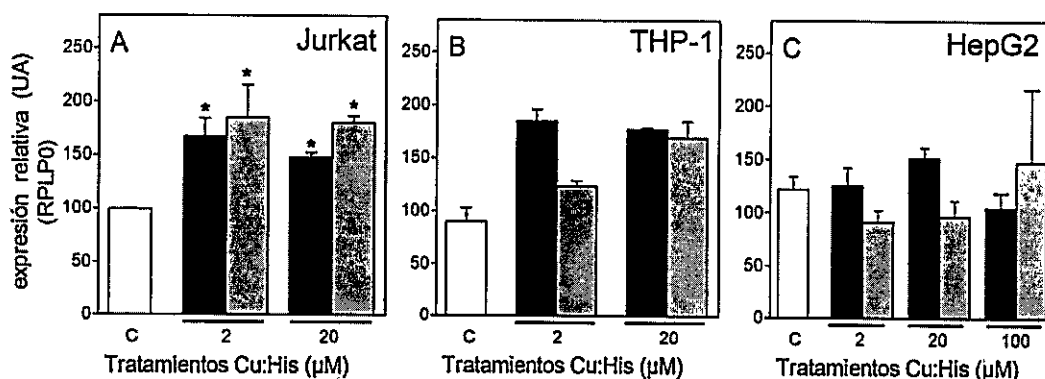
**Figuras 13: Expresión relativa de la enzima 3-hidroxy-3-metilglutaril CoA reductasa en líneas celulares humanas expuestas a Cu-His.**

En la gráfica se muestra la expresión relativa del gen *hmgcr* en Jurkat (A), THP-1 (B) y HepG2 (C) sometidas a distintos tratamientos con tiempos de exposición de 6h (barras negras), 24 h (barras grises) y control (barras blancas). Los resultados se grafican como promedio  $\pm$  DS y la diferencias significativas respecto del control ( $P < 0,05$  \* one way ANOVA y test post-hoc de Tukey), ( $n=3$ ).

### 5.3.4 Expresión relativa del Farnesil Difosfato Farnesil Transferasa 1 (*fdft1*)

La Farnesil Difosfato Farnesil Transferasa 1 (*fdft1*) o escualeno sintasa cataliza la dimerización de dos moléculas de farnesil difosfato para la formación del escualeno. Esta es la primera reacción específica de la biosíntesis del colesterol, las anteriores corresponden a la vía del mevalonato.

La expresión relativa de este gen muestra un aumento en todas las líneas celulares utilizadas, sin embargo solo en linfocitos se registraron diferencias significativas respecto del control a las 6 y 24 h. Los aumentos en la expresión relativa fueron similares sin encontrar diferencias respecto de los tratamientos utilizados (2 y 20  $\mu$ M Cu-His). En monocitos, se manifiesta un aumento de expresión sin ser significativo para ambos tiempos, en donde la expresión basal de *fdft1* es mayor respecto de células Jurkat y finalmente en hepatocitos la respuesta al tratamiento con Cu no cambia, ni los tratamientos, ni la temporalidad de la expresión inducen cambios significativos (figura 14).

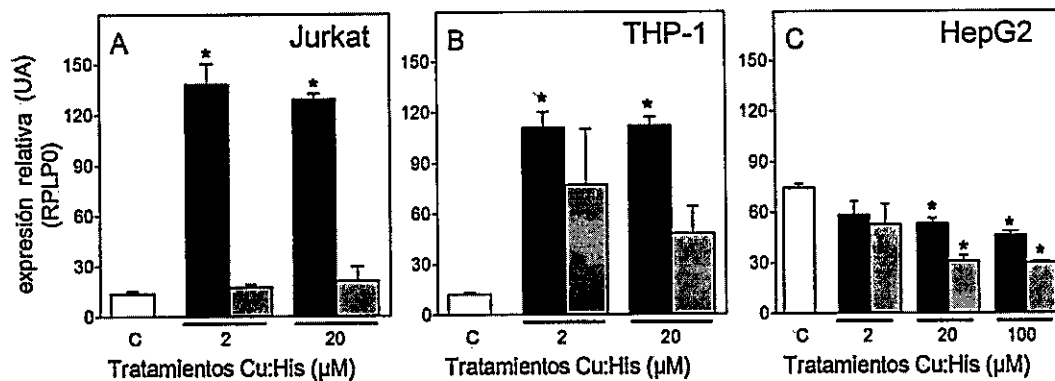


**Figuras 14. Expresión relativa de la enzima Farnesil Difosfato Farnesil Transferasa 1 en líneas celulares humanas expuestas a Cu-His.**

En la gráfica se muestra la expresión relativa del gen *fdft1* en Jurkat (A), THP-1 (B) y HepG2 (C) sometidas a distintos tratamientos con tiempos de exposición de 6h (barras negras), 24 h (barras grises) y control (barras blancas). Los resultados se grafican como promedio  $\pm$  DS y la diferencias significativas respecto del control ( $P < 0,05$  \* one way ANOVA y test post-hoc de Tukey), ( $n=3$ ).

### 5.3.5 Expresión relativa de la sintasa de ácidos grasos (*fasn*)

Este gen codifica para una enzima multifuncional, que tiene por función principal catalizar la síntesis de ácido palmítico a partir de acetil-CoA y malonil-CoA. La expresión de este gen está regulada por SREBP-1c y su aumento de expresión, se ha asociado a la inducción por insulina, siendo este un modelo de cómo las dietas ricas en carbohidratos inducen la expresión de transcritos vinculados a la glicolisis y lipogénesis (Foufelle & Ferré, 2002). La expresión de *fasn* aumenta a las 6 h para linfocitos y monocitos, sin embargo a las 24 h se observa una expresión cercana a la basal para las células Jurkat. Diferente es la respuesta en células THP-1 que sin ser significativa es similar a su respuesta en las 6 h de tratamiento. En el caso de los hepatocitos la respuesta al tratamiento induce una disminución en la expresión del gen en ambos tiempos. Además, esta disminución es significativa para tratamientos mayores a 20  $\mu$ M de Cu-His. Para células Jurkat y THP-1 el aumento de expresión llega a más de tres veces de cambio respecto del control a las 6 h y en HepG2 disminuye a más de dos veces de cambio. Los datos de expresión se grafican la figura 15.



**Figura 15. Expresión relativa de la sintasa de ácidos grasos (*fasn*) en líneas celulares humanas expuestas a Cu-His.**

En la gráfica se muestra la expresión relativa del gen *fasn* en Jurkat (A), THP-1 (B) y HepG2 (C) sometidas a distintos tratamientos con tiempos de exposición de 6h (barras negras), 24 h (barras grises) y control (barras blancas). Los resultados se grafican como promedio  $\pm$  DS y la diferencias significativas respecto del control (  $P < 0,05$  \* one way ANOVA y test post-hoc de Tukey), ( $n=3$ ).

## DISCUSIÓN

### **Fundamentos metodológicos.**

El vínculo entre el cobre y el colesterol se remonta a la década de los 70's. Estudios realizados en ratas, mostraron un aumento en la concentración de lipoproteínas plasmáticas ricas en colesterol (LDL) bajo razones crecientes del Zn/Cu suministrado (Klevay, 1973). Luego estas observaciones se centrarían en la deficiencia de Cu como inductor de la hipercolesterolemia en ratas (Allen & Klevay 1978) y en humanos (Klevay y cols, 1984). Así los estudios posteriores enfatizarían el aumento en la biosíntesis de colesterol en condiciones de deficiencia, utilizando un precursor marcado radioactivamente (Shao y col., 1980). Por otra parte, estudios en condiciones de suplementación mostraron efectos positivos en enfermedades de riesgo cardiovascular (Bügel y col., 2005). Lamb y cols. demostraron que la suplementación inhibe la progresión de la aterogénesis en conejos (Lamb y col., 1999). De esta forma se hace manifiesto el vínculo entre colesterol y el cobre.

A nivel sistémico, el colesterol se sintetiza en el hígado, este mismo órgano es un punto de control clave en la homeostasis del Cu. Por esta razón, la línea celular HepG2 ha sido ampliamente utilizada en estudios enfocados en comprender la regulación de la homeostasis del Cu (Song & Freedman 2005), así como también en el estudio del metabolismo del colesterol (Erickson & Fielding 1986). El pool de colesterol hepático constituido por la absorción intestinal desde la dieta o por su producción endógena es distribuido desde el hígado a los distintos tejidos principalmente como lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas lipoproteínas, en

su versión oxidada, estimulan la expresión de factores de adhesión para monocitos en endotelios disfuncionales, con la posterior diferenciación a macrófagos, iniciándose la aterosclerosis. La función de los monocitos en los inicios de esta patología ha sido ampliamente estudiado (Ludewing & Laman 2004), así como también su diferenciación a macrófagos y posterior acumulación de oxi-LDL por receptores alternativos (SR-RA), generando células espumosas (Banka y col., 1991). Las líneas celulares de monocitos y linfocitos en conjunto componen la población de células mononucleares de la sangre periférica (PBMNCs). Las cuales cumplen funciones en la respuesta inmunológica innata y adaptativa. Estas poblaciones de células son de fácil acceso desde muestras de sangre, siendo ampliamente utilizadas en la búsqueda de biomarcadores (Bertinato & Zouzoulas 2009).

En el trabajo de Huster, se estableció un modelo murino para la enfermedad de Wilson (ratones KO para ATP7B), caracterizado por la acumulación crónica de Cu en el hígado, se observaron cambios transcripcionales específicos para genes del metabolismo de lípidos y del control de ciclo celular según la clasificación GO (Huster y col., 2007). Svensson en tanto demostró cambios transcripcionales en macrófagos humanos expuestos a Cu (Svensson y col., 2003). Ambos trabajos muestran condiciones de sobrecarga experimental y/o inducida por la ausencia del transportador ATP7B en distintos tipos celulares.

El objetivo principal de este estudio fue determinar el efecto de la sobrecarga de Cu inducida por suplementación, en los niveles transcripcionales de genes vinculados al metabolismo de lípidos. Para ello se utilizaron las líneas celulares de hepatocitos (HepG2), como un tipo celular asociado a la homeostasis sistémica del Cu, y a las líneas mononucleares de la sangre; monocitos (THP-1) y linfocitos (Jurkat) como participantes indirectos. La línea celular linfocitaria representa un punto de contraste respecto de los monocitos.

### **Viabilidad y sobrecarga de cobre**

En primer lugar se establecieron los tratamientos de Cu. La concentración plasmática de Cu es de 20  $\mu\text{M}$  (Linder, 2001; Tapiero y col., 2003). De esta concentración solo el 10% esta acomplejado con albumina y/o aminoácidos, representando la fracción de Cu biodisponible, el 90% restante se encuentra unido a ceruloplasmina; una cuproenzima con actividad ferroxidasa. Se utilizaron concentraciones fisiológicas y supra-fisiológicas de Cu (2 y 20  $\mu\text{M}$ , respectivamente) para las líneas inmunológicas de monocitos y linfocitos. Sin embargo, para hepatocitos se han reportado concentraciones mayores de Cu llegando hasta los 600  $\mu\text{M}$  en estudios de acumulación aguda (Song y col., 2009). Sin pretender estudiar este tipo de respuestas transcripcionales (toxicidad aguda), se utilizó una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de Cu debido a que es una concentración supra-fisiológica y ampliamente utilizada en literatura (Barthel y col., 2007). De esta forma las concentraciones utilizadas aquí están en concordancia con los valores a nivel fisiológico y representan una posibilidad real de exposición a Cu en condiciones de suplementación.

Luego de decidir las líneas a utilizar y las concentraciones, el método experimental requería considerar los tiempos de exposición al metal. Para esto se realizaron varios tiempos (6, 12, 24 y 48 h). De estos tiempos solo se eligieron dos: exposiciones cortas (6 h) y largas (24 h). Los tratamientos fueron realizados de forma regresiva, 24 h posterior al sembrado en las células y generando un tiempo de cultivo igual para todos los tratamientos en todas las líneas celulares utilizadas.

Nuestras primeras observaciones requerían determinar si las concentraciones utilizadas afectaban la viabilidad, para esto se realizaron ensayos de reducción de la sal de tetrazolio (MTT). Así pudimos asegurar una sobrevida



mayor al 80% en todos los tratamientos donde se midió la respuesta transcripcional. Para los hepatocitos (HepG2) los datos de viabilidad eran esperables ya que en la literatura se describen tratamientos con Cu en condiciones de acumulación aguda (600  $\mu\text{M}$ ) y la viabilidad celular se mantiene por sobre el 75% (Seth y col., 2004). Para las líneas mononucleares no se reportan datos de viabilidad en exposición a Cu. En estas líneas se observó una diferencia en la viabilidad luego del primer ciclo de duplicación observándose una mayor sensibilidad de los linfocitos respecto de los monocitos.

Posterior a determinar el efecto en la viabilidad celular, se confirmó las condiciones de sobrecarga midiendo la concentración intracelular de Cu acumulado en las distintas líneas celulares (THP-1, Jurkat y HepG-2). Los resultados mostraron acumulaciones crecientes de un en todas las líneas analizadas. Para monocitos y linfocitos (THP-1 y Jurkat) estas alcanzaron un aumento de hasta las seis veces (24 h) respecto a la condición control y cuatro veces a tiempos cortos (6 h). Mientras que en hepatocitos (HepG2) el aumento fue de dos veces para la concentración y tiempo mayor. La diferencia en la capacidad de carga entre las líneas celulares (6 veces de cambio a 20  $\mu\text{M}$  por 24 h para Jurkat y THP-1 y 2 veces de cambio en 100  $\mu\text{M}$  por 24 h en HepG2) generó dudas respecto de la condición de sobrecarga de los hepatocitos, sin embargo la expresión relativa del mRNA de *mt2a* mostró un aumento creciente respecto de la concentración de Cu, denotando así una respuesta transcripcional a la sobrecarga.

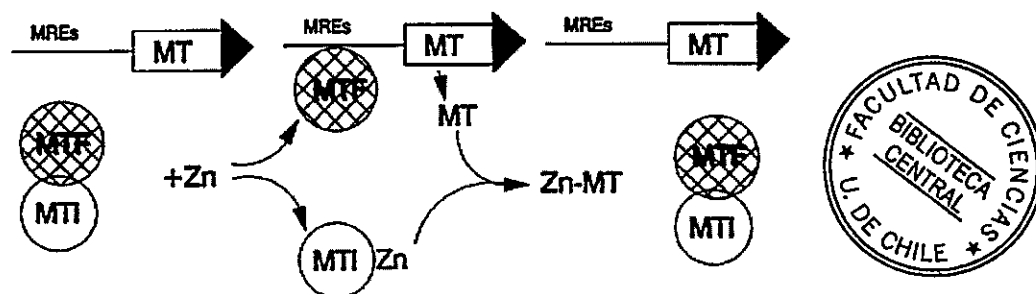
Los datos de contenido intracelular de Cu muestran la capacidad de estas líneas celulares de incorporar el metal, sin generar condiciones de estrés que modifiquen su viabilidad. La concentración intracelular de Cu depende tanto de la incorporación como del eflujo del Cu. Caracterizando así la capacidad de los hepatocitos (HepG2) de eliminar el exceso de Cu, ya que a tratamientos cinco veces mayor a la de Jurkat y THP-1, los hepatocitos aumentan su concentración

intracelular dos veces más que el control, en tanto que las otras líneas llegan hasta nueve veces.

### **Efectos de la sobrecarga de Cu**

A nivel celular existen mecanismos que regulan la concentración intracelular de Cu y que evitan su deficiencia y/o exceso. Transportadores de ingreso y salida, chaperonas y cuproenzimas participan en esta regulación. Además, la metalotioneína ha sido sindicada como una proteína importante en el almacenamiento seguro del Cu intracelular en concentraciones supra fisiológicas (Tapia y col., 2004). Así la expresión relativa para la isoforma 2A de la metalotioneína humana aumento significativamente a las concentraciones supra-fisiológicas de Cu (Tapia y col., 2004).

El aumento de *mt2a* a concentraciones supra-fisiológicas de Cu se condice con el aumento de la proteína y el posterior almacenamiento del metal (Arredondo y col., 2004). Esta respuesta debería estar mediada por la unión en *trans* del factor de transcripción MTF-1 en la secuencia de respuesta a metales (MRE) en el promotor de *mt2a* según se describe en la literatura (Giedroc y col., 2001). La respuesta transcripcional del transcrito *mt2a* al Cu se puede explicar según el modelo de Palmiter (Palmiter, 1994). En este modelo MTF-1 interactúa con un inhibidor de la transcripción de la metalotioneína (MTI), el cual sería el sensor de metales en este modelo. Así el Zn u otro metal como el Cd o Cu se coordinaría en MTI, debilitando la interacción MTF-1/MTI, y así dejando libre a MTF-1 para inducir la expresión transcripcional de la MT, como se esquematiza en la figura 16.



**Figura 16: Modelo de inducción de MT por metales distintos a zinc.**

Modelo propuesto por Palmiter, donde MT es el gen regulado, MREs son los elementos regulatorios de respuesta a metales, MTF es el factor de transcripción de unión a MRE y MTI el inhibidor de la transcripción con afinidad por metales como Zn y Cu, entre otros. Imagen desde Palmiter R.D. (1994). Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 91, pp. 1219-1223, February 1994.

Este modelo podría explicar los cambios transcripcionales observados para el gen *mt2a* en respuesta a un metal distinto del Zn, como es el Cu. Adicionalmente se sabe que un metal de transición del periodo 4 que se encuentra coordinado puede sufrir el desplazamiento por otro metal de transición que se encuentre más alto en la escala de Irving Williams. Esta categorización describe la estabilidad cualitativa que posee un metal en coordinación, donde el Cu(II) y el Cu(I) están por sobre el zinc (Robinson & Winge 2010). De esta forma, el Cu desplazaría al Zn de la coordinación por los residuos sulfhídricos en la MT generando un aumento del Zn intracelular y la posterior transcripción de *mt2a*. Luego de caracterizar la respuesta transcripcional clásica a Cu en las líneas celulares, se analizó el efecto de la sobrecarga en la expresión de los genes que codifican para proteínas tales como la superóxido dismutasa (SOD1) y su chaperona (CCS). La producción del ion superóxido ocurre principalmente en la mitocondria por los complejos I y III. La dismutación del ion superóxido procede a través de las distintas enzimas a nivel mitocondrial (SOD2-Mn), citoplasmático (SOD1-Cu/Zn) y extracelular (SOD3). Como consecuencia de esta reacción se genera peróxido de hidrogeno que luego es eliminado por la glutatión peroxidasa o la catalasa (Zelko y col., 2002).

Los datos de expresión para el gen *sod1* mostraron aumento en la expresión en las líneas mononucleares y una tendencia al alza en células HepG2. Esta última observación se ratifica desde la literatura donde Cd, Zn y Cu inducen la expresión de *sod1* a través de MRE ubicados a 270 bp río arriba del origen de la transcripción del gen *sod1* (Yoo y col., 1999). Adicionalmente el promotor de *sod1* puede ser regulado por diversos factores de transcripción inducidos por Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) como Sp1, Egr-1 y WT1 representando una forma alternativa de expresión para *sod1* (Minc y col., 1999). En particular, Sp1 es un factor de transcripción tipo dedos de zinc, que está vinculado a la homeostasis celular de Cu y que regula transcripcionalmente a *ctr1* (Song y col., 2008). Por otra parte, el estrés oxidativo induce la señalización de la vía PI3K/Akt produciendo efectos en las señales de supervivencia, proliferación y de respuesta al daño. Se ha demostrado que la expresión del gen *sod1* es regulada por la vía PI3K/Akt. Esta regulación está mediada por NFκB, a través de la secuencia de unión específicas ubicadas a 480 bp río arriba del origen de transcripción del gen *sod1* (Rojo y col., 2004).

Para los genes vinculados en la homeostasis de Cu se analizaron los datos de expresión de la chaperona CCS. Estos resultados mostraron una disminución en el transcrito en la línea linfocitaria como también en los cultivos primarios de linfocitos humanos. Aunque todavía no se ha reportado la caracterización del promotor de *ccs*, existen otros mecanismos que podrían dar cuenta de la disminución del transcrito en condiciones de sobrecarga. Recientemente se ha demostrado que la ubiquitinación de CCS mediada por XIAP (proteína anti-apoptóticas vinculada al cromosoma X) aumenta la actividad de CCS en el traspaso de átomos de Cu a la SOD1 Cu/Zn (Brady y col., 2010). De esta forma la disminución en el transcrito podría atribuirse a un posible efecto transcripcional debido a la mejora en la capacidad de activación que poseen las CCS ubiquitinadas.

### Vía de transducción de señales y respuesta transcripcional

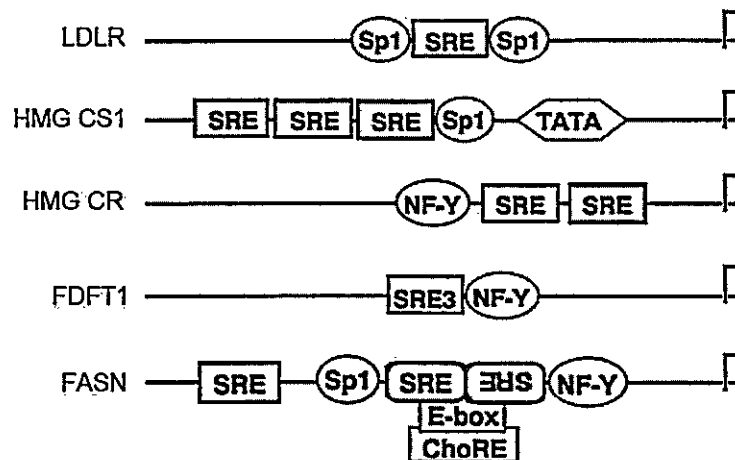
La respuesta celular al estrés oxidativo oscila entre la sobrevida y la apoptosis, dependiendo del daño celular provocado. De esta forma, el Cu como inductor de estrés oxidativo activará distintas cascadas de señalización intracelular y dependiendo de su concentración y tiempo de exposición se producirá la integración de estas señales induciendo apoptosis, senescencia o sobrevida. Una de estas cascadas de señalización es la vía PI3K/AKT. Esta vía de transducción es activada por la insulina a través de su receptor. Barthel y cols. proponen la activación de esta vía por parte del Cu y Zn en hepatocitos humanos, generando un estímulo tipo insulina (insulino-mimético). Se demostró que la inducción de la vía PI3K/AKT por Cu, genera la exclusión nuclear del factor de transcripción FoxO1 y el mecanismo por el cual el Cu induciría esta respuesta dependería de la generación de estrés oxidativo a partir de la re-oxidación del ion cuproso o por la inhibición inducida por Cu de la actividad fosfatasa de las proteínas tirosina fosfatasa (PTPs), encargadas de desfosforilar a las quinasas de una cascada intracelular (Barthel y col., 2007).

El factor FoxO1 participa en la represión a través de la unión a la región de unión del factor de transcripción LXR en el promotor de SREBP1c (Liu y col., 2010). Este factor de transcripción es el regulador maestro de la respuesta a insulina, induciendo la activación transcripcional de los genes vinculados a la glicolisis (*gk*, *pepck*) y a la lipogénesis (*acc*, *fas*) (Foretz y col., 1999). Adicionalmente la activación de AKT induce señales de sobrevida al regular negativamente las vías apoptóticas a través de la modulación de proteínas como Bad, FoxO y GSK-3 (Aikawa y col., 2000). De esta forma, una posible respuesta a la inducción de genes lipogénicos podría radicar en la activación de la vía AKT inducida por el Cu.

### **Cu como regulador transcripcional de genes colesterogénicos**

Los genes *fasn*, *hmgcr* y *ldlr* sufrieron cambios de expresión diferencial entre las líneas mononucleares y hepática. Estos cambios fueron de más de dos veces de cambio respecto al control; al alza en células mononucleares y a la baja en células hepatocitos, donde el inductor común es el Cu.

La pregunta por el mecanismo subyacente en esta relación Cu-colesterol, podría explicarse por la respuesta al estrés oxidativo provocado por el metal. Sin embargo, esto no explica por completo la respuesta diferencial entre las líneas celulares mononucleares y hepatocitos. Otro elemento a considerar es que el contexto génico-regulatorio de cada tipo celular daría cuenta de este efecto diferencial. Sin embargo, el análisis se podría reducir a los estímulos que influyen en la transcripción de estos genes. Es así como todos estos genes que codifican para proteínas vinculadas al metabolismo de colesterol, a través de su biosíntesis (HMGCS1, HMGCR y FDFT1) o captación exógena (LDLR), además de un representante de la síntesis de ácido grasos (FASN) poseen los dominios clásicos de unión a SREBPs (Amemiya-Kudo y col., 2002). Estos genes pueden dividirse según su trans-activador, donde SREBP-2 promueve la transcripción en el promotor de los genes vinculados al colesterol, en tanto que SREBP1c induce a FASN. Estos elementos regulatorios descritos en la literatura (Sato y col, 1996), están acompañados por dominios de unión a Sp1 y NF-Y como se esquematiza en la figura 17.



**Figura 17: Elementos regulatorios en cis para genes lipogénicos**

El esquema modificado desde Amemiya-Kudo y col. 2002; representa los elementos regulatorios en cis identificados y caracterizados en los promotores de los genes vinculados a la lipogénesis. Se identifican las secuencias de unión a Sp1, NF.Y, E-box, ChoRE y enmarcados rojos los elementos reguladores esteroidales (SRE).

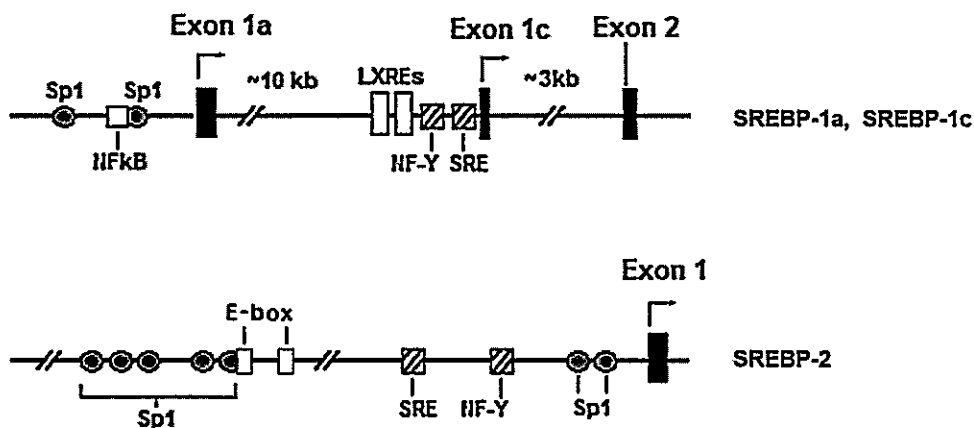
Las SREBPs darían cuenta de la regulación transcripcional que ejerce el Cu. En particular en este trabajo se pretendía estudiar el efecto del Cu sobre los genes vinculados a la biosíntesis de colesterol, donde el gen *fasn* sirve como un punto de comparación debido a que posee un trans-activador como SREBP1c, que pertenece a la familia de reguladores maestros en la lipogénesis, pero que activa a un grupo de genes distintos a los de colesterol, principalmente vinculados a la insulina por intermedio de la activación de la vía PI3K/AKT (Eberle y col., 2004).

Al sobreexpresar SREBP-1a, 1c y 2 en ratas transgénicas, se observaron regulaciones transcripcionales específicas para genes asociados al metabolismo colesterol por parte de SREBP-2 y de la biosíntesis de ácidos grasos y glicolisis por parte de SREBP1c. Para ratas que sobreexpresan SREBP1a se observó un aumento en los niveles de transcritos de genes asociados a los tres procesos anteriores (Amemiya-Kudo y col., 2002). Estos tres factores son sintetizados como proteínas de membrana del retículo endoplasmático y sufren el mismo proceso

proteolítico en la red trans-Golgi para posteriormente ingresar al núcleo vía la importina  $\beta$  (Nagoshi y col., 1999) y así activar a sus genes blanco. Así, la cantidad relativa de mRNA de las isoformas de 1a y 1c de SREBP1 varía entre tejidos, y esta diferencia tejido específica podría dar cuenta de la respuesta transcripcional diferencial entre nuestras líneas. Así la razón 1a:1c en cultivos primarios de hígado humano es de 1:5.8, similar a la razón de hígado de rata 1:8.8, sin embargo en HepG2 la razón es 1:0.5 manifestando una diferencia entre el modelo celular y el tejido mismo (Shimano y col., 1997). La isoforma 1c es predominante en la mayoría de los tejidos (adiposo, adrenal, músculo, entre otros), mostrando así una mayor regulación de la síntesis de ácidos grasos que de colesterol en hígado. Respecto a la razón (1a:1c) en células mononucleares, no se reportan datos en la literatura. De esta forma, una expresión diferencial de estas isoformas podría dar cuenta de los resultados obtenidos aquí, sin embargo sería necesario cuantificar la expresión relativa de SREBP2 en nuestras líneas celulares.

Adicionalmente a la especificidad y abundancia relativa de cada SREBP en cada tejido, se hace necesario preguntar por su regulación transcripcional. En el promotor de la isoforma de SREBP1a, se describen secuencias de unión a SP1, y NF $\kappa$ B (Zhang y col., 2005), mientras que el promotor para SREBP1c ubicado entre los exones 1a y 1c del gen *sreb1* posee sitios de unión a LXR, NF-Y y al propio SREBP (Chen y col., 2004). Lo anterior se esquematiza en la figura 18.





**Figura 18 : Elementos regulatorios en cis para los SREBPs**

El esquema modificado desde Chen y col, 2004; muestra las secuencias caracterizadas para la isoforma SREBP-1a (Zhang y col, 2005) y SREBP-1c (Chen y col, 2004) y SREBP-2 (Sato y col, 1996), donde se observan las secuencias de unión a diversos factores de transcripción como Sp1, NF- $\kappa$ B, E-box, LXR y SREBPs.

Los sitios de unión a LXR (LXREs) permanecen reprimidos por el factor de transcripción FoxO1 inactivando la expresión de SREBP1c. La exclusión nuclear de FoxO1 mediada por AKT induce la expresión de SREBP1c y la activación transcripcional de *fasn*. Nuestros resultados demuestran que *fasn* aumentó en las líneas mononucleares, pero no en la línea hepática. Este aumento podría ocurrir a través de la activación de la vía PI3K/AKT, aumentando así la expresión y acelerando la maduración de SREBP1c, y como consecuencia la activación transcripcional del gen *fasn*. Este mecanismo de relocalización de FoxO1 inducido por Cu a través de la fosforilación de AKT se ha reportado en células HepG2 (Ostrakwovitch y col., 2001), sin embargo nuestros datos muestran esta respuesta en las líneas Jurkat y THP-1 y una baja en HepG2 respecto al control. Para justificar nuestros cambios de expresión para el gen *fasn* en las células mononucleares, se debería demostrar la activación de la vía PI3K/AKT mediada por Cu como estímulo inductor de estrés oxidativo. Aparte el aumento en la expresión de *fasn* en células mononucleares ocurre principalmente a las 6 h, caracterizado como una inducción

temprana, aludiendo a la posible activación transitoria de la vía PI3K/AKT. Por otra parte, la respuesta transcripcional de *fasn* observada en hepatocitos debería ser la misma que para las células mononucleares, ya que la vía PI3K/AKT estaría siendo activada. Se ha reportado una vinculación entre la activación de AKT en la línea celular humana del epitelio pigmentario retinal y la expresión de enzimas vinculadas al metabolismo del colesterol y ácidos grasos vía SREBPs (Porstmann y col., 2005). Las concentraciones de Cu utilizadas por Barthel en los estudios de inducción de AKT en HepG2 eran similares a los nuestros, siendo 100  $\mu$ M la concentración máxima utilizada, sin embargo el tipo de Cu suministrado (sales de Cu;  $\text{CuCl}_2$  y  $\text{CuSO}_4$  versus Cu:His), los tiempos de cultivo previo a la siembra (5 días versus 1 día) y el tiempo de exposición (2 h versus 6 a 24 h) fueron distintos (Barthel y col., 2007).

Por otra parte, la kinasa AMPK participa como sensor celular del nivel energético, siendo activada por un aumento de la razón AMP/ATP (Schimmack y col., 2005). Así la célula se adapta a la condición de déficit energético, inhibiendo los procesos de síntesis de macromoléculas energéticamente costosa como el colesterol y los ácidos grasos. Esto ocurre a través de la fosforilación mediada por AMPK y posterior inactivación de las enzimas claves en estos procesos como la acetil-CoA carboxilasa (ácidos grasos) y la HMGCoA reductasa (colesterol).

La inducción de estrés oxidativo a través del Cu suministrado, generaría una disminución del ATP y por lo tanto activaría la AMPK. Esto produciría la regulación de *fasn* a nivel transcripcional, en apoyo a esta sugerencia, hepatocitos de ratas la inhibición de la expresión del mRNA de *fasn* inducido por glucosa a través de la activación de AMPK inducida por 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl (AICAR) (Foretz y col., 1998).

La activación de vías PI3K/AKT y MAPKs inducen proliferación y supervivencia, activando genes vinculados a la lipogénesis, donde el gasto energético derivado de

la síntesis de estas macromoléculas requiere de una fuente de energía (Menendez & Lupu, 2007). Así la vía de señalización de la insulina induce señales anti-apoptóticas, lipogénesis y la translocación de los transportadores GLUT4 desde las vesículas intracelulares, asegurando la incorporación y posterior degradación de la glucosa (Imamura y col., 2003). Por otra parte, el gasto energético requerido por condiciones de estrés oxidativo generaría una disminución del ATP, aumentando así la razón AMP/ATP, activando a AMPK e inhibiendo la lipogénesis y la expresión génica de las enzimas involucradas en este proceso. De esta forma, la respuesta de cada línea celular como los hepatocitos, linfocitos y monocitos depende de la integración de estas señales y como consecuencia el aumento o disminución de los genes lipogénicos.

La expresión de los genes vinculados al metabolismo del colesterol *ldlr* y *hmgcr*, muestran los mismos cambios respecto de *fasn*. Estos genes en su conjunto describen una respuesta transcripcional inducida por Cu para genes lipogénicos en las líneas Jurkat y THP-1 y lo contrario en HepG2. De esta forma se observó un aumento en todos los genes cuantificados con la excepción de *ldlr* y *fasn*, todos los genes aumentaron su expresión a ambos tiempos de exposición a Cu. En cambio, en células HepG2, la expresión de *ldlr* y *hmgcr* disminuyó por el tratamiento con Cu.

Como se mencionó con anterioridad, SREBP2 induce la expresión de genes vinculados al metabolismo del colesterol, sin embargo se ha demostrado la inducción de LDLR (Streicher y col., 1996). Además se ha reportado un aumento de LDLR a través de la activación de la vía PI3K/AKT a partir de la inducción tipo insulina producida por un flavonoide derivado de los pomáceos (naringenina) (Borradaile y col., 2003). A su vez, se reportó la generación de un efecto compensatorio en los niveles de mRNA basales de *srebp2*, en ausencia de las isoformas de SREBP1 en hígados de ratas (Shimano y col., 1997).

Las modificaciones post-traduccionales de los SREBPs se describen como una respuesta a la cantidad de esteroides intracelulares (Wang y col., 1994). De esta forma, la maduración y transcripción de genes colesterogénicos que participan en la vía biosintética del colesterol, están reguladas por su producto final. Sin embargo, estudios recientes muestran como además de inducir la exclusión nuclear de los factores FoxOs, la vía PI3K/AKT participa en la translocación del complejo SREBP/SCAP (Matsuda y col., 2001) desde la membrana del retículo hacia la red trans-golgi. Así, la señalización tipo insulina del Cu tendría un efecto doble induciendo la transcripción de reguladores transcripcionales claves en la lipogénesis e induciendo las modificaciones post-traduccionales inducidas por la fosforilación de AKT.

Esta respuesta diferencial de los genes *fasn*, *hmgcr* y *ldlr* podría explicarse por dos fenómenos que operarían en conjunto. Por una parte, las líneas mononucleares y la hepática podrían activar distintas vías de transducción de señales, generando una respuesta diferencial dependiente del tipo celular. Esta respuesta estaría básicamente condicionada a la capacidad de cada tipo celular de soportar, según sus recursos celulares, la agresión. De esta forma resulta evidente la mayor capacidad de un hepatocito de contrarrestar el efecto oxidativo del Cu debido entre otras cosas al poder reductor propiciado por la abundancia de glutatión. Por otra parte, la componente genética daría cuenta de este fenómeno, así genes de expresión tejido específica como *insig1* y *insig2a*, que tiene como función evitar el escape desde el retículo hacia la red trans-golgi de la proteína inmadura de SREBP. La isoforma *insig2a* se expresa en hepatocitos de ratas y disminuye su expresión bajo estímulos de insulina de esta forma ocurre el procesamiento y posterior translocación al núcleo de SREBP1c, activando así a sus genes diana de forma constitutiva (Yabe y col., 2003). La expresión tejido específico, también generaría diferencias en los trans-activadores, su abundancia y

la dependencia regulatoria del estímulo. Además es necesario considerar la abundancia de los mRNA de estos reguladores transcripcionales (SREBP-1a, 1c y 2) en hepatocitos y células mononucleares donde no se reportan datos hasta la fecha.

## CONCLUSION

Se acepta la hipótesis de que un aumento en el Cu extracelular biodisponible modifica el patrón de expresión de genes vinculados a la biosíntesis de colesterol. Al exponer a cobre modelos celulares de participación directa (hepatocitos) e indirecta (células mononucleares) en la homeostasis del metal, se observó un aumento en contenido interno de Cu y este se correlacionó con los cambios de expresión en los genes vinculados a la biosíntesis de colesterol y de ácidos grasos. Estos cambios en la abundancia relativa de los transcritos fueron mediados por la exposición a Cu a tiempos cortos, e independiente de la dosis de Cu. Finalmente existe una expresión diferencial de estos transcritos, es decir, baja expresión en células de hepatocitos y alta expresión en las células mononucleares bajo un mismo estímulo. Posiblemente suponiendo una componente génica respecto de la abundancia de ciertos factores de transcripción y del manejo a nivel celular de la sobrecarga de Cu y sus efectos. Así, estos resultados contribuyen a entender la relación entre un micronutriente esencial como el Cu y el metabolismo de colesterol, sugiriendo una regulación transcripcional que puede modificar la síntesis de colesterol en forma tejido específica indicando una novedosa forma de regulación metabólica.

## BIBLIOGRAFÍA

Aikawa, R., Nawano, M., Gu, Y., Katagiri, H., Asano, T. 2000. Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation*. **102** :2873–2879.

Allen, K.G.D. & Klevay, L.M.1978. Cholesterolemic and cardiovascular abnormalities in rats caused by copper deficiency. *Atherosclerosis* **29**: 81-93.

Altmann, S.W., Davis, H.R., Zhu, L.J. 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* **303**:1201-4.

Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Hasty, A.H., Yahagi, N., Yoshikawa, T. et al. 2002. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes, *J. Lipid Res.* **43**: 1220–1235.

Andrew, C., Li & Glass, C. K., 2004, PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis, *J. Lipid Res.* **46**: 2161-2173.

Andrews NC. 1999. The iron transporter DMT1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **31**:991-996.

Arredondo, M. Cambiazo, V. Tapia, L. Núñez M.T., Uauy R. & Gonzalez, M. 2004. Copper overload affects copper and iron metabolism in HepG2 cells, *Am. J. Physiol.* **287**:G27–G32.

Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C.V., Nuñez, M.T. 2003.DMT1, a physiologically relevant apical  $\text{Cu}^{1+}$  transporter of intestinal cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **284(6)**:C1525-30.

Aston, N., Watt, N., Morton, I., Tanner, M., Evans, G. 2000. Copper toxicity affects proliferation and viability of human hepatoma cells (HepG2 line). *Hum. & Exp. Toxicol.* **19**:367-376.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. y Struhl, K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*, Third ed. (eds.) John Wiley and Sons.

Auwerx, J. H., Chait, A. Wolfbauer, G. & Deeb S. S. 1989. Loss of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in differentiated cells of myelomonocytic origin. *Blood* **74**:1807–1810.

Azzout-Marniche, D., Bécard, D., Guichard, C., Foretz, M., Ferré, P., Foufelle, F. 2000. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem. J.* **1**:350-354.

- Banka, C. L., Black, A. S., Dyer, C. A., and Curtiss, L. K. 1991. THP-1 cells form foam cells in response to coculture with lipoproteins but not platelets. *J. Lipid Res.* **32**: 35–43.
- Barthel, A., Ostrakhovitch, E.A., Walter, P.L., Kampkotter, A., Klotz, L.O. 2007. Stimulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling by copper and zinc ions: mechanisms and consequences. *Arch. Biochem. Biophys.* **463**: 175–182.
- Beg, Z.H., Stonik, J.A., & Brewer, H.B. 1978. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: regulation of enzymatic activity by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** (8) 3678-3682.
- Bertinato, J., Zouzoulas, A. 2009. Considerations in the development of biomarkers of copper status. *J. A.O.A.C.* **92** (5): 1541-50.
- Borradaile, N. M., de Dreu, L. E. & Huff, M. W. 2003. Inhibition of net HepG2 cell apolipoprotein B secretion by the citrus flavonoid naringenin involves activation of phosphatidylinositol 3-kinase, independent of insulin receptor substrate-1 phosphorylation. *Diabetes* **52**: 2554 –2561.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Brady, G.F., Galban, S., Liu, X., Basrur, V., Gitlin, J.D, Elenitoba-Johnson, K.S., Wilson, T.E., Duckett, C.S. 2010. Regulation of the copper chaperone CCS by XIAP-mediated ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* **30**: 1923-1936.
- Bügel, S., Harper, A., Rock, E., O'Connor, J.M., Bonham, M.P., Strain, J.J. 2005. Effect of copper supplementation on indices of copper status and certain CVD risk markers in young healthy women. *Br. J. Nutr.* **94**:231–6.
- Cartwright, G.E., Wintrobe, M.M. 1964. Copper metabolism in normal subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **14**:224-232.
- Casareno, R.L.B., Waggoner, D., Gitlin, J.D. 1998. The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* **273**: 23 625-23 628.
- Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. 2004. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:11245–11250.
- Clayton, P.T.1998. Disorders of cholesterol biosynthesis. *Arch. Dis. Child.* **78**:185–189.
- Cousins, R.J., Leinart, A.S., 1988. Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin 1. *FASEB J.* **2**, 2884–2890.

Crutchley, D.J., Que, B.G. 1995. Copper-induced tissue factor expression in human monocytic THP-1 cells and its inhibition by antioxidants. *Circulation* **92**:238–243.

Culotta, V.C., Klomp, L.W., Strain, J., Casareno, R.L., Krems, B., Gitlin, J.D. 1997. The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Bio. Chem* **272**: 23469-23472.

Dalton, T.P., Li, Q., Bittel, D., Liang, L., Andrews, G.K. 1996. Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity. Occupancy in vivo of metal response elements in the metallothionein-I gene promoter. *J. Biol. Chem.* **271**:26233–41.

*De Cremoux P, Bieche I, Tran-Perennou C, Vignaud S, Boudou E, Asselain B, et al.* 2004. Inter-laboratory quality control for hormone-dependent gene expression in human breast tumors using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocr. Relat. Cáncer.* **11**:489-495

Dijkstra, M., Vonk, R.J., Kuipers, F. 1996. How does copper get into bile? new insights into the mechanism(s) of hepatobiliary copper transport. *J Hepatol.* **24**: 109-120.

Ebadi, M., Leuschen, M.P., El Refaey, H., Hamada, F.M., Rojas, P., 1996. The antioxidant properties of zinc and metallothionein. *Neurochem. Int.* **29**, 159–166.

Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., & Foufelle, F., 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, **86**(11), 839-848.

Erickson, S.K., Fielding, P.E. 1986. Parameters of cholesterol metabolism in the human hepatoma cell line, Hep-G2. *J. Lipid. Res.* **27**: 875-883.

Ferenci, P. 2006. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Hum. Genet.* **120**:151–9.

Ferns, G.A., Lamb, D.J., Taylor, A. 1997. The possible role of copper ions in Atherogenesis: the Blue Janus. *Atherosclerosis.* **133**(2):139-52.

Foretz, M., Carling, D., Guichard, C., Ferré, P. and Fofelle, F. 1998. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **273**: 14767–14771.

Foufelle, F. & Ferré, P. 2002. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J.* **366**: 377-391.

Freedman, J.H., Ciriolo, M.R. and Peisach, J. 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* **264**, 5598-5605.



Giedroc, D.P., Chen, X., & Apuy, J.L. 2001. Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation. *Antioxid. Redox Sign.* **3**:577-596.

Glerum, D.M., Shtanko, A., Tzagolo, A. 1996. Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* **271**:14504-14509.

Goldstein, J.L. & Brown, M.S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**: 425-430.

González, M., Reyes-Jara, A., Suazo, M., Jo, W.J. & Vulpe, C. 2008. Expression of copper-related genes in response to copper load. *Am.J.Clin.Nutr.* **88**:830S-834S.

González, M., Tapia, L., Alvarado, M., Tornero, J., Fernández, R. 1999. Intracellular determination of trace elements by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry in mammalian cultured cells. *J. Anal. At. Spectrom.* **14**:885-888.

Grummer, R.R., Carroll, D.J. 1988. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *J. Anim. Sci.* **66**(12):3160-73.

Gunshin, H., Mackenzie B., Berger, U.V. Gunshin, Y. Romero, M.F. Boron, W.F. Nussberger, S. Gollan, J.L. & Hediger M.A. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**: 482-488.

Hamza, I., Schaefer, M., Klomp, L.W., Gitlin, J.D. 1999. Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:13363-13368.

Harris, E. 2000. Cellular copper transport and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **20**: 291-310.

Harvey, L.J., McArdle, H.J. 2008. Biomarkers of copper status: a brief update. *Br. J. Nutr.*, **99** (Suppl. 3) (2008), pp. S10-13

Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**:1125-31.

Huffman, D., O'Halloran, T. 2001. Function, structure and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Ann. Rev. biochem.* **70**: 677-701.

Hung, I.H., Casareno, R.L., Labesse, G., Mathews, F.S., Gitlin, J.D. 1998. HAH1 is a copper-binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defense. *J Biol Chem* **273**:1749-1754.

Huster, D., Purnat, T.D., Burkhead, J.L., Ralle, M, Fiehn, O., Stuckert, F., Olson, N.E., Teupser, D., Lutsenko, S. 2007. High Copper Selectively Alters Lipid Metabolism and Cell Cycle Machinery in the Mouse Model of Wilson Disease. *J. Biol. Chem.* **282**:8343-8355

Imbra, R.J. & Karin, M. 1987. Metallothionein gene expression is regulated by serum factors and activators of protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* **7**:1358-1363.

Imamura, T., Huang, J., Usui, I., Satoh, H., Bever, J., & Olefsky, J. M., 2003. Insulin-induced GLUT4 translocation involves protein kinase C- $\lambda$ -mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein kinesin. *Molecular and cellular biology*, **23**(14), 4892-4900.

Inoue K, Takano H, Shimada A, Satoh M . 2009. Metallothionein as an Anti-Inflammatory Mediator . *Mediators Inflamm.* 2009:101659.

Jensen, L.T. & Culotta, V.C. 2005. Activation of Cu/Zn superoxide dismutases from *C. elegans* does not require the copper chaperone CCS, *J. Biol. Chem.* **280**:41373-41379.

Kim, B.E., Nevitt, T., Thiele, D.J. 2008. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat. Chem. Biol.* **4**:176-185.

Kita, K., Miura, N. Yoshida, M. Yamazaki, K. Ohkubo, T. Imai, Y. Naganuma, A. 2006. Potential effect on cellular response to cadmium of a single-nucleotide A  $\rightarrow$ G polymorphism in the promoter of the human gene for metallothionein IIA. *Hum. Genet.*, **120** pp. 553-560.

Klevay, L.M. 1983. Hypercholesterolemia in rats produced by an increase in the ratio of zinc to copper. *Am. J. Clin. Nutr.* **26**:1060-6.

Klevay, L.M., Inman, L., Johnson, L.K. 1984. Increased cholesterol in plasma in a young man during experimental copper depletion. *Metabolism* **33**:1112-8.

Lamb, D.J., Reeves, G.L., Taylor, A., and Ferns, G.A. 1999. Dietary copper supplementation reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis* **33**:33-43.

Lee, J., Peña, M.M.O., Nose, Y. and Thiele, D. J. 2002. Biochemical characterization of the Human Copper Transporter Ctr1. *J. Biol. Chem.* **277**: 4380-4387.

Linder, M., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R., Lomeli, N., 1998. Copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**:965S-971S.

Linder, M.C. 2001. Copper and genomic stability in mammals. *Mutat Res.* **475**(1-2): 141-52.

Liu, X., Qiao, A., Ke, Y., Kong, X., Liang, J., Wang, R., Ouyang, X., Zuo, J., Chang, Y., Fang, F. 2010. FoxO1 represses LXR $\alpha$ -mediated transcriptional activity of SREBP-1c promoter in HepG2 cells, *FEBS Letters* **584**: 4330-4334.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman. Section 11.6, Processing of rRNA and tRNA. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21729/>

Ludewig, B., Laman, J.D. 2004. The in and out of monocytes in atherosclerotic plaques: balancing inflammation through migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:11529-11530.

Lutsenko, S. 2010. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Curr Opin Chem Biol* **14**:1-7.

Lutsenko, S., Barnes, N.L., Bartee, M.Y., Dmitriev, O.Y. 2007. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Phys. Rev.* **87**:1011-1046.

Matsuda, M., Korn, B. S., Hammer, R. E., Moon, Y. A., Komuro, R., Horton, J. D., Shimomura, I., 2001. SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes & development*, **15**(10), 1206-1216.

McCord, J.M. & Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**: 6049 - 6055.

Menendez, J. A., & Lupu, R., 2007. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*, **7**(10), 763-777.

Miao, L., St Clair, D.K. 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic. Biol. Med.* **47**:344-356.

Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H., Rodilla, V., 2000. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 35-70.

Minc, E., de Coppet, P., Masson, P., Thiery, L., Dutertre, S., Amor-Gueret, M., Jaulin, C. 1999. The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J. Biol. Chem.* **274**:503-509.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**(1-2):55-63.

Muller, P., van Bakel, H., van de Sluis, B. 2007. Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **12**:495-507.

Muñoz, C., López, M., Olivares, M., Pizarro, F., Arredondo, M., Araya, M. 2005. Differential response of interleukin-2 production to chronic copper supplementation in healthy humans. *Eur. Cytokine Netw.* **16**:261-5.

Murphy, B.J., Andrews, G.K., Bittel, D., Discher, D.J., McCue, J., Green, C.J., Yanovsky, M., Giaccia, A., Sutherland, R.M., Laderoute, K.R., & Webster, K.A. 1999. Activation of Metallothionein Gene Expression by

Hypoxia Involves Metal Response Elements and Metal Transcription Factor-1. *Cancer Research* **59**, 1315–1322.

Nagoshi, E., Imamoto, N., Sato, R., Yoneda, Y. 1999. Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix/leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip, *Mol. Biol. Cell.* **10**:2221–2233.

Nelson DL, Cox MM. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th edition. New York: W. H. Freeman. Section 21.4 Biosynthesis of Cholesterol, Steroids, and Isoprenoids

Ohgami, R.S., Campagna, D.R., McDonald, A., Fleming, M.D. 2006. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* **108**: 1388–94.

Ostrakhovitch, E. A., Lordnejad, M. R., Schliess, F., Sies, H., Klotz, L.O. 2002. Copper ions strongly activate the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway independent of the generation of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**:232 – 239.

Palmiter, R.D. 1994. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **91**:1219–23.

Peña, M.M., Lee, J., Thiele, D.J. 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* **129**: 1251-160.

Petris, M. J., Smith, K., Lee, J. & Thiele, D. J. 2003. Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J. Biol. Chem.* **278**: 9639 –9646.

Porstmann, T., B. Griffiths, Y. L. Chung, O. Delpuech, J. R. Griffiths, J. Downward, and A. Schulze. 2005. PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* **24**:6465–6481.

Rae, T., Schmidt, P., Pufahl, R., Culotta, V., O'Halloran, T. 1999. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**: 805-808.

Robinson, N.J. & Winge, D.R. 2010. Copper metallochaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **79**: 537-562.

Rojo, A. I., Salinas, M., Martin, D., Perona, R., Cuadrado, A. 2004. Regulation of Cu/Zn superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J. Neurosci.*, 24 pp. 7324-7334.

Ruiz, F.H., Gonzalez, M., Bodini, M., Opazo, C. & Inestrosa, N.C. 1999. Cysteine 144 is a key residue in the copper reduction by the  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* **73**, 1288–1292.

- Samson, S.L., Gedamu, L., 1998. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **59**, 257–288.
- Sato, R., Inoue, J., Kawabe, Y., Kodama, T., Takano, T., & Maeda, M. (1996). Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(43), 26461–26464.
- Schimmack, G., DeFronzo, R.A., Musi, N. 2006. AMP-activated protein kinase: role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes Obes. Metab.* **8**:591–60.
- Sciavolino, P.J., Vilcek, J., 1995. Regulation of metallothionein gene expression by TNF-alpha and IFN-beta in human fibroblasts. *Cytokine* **7**, 242–250.
- Seth, R., Yang, S., Choi, S., Sabeen, M., Roberts, E.A. 2004. In vitro assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, HepG2, *Toxicol. In Vitro* **18**: 501–509.
- Shao, M.J.S., Lei, K.Y. 1980. Conversion of (<sup>2-14</sup>C)mevalonate into cholesterol, lanosterol and squalene in copper deficient rats. *J. Nutr.* **110**:859–67.
- Sharp, P.A. 2003. Ctr1 and its role in body copper homeostasis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 288–291.
- Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R.E., Herz, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Horton, J.D. 1997. Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J. Clin. Invest.* **100**: 2115–2124.
- Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S. 1997. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.* **99**: 838–84
- Song, I.S., Chen, H.H., Aiba, I., Hossain, A., Liang, Z.D., Klomp, L.W., Kuo, M.T. 2008. Transcription factor Sp1 plays an important role in the regulation of copper homeostasis in mammalian cells. *Mol. Pharmacol.* **74**:705–713.
- Song, M., Freedman, J. 2005. Expression of copper-responsive genes in HepG2 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **279**(1-2):141-147.
- Song, M.O., Li, J. & Freedman, J. H. 2009. Physiological and toxicological transcriptome changes in HepG2 cells exposed to copper. *Physiol. Genomics.* **38**:386–401.
- Streicher, R., Kotzka, J., Muller-Wieland, D., Siemeister, G., Munck M., and Krone W. 1996. SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein

receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I. *J. Biol. Chem.* **271**: 7128–7133.

Stuart, G.W., Searle, P.F., and Palmiter, R.D. 1985. Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature* **317**: 828–831.

Suazo, M., Olivares, F., Mendez, M.A. 2008. CCS and SOD1 mRNA are reduced after copper supplementation in peripheral mononuclear cells of individuals with high serum ceruloplasmin concentration. *J. Nutr. Biochem.* **19**:269–74.

Svensson, P.A., Englund, M.C., Markström, E., Ohlsson, B.G., Jernås, M., Billig, H., Torgerson, J.S., Wiklund, O., Carlsson, L.M., Carlsson, B. 2003. Copper induces the expression of cholesterologenic genes in human macrophages. *Atherosclerosis* **169**:71–76.

Tang, Z., Gasperkova, D., Xu, J., Baillie, R., Lee, J.H., Clarke, S.D. 2000. Copper deficiency induces hepatic fatty acid synthase gene transcription in rats by increasing the nuclear content of mature sterol regulatory element binding protein. *J. Nutr.* **130**:2915-21.

Tao, T.Y., Gitlin, J.D. 2003. Hepatic copper metabolism: Insights from genetic disease. *Hepatology* **37**(6); 1241–1247.

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

Tapia, L., Suazo, M., Hodar, C., Cambiazo, V., González, M. 2003. Copper exposure modifies the content and distribution of trace metals in mammalian cultured cells. *Biometals.* **16**(1):169-74.

Tapiero, H., Tew, K.D. 2003. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.* **57**:399–411.

Turnlund, J.R., Keyes, W.R., Peiffer, G.L., Scott, K.C. 1998. Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope <sup>65</sup>Cu. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**(6):1219-25.

Uauy, R., Olivares, M. and González, M. 1998. Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**: 952S–959.

Udvardi, M.K., Czechowski, T., Scheible, W.R. 2008. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* **20**: 1736–173.

Van den Berghe, P.V., Klomp, L.W. 2010. Posttranslational regulation of copper transporters. *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**:37–46.

Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S. and Gitschier, J. 1993. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nature Genet.* **3**: 7-13.

Wang, X., Sato, R., Brown, M. S., Hua, X., & Goldstein, J. L. 1994. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*, **77**(1), 53-62.

Westin, G. & Schaffner, W. 1988. A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *EMBO J.* **7**: 3763-3770.

Yabe, D., Komuro, R., Liang, G., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. 2003. Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(6), 3155-3160.

Yoo, H. Y., Chang, M. S., Rho, H. M. 1999. Heavy metal-mediated activation of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene via a metal-responsive element. *Mol. Gen. Genet.* **262**:310-313.

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

Zhang, C.Z., Shin, D.J., Osborne, T.F. 2005. A simple promoter containing two Sp1 sites controls expression of sterol regulatory element binding protein-1a (SREBP-1a). *Biochem. J.* **386**: 1-8

Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, **33**(3), 337-349.

**ANEXO**



## Physiological copper exposure in Jurkat cells induces changes in the expression of genes encoding cholesterol biosynthesis proteins

Ricardo Gutiérrez-García · Talía del Pozo ·  
Miriam Suazo · Verónica Cambiazo ·  
Mauricio González

Received: 14 June 2013 / Accepted: 17 October 2013 / Published online: 30 October 2013  
© Springer Science+Business Media New York 2013

**Abstract** Copper is an essential micronutrient that functions as an enzymatic cofactor in a wide range of cellular processes. Although adequate Cu levels are essential for normal metabolism, excess Cu can be toxic to cells. Cellular responses to copper deficiency and overload involve changes in the expression of genes directly and indirectly involved in copper metabolism. However little is known on the effect of physiological copper concentration on gene expression changes. In the current study we aimed to establish whether the expression of genes encoding enzymes related to cholesterol (*hmgcs1*, *hmgcr*, *fdft*) and fatty acid biosynthesis and LDL receptor can be induced by an iso-physiological copper concentration. The iso-physiological copper concentration was determined as the bioavailable plasmatic copper in a healthy adult population. In doing so, two blood cell

lines (Jurkat and THP-1) were exposed for 6 or 24 h to iso- or supraphysiological copper concentrations. Our results indicated that in cells exposed to an iso-physiological copper concentration the early induction of genes involved in lipid metabolism was not mediated by copper itself but by the modification of the cellular redox status. Thus our results contributed to understand the involvement of copper in the regulation of cholesterol metabolism under physiological conditions.

**Keywords** Gene expression · Copper · Cholesterol · ROS · Jurkat · THP-1

### Introduction

Copper is an essential micronutrient in humans (Uauy et al. 1998). Its ability to accept and donate electrons

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10534-013-9680-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Gutiérrez-García · T. del Pozo · M. Suazo ·  
V. Cambiazo · M. González (✉)  
Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica,  
INTA, Universidad de Chile, El Líbano 5524, Macul,  
Santiago, Chile  
e-mail: mgonzale@inta.uchile.cl

R. Gutiérrez-García · T. del Pozo · V. Cambiazo ·  
M. González  
Fondap-Center of Genome Regulation, Universidad de  
Chile, Santiago, Chile

M. Suazo  
Escuela de Nutrición, Universidad San Sebastián,  
Valdivia, Chile

M. González  
Laboratorio de Bioinformática y Matemática del Genoma,  
Centro de Modelamiento Matemático (UMI 2807,  
CNRS), Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas,  
Universidad de Chile, Santiago, Chile

gives copper the characteristic of being a very efficient cofactor for redox enzymes. Copper-dependent enzymes participate in diverse physiological processes, such as electron transport by cytochrome *c* oxidase in the oxidative phosphorylation, protection against free radicals such as superoxide ion through the Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), stabilization of extracellular matrix by cross-linking collagen and elastin through protein-lysine 6-oxidase or iron homeostasis through ferroxidase activity of ceruloplasmin, among others (Lee et al. 2001). However, excess copper potentially produces reactive oxygen species (ROS), via Fenton-like reaction, which may promote oxidative damage of many biological targets including, lipoproteins, DNA, or thiol-containing enzymes (Luza and Speisky 1996). To prevent the consequences of copper deficiency or overload, mammalian have evolved molecular mechanisms that regulate its uptake, intracellular traffic, storage, and efflux. Cellular responses to variations in copper levels included post-translational modifications (Gupta and Lutsenko 2009) and/or changes in the gene expression patterns of the molecular components involved in copper metabolism (Cousins 1994). Regarding transcriptional mechanism, several studies in different biological models showed that transcriptional changes in response to varying copper levels include both genes directly involved in copper homeostasis (Armendariz et al. 2004; Gonzalez et al. 2008; Kelly and Palmiter 1996; Sadhu and Gedamu 1989) and genes involved in different cellular process not directly connected to copper metabolism that, however change their expression during the cellular adaptation to copper availability (Gonzalez et al. 2008; Muller et al. 2007). In this context, an interesting link between copper homeostasis and lipid metabolism has been reported in the literature (Lei 1991). For instance, in rats, copper deficiency stimulates hepatic lipogenic gene expression by increasing the hepatic translocation of mature SREBP-1 (Tang et al. 2000). Moreover, in livers of murine models of Wilson's disease, the high concentration of intracellular copper correlates with a decreased expression of genes associated with cholesterol biosynthesis and with low cholesterol concentration (Huster et al. 2007). However, the signaling pathways underlying the transcriptional regulation of cholesterol related genes by copper exposure is not known. On one hand, copper may affect intracellular redox status, which has been

connected with regulatory transcriptional pathways (McElwee et al. 2009; Wang et al. 2010), on the other copper may modulated metal transcription factors response by itself (Heuchel et al. 1994; Lichtlen and Schaffner 2001; Saydam et al. 2002). Alternatively, changes of cellular copper content may alter metal-binding sites, via amine, thiolate, carboxyl, and other ligands presents in proteins, including transcription factors, following via the Irving-Williams order (Cousins 1994). In this scenario, our aim was to examine whether changes in the expression of genes encoding enzymes related to cholesterol (*hmgcs1*, *hmgcr*, *fdft*) and fatty acid (*fasn*) biosynthesis and LDL receptor (*ldlr*) can be induced by changes in the internal content of the metal or by a modification of the cellular redox status. In doing so, we use two blood cell lines (Jurkat and THP-1) (Palmer et al. 2006) maintained during 6 or 24 h at iso- or supra- physiological copper concentration (2 or 20  $\mu\text{M}$  Cu-His, respectively). Our results provide experimental evidence that in an iso-physiological extracellular copper concentration the activation of cholesterol related genes correlated with a significant increment of ROS while the intracellular copper concentration was still lower than the concentration needed to induce metallothionein gene expression.

## Materials and methods

### Cell line and reagents

The human leukemia T cell line: Jurkat Clone E6-1 (ATCC<sup>®</sup> Number: TIB-152TM) and human leukemia monocyte: THP-1 (ATCC<sup>®</sup> Number: TIB-202TM) were acquired from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10 % fetal bovine serum, 100 U/ml of penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of streptomycin at 37 °C and 5 %  $\text{CO}_2$ . These cells were cultured at a density of  $7.5 \times 10^5$  cells/well ( $8 \times 10^4$  cell/ $\text{cm}^2$ ) in 6-well plates for 6 and 24 h to the 70-80 % confluence.

### Cu-His treatments

Copper was supplemented to the culture medium, as Cu-His complex (1:10 ratio) (Tapia et al. 2003), to



reach iso- or supra-physiological concentration (2 or 20  $\mu\text{M}$ ) for 6 or 24 h (Linder and Hazegh-Azam 1996; Suazo et al. 2008). For copper depletion, cells were incubated 48 h previous to copper treatment in medium supplemented with 200  $\mu\text{M}$  of bathocuproine disulfonic acid (BCS), and then washed three times with PBS-EDTA. Relative survival of cells was evaluated by using MTT (trypan blue and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay as described previously (Tapia et al. 2003). The viability was above 85 % in all treatments with Cu-His. All analyses were performed in triplicate samples.

#### Intracellular copper content

For copper content quantification, cells were processed as described in (Tapia et al. 2003). Briefly, cells were digested in nitric acid (JT Baker, Phyllisburg, NJ, USA) in a vortex and diluted with distilled deionized water. Then samples were incubated at 60 °C overnight. The copper concentration was determined by means of a graphite furnace atomic adsorption spectrophotometer (AAS, Perkin Elmer; SIMMA 6100, Shelton, CT, USA). Calibration was against a standard curve prepared using dilutions of a copper standard (J. T. Baker, Phyllisburg, NJ, USA), and the sample values were normalized to the total protein content.

#### ROS determination

Intracellular ROS was determined using 2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) as described (Steinbrenner et al. 2005). Cells were exposed to Cu-His (2 and 20  $\mu\text{M}$ ) for the indicated times (6 and 24 h) and then stained with  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (10  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at 37 °C and 5 %  $\text{CO}_2$  in the dark. After that, cells washed twice with PBS and measured fluorescence (excitation: 485 nm, emission: 545 nm). The mean data was normalized to the total protein content.

#### RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA extraction from cells was carried out using Tri-reagent (Ambion, Austin, TX, USA), following manufacturer recommendations. RNA quantity was

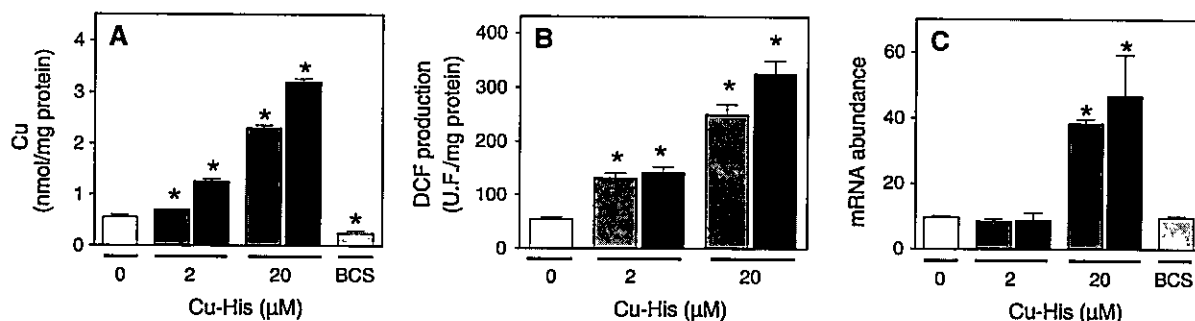
determined through an MBA 2000 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) at 260 nm and RNA purity was ascertained from optical density ratio at 260/280 nm. The total RNA extraction was treated with DNase (DNase I) (Ambion, Austin, TX, USA) and the integrity was checked by denaturant gel. 1.5  $\mu\text{g}$  of RNA was used to synthesize single-strand cDNA with reverse transcriptase (M-MLV) (Promega, Madison, WI, USA), plus RNase inhibitor (RNasin) (Promega, Madison, WI, USA) according to manufacturer recommendations.

#### Real-time RT-PCR

Reactions were carried out in a LightCycler System 1.5 (Roche Diagnostics, GmbH, Rotkreuz, Switzerland) using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Applied Biosystems, CA, USA). Primers were designed using Perlprimer software (Marshall 2004) and are described in Table 1S (see supplementary material). Reaction mixes were performed in a volume of 15  $\mu\text{l}$  containing 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 pmol of each primer and 12 ng of cDNA (1:15 dilution). Efficiency was determined for each sample and gene by Lin-RegPCR v7.5 using data obtained from exponential phase of each individual amplification plot (Ramakers et al. 2003). Human RPLP0 (de Cremoux et al. 2004) was used as gene reference to normalize the expression levels between the samples (Dheda et al. 2004). The following standard thermal profile was used: 2 min at 50 °C, 2 min at 95 °C, 40 repetitions of 5 s at 95 °C and 15 s at 60 °C, and a final stage of 15 s at 72 °C. mRNA abundance data for each gene are expressed as fold change according Pfaff method (Pfaffl 2001).

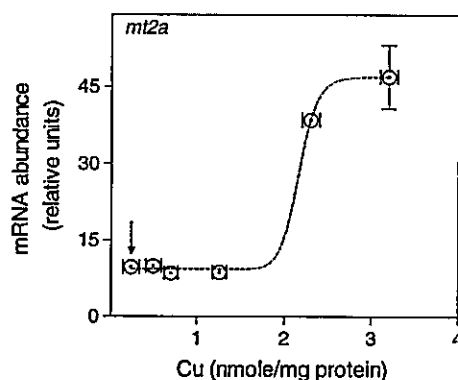
#### Statistical and data analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 4 software (GraphPad, San Diego, CA). Differences between multiple groups were assessed by ANOVA using Tukey's post-test. A mix model two ways ANOVA was used in Fig. 1. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . The data of Fig. 2 was fitted to four parameters logistic (4PL) equation using non-linear regression analysis.



**Fig. 1** Copper and ROS contents in Jurkat cells. **a** Intracellular copper content was measured by AAS in Jurkat cells supplemented with 2 and 20  $\mu\text{M}$  of Cu-His for 6 (gray bars) and 24 h (black bars) and 24 h without supplementation as a control (white bars). Cells treated with BCS (200  $\mu\text{M}$ ) for 48 h (light gray bars). **b** ROS production was measured by fluorescent detection of DCF (excitation: 485 nm, emission: 545 nm) in

cells treated as described in (a) and values are expressed as mean  $\pm$  SEM from  $n = 6$ . **c** *mt2a* transcript abundance was quantified by real time RT-PCR and normalized with the values of the housekeeping gene (*rplp0*) in cells treated as was described in (a). Values for (a, b and c) are expressed as mean  $\pm$  SEM from  $n = 5$ . Asterisks indicate significant difference ( $*p < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc test)



**Fig. 2** Correlation between intracellular copper content and *mt2a* transcript levels when cells were exposure to graded concentrations of the metal (data from Fig. 1a, b). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). The data were fitted to a logistic function with  $r^2: 0.91$ . Arrow indicate data from BCS treatment

## Results

### Copper and ROS contents in Jurkat cells exposed to iso- and supra-physiological copper concentrations

First, we evaluated the effect of copper supply on the uptake of copper in the Jurkat cell model. For this, cells were exposed to copper in the form of Cu-His complex (1:10) to improve the uptake of metal because this form is more similar to the copper that is available in the plasma (Deschamps et al. 2004; Kreuder et al. 1993). Cells were supplemented with Cu-His (2  $\mu\text{M}$ ) during 6 and 24 h. This copper

concentration is within the iso-physiological range of bioavailable copper (Suazo et al. 2008), as calculated from plasmatic levels of non-ceruloplasmin copper data obtained from healthy adults that represented the 5 % highest and lowest extremes in the distribution curve of serum ceruloplasmin concentrations of 800 individuals (Suazo et al. 2008). Therefore, a supplement of 20  $\mu\text{M}$  of Cu-His was used as a supra-physiological copper exposure (Linder & Hazegh-Azam 1996). In addition, BCS a specific copper chelator, was used to evaluate the effect of the copper depletion. In the control condition, the unsupplemented medium contained 0.4  $\mu\text{M}$  of copper according to Tapia et al. 2004. The results showed that both copper exposure and BCS treatment modified the intracellular concentration of the metal (Fig. 1a). The variations in copper contents were both dose (2–20  $\mu\text{M}$  of Cu-His) and time-dependent (6–24 h) and a two way ANOVA mixed model (dose  $\times$  time) revealed the interaction of both variables. However, 90 % of the variation was dependent on the dose, with a maximum of 3.2 nmol Cu/mg protein after 24 h of exposure to 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 1a). Given that, increase of intracellular copper can lead to ROS (Gaetke and Chow 2003; Kehrer 2000), we analyzed whether intracellular ROS level was affected in Jurkat cells exposed to copper (Fig. 1b). ROS increased significantly after 6 and 24 h in the cells exposed to iso-physiological copper concentration, however more ROS was accumulated in the cells treated with 20  $\mu\text{M}$  of Cu-His compared with 2  $\mu\text{M}$  Cu-His treatment (Fig. 1b).

### Induction of metallothionein gene expression in Jurkat cells is controlled by the level of intracellular copper

We evaluated the transcriptional response *mt2a* gene under the same conditions of copper exposure described above. This gene that encodes the metallothionein 2A protein has been reported to be responsive to copper in a wide range of conditions (Pauwels et al. 1994; Sadhu and Gedamu 1989; Tapia et al. 2004; Thiele 1992). A significant increase in *mt2a* transcript abundance was detected after 6 and 24 h of exposure to 20  $\mu\text{M}$  of Cu–His (Fig. 1c). To analyze the correlation between mRNA abundance of *mt2a* and intracellular copper content, we re-assessed the expression data with respect to the intracellular copper content in the Jurkat cells exposed to different copper concentrations for 6 and 24 h, as presented in Fig. 2. The results indicated a positive correlation between the internal contents of copper and the mRNA abundance of *mt2a*, which fits with a logistic regression model (see “Materials and methods” section). Thus below 2 nmol Cu/mg protein, a basal expression level of *mt2a* was measured, however when the content exceeded this level, *mt2a* abundance increased more than five times (Fig. 2).

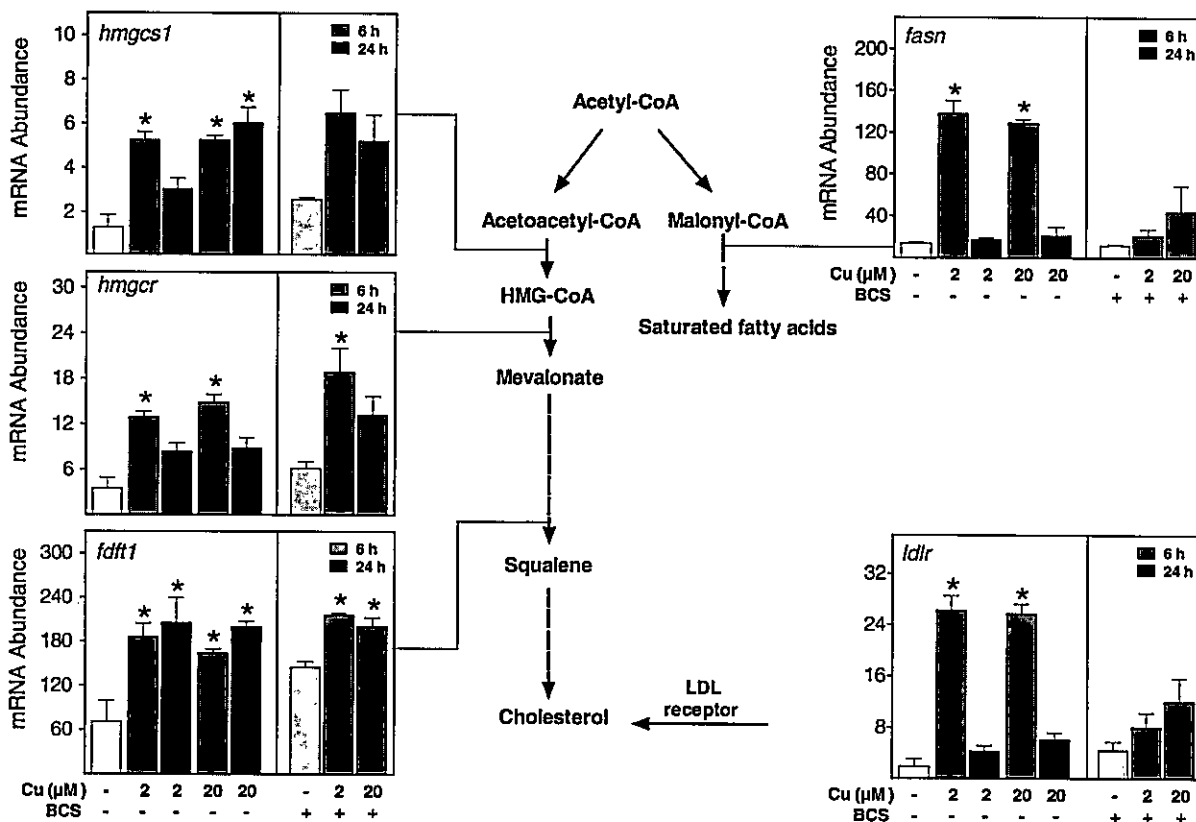
### Physiological copper concentration induces the expression of cholesterol and fatty acid genes

To assess whether iso- or supra-physiological extracellular copper were able to induce the expression of cholesterol genes we measured transcript abundance of key genes associated with lipid metabolism, such as *hmgcs1*, *hmgcr* and *fdft1* genes that encode enzymes involved in the biosynthesis cholesterol from acetyl-CoA. In addition we quantified the mRNA abundance of *ldlr*, an important receptor in the incorporation of exogenous cholesterol and that of *fasn*, a key enzyme in the biosynthesis of fatty acids from malonyl-CoA (Fig. 3). All these genes showed a significantly increment in their abundance after 6 h of exposure to 2 and 20  $\mu\text{M}$  copper, similar results were observed for *hmgcs1*, *fasn* and *ldlr* when the monocyte line cell THP-1 was used (see Fig. 1S). For *fdft1* increase in transcript abundance was still observed after 24 h of exposure to 2 and 20  $\mu\text{M}$  of extracellular Cu–His, whereas in the case of *hmgcs1* increased levels of transcripts were detected only after 24 h of exposure

to 20  $\mu\text{M}$  of Cu–His (Fig. 3). The other three transcripts (*hmgcr*, *ldlr* and *fasn*) showed a transient increment in abundance reaching a maximum at 6 h of Cu–His exposure (2 and 20  $\mu\text{M}$ ) and decreasing after that to the level measured in cells non-exposed to copper (white bar, Fig. 3). Similar temporal gene expression pattern was observed in THP-1 cells for *hmgcs1*, *ldlr* and *fasn* (Fig. 1S). However the BCS abolished the early transcriptional response of *ldlr* and *fasn* at iso and supra-physiological copper concentration (right panel, Fig. 3), suggesting that this response is sensitive to decrease a basal intracellular copper content. These results obtained with peripheral blood mononuclear cell lines indicated that transcripts level of genes that encoded protein involved in cholesterol and fatty acid metabolism were modified early (6 h) in response to an iso-physiological copper exposure.

### Discussion

In this paper, we evaluated the transcriptional consequences of intracellular copper increment and/or ROS accumulation in peripheral blood mononuclear cell lines exposed to iso- and supra-physiological extracellular copper. We aimed to assess whether the expression of genes that are not directly associated with copper metabolism (cholesterol and fatty acid genes) was affected in this range of copper exposure. As a first step, we defined cell culture conditions that increase intracellular copper content and expression of *mt2a* gene. Our results indicated that in Jurkat cells, the *mt2a* was only induced when intracellular copper reached a threshold level of 2 nmol Cu/mg protein after either 6 or 24 h of exposure to supra-physiological concentration of extracellular copper. These results are in agreement with the metallothionein gene expression is controlled by the level of intracellular copper (Huster et al. 2007; Sadhu and Gedamu 1989; Tapia et al. 2004). In contrast, the expression of genes involved in lipid metabolism, was induced by iso-physiological concentration of extracellular copper and, thus the intracellular copper concentration was below the experimental threshold level calculated for *mt2a* induction. These results suggest that lipid metabolism genes were induced by a mechanism that probably depend on copper exposure but it did not require a significant increment of intracellular copper.



**Fig. 3** Relative transcript abundance of lipid metabolism genes in cells exposed to copper. The diagram key genes in cholesterol biosynthesis (*hmgcs1*, *hmgcr* and *fdft1*) of fatty acids (*fasn*) and uptake of cholesterol (*ldlr*). Jurkat cells were supplemented with 0, 2 and 20 μM of Cu-His for 6 h (gray bars) and 24 h (black bars) of exposure to the metal. Relative transcript levels were analyzed by real time RT-PCR (left panel). Cells treatment with

200 μM of BCS (light gray bars) for 48 h and 2 and 20 μM of Cu-His for 6 h (gray bars, right panel). Data shown are transcript abundance relative to gene reference (*pripl0*). Values are expressed as mean ± SEM in triplicate and asterisks indicate significant difference (\* $p < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc test)

Interestingly, it has been shown that null or marginal increments of intracellular copper may affect the redox status of cells (Gaetke and Chow 2003; Kehrer 2000), which in turn can induce transcriptional changes in a range of minutes to hours (Sekiya et al. 2008, 2004; Svensson et al. 2003). In support of this possibility, a previous work has showed that human macrophages maintained for 6 h in a medium supplemented with a low concentration of copper (0.4 μM of CuSO<sub>4</sub>) increased the expression of *ldlr* and *hmgcr* (Svensson et al. 2003). Considering that the level of non-Cp copper observed in healthy adults, with low level of ceruloplasmin, is  $1.1 \pm 0.5$  μmol/L (Suazo et al. 2008), supplements of 0.4 μM of CuSO<sub>4</sub> may be considered as an iso-physiological plasmatic copper concentration. Moreover, transcriptional changes of genes encoding proteins involved in fatty acid

metabolism have been induced in cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sekiya et al. 2008), suggesting that a small increment of intracellular copper may induce expression of genes associated with lipid metabolism through a copper dependent change of cellular redox status. In this work, we showed a direct correlation between extracellular level of copper and ROS accumulation in Jurkat cells, suggesting that the early induction of the lipid genes in cells exposed to an iso-physiological copper concentration may be mediated by the early accumulation of ROS.

In this context we propose a two-step signaling pathway activated by an iso-physiological plasmatic copper level: 1) a slight increment of intracellular copper modifies the redox status of cells, and 2) changes of redox status may promote the activity of transcription factors, for example SREBP-1a, -1c

and -2 belonging transcription factor SREBPs family (Amemiya-Kudo et al. 2002; Burkhead et al. 2011). However, the strongest up-regulation of *ldlr* and *fasn* after 6 h of exposure to 2  $\mu$ M copper seemed to depend on a basal intracellular copper content, which was necessary to elicit gene activation under iso-physiological conditions. Even though further investigation is required to elucidate the molecular bases of the signaling pathway activated by iso-physiological copper level, our results suggest that variations in copper bioavailable even in a physiological range, might be affect cellular processes linked to lipid metabolism, among them cell–cell interaction, cell signaling through lipid rafts or just *de novo* cholesterol biosynthesis. However, further investigation is required to elucidate the molecular bases of the signaling pathway activated by iso-physiological copper level.

**Acknowledgments** Funding sources: This research was supported by grants from FONDECYT 3120098, 11070255, 1110427 and 1120254 and FONDAP 15090007.

## References

- Amemiya-Kudo M, Shimano H, Hasty AH, Yahagi N, Yoshikawa T, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N (2002) Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res* 43:1220–1235
- Armendariz AD, Gonzalez M, Loguinov AV, Vulpe CD (2004) Gene expression profiling in chronic copper overload reveals upregulation of Prnp and App. *Physiol Genomics* 20:45–54
- Burkhead JL, Ralle M, Wilmarth P, David L, Lutsenko S (2011) Elevated copper remodels hepatic RNA processing machinery in the mouse model of Wilson's disease. *J Mol Biol* 406:44–58
- Cousins RJ (1994) Metal elements and gene expression. *Annu Rev Nutr* 14:449–469
- de Cremoux P, Bieche I, Tran-Perennou C, Vignaud S, Boudou E, Asselain B, Lidereau R, Magdelenat H, Becette V, Sigal-Zafrani B, Spyrtos F (2004) Inter-laboratory quality control for hormone-dependent gene expression in human breast tumors using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocr Relat Cancer* 11:489–495
- Deschamps P, Kulkarni PP, Sarkar B (2004) X-ray structure of physiological copper(II)-bis(L-histidinato) complex. *Inorg Chem* 43:3338–3340
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 37:112–114, 116, 118–119
- Gaetke LM, Chow CK (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189:147–163
- Gonzalez M, Reyes-Jara A, Suazo M, Jo WJ, Vulpe C (2008) Expression of copper-related genes in response to copper load. *Am J Clin Nutr* 88:830S–834S
- Gupta A, Lutsenko S (2009) Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Future Med Chem* 1:1125–1142
- Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M, Schaffner W (1994) The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J* 13:2870–2875
- Huster D, Purnat TD, Burkhead JL, Ralle M, Fiehn O, Stuckert F, Olson NE, Teupser D, Lutsenko S (2007) High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson disease. *J Biol Chem* 282:8343–8355
- Kehrer JP (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149:43–50
- Kelly EJ, Palmiter RD (1996) A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nat Genet* 13:219–222
- Kreuder J, Otten A, Fuder H, Tumer Z, Tonnesen T, Horn N, Dralle D (1993) Clinical and biochemical consequences of copper-histidine therapy in Menkes disease. *Eur J Pediatr* 152:828–832
- Lee J, Prohaska JR, Thiele DJ (2001) Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6842–6847
- Lei KY (1991) Dietary copper: cholesterol and lipoprotein metabolism. *Annu Rev Nutr* 11:265–283
- Lichtlen P, Schaffner W (2001) The “metal transcription factor” MTF-1: biological facts and medical implications. *Swiss Med Wkly* 131:647–652
- Linder MC, Hazegh-Azam M (1996) Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 63:S797–S811
- Luza SC, Speisky HC (1996) Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. *Am J Clin Nutr* 63:812S–820S
- Marshall OJ (2004) PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20:2471–2472
- McElwee MK, Song MO, Freedman JH (2009) Copper activation of NF-kappaB signaling in HepG2 cells. *J Mol Biol* 393:1013–1021
- Muller P, van Bakel H, van de Sluis B, Holstege F, Wijmenga C, Klomp LW (2007) Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes. *J Biol Inorg Chem* 12:495–507
- Palmer C, Diehn M, Alizadeh AA, Brown PO (2006) Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. *BMC Genomics* 7:115
- Pauwels M, van Weyenbergh J, Soumillion A, Proost P, De Ley M (1994) Induction by zinc of specific metallothionein isoforms in human monocytes. *Eur J Biochem* 220:105–110
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time

- polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339:62–66
- Sadhu C, Gedamu L (1989) Metal-specific posttranscriptional control of human metallothionein genes. *Mol Cell Biol* 9:5738–5741
- Saydam N, Adams TK, Steiner F, Schaffner W, Freedman JH (2002) Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *J Biol Chem* 277:20438–20445
- Sekiya M, Hiraishi A, Touyama M, Sakamoto K (2008) Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 375:602–607
- Seth R, Yang S, Choi S, Sabeen M, Roberts EA (2004) In vitro assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2. *Toxicol In Vitro* 18:501–509
- Steinbrenner H, Ramos MC, Stuhlmann D, Mitic D, Sies H, Brenneisen P (2005) Tumor promoter TPA stimulates MMP-9 secretion from human keratinocytes by activation of superoxide-producing NADPH oxidase. *Free Radic Res* 39:245–253
- Suazo M, Olivares F, Mendez MA, Pulgar R, Prohaska JR, Arredondo M, Pizarro F, Olivares M, Araya M, Gonzalez M (2008) CCS and SOD1 mRNA are reduced after copper supplementation in peripheral mononuclear cells of individuals with high serum ceruloplasmin concentration. *J Nutr Biochem* 19:269–274
- Svensson PA, Englund MC, Markstrom E, Ohlsson BG, Jernas M, Billig H, Torgerson JS, Wiklund O, Carlsson LM, Carlsson B (2003) Copper induces the expression of cholesterologenic genes in human macrophages. *Atherosclerosis* 169:71–76
- Tang Z, Gasperkova D, Xu J, Baillie R, Lee JH, Clarke SD (2000) Copper deficiency induces hepatic fatty acid synthase gene transcription in rats by increasing the nuclear content of mature sterol regulatory element binding protein 1. *J Nutr* 130:2915–2921
- Tapia L, Suazo M, Hodar C, Cambiazo V, Gonzalez M (2003) Copper exposure modifies the content and distribution of trace metals in mammalian cultured cells. *Biometals* 16:169–174
- Tapia L, Gonzalez-Aguero M, Cisternas MF, Suazo M, Cambiazo V, Uauy R, Gonzalez M (2004) Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels. *Biochem J* 378:617–624
- Thiele DJ (1992) Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 20:1183–1191
- Uauy R, Olivares M, Gonzalez M (1998) Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr* 67:952s–959s
- Wang XJ, Hayes JD, Higgins LG, Wolf CR, Dinkova-Kostova AT (2010) Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones. *Chem Biol* 17:75–85