

UCH-FC
Biotecnología



C. 346
C. 1

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**INTERACCIÓN ENTRE LA ENZIMA HO-1 Y Bcl-2/Bax
Y SU RELACIÓN CON EL STATUS DE Fe**

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

Carolina Soledad Carriel Burgos

Agosto, 2007

Santiago – Chile

Director de Memoria de Título: Dr Miguel Arredondo Olguín



**“INTERACCIÓN ENTRE LA ENZIMA HO-1 Y Bcl-2/Bax
Y SU RELACIÓN CON EL STATUS DE Fe”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

CAROLINA CARRIEL BURGOS

Dr. Miguel Arredondo Olguín

Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. M. Tulio Núñez González

Presidente Comisión

Dr. Alejandro Roth Metcalfe

Corrector



Santiago de Chile, Agosto de 2007

A mis abuelos Carmen, Elsa y Luis con mucho cariño.



Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia, por toda la paciencia y cariño, a mi mamá, mi papá y mi hermano Gonzalo.

Quiero agradecer también al Laboratorio de Microminerales del INTA. A mi profe Miguel, principalmente por la PACIENCIA que ha tenido conmigo. A Ange y Paula, que han sido parte fundamental durante mi estadía en el INTA, apoyándome, aconsejándome y haciendo mi día muuy entretenido con esas eternas sobremesas donde aprendíamos tantas cosas nuevas y muy interesantes. Junto a ellas, también agradezco a Deni, Sole, Carola V, Cony, Diego, Lily y profe Pizarro, por esas excelentes tardes de carrete, asados y ponches, y por siempre hacer del lab un lugar más entretenido.

A mis amigos Negro y Coté, por estar siempre apoyándome, haciéndome reír, o simplemente peleando o pelando el cable conmigo con cualquier cosa, gracias por todo amigos!!!

A mis amigos de colegio Cristian, Jota, Leo, Pancho, Jorge, Flaca, Lore, Oscar y Miguel, por estar siempre ahí cuando los necesité y acompañarme hasta éste momento.

A las chicas de los pastos Lomi, Francia, Chiqui, Anita, Andre, Nati Contreras y Nati Aravena, y a los nuevos integrantes Maximiliano y Martina.

Al máximo grupo de estudio de Dr Johow: Seba, Iván, Cristóbal y Ororo, por esas tardes eternas de estudio y risas (tututurututuru), lo mejor de la U.

A mis amigos Ferni, Mariela, Costa, Pablo, por TODO (son muchas cosas para entrar en detalle)

A Nacho, Matu, Maca, Pilar, Pepe, Fabiola, Felipe, Ricardo, Matías, Undu, Pitilla FC, Tuti, Cato y muchas personas más, por los mejores momentos, las vacaciones, cumpleaños, congresos, amigos secretos, fiestas de disfraces, bajones, recitales, tocatas, películas, paseos, en generalam, por todo lo que hemos pasado durante estos años y que espero nunca termine .

Al Laboratorio de Biología del Envejecimiento, especialmente a Pamela Valdés, por su asesoría y préstamos de materiales durante el desarrollo de ésta tesis.

A mi amigo Miguel, aunque físicamente no estás, se que estás y estarás. siempre acompañandome y cuidándome.

A mi comisión, Dr. Nuñez y Dr. Roth, por el valioso aporte hecho a éste trabajo.

Y por último nada de ésto habría sido posible sin el gentil auspicio de Pianteam, CMSQD





Carolina Carriel Burgos nació en Concepción el 10 de Noviembre de 1981, y se pasó su infancia dando vueltas por Chile, vivió en Viña, Coquimbo y La Serena , para finalmente asentarse en la capital, donde terminaría sus estudios secundarios. Luego de seguir dando vueltas, ahora por preuniversitario y Bachillerato, opta por el camino de la Ciencia ingresando a Ingeniería en Biotecnología Molecular, donde desarrollaría y enfocaría sus inquietudes. Debido a su extrovertida personalidad, no solo ha podido dedicar su tiempo a la ciencia, sino que también a la enseñanza, dando clases en muchísimas asignaturas, a los negocios, vendiendo los más variados artículos y a sus amigos a quienes nos ha llenado con su alegría y buena onda. Aunque esta tesis pueda quedar olvidada en la biblioteca, te aseguro que los que te conocemos no llegaremos a olvidarnos de ti ni tu "chispeante" humor. Carola, esperamos que después de haber dado tantas vueltas en la vida, la inquietud que te ha llevado a buscar tu futuro no se agote y te impulse a seguir recorriendo el mundo y avanzar, para que terminemos en Brasil, mojándonos las patitas en una playa paradisíaca, tranquilas de haber logrado lo que nos propusimos. Mucha suerte en lo que sigue, aunque sabemos que la tendrás por que tienes toda la iniciativa y fuerza para desarrollar lo que te propongas.

Tus amigas Fernanda y Mariela

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
TÍTULO	1
COMISIÓN	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESEÑA	5
ÍNDICE DE CONTENIDOS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Vías de activación de pro-caspasas	16
1.2 Vía de activación de pro-caspasas mediado por receptores de muerte	17
1.2 Vía de activación de pro-caspasas mediado por mitocondria	18
1.3 Homeostasis de hierro	20
1.4 Hem Oxigenasa 1	23
1.5 Estrés oxidativo, enfermedades neurodegenerativas y Hem oxigenasa 1	26
2. HIPÓTESIS	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GENERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30



4. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1 Materiales	
4.1.1 Línea celular	31
4.1.2 Reactivos químicos y de cultivo celular	31
4.1.3 Equipos	32
4.1.4 Materiales de cultivo	32
4.2 Métodos	
4.2.1 Cultivo celular	33
4.2.2 Obtención de ARN de células SH-Sy5Y	33
4.2.3 Obtención de cDNA a partir de RNA total	34
4.2.4 RT-PCR semicuantitativo de los genes <i>ho1</i> , <i>bcl-2</i> y <i>bax</i> .	34
4.2.5 Determinación de la concentración de proteínas	35
4.2.6 Determinación del contenido total de hierro intracelular	36
4.2.7 Localización de HO-1, Bax y Bcl-2 con microscopía confocal	37
4.2.8 Co-localización de HO-1, Bax y Bcl-2 con microscopía confocal	
4.2.9 Co-inmunoprecipitación de HO1 con Bax y Bcl-2	38
5. RESULTADOS	40
5.1 Niveles de Fe interno en células expuestas a Fe-NTA	40
5.2 Análisis de la expresión de Bcl-2, Bax y HO-1 en respuesta a estímulos de Fe-NTA	41
5.3 Estudios de localización subcelular de HO-1, Bax y Bcl-2	44
5.4 Estudios de co-localización de las proteínas HO1 y/o Bax y/o Bcl-2	48

5.5 Estudios de coinmunoprecipitación de las proteínas HO-1 y/o Bax y/o Bcl-2	50
6. DISCUSIÓN	52
6.1 Determinación de contenido de Fe interno en células SH-SY5Y	52
6.2 Expresión de Bcl-2, Bax y HO-1 en respuesta a estímulos de Fe-NTA	53
6.3 Estudios de localización y co-localización subcelular de HO-1, Bcl-2 y Bax	56
6.4 Estudios de co-inmunoprecipitación de HO-1/ Bcl-2 y HO-1/Bax	58
7. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES	62
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Ilustración de la principal vía de activación de caspasas mediada por el receptor de factor de necrosis tumoral (TNF).	18
Figura 2 Ilustración de la vía de activación de procaspasas mediado por mitocondria.	20
Figura 3 Sistema de regulación post-transcripcional IRE/IRP	23
Figura 4 Contenido intracelular de Fe en células SH-SY5Y incubadas con diferentes concentraciones de Fe-NTA.	41
Figura 5 Imágenes representativas de electroforesis en geles de agarosa para estudiar la expresión de Bcl-2, Bax y HO-1 a nivel transcripcional.	42
Figura 6 Análisis densitométrico de la expresión de HO-1, Bcl2 y Bax a nivel transcripcional de las imágenes de la figura 5	43
Figura 7 Inmunolocalización de HO-1 en células SH-SY5Y no-expuestas a Fe-NTA en el medio de cultivo	45
Figura 8 Inmunolocalización de HO-1 en células SH-SY5Y expuestas a Fe-NTA (50 μ M) en el medio de cultivo	45
Figura 9 Inmunolocalización de Bcl-2 en células SH-SY5Y sin tratamiento de Fe-NTA en el medio de cultivo	46
Figura 10 Inmunolocalización de Bcl-2 en células SH-SY5Y expuestas a Fe-NTA (50 μ M) en el medio de cultivo.	46

Figura 11 Inmunolocalización de Bax en células SH-SY5Y no-expuestas a Fe-NTA en el medio de cultivo.	47
Figura 12 Inmunolocalización de Bax en células SH-SY5Y expuestas a Fe-NTA (50 μ M) en el medio de cultivo.	47
Figura 13 Co-inmunolocalización de la enzima HO-1 con la proteína anti-apoptótica Bcl-2	48
Figura 14 Co-inmunolocalización de la enzima HO-1 con la proteína pro-apoptótica Bax.	49
Figura 15 Co-inmunoprecipitación de HO-1 con Bcl-2 y Bax	51
Figura 16 Modelo explicativo de la posible interacción entre la enzima HO-1 y las proteínas Bcl-2 y Bax.	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ARNm:	Acido ribonucleico mensajero
Bax:	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2:	Proteína de linfoma de células B
BSA:	Albúmina sérica de bovino
ADNc:	Acido desoxirribonucleico complementario
CAD:	ADNasa activada por caspasas
CO:	Monóxido de Carbono
DE:	Desviación estándar
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
Fe:	Hierro
Fn:	Ferritina
HO-1:	Heme oxigenasa I
kDa:	kilo Dalton
MARE:	Elemento de reconocimiento de proteínas Maf
NTA:	Ácido Nitrilotriacético
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR:	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SFB:	Suero fetal bovino
Tween 20:	Polioxietilensorbitan monolaurato

RESUMEN

Cuando las células se encuentran sometidas a estrés oxidativo severo, se gatilla el proceso de muerte celular programada o apoptosis, producto de diversos eventos que incluyen la liberación de citocromo C en la mitocondria, la fragmentación del ADN y la liberación de lisozimas (Kerr y cols 1972). En la mitocondria, la apoptosis es regulada por proteínas de la familia Bcl-2 que comprende proteínas que promueven o inhiben la apoptosis. Entre ellas se destaca la acción de 2 proteínas que tienen un papel antagónico, Bax y Bcl-2. Bax es una proteína pro-apoptótica que se encuentra soluble en el citoplasma, pero al desencadenarse el proceso apoptótico, se transloca a la membrana mitocondrial externa y promueve la salida del citocromo C. Por otro lado, Bcl-2 es una proteína anti apoptótica, ya que es capaz de inhibir la función de Bax, evitando la salida del citocromo C. Se ha postulado que frente a estrés oxidativo, podría existir interacción entre estas proteínas y la enzima Hem Oxigenasa 1 (HO-1), la cual participa en la degradación del grupo Hem y juega un papel citoprotector dado por los subproductos que se originan durante la catálisis de Hem, y por su capacidad de activar factores de transcripción de genes responsables de la defensa celular frente a estrés oxidativo.

Para verificar la posible interacción de HO-1 con Bcl-2 y Bax, se incubaron células de neuroblastoma SH-SY5Y con concentraciones crecientes de Fe (8 a 75 μ M) como inductor de estrés oxidativo. Observamos que a medida que aumenta la concentración Fe, existe un patrón de respuesta bifásica en la expresión de los ARNm de HO-1, Bcl-2, y Bax. En experimentos de inmunolocalización, se observó que HO-1 colocaliza con Bcl-2 y Bax en células incubadas con 50 μ M de Fe. Estas

colocalizaciones son inconsistentes con la localización subcelular de Bcl-2 y Bax observada en ésta tesis y por lo tanto no permiten concluir con certeza si efectivamente colocalizan o no. Para determinar si hay una interacción física entre estas proteínas, realizamos estudios de coimmunoprecipitación, donde observamos interacción entre HO-1 y Bcl- 2 a altas concentraciones de Fe (75 μ M Fe-NTA), pero no entre HO-1 y Bax. Estos resultados sugieren que en células SH-SY5Y, HO-1, al interactuar con la proteína anti-apoptótica Bcl-2, podría tener un papel pro-apoptótico.

ABSTRACT

Uncontrolled oxidative stress triggers programmed cell death or apoptosis, a process mediated by events that happen in organelles, among others mitochondrial cytochrome C release, DNA fragmentation and lysozyme release. In mitochondria, apoptosis is regulated by proteins of the Bcl-2 family which comprise proteins that either promote or inhibit apoptosis. Among them it is outstanding the action of two proteins with antagonic roles: Bax and Bcl-2. Bax is a pro-apoptotic protein found soluble in the cytoplasm. However, when the apoptotic process begins, Bax is translocated to the mitochondrial outer membrane and promotes cytochrome C release. Bcl-2, on the other hand, is an anti-apoptotic protein that interacts with Bax and inhibits cytochrome C release. In this Seminar we tested the hypothesis that under oxidative stress conditions there is an interaction between heme oxygenase 1 (HO-1) and either Bcl-2 or Bax, blocking or enhancing the cytoprotective role of HO-1 given by the products that originate from Hem's catalysis. We also tested if excess iron activates the transcription HO-1, Bcl-2 or Bax as a mechanism of cellular defense against oxidative stress. To these ends, we cultured neuroblastoma cells (SH-SY5Y) with different iron concentrations (8, 15, 25, 50, 75 μ M) in the extracellular medium and studied 1) intracellular iron concentration; 2) mRNA expression of *ho-1*; *bcl-2* and *bax*; 3) immunolocalization and co-localization of Bcl-2; Bax and HO-1, and 4) co-immunoprecipitations of HO-1/Bcl-2 and HO-1/Bax. Our results indicate that when the concentration of extracellular Fe increased there was a byphasic response in the expression of HO-1, Bcl-2 and Bax. Immunolocalization were performed to determinate sub cellular location of these proteins. We found that high (50 μ M) extracellular Fe

induced the cytosolic co-localization of HO-1 with both Bcl-2 and Bax. However, the results of HO-1 co-localization, in which HO-1 was shown mostly in the cytosol, were inconsistent with our results of sub-cellular location of this protein, that showed a nuclear localization. Co-precipitation of HO-1 with either Bcl-2 or Bax showed that there is an interaction between HO-1 and Bcl-2 at high iron concentrations (75 μ M Fe-NTA), but not between HO-1 and Bax. These results suggest that, because of its interaction with Bcl-2, HO-1 may have an apoptotic role.

1. INTRODUCCIÓN

El mecanismo bioquímico que subyace a la apoptosis, o muerte celular programada, es un área de extenso estudio debido a la importancia de la mantención del balance homeostático frente a estímulos anti- y pro-apoptóticos. Este balance es crucial para el funcionamiento adecuado de los organismos, ya que, frente a una pérdida de éste, se podrían desarrollar diversas patologías, tales como desórdenes neurodegenerativos - mal de Alzheimer (Behl., 2000), mal de Parkinson (Tatton y col., 2003)-, Cáncer (Lowe & Lin., 2000) o Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (Roshal y col., 2001) entre otras.

Los diversos factores responsables del desencadenamiento de procesos apoptóticos tienen un denominador común, la activación de enzimas proteolíticas denominadas caspasas. Hasta la fecha se han descrito 14 caspasas que comparten características comunes: todas son cisteín-proteasas específicas de aspartato; tienen en su sitio activo un pentapéptido "QACXG" (X puede ser R, Q o D) y sus precursores son zimógenos conocidos como pro-caspasas (revisado en Fan y col., 2005).

1.1 Vías de activación de pro-caspasas

Existen 2 importantes vías de activación de caspasas: (i) Activación inducida por receptores o ligando dependiente (vía extrínseca) a través de "receptores de muerte" tales como Fas (CD95) y (ii) Vía mitocondria-dependiente (vía intrínseca), en que frente a estímulos como estrés, irradiación o inflamación, ocurre liberación de citocromo C desde la mitocondria hacia el citoplasma.

1.2 Vía de activación de caspasas mediada por “receptores de muerte”

Existen señales extrínsecas de muerte, como el factor Fas ligando (FasL) o el factor de necrosis tumoral TNF-2, que son reconocidos en forma específica por sus respectivos receptores (Fas y TNFR) ubicados en la membrana plasmática. Éstos receptores contienen dominios de muerte (DD) en su estructura, los cuales son reconocidos por proteínas FADD o TRADD (proteína asociada a Fas o receptor de TNF con dominios de muerte), las cuales se agregan y activan al receptor (Boldin y cols., 1995). Al ocurrir esto, las proteínas FADD exponen dominios efectores de muerte (Death Effector Domains, DEDs) que interactúan con DEDs de pro-caspasa-8, induciendo la oligomerización de ésta en la cara interna de la membrana citoplasmática (Figura 1). Después de éste evento, se forma el complejo DISC (Death-Inducing Signal Complex) producto de la compactación de 2 pro-caspasas-8 lineales, proceso que desencadena la autoactivación de caspasa-8, que en un evento posterior, activa la caspasa-3.

En líneas celulares linfoides como Jurkat y CEM, se ha demostrado que existe una vía alternativa de activación de caspasas mediada por receptores. En estas células, caspasa-8 es medianamente activada, se reduce la formación de DISC y no hay activación directa de caspasa-3. Sin embargo, caspasa-8 puede activar la vía apoptótica mitocondria-dependiente cortando la proteína citoplasmática Bid (proteína pro-apoptótica que pertenece a la familia Bcl-2), lo que da como resultado su forma activa, tBid, que produce finamente la activación de la vía apoptótica mitocondrial, liberando citocromo C y factor inductor de apoptosis (AIF) entre otras moléculas (Scaffidi y col., 1998).

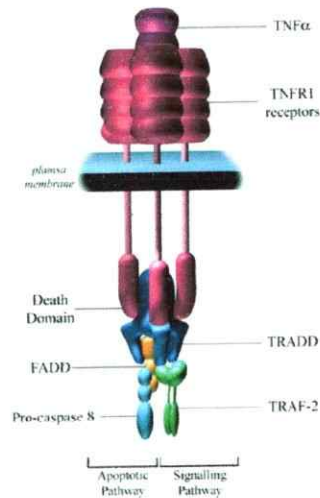


Figura 1. Ilustración de la principal vía de activación de caspasas mediada por el receptor de factor de necrosis tumoral (TNF). (Figura extraída de www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash)

1.3. Vía de activación de pro-caspasas mediado por mitocondria.

Además de la autoactivación de la pro-caspasa 8 para formar parte del complejo DISC, ésta caspasa puede ser activada a través de una vía dependiente de citocromo C. Esta vía es regulada por proteínas de la familia Bcl-2, que juegan un rol clave en el control de la vida y muerte celular, manteniendo el balance entre componentes anti- y pro-apoptóticos (Gross y col., 1999). Esta familia se divide en 3 subfamilias de proteínas que promueven o inhiben la apoptosis:

- I) Subfamilia Bcl-2, que corresponde a proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W y MCL-1.
- II) Subfamilia Bax, que corresponde a proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bak y Bok y

III) Subfamilia BH3, que también corresponde a proteínas pro-apoptóticas y que está constituida por las proteínas Bad, Bid, Bik, Blk y BimL (Danial y cols., 2004).

Los miembros de la familia Bcl-2 se caracterizan por poseer dominios homólogos denominados BH (BH: *Bcl-2 homology domain*). Estos dominios permiten la interacción de éstas proteínas entre si o con otros miembros de la familia (Adams y col., 1998). Bcl-2 es una proteína citoplasmática, que interactúa con Bax, proteína con actividad pro-apoptótica que también pertenece a la familia Bcl-2. Bax se transloca a la mitocondria, formando oligómeros e insertándose en la membrana mitocondrial externa, promoviendo así la salida del citocromo C hacia el citoplasma (Kowaltowsky y col., 2000).

Una vez iniciado el proceso apoptótico, se ha descrito que Bcl-2 es capaz de prevenir la oligomerización e inserción de Bax en la membrana externa mitocondrial, evitando la pérdida del gradiente electroquímico, liberación del citocromo C y activación de caspasas, eventos propios de la apoptosis (Eskes y col., 1998; Mikhailov y col., 2001).

Durante la apoptosis, junto con la salida de citocromo C desde la mitocondria, también se libera dATP o ATP, que induce la oligomerización del factor apoptótico de activación de proteasas-1 (Apaf-1), el cual se une a la pro-caspasa-9, dATP y citocromo C resultando en la formación de un complejo denominado **apoptosoma** (Figura 2). El extremo N-terminal de Apaf-1 y la pro-caspasa-9 presentan dominios de reclutamiento de caspasas (CARDs), que interactúan y forman un complejo con una relación de 1:1. La caspasa-9 a su vez, puede autoactivarse al igual que pro-caspasa-3, en un sistema de retroalimentación positiva.

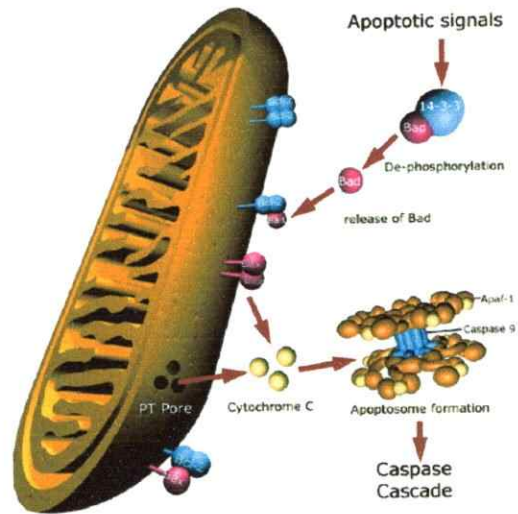


Figura 2. Ilustración de la vía de activación de procaspasas mediado por mitocondria. (Figura extraída de www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash)

Una vez activadas las caspasas que inducen apoptosis, tales como caspasas 2, 8 y/o 10, éstas activan a las caspasas 3, 6 y 7. La caspasa 3 es responsable de la ruptura de PARP [Poly(ADP-ribosa)polimerasa] -que media la reparación de quiebres de ADN de hebra simple mediante la activación y reclutamiento de enzimas reparadoras de ADN- y de CAD, que normalmente se encuentra formando un complejo con el inhibidor ICAD. Durante la apoptosis, ICAD es cortado por las caspasas 3 y 7, se libera CAD y se produce la fragmentación de ADN nuclear. Por otro lado, caspasa 6 participa en la ruptura de la proteína lamina A -que forma parte del esqueleto nuclear, además de mediar la interacción de la cromatina con la membrana nuclear- lo que produce la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN (Fan y col., 2005).

1.4. Homeostasis de hierro

El hierro (Fe) es un nutriente que juega un rol esencial en distintas funciones biológicas. Tiene la propiedad de existir en dos estados de oxidación (Fe^{+2} y Fe^{+3}) y ser convertido en formas funcionales tales como el grupo hem y los núcleos de Fe-S, gracias a lo cual es capaz de mediar reacciones bioquímicas fundamentales como los procesos de transporte y almacenamiento de oxígeno, fosforilación oxidativa, metabolismo de neurotransmisores y síntesis de ADN. Constituye un componente esencial en la cadena respiratoria confiriendo actividad redox a citocromos y otras enzimas, como xantina oxidasa, catalasa, NADH deshidrogenasa, ribonucleótido reductasa y aconitasa (Eisenstein., 2000).

Por otro lado, un exceso de Fe es tóxico, ya que puede participar en la generación de radicales libres a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Wardman & Candelais., 1996). Los radicales libres son especies altamente reactivas que someten a las células a estrés oxidativo, dañando membranas celulares, proteínas y ADN.

Con estos antecedentes se puede deducir que tanto la carencia como el exceso de este metal producen cambios patológicos en el organismo, por lo que la homeostasis de Fe es altamente regulada por una compleja red de transportadores, moléculas de almacenamiento y proteínas reguladoras.

En la homeostasis de hierro en vertebrados participan proteínas como la ferritina (Fn), proteína intracelular que almacena hierro; el receptor para transferrina (RTf), que media el ingreso de hierro a la célula y el transportador DMT1 (que ingresa hierro a la célula (Martini y col., 2002), las cuales son reguladas de manera post-transcripcional por la actividad de proteínas reguladoras de hierro (IRP1 e IRP2), que

se encuentran en el citoplasma. Los ARNm de la Fn, RTf y DMT1 contienen elementos de respuesta a hierro, denominados elementos IRE, estas secuencias se encuentran en la región 5' no traducida del ARNm de la ferritina y en la región 3' no traducida de los ARNm de DMT1 y RTf. Las proteínas IRP1 e IRP2 en respuesta a los niveles celulares bajos de hierro se unen a éstas secuencias IRE impidiendo la traducción del ARNm de la Fn o estabilizando los ARNm del DMT1 y RTf, favoreciendo la entrada y aumento intracelular de Fe (Theil y col., 2000) (Figura 3).

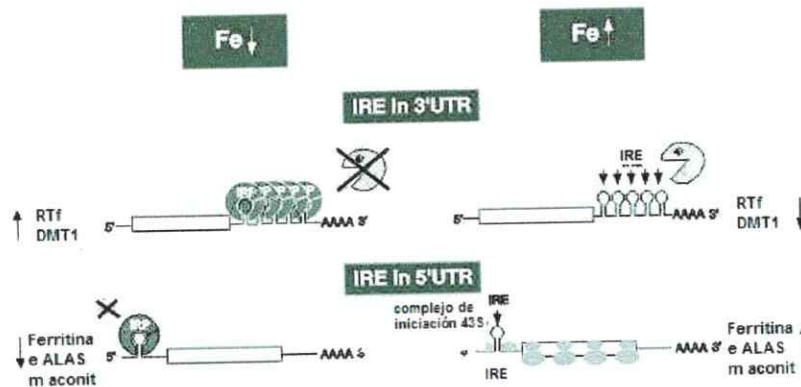


Figura 3: Sistema de regulación post-transcripcional IRE/IRP. A baja concentración de Fe intracelular, las proteínas IRP1 e IRP2 presentan un complejo 3Fe-4S y tienen actividad de unión IREs, secuencias presentes en la región 3' o 5' no traducida de los ARNm involucrados en el metabolismo de Fe. Esta unión, estabiliza el ARNm cuando la secuencia IRE se encuentra en la región 3' no traducida del mensajero (DMT1 y RTf) e inhibe la formación del complejo de iniciación de la traducción cuando la secuencia IRE se encuentra en la región 5' (Fn, eALAS y aconitasa mitocondrial). Esto induce la síntesis de proteínas de captación y disminución de la proteína de almacenaje (Fn) de Fe y de síntesis de Fe-hem. Al aumentar el Fe intracelular, IRP1 adquiere un complejo 4Fe-4S y pierde su capacidad de unirse al ARNm, transformándose en una aconitasa citoplasmática. Los transcritos con IRE en la región 3' no traducida son degradados y los con IRE en el 5' son traducidos. Además, el aumento de Fe intracelular, induce que la proteína IRP2 sea ubiquitinada y degradada en proteosomas. El conjunto de estos eventos produce una disminución en las proteínas de captación de Fe (DMT1 y RTf) y un aumento en los de captación (Fn) y utilización (eALAS).

La homeostasis corporal de Fe es mantenida mediante la regulación de su absorción y el mantenimiento de las reservas corporales. A diferencia de otros minerales, el ser humano no posee un mecanismo regulado que permita la excreción del exceso de este metal. Las pérdidas de Fe ocurren por mecanismos inespecíficos

como exfoliación de células, hemorragias y fluidos como lágrimas y sudor. En individuos adultos sanos se absorbe aproximadamente 1 mg de Fe al día, cantidad suficiente para reemplazar las pérdidas fisiológicas. De un total de 3 a 4 gramos de Fe total en el organismo aproximadamente 2,5 gramos forman parte de la hemoglobina presente de los glóbulos rojos maduros, los cuales presentan la mayor demanda funcional por este metal. Los glóbulos rojos senescentes son fagocitados por el sistema reticuloendotelial, el Fe liberado en este proceso, puede ser almacenado, liberado al plasma o relocalizado en el hígado, dependiendo de los requerimientos corporales (Miret y col., 2003).

1.5 Hem Oxigenasa 1

La enzima hem oxigenasa cataliza la degradación de hem formando biliverdina, monóxido de carbono (CO) y Fe^{+2} (Tenhunen y col, 1968). La biliverdina generada en la reacción es rápidamente reducida a bilirrubina por la enzima biliverdina reductasa. Ambas moléculas ejercen un efecto protector debido a sus propiedades antioxidantes, secuestrando radicales peroxilo e inhibiendo la peroxidación de lípidos (Stocker y col., 1987)

El monóxido de carbono (CO) suprime la respuesta pro-inflamatoria y promueve la respuesta anti-inflamatoria de macrófagos, inhibiendo la producción de TNF- α e induciendo la producción de IL-10 (Otterbein y col., 2000).

La liberación de Fe^{+2} induce la rápida expresión de Fn. Esto daría cuenta de un papel protector disminuyendo el efecto pro-oxidante provocado por el Fe libre capaz de generar radicales hidroxilo. Eisenstein y col (1991) demostraron que la expresión de Fn aumenta junto con la de HO-1 y disminuye con la inhibición de la actividad HO-1 en fibroblastos de rata. En contraste, resultados en un modelo de choque endotóxico en

ratas, mostraron que la potente citoprotección provista por HO-1 pareció ser independiente de ferritina, ya que la administración de apoferritina y Fe (para inducir la expresión de ferritina) no fueron efectivas en conferir protección (Otterbein y col., 1997).

A la fecha, se han identificado 3 isoformas de HO que catalizan esta reacción: HO-1, HO-2 y HO-3 (Maines y col., 1986, 1997). Las enzimas hem oxigenasa poseen un segmento de 24 aminoácidos perfectamente conservados, que forma un bolsillo hidrofóbico que une los grupos pirroles 1 y 2 del hem a través de uniones electrostáticas. Este bolsillo no reconoce al metal de las metaloporfirinas, sino que su especificidad es sólo hacia las cadenas laterales del anillo porfirínico. Por esta razón, metaloporfirinas no fisiológicas como Sn-Protoporfirina (Sn-PP), Zn-Protoporfirina (Zn-PP) u otras pueden competir con Fe-Protoporfirina IX (Fe-PP) e inhibir la actividad de la Hem Oxigenasa (Maines., 1997).

La actividad enzimática de HO-1 (32 kDa) o HSP32 (Heat Shock Protein 32) ha sido detectada en tejidos tales como hígado, bazo, páncreas, intestino, pulmón, corazón y próstata, entre otros (Taylor y col., 1998). Su expresión es inducible por estímulos como NO (Datta & Lianos, 1999); citoquinas (Rizzardini y col., 1998); metales pesados (Eyssen-Hernandez y col., 1996); endotoxinas (Carraway y col., 1998); hipoxia (Carraway y col., 2000); hiperoxia (Lee y col., 1996); radiación UV (Ossola & Tomaro, 1998); hem (Tenhunen y col., 1968); estrés por calor (Shibahara y col., 1987) y por peróxido de hidrógeno (Keyse & Tyrrel, 1989).

Se han identificado elementos regulatorios en la región promotora del gen que codifica HO-1, incluyendo sitios de unión a factores de transcripción que responden a estrés oxidativo, como el factor nuclear NF κ B y la proteína activadora AP-2 (Lavrovsky

y col., 1994). Además, contiene una copia funcional MARE (Elemento de reconocimiento de proteínas Maf -cofactoras de factores de transcripción-) (Motohashi y col., 1997), inmediatamente río abajo de un elemento de respuesta a cadmio (Kitamuro, 2003), lo que permite que la enzima sea inducida por el hem y además sea cofactor de diversas hemoproteínas como hemoglobina, mioglobina, y citocromos.

Frente a estímulos que generan estrés, como la hipoxia y el tratamiento con hem, ésta enzima se localiza en el núcleo, una vez allí activa factores de transcripción de genes relacionados con respuesta a estrés oxidativo mediante un mecanismo aún desconocido (Lin y col., 2007). Para que la catálisis del hem ocurra es esencial que éste alcance el centro activo de la enzima, para lo cual debe ser transportado hasta el RE (Maines., 1997). Los mecanismos de transporte intracelular de hem aún no han sido explorados, y su conocimiento facilitaría el desarrollo de aplicaciones clínicas contra enfermedades que involucren fallas en su metabolismo.

La inducción de HO-1 en respuesta a hem, metales pesados (cobalto; cadmio), NO, LDL oxidado y citoquinas es consecuencia de transcripción *de novo* (Rizzardini y col., 1993). Por lo tanto, su expresión puede ser inducida por una variedad de estímulos no-hem capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ROS).

Estudios realizados por Keyse & Terrel (1987), Vile & Terrel (1993) y Maeshima y col., (1996), han demostrado que HO-1 puede ser inducida por numerosos agentes que causan estrés oxidativo, sino que además la enzima cumple un papel citoprotector frente a este estrés en muchos tipos celulares, ya sea por los productos antioxidantes de la catálisis de hem,- biliverdina/ bilirrubina- como por su capacidad de activar factores de transcripción asociados a genes de respuesta a estrés. Además, Keyse & Tyrrel (1989) demostraron que la HO-1 confiere citoprotección contra estrés oxidativo

particularmente si es inducida antes de la exposición al agente estresante. Este paradigma fue apoyado por las observaciones hechas en ratones y humanos deficientes de la proteína. Se generaron ratones HO-1 (-/-) mediante delección dirigida del gen *ho1*, los cuáles presentaron los mismos síntomas que pacientes con hemocromatosis hereditaria; aumento de tamaño del bazo, aumento en la peroxidación de lípidos, fibrosis, daño hepático, disminución en la movilidad, y mortalidad prematura, entre otros, como una consecuencia de la acumulación tisular de hierro (Poss y col., 1997). Además se analizaron los efectos de agentes oxidantes en células aisladas de estos ratones, observando que estas células son más susceptibles a acumular radicales libres y a presentar daño oxidativo *in vitro* e *in vivo*, estableciendo que HO-1 constituye un importante sistema antioxidante. Yachie y col., (1999) identificaron el primer caso de un paciente deficiente en HO-1. Este paciente presentó alteraciones fenotípicas similares a las de los ratones HO-1 (-/-), incluyendo retardo del crecimiento, anemia, leucocitosis y susceptibilidad a estrés oxidativo.

1.6 Estrés oxidativo, enfermedades neurodegenerativas y Hem oxigenasa 1

El estrés oxidativo en la célula está involucrado con numerosos desórdenes neurodegenerativos, y entre ellos, el mal de Alzheimer es uno de los más críticos, convirtiéndose en muchos países en uno de los problemas médicos y socio-económicos más importantes (Stewart., 1998) y a pesar del gran interés científico, aún no se sabe concretamente que tratamiento aplicar frente a éstas enfermedades multifactoriales, que permitan la recuperación total de los pacientes. Dentro de los factores que pueden producir éstos desórdenes, se encuentran las proteínas Tau y el péptido β -amiloide (revisión de Bodles y col., 2001); iones metálicos (Quinlan y col.,

2001) y especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Wang y col., 2000) entre otros factores, que finalmente producen que la célula entre en el proceso de muerte celular programada o apoptosis.

Dado que su metabolismo oxidativo es intenso, el cerebro consume gran cantidad de oxígeno, generando por lo tanto grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (Aguirre P y col., 2005). Existen numerosos procesos neurodegenerativos que involucran la acumulación de hierro redox activo (Jankovic., 2004), éstos procesos se hacen evidentes a medida que envejecemos.

Existen antecedentes que indican que la enzima HO-1 juega un importante papel en numerosos desórdenes neurodegenerativos, entre ellos el mal de Alzheimer (Celec & Príhordova., 2003). Se ha demostrado que la actividad de ésta enzima, medida por la tasa de producción de bilirrubina proveniente de la catálisis de biliverdina, subproducto de la degradación de hem, disminuye en pacientes que desarrollan el mal o en sus familiares. Por otro lado, se ha determinado que la distribución espacial de HO-1 en el cerebro de pacientes con Alzheimer es idéntica a la expresión patológica de Tau; y que al sobreexpresar HO-1, los niveles de Tau disminuyen drásticamente en células de neuroblastoma, por lo que los autores sugieren un mecanismo común de expresión de Tau patológica y de HO-1 (Takeda y col., 2000). Lo mismo ocurre con las proteínas Bcl-2 y Bax, cuya expresión aumenta y disminuye respectivamente en células de miocardio de ratón sometidas a daño inducido por isquemia y que sobreexpresan HO-1 (Melo y col., 2002).

Frente a estos antecedentes, se hace necesario tener un conocimiento mayor sobre los mecanismos que subyacen la acción de la enzima HO-1 frente a estrés oxidativo. En particular, es necesario determinar si el efecto anti-oxidante de HO-1 es sólo atribuible a los productos de la catálisis de hem, o adicionalmente a su interacción

con factores de transcripción de genes asociados a estrés oxidativo, o a algún tipo de interacción con proteínas que participan en el proceso de apoptosis.

2. HIPÓTESIS

La enzima HO-1 cataliza el paso limitante de la degradación del grupo hem, liberando como productos de ésta reacción Fe^{+2} , monóxido de carbono y biliverdina, cumpliendo así un papel cito-protector en la célula al liberar éstos agentes anti oxidantes (Lin y col., 2007). Sin embargo, también podría ejercer su acción interactuando directamente con proteínas que participan en los procesos apoptosis. Sobre la base de estos antecedentes, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

“Existe una interacción entre la enzima HO-1, Bax y Bcl-2 que permite a HO-1 cumplir un rol citoprotector frente a daño por estrés oxidativo mediado por hierro.”

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

“Caracterizar la respuesta de las proteínas HO-1, Bax y Bcl-2 frente un estímulo con Fe inorgánico en el linaje celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y y determinar si existe interacción entre HO-1 y/o Bcl-2 y Bax”.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la expresión de las proteínas HO-1, Bcl-2 y Bax en respuesta a exposición a hierro inorgánico.
- Determinar la localización subcelular de las proteínas HO-1, Bcl-2 y Bax frente a estímulo de hierro inorgánico.
- Determinar una posible interacción de HO-1 con Bax, Bcl-2 o ambas mediante estudios de co-localización y co-inmunoprecipitación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Línea celular

La línea celular SH-SY5Y de la American Type Culture Collection (#CRL-2266, Rockville, MD) es una línea celular derivada de un triple clonamiento (SK-N-SH → SH-SY → SH-SY5 → SH-SY5Y) de la línea celular SK-N-SH de células de neuroblastoma (Ross y col., 1983). Estas células poseen un único marcador que se encuentra en el cromosoma 1, con una inserción compleja de una copia adicional de un segmento 1q en el brazo largo, que genera una trisomía de 1q. Se ha reportado que estas células alcanzan confluencia a concentraciones mayores a 1×10^6 células/cm², y que exhiben niveles moderados de actividad dopamina beta-hidroxilasa (Greenslade y col., 1978).

4.1.2 Reactivos químicos y de cultivo celular

Fermentas: Agarosa Top NuSieve, Taq DNA polimerasa, Amortiguador PCR 10X, MgCl₂ 50 mM, GTP, ATP, TTP, CTP, RNAsa H, transcriptasa reversa RevertAid, Oligo dT.

Gibco: Medio F12, Medio MEM, tripsina, suero fetal bovino, antibiótico/antimicótico, archilamida, bisacrilamida.

Invitrogen: Taq DNA polimerasa, Amortiguador PCR 10X, MgCl 25 mM, TRIzol, inhibidor de proteasas, anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a Alexa flúor 543,

anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a Alexa flúor 488, anticuerpo de cabra anti IgG de conejo acoplado a Alexa flúor 543.

MERCK: Ácido Cítrico, CaCl₂, MgCl₂, KH₂PO₄, Tritón X-100, Metanol, Etanol, NaOH, HCl, FeCl₃, NTA, DTT, cloroformo, isopropanol.

Perkin Elmer: Membrana de nitrocelulosa.

PIERCE: Anticuerpo de ratón anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano, Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano, proteína A-sefarosa.

R&D Systems: anticuerpo monoclonal de ratón anti- Bcl-2 humana, anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bax humana.

SIGMA: EDTA, β-mercaptoetanol.

US Biological: Anticuerpo policlonal de conejo anti-HO-1 humana, anticuerpo monoclonal de ratón anti- Bcl-2 humana, anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bax humana.

Winkler: Tris, Ácido Bórico, BSA, Glicina, Ácido nítrico, NaCl, KCl, TBS, PMSF, Tween 20, DMSO, Bromuro de etidio, azul de bromofenol, dodecil sulfato de sodio, marcador ADN 100 pb y 1 kb, marcador preteñido de proteínas (20-118 KDa).

4.1.3 Equipos

Espectrofotómetro UV-visible UV-1601 (Shimadzu), Fuente de poder Power Station 300 (Labnet), Transluminador UV (Genesys), Baño termoregulado (Memmert), Incubadora con inyección de CO₂ (ShelLab), Termociclador 2720 (Applied Biosystems), Centrífuga 5416 (Eppendorf), Centrífuga refrigerada (Vision), Placa calefactora (Scientific Products), Agitador/calefactor Nuovall (Thermolyne), pHímetro (Oakton), Centrífuga

Spectrafuga 16M (Labnet), Balanza Mettler PM 4600 (Delta Range), Bomba de vacío Rocker 300 (Mundolab), Campana de flujo laminar FASTER (Cientec).

4.1.4 Materiales de cultivo

- Placas de cultivo de 6 pocillos, 35 mm diámetro, Orange Scientific (2030500).
- Botellas plásticas de 40 ml (25 cm²), Orange Scientific (2010100).
- Pipetas plásticas desechables Orange Scientific, 10 ml (PN10E1).
- Unidades de filtración, tamaño de poro 0,2 μ m, Orange Scientific (1520012).
- Jeringas sin aguja 20cc/ml, TERUMO.
- Pipetas pasteur estériles TCL
- Unidad de filtración para bomba de vacío Steritop, Millipore.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cultivo celular. Las células SH-SY5Y fueron cultivadas en medio F12:MEM (1:1) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB). Estas células pueden cultivarse en placas o botellas. Se sembraron 2×10^5 células en botella de 25 mL. Se crecieron por 5-6 días con cambio de medio cada 2 días y se incubaron con distintas concentraciones de Fe (8, 15, 25, 50, 75 μ M Fe-NTA) a 37° C, 5% CO₂. Durante este período las células alcanzaron confluencia, luego fueron tripsinizadas y resembradas en iguales condiciones. La concentración de Fe basal en el medio de cultivo (F12:MEM + 10% SFB) fue de aproximadamente 8 μ M.

4.2.2 Obtención de ARN de células SH-SY5Y. Se aisló ARN total de células SH-SY5Y tratadas con diferentes concentraciones de Fe-NTA (8, 15, 25, 50, 75 μ M Fe-NTA) utilizando el reactivo TRizol. Brevemente, células sembradas en botellas de 25

mL fueron cultivadas por 5-6 días con cambio de medio regular cada 2 días. Las células fueron incubadas con TRizol a temperatura ambiente por 10 minutos para permitir la disociación de los complejos núcleo-proteínas. Luego, se agregó 0,2 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se centrifugó. La fase acuosa fue traspasada a un nuevo tubo. El ARN fue precipitado con 0,5 mL de isopropanol, y lavado con etanol 75%, para ser finalmente resuspendido en H₂O-DEPC y guardado a -20° C.

4.2.3 Obtención de ADNc a partir de ARN total. El ADNc fue obtenido por transcripción reversa. La reacción se realizó agregando 5 µg de ARN y partidor Oligo dT (0,5 µg), se incubó a 70° C por 10 minutos y se dejó en hielo por 1 minuto. Posteriormente se agregó 6 µl de la mezcla B (2 µl de Tampón de PCR 10X; 1 µl MgCl₂ 50 mM; 1µl dNTPs 10mM; 2 µl DTT 0,1M) y se incubó a 42° C por 5 minutos. Luego se agregó transcriptasa reversa RevertAid y se incubó por 50 minutos adicionales a la misma temperatura. La reacción fue terminada a 70° C por 15 minutos. Por último, se agregó 1 µl de RNAsa H, enzima que degrada el ARN de híbridos ARN/ADN que puedan estar presentes en la mezcla de reacción. Se incubó a 37° C por 20 minutos y luego a 4° C.

4.2.4 RT-PCR semicuantitativo de los genes *ho1*, *bcl-2* y *bax*. El ADNc de los genes *ho1*, *bcl-2* y *bax* fue amplificado por medio de la reacción de PCR. Para amplificar *ho-1* las muestras se sometieron a 94° C por 3 min, y luego al programa correspondiente (35 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 55° C, 40 s a 72° C y 7 minutos de extensión final a 72° C) utilizando los partidores específicos 5'-cccaaa gcttgcgcttctcagat-3' y 5'-gggaaacgaattctggccataggac-3'. Se obtuvo un fragmento de 201 pb.

Para amplificar *bcl-2* las muestras se sometieron a 94° C durante 3 min, y luego a 30 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 54° C, 40 s a 72° C y 7 minutos de extensión final a 72°

C, utilizando los partidores específicos: 5'-cattggaagttcaaatcagc- 3' y 5'-gcttgcattctggacgag-3'. Se obtuvo un fragmento de 306 pb.

Para amplificar *bax* las muestras se incubaron a 94° C durante 3 min, y luego a 30 ciclos de 30 s a 94° C ,30 s a 56° C, 40 s a 72° C y 7 minutos de extensión final a 72° C, utilizando los partidores específicos 5'-ttgcttcaggggatgattgc-3' y 5'-cgccacaaagtggtc-aggt-3'. Se obtuvo un fragmento de 316 pb.

Como control de expresión se utilizó la amplificación de un gen que codifica para actina. Para amplificar el gen, las muestras se sometieron a una reacción de 94° C durante 3 min, y luego a 30 ciclos de 30 s a 94° C ,30 s a 60° C, 40 s a 72° C y 7 minutos de extensión final a 72° C, utilizando los partidores específicos 5'-ggacttcgagcaagagatgg-3' y 5'-gactcgtcactctctgcttg-3', y obteniendo un producto de PCR de 432 pb

Los productos de PCR obtenidos fueron observados en geles de agarosa al 2 %, 0,5 ug/ml de bromuro de etidio en un transiluminador UV (Vilber Lourmat) y el análisis densitométrico -utilizando como control la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la proteína actina- se realizó utilizando el software Image J.

4.2.5 Determinación de la concentración de proteínas. Se preparó un extracto celular de células SH-SY5Y tratadas con diferentes concentraciones de Fe-NTA (8, 15, 25, 50, 75 μ M Fe-NTA). Para ello, se extrajo el medio de cultivo de las células incubadas en botellas o placas y se incubaron por 15 minutos en amortiguador Tris-EDTA a 37° C. Luego se traspasaron las células a tubos Eppendorf, se centrifugaron por 30 s a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se agregó 50 μ L de una mezcla de amortiguador de lisis (Tris 20 mM pH 7,4 /NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1%) e inhibidores de proteasas (PMSF 0,2 mM, Aprotinina 1 mM, Leupeptina 1 mM y Pepstatina 0,2 mM), se incubó por 15 min en hielo, se centrifugó a

4° C por 10 minutos a 10.000 rpm, se extrajeron alícuotas de 10 µL para medir concentración de proteínas y el resto se guardó para determinación de contenido total de hierro intracelular y experimentos de co-inmunoprecipitación. La determinación de concentración de proteínas se realizó mediante el método de Lowry y col. (1951), midiendo la absorbancia a 600 nm y posteriormente interpolar a partir de una curva de estandarización con BSA.

4.2.6 Determinación del contenido total de hierro intracelular. A una alícuota de extracto celular, preparado como se mencionó anteriormente, se agregó igual volumen de ácido nítrico al 65%, se incubó a 60° C durante la noche, y luego el contenido de hierro fue medido en un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito (SIMAA 6100, Perkin Elmer) y se utilizó como control interno MR-CCHEN-002 (*Venus antiqua*) y DOIt-2 (*Dogfish liver*) para validar las determinaciones de hierro (Cisternas y col., 2005).

4.2.7 Localización de HO-1, Bax y Bcl-2 con microscopía confocal. Células SH-SY5Y fueron sembradas sobre cubreobjetos por 5-6 días y se expusieron o no a Fe-NTA 50 µM durante el cultivo. El día del experimento las células se lavaron 3 veces en PBS-MC (PBS Magnesio/Calcio: PBS, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 0,1mM). Luego se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS-MC por 15 minutos. Después se lavaron 3 veces con PBS-MC y las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,2% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se bloquearon con PBS-MC más BSA 0,5% 2 veces por 5 minutos y se incubaron durante la noche a 4° C con: **a)** un anticuerpo policlonal de conejo anti-HO1 humana (1:2500, US biological); **b)** con un anticuerpo monoclonal de ratón anti Bcl-2 humana (1:1000) o **c)** con un anticuerpo monoclonal de ratón anti Bax humana (1:1000) según cada experimento en PBS con BSA 0,5% (PBS-BSA). Al día siguiente se lavaron 6 veces por 5 minutos con PBS-BSA

y luego se incubaron 4 horas a 4° C en oscuridad con anticuerpos anti-IgG de conejo y de ratón acoplado a Alexa flúor 543 para detectar HO-1, Bcl-2 y Bax según correspondía .Luego de esto se lavaron 6 veces por 5 minutos en PBS-BSA y una vez en PBS, se retiró el exceso de agua, se montaron sobre porta objetos, se agregó una gota de aceite de inmersión a cada cubreobjeto y se procedió a observar con microscopio confocal (LSM META510, Carl Zeiss) con lente Plan-Apochromat 63X/1.4. Para cada inmunocalización se utilizó una apertura de 370 µm y se obtuvieron apilamientos de cortes ópticos de 0,92 µm cada uno y se proyectaron entre 9 y 10 imágenes para obtener la foto final.

4.2.8 Co-localización de HO-1, Bax y Bcl-2 con microscopía confocal. Para determinar si existe co-localización entre HO-1/Bcl-2, y HO-1/Bax frente a condiciones de estrés oxidativo mediado por hierro, células SH-SY5Y fueron sembradas sobre cubreobjetos por 5-6 días y se incubaron con o sin Fe-NTA 50 µM durante ese tiempo. El día del experimento las células se lavaron 3 veces en PBS-MC (PBS Magnesio/Calcio: PBS, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 0,1mM). Luego se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS-MC por 15 minutos. Después se lavaron 3 veces con PBS-MC y las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,2% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se bloquearon con PBS-MC más BSA 0,5% 2 veces por 5 minutos, y se incubaron durante la noche a 4° C con: **a)** un anticuerpo policlonal de conejo anti-HO1 humana (1:2500, US Biologicals) y con un anticuerpo monoclonal de ratón anti Bcl-2 humana (1:1000, R & D Systems) y **b)** con un anticuerpo policlonal de conejo anti-HO1 humana (1:2500) junto a anticuerpo monoclonal de ratón anti Bax humana (1:1000, R & D Systems), según corresponda, en PBS con BSA 0,5% (PBS-BSA). Al día siguiente se lavaron 6 veces por 5 minutos con PBS-BSA y luego se incubaron 4 horas a 4° C en oscuridad con una mezcla de anticuerpos marcados con

sondas fluorescentes: **a)** anticuerpos anti-IgG de conejo acoplado a Alexa flúor 543 para detectar HO-1 y **b)** anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a Alexa flúor 488 para detectar Bcl-2 o Bax según corresponda. Luego de esto se lavaron 6 veces por 5 minutos en PBS-BSA, para finalmente montar los cubreobjetos sobre portaobjetos a los cuáles previamente se les había agregado una gota de líquido de montaje. Se procedió a observar en el microscopio confocal (LSM META510, Carl Zeiss) con lente Plan-Apochromat 63X/1.4. Las imágenes digitales fueron exportadas al programa LSM 5 Image Browser como proyecciones de 0,92 μm cada una o como fotos individuales. Para la co-localización se utilizó un pinhole de 370 μm para un canal y pinhole 366 μm para el otro.

4.2.9 Co-inmunoprecipitación de HO-1 con Bax y Bcl-2. Se estudió la posible interacción entre HO1/Bcl-2 y HO-1/Bax. Para esto, se sembraron células SH-SY5Y en botellas de 25 cm^2 y se expusieron a distintas concentraciones de Fe-NTA (8, 15, 25, 50, 75 μM) durante 5-6 días. El día del experimento, se lavaron 2 veces con PBS Ca/Mg (PBS 1X, CaCl_2 1,3 mM, MgCl_2 1 mM) y se preparó un extracto celular con amortiguador de lisis (PBS Ca/Mg, 1% Tritón X-100, PMSF 1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas). Se incubó por 1 hora a 4° C y se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos. Al extracto de proteínas se agregó 100 μL de una solución de Proteína A-sefarosa en PBS 1:10. Se incubó por 2 horas a 4° C, luego el extracto fue centrifugado 1 minuto a 14000 rpm y se incubó con el anticuerpo precipitante anti-Bcl-2, anti-Bax o anti-HO-1 (US Biologicals) con una dilución 1:5000 durante la noche a 4° C en agitación. Luego se centrifugó 1 minuto a 14000 rpm, el sobrenadante fue eliminado, y el precipitado se resuspendió en 50 μL de Proteína A-sefarosa, y se incubó 2 horas a 4° C y 30 minutos a temperatura ambiente. El extracto fue centrifugado y lavado 2 veces con amortiguador de lisis y 2 veces con PBS Ca/Mg. Se agregó al precipitado 40

μ L de amortiguador de carga 6x y se cargó en un gel PAGE-SDS 14%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN, Perkin Elmer), la cual se bloqueó por 2 horas a temperatura ambiente con leche descremada al 5% en TBS-T 1X (Tris base 0,05 M, NaCl 0,9%, Tween 20 0,05% pH 7,6). Se inmunodetectó HO-1, Bcl-2 o Bax con anticuerpos monoclonales o policlonales según correspondía (US Biological) 1:2500 en TBS-T a 4° C ON. Al día siguiente se lavó la membrana 4 veces por 15 minutos con TBS-T y se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano 1:10000 (Pierce #31430) por 2 horas a temperatura ambiente.

6.- RESULTADOS

6.1 Niveles de Fe interno en células expuestas a Fe-NTA.

Previamente se ha descrito en células Caco-2 que la enzima HO-1 frente a un exceso de hierro es capaz de estimular su salida desde la célula para evitar el daño oxidativo que produce (Arredondo y col, 2005). Para determinar si efectivamente el hierro agregado a las células efectivamente está ingresando a ella, se cultivaron células SH-SY5Y con distintas concentraciones de Fe-NTA (8, 15, 25, 50, 75 μM) durante 5-6 días.

Se observó que al aumentar la concentración de Fe externo, la concentración de hierro interno en las células aumenta desde 0,03 a 0,09 μM Fe/mg proteína. La concentración basal de Fe presente en el medio de cultivo fue 8 μM , que corresponde a la sumatoria del hierro que contiene el SFB y el medio de cultivo. La diferencia en el contenido de Fe interno entre el valor basal y 75 μM fue significativa (Anova una vía; $F=6,99$; * $p < 0,01$) (Figura 4).

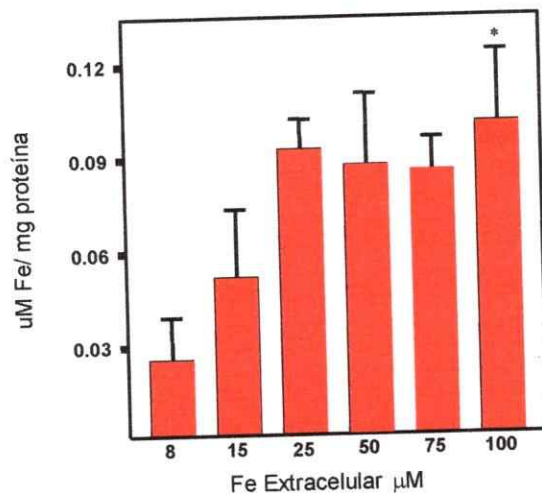


Figura 4: Contenido intracelular de Fe en células SH-SY5Y incubadas con diferentes concentraciones de Fe-NTA. A células incubadas en medio de cultivo F12:MEM, 10% SFB por 5-6 días en placas de 6 pocillos, se agregó Fe-NTA (8, 15, 25, 50, 75 μM). El día del experimento se preparó un extracto celular, se determinó concentración de proteínas y Fe total. El contenido de Fe se midió por espectrometría de absorción atómica, para ello, se incubó ON a 60° C extracto celular con 1 volumen de ácido nítrico 65%. (Valores son promedio \pm SD; n=3 determinaciones independientes, en duplicado) (Anova una vía, * p < 0.01)

6.2 Análisis de la expresión de Bcl-2, Bax y HO-1 en respuesta a un estímulo de Fe-NTA.

Estudiamos el efecto de la exposición a Fe-NTA en la expresión de los genes *bcl-2*, *bax* y *ho-1*, agregando diferentes concentraciones de Fe-NTA (15, 25, 50, 75 μM Fe) al medio de cultivo de células SH-SY5Y durante 5-6 días (utilizando como concentración basal en el medio de cultivo 8 μM Fe) y se estudió la expresión del ARNm de Bax, Bcl-2 y HO-1 mediante RT-PCR semi-cuantitativo. Los amplificados fueron cargados en geles de agarosa y visualizados en un transiluminador. Utilizamos como control de la amplificación un fragmento del gen que codifica para la proteína actina (Figura 5). Las bandas fueron analizadas densitométricamente con el programa ImageJ.

La expresión de HO-1, Bcl-2 y Bax presenta un patrón de respuesta bifásica, con un máximo de expresión a una concentración cercana a 15 μM para HO-1 y Bcl-2 y de 25 μM para Bax, luego hay una drástica disminución de la expresión de los ARNm de éstas 3 proteínas. Al realizar el análisis estadístico, se obtuvo que el cambio entre el 15 y 75 μM fue significativo (Anova una vía; $F = 5,35$; $p < 0,04$) (Figura 6).

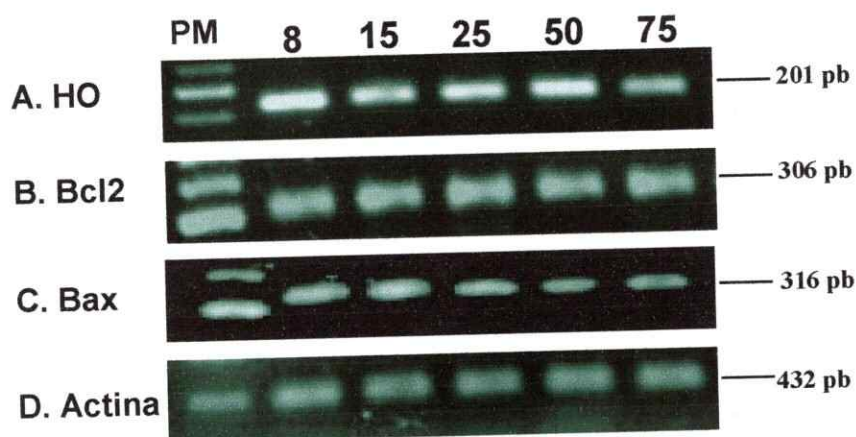


Figura 5. Imágenes representativas de electroforesis en geles de agarosa para estudiar la expresión de Bcl-2, Bax y HO-1 a nivel transcripcional. Células SH-SY5Y fueron cultivadas por 5-6 días en medio de cultivo suplementado con 8, 15, 25, 50, 75 μM , Fe-NTA. Se extrajo ARN, se realizó RT-PCR y se amplificaron las secuencias correspondientes a HO-1 (A), Bcl-2 (B) y Bax (C) y se visualizaron en geles de agarosa (2%). El tamaño de banda obtenido para HO-1 fue de aproximadamente 201 pb, para Bcl-2 de 306 pb y para Bax de 316 pb utilizando el marcador de peso molecular GeneRuler (100-3000 pb) (Fermentas). Se amplificó un fragmento del gen que codifica para actina como control (D).

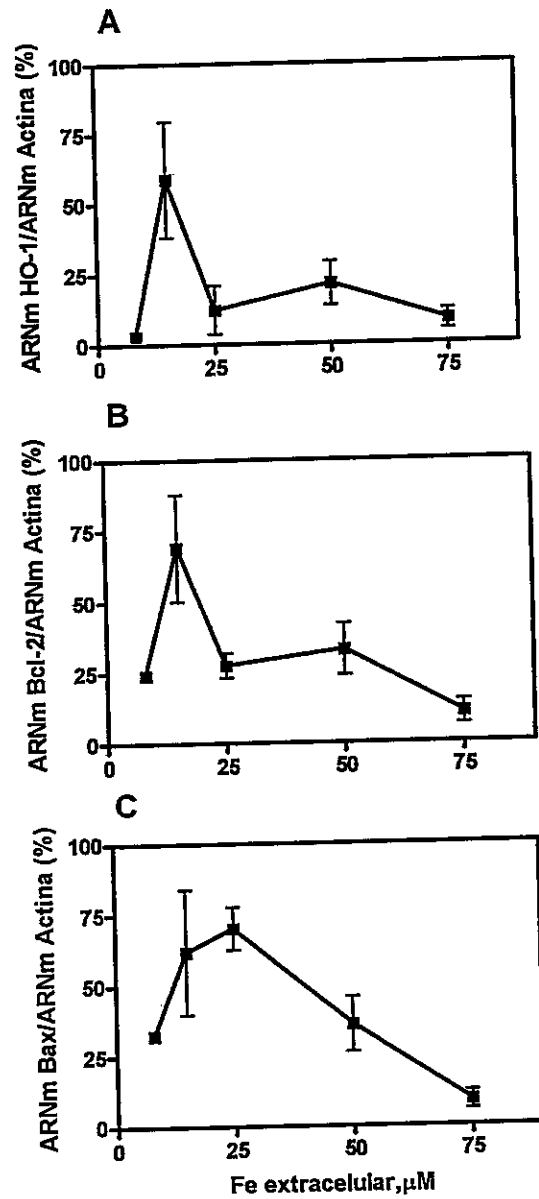


Figura 6. Análisis densitométrico de la expresión de HO-1, Bcl2 y Bax a nivel transcripcional de las imágenes de la figura 5. a) HO-1; b) Bcl-2 y c) Bax. Valores son promedio \pm DE de 6 determinaciones independientes en duplicado. (Anova una vía; $F=5,35$; $p < 0,04$).

6.3 Estudios de localización subcelular de HO-1, Bax y Bcl-2.

Ya que los resultados obtenidos muestran que existe una diferencia en la expresión de HO-1, Bax y Bcl-2 frente a estímulos dados por distintas concentraciones de hierro, decidimos estudiar la localización subcelular de cada una de las proteínas estudiadas en las células SH-SY5Y controles y expuestas a Fe-NTA 50 μ M en el medio de cultivo. Al cabo de 5-6 días las células se fijaron y permeabilizaron, para luego detectar cada una de las proteínas con el anticuerpo correspondiente según se describió en Métodos.

La localización intracelular de HO-1 en células no expuestas a Fe-NTA (Figura 7) o en aquellas incubadas con Fe-NTA (Figura 8), fue principalmente nuclear. La proteína Bcl-2, en las células controles se localizó principalmente en el citoplasma y perinuclearmente (Figura 9), sin embargo, al incubar las células con Fe-NTA, Bcl-2 se localizó principalmente en el núcleo (Figura 10). La proteína Bax, en las células controles se localizó principalmente en el núcleo (Figura 11), mientras que en las células incubadas en presencia de Fe-NTA, se localizó en todo el citoplasma (Figura 12). Observamos además que existe un cambio importante en la morfología de las células al ser sometidas a estrés oxidativo inducido por hierro. Las imágenes muestran células con morfología y distribución más representativas en cada caso.

Para determinar si la posición de estas proteínas alrededor del núcleo, corresponde a una localización mitocondrial o de retículo endoplásmico, es necesario realizar ensayos de colocalización con sondas específicas para estos organelos.

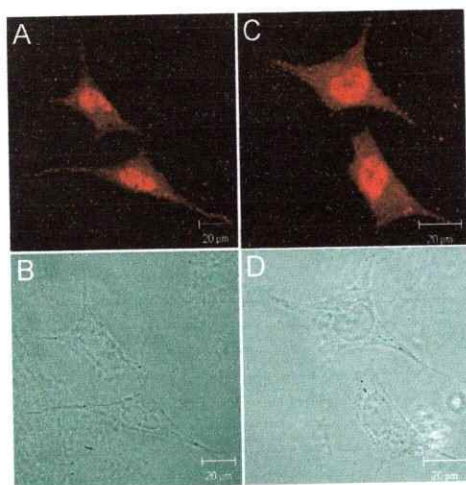


Figura 7: Inmunolocalización de HO-1 en células SH-SY5Y no-expuestas a Fe-NTA en el medio de cultivo. (n=3 experimentos independientes). **A y C: Inmunolocalización de HO-1 en células que no fueron expuestas a Fe-NTA en el medio de cultivo:** Las células fueron crecidas en medio de cultivo MEM: F12 (1:1) 10% SFB por 6 días sobre cubreobjetos. El día del experimento, las células fueron tratadas como se describe en Materiales y Métodos y luego procesadas para inmunofluorescencia con el anticuerpo policlonal de conejo anti-HO1 humana seguido de un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a Alexa flúor 543, Aumento 63X. **B y D:** contraste de fase de A y C respectivamente.

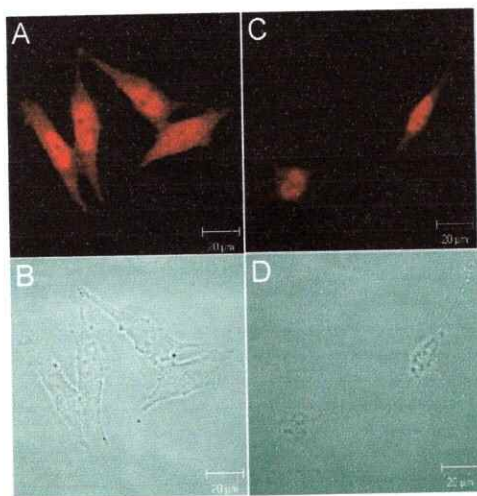


Figura 8: Inmunolocalización de HO-1 en células SH-SY5Y expuestas a Fe-NTA (50 μ M) en el medio de cultivo. (n=3 experimentos independientes). **A y C: Inmunolocalización de HO-1 en células que expuestas a Fe-NTA 50 μ M en el medio de cultivo:** Las células fueron crecidas en las mismas condiciones antes mencionadas. El día del experimento, las células fueron tratadas como se describe en Materiales y Métodos y luego procesadas para inmunofluorescencia con el anticuerpo policlonal de conejo anti-HO1 humana seguido de un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a Alexa flúor 543. Aumento 63X. **B y D:** contraste de fase de A y C respectivamente.

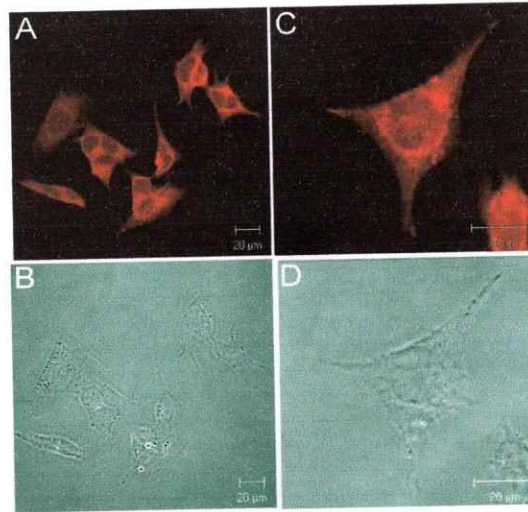


Figura 9: Inmunolocalización de Bcl-2 en células SH-SY5Y sin tratamiento de Fe-NTA en el medio de cultivo. (n = 3 experimentos independientes). **A y C: Inmunolocalización de Bcl-2 en células que no fueron expuestas a Fe-NTA en el medio de cultivo:** Las células fueron crecidas en medio de cultivo MEM: F12 (1:1) 10% SFB por 5-6 días sobre cubreobjetos. El día del experimento, las células fueron tratadas como se describe en Materiales y Métodos y luego procesadas para inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bcl-2 humana seguido de un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a Alexa flúor 543. Aumento, 63X **B y D:** contraste de fase de A y C respectivamente.

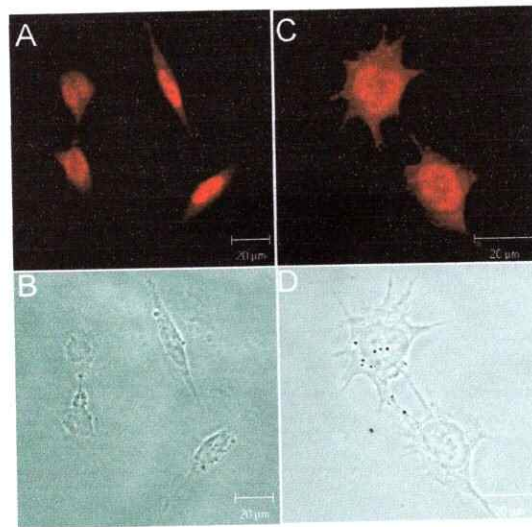


Figura 10: Inmunolocalización de Bcl-2 en células SH-SY5Y expuestas a Fe-NTA (50 μM) en el medio de cultivo. (Figura representativa de 3 experimentos independientes) **A y C: Inmunolocalización de Bcl-2 en células expuestas a 50 μM Fe-NTA en el medio de cultivo.** Las células fueron crecidas en medio de cultivo 10% SFB y 50 μM Fe-NTA por 5-6 días sobre cubreobjetos y tratadas como se describió en Materiales y Métodos y luego procesadas para inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bcl-2 humana seguido de un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a Alexa flúor 546. Aumento, 63X **B y D:** contraste de fase de A y C.

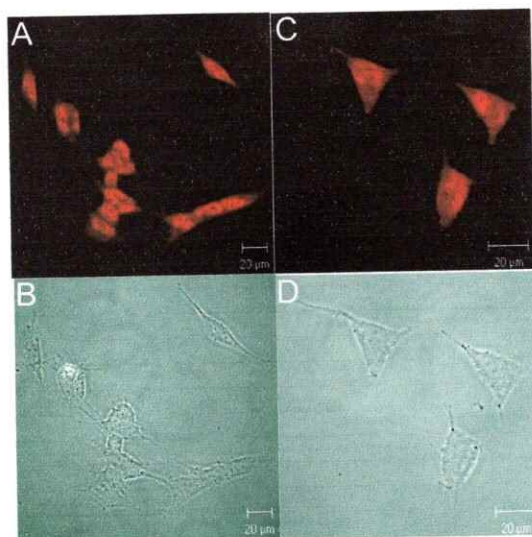


Figura 11: Inmunolocalización de Bax en células SH-SY5Y no-expuestas a Fe-NTA en el medio de cultivo. (n= 3 experimentos independientes). **A y C: Inmunolocalización de Bax en células que no fueron expuestas a Fe-NTA en el medio de cultivo:** Las células fueron crecidas en medio de cultivo MEM: F12 (1:1) 10% SFB por 5-6 días sobre cubreobjetos. El día del experimento, las células fueron tratadas como se describe en Materiales y Métodos y luego procesadas para inmunofluorescencia con el anticuerpo policlonal de conejo anti-Bax humana seguido de un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a Alexa flúor 543. Aumento, 63X **B y D:** contraste de fase de A y C respectivamente.

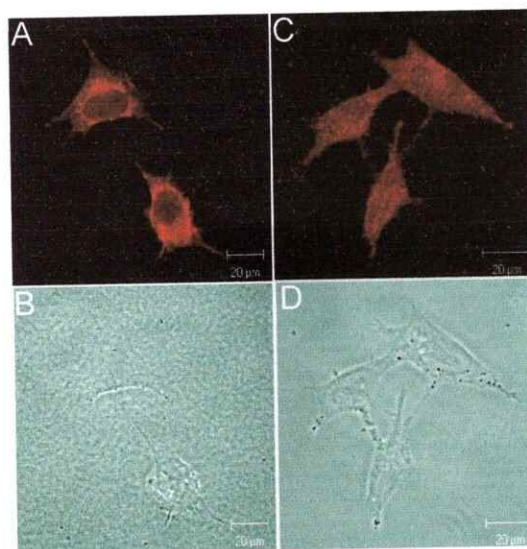


Figura 12: Inmunolocalización de Bax en células SH-SY5Y expuestas a Fe-NTA (50 μM) en el medio de cultivo. (n=3 experimentos independientes). **A y C: Inmunolocalización de Bax en células expuestas a Fe-NTA en el medio de cultivo:** Las células fueron crecidas en medio de cultivo MEM: F12 (1:1) 10% SFB por 5-6 días sobre cubreobjetos. El día del experimento, las células fueron tratadas como se describe en Materiales y Métodos y luego procesadas para inmunofluorescencia con el anticuerpo policlonal de conejo anti-Bax humana seguido de un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a Alexa flúor 543. Aumento, 63X **B y D:** contraste de fase de A y C respectivamente.

6.4 Estudios de co-localización de las proteínas HO1 y/o Bax y/o Bcl-2.

Como primera aproximación para determinar si efectivamente existe interacción entre HO-1 y Bcl-2 o Bax o ambas, se realizó co-localización de HO-1/Bcl-2 y HO-1/Bax incubando con ambos anticuerpos en células sometidas a un tratamiento de 50 μM de Fe durante 5-6 d. En células sometidas al tratamiento con hierro, se observó que la enzima HO-1 co-localiza en estructuras citosólicas tanto con Bcl-2 como con Bax. La figura 13 muestra la co-inmunolocalización de HO-1 y Bcl-2. Se observó que HO-1 (A) y Bcl-2 (C) mantienen una localización perinuclear similar en esta concentración de Fe. La co-localización (D) sugiere que estas proteínas co-localizan al incubar las células con esta concentración de Fe. Se muestra también el contraste de fase de la imagen (B)

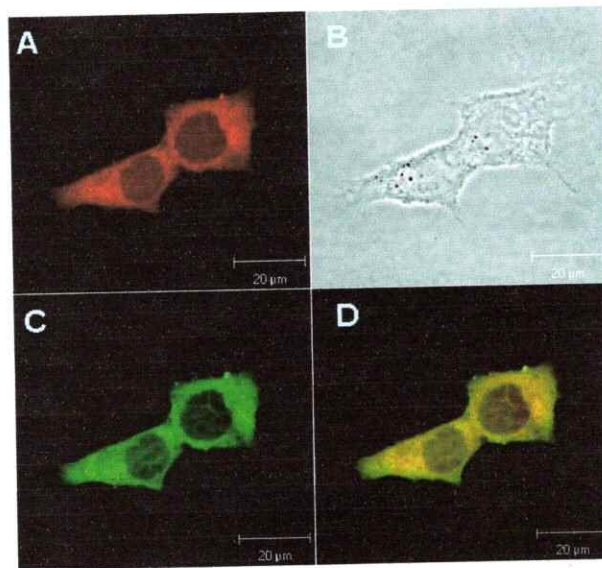


Figura 13: Co-inmunolocalización de la enzima HO-1 con la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Células SH-SY5Y fueron cultivadas por 5-6 días en medio de cultivo F12: MEM (1:1), 10% SFB sobre cubreobjetos. Al segundo día de cultivo se agregó Fe-NTA 50 μM , el cual se mantuvo en el medio hasta el día del experimento. Después de ser fijadas y posteriormente lavadas, las células fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo anti-HO1 humana (A) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bcl-2 humana (C) durante 14 horas, luego incubadas con una mezcla de anticuerpos secundarios fluorescentes; anticuerpo anti-IgG Alexa 488 de ratón para detectar Bcl-2 y anticuerpo anti-IgG de conejo Alexa 546 para la detección de HO-1. Se observa co-inmunolocalización de ambas proteínas (D). (B) Contraste de fase de la imagen.

La figura 14 muestra la co-inmunolocalización de HO-1 y Bax. Se observó que tanto HO-1 (**A**) como Bax (**C**) mantienen una localización perinuclear en esta concentración de Fe. La imagen sugiere que bajo estas condiciones, estas proteínas podrían co-localizar (**D**). Contraste de fase de la imagen (**B**)

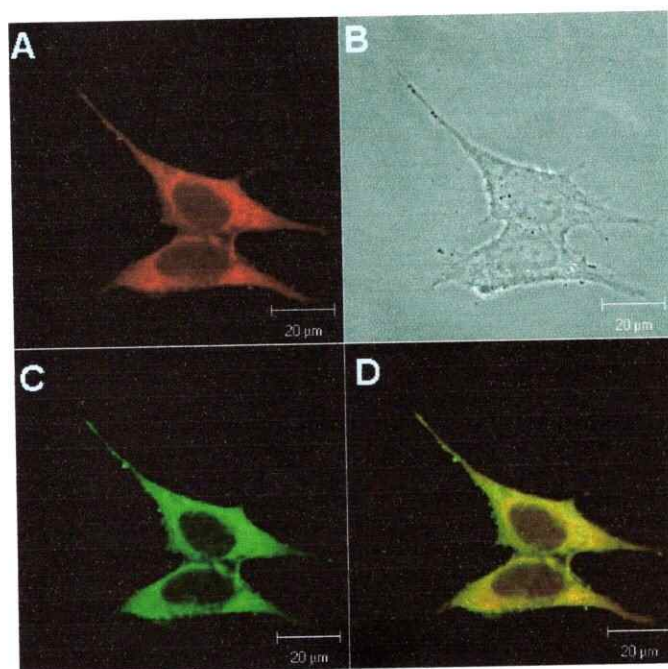


Figura 14: Co-inmunolocalización de la enzima HO-1 con la proteína pro-apoptótica Bax. Células SH-SY5Y fueron cultivadas por 5-6 días en medio de cultivo sobre cubreobjetos. Al segundo día de cultivo se agregó Fe-NTA 50 μ M, el que se mantuvo en el medio hasta el día del experimento. Se procedió como se describe en materiales y métodos. Después de ser fijadas y posteriormente lavadas, las células fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo anti-HO1 humana (**A**) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bax humana (**C**) durante 14 horas. Luego se incubaron con una mezcla de anticuerpos secundarios fluorescentes; anticuerpo anti-IgG de ratón Alexa 488 para detectar Bax y anticuerpo anti-IgG de conejo Alexa 546 para la detección de HO-1, se observa co-inmunolocalización de ambas proteínas (**D**). (**B**) Contraste de fase de la imagen.

6.5 Estudios de co-inmunoprecipitación de las proteínas HO-1 y/o Bax y/o

Bcl-2.

Para comprobar si realmente existe interacción entre HO-1 con Bax y/o Bcl-2, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación entre HO-1/Bcl-2 y entre HO-1/Bax. Para esto, se cultivaron células SH-SY5Y en medio con Fe-NTA por 5-6 días, al cabo de los cuales se realizó un extracto celular, al cual se agregó anticuerpo policlonal de conejo anti-HO1 (anticuerpo precipitante) y se incubó con proteína A-Sefarosa durante 14 horas. Luego de lavar y eluir las proteínas, se separaron por electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida al 12%. Finalmente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se incubó con anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bax o anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bcl-2 según corresponde y luego con los anticuerpos secundarios correspondientes, y se detectó la proteína Bax, o Bcl-2 mediante autoradiografía. La figura 15A muestra el resultado obtenido de la co-inmunoprecipitación Bcl-2/HO-1, en la cual se utilizó anti-HO-1 como anticuerpo precipitante y anti-Bcl-2 como anticuerpo de detección. Se observa la banda que corresponde a la cadena pesada de IgG, de peso molecular aparente de 50 KDa, y la banda de aproximadamente 26 KDa correspondiente a Bcl-2. En la Figura 15B se observa el resultado obtenido de la co-inmunoprecipitación Bax /HO-1, en la cual se utilizó anti-HO1 como anticuerpo precipitante y anti-Bax como anticuerpo de detección. Se observa la banda que corresponde a la cadena pesada de la IgG, pero no es posible la detección de Bax en éste experimento.

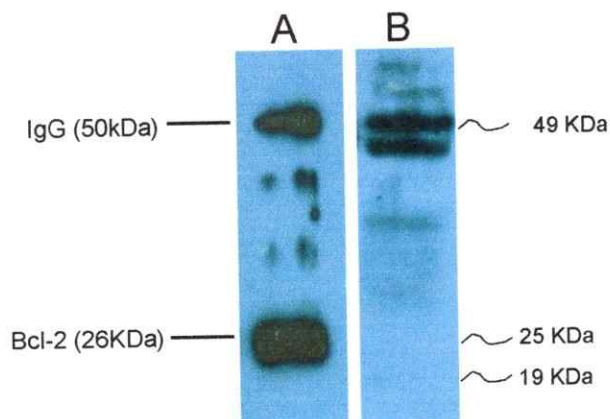


Figura 15. Co-inmunoprecipitación de HO-1 con Bcl-2 y Bax. Células SH-SY5Y fueron cultivadas por 5-6 días en medio F12: MEM (1:1) 10% SFB. Se cultivaron células sin y con Fe-NTA 75 μ M y 150 μ M. El día del experimento se preparó un extracto celular y se procedió como se describe en materiales y métodos. Como se observa en la figura, es posible detectar HO-1 utilizando un anticuerpo anti- Bcl.2 humana, lo cual no ocurre al utilizar anti- Bax humano como anticuerpo de detección. **A. Co-inmunoprecipitación HO-1/Bcl-2:** HO-1 fue precipitada con un anticuerpo anti-HO-1 y Proteína A-seferosa. El precipitado fue separado por SDS-PAGE al 12%, la membrana fue incubada con anti-Bcl-2, y luego con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplada a peroxidasa de rábano. Luego de revelar se observaron dos bandas; una de aproximadamente 50 KDa que corresponde a la IgG del anticuerpo secundario, y una de aproximadamente 26 KDa que corresponde a Bcl-2. **B. Co-inmunoprecipitación HO-1/Bax:** HO-1 fue precipitada con un anticuerpo anti-HO1 y Proteína A-seferosa. El precipitado fue separado por SDS-PAGE al 12%, la membrana fue incubada con un anticuerpo anti-Bax, y luego con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplada a peroxidasa de rábano. Luego de revelar se observó sólo la banda correspondiente a la cadena pesada de la IgG de 50 KDa

6. DISCUSIÓN

En la presente tesis se estudió la posible interacción entre la enzima HO-1 y las proteínas Bcl-2 y Bax, que juegan un rol clave en la apoptosis. Para esto se determinó la expresión de éstas proteínas al ser expuestas a distintas concentraciones de hierro metálico que participa como inductor de estrés oxidativo. Se estudiaron, además, los niveles de hierro interno en células SH-SY5Y expuestas a esas condiciones, la redistribución de éstas proteínas frente a estímulos de hierro, la co-localización de éstas proteínas y la posible interacción entre ellas mediante experimentos de microscopía y co-inmunoprecipitación. Los resultados obtenidos se discuten a continuación.

6.1 Determinación de contenido de hierro interno en células SH-SY5Y.

Al determinar el contenido de hierro interno en células SH-SY5Y al ser sometidas a diferentes concentraciones de Fe-NTA se observó que a medida que aumenta la concentración de hierro en el medio de cultivo, aumenta la concentración de hierro intracelular hasta llegar a una saturación (Figura 4). Si bien este resultado no es nuevo, ya que se ha reportado tanto en células Caco-2 (Arredondo y col., 2005) como en células SH-SY5Y (Aguirre y col., 2005), era importante para nosotros determinar que efectivamente el hierro administrado en el medio de cultivo fue internalizado y así utilizado como un agente inductor de estrés oxidativo. En este aspecto, experimentos de Aguirre y col., (2007) demostraron que en células SH-SY5Y sometidas a concentraciones crecientes de Fe se produce un incremento en el estrés

oxidativo, el cual llega a una saturación debido a que las células desarrollan procesos adaptativos que permiten aumentar las defensas antioxidantes frente a tal estrés.

6.2 Expresión de Bcl-2, Bax y HO-1 en respuesta a un estímulo de Fe-NTA.

Al incubar las células SH-SY5Y con concentraciones crecientes de Fe-NTA se observó un patrón bifásico de cambio en la expresión de estos genes. En el rango 8-15 μM Fe, hay un incremento en la expresión de HO-1 y Bcl-2, posiblemente debido a que las células han activado mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo. Sin embargo, frente a un incremento mayor en los niveles de Fe extracelular, aumenta notablemente el estrés oxidativo (Aguirre et al., 2005). Es posible que el aumento de estrés genere una respuesta pro-apoptótica puesto que la célula no es capaz de neutralizar este incremento, lo cual se ve reflejado en la drástica disminución de la expresión de los ARNm de ambas proteínas (Figuras 6A, 6B). Con respecto al cambio en la expresión de Bax (6C), observamos un incremento en su expresión en el rango 8-25 μM debido al estrés oxidativo al que están expuestas las células, a esas concentraciones su expresión es máxima pues se estaría desencadenando la apoptosis; a concentraciones mayores se observa una disminución drástica de su expresión que ocurre por una disminución de la viabilidad celular y a que posiblemente a esas concentraciones ya se ha gatillado la apoptosis.

Este comportamiento bifásico ha sido reportado para glutatión, la principal molécula antioxidante en la célula (Núñez y col., 2004). Células SH-SY5Y sometidas a concentraciones crecientes de Fe (10-80 μM) muestran una disminución en la viabilidad celular y un patrón bifásico de cambio de glutatión de una manera similar al cambio de expresión observado para HO-1 y Bcl-2, ambas proteínas con funciones citoprotectoras, posiblemente porque frente a tal estrés, las defensas antioxidantes no

son capaces de revertir el ambiente oxidante generado en la célula producto de la exposición a Fe (Núñez y col., 2004).

Resultados previos de nuestro laboratorio, mostraron un aumento en la expresión de HO-1 frente a un estímulo de Fe hemínico en células tipo epitelio intestinal Caco-2 como un mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo. Frente a altas concentraciones de Fe hemínico, ésta enzima es capaz de degradar el grupo hem y sacar el Fe de la célula por un mecanismo molecular aún no completamente dilucidado (Arredondo y col 2005).

El hierro es un metal que está presente en la estructura de muchas enzimas y proteínas celulares. En el cerebro, la importancia que tiene el hierro para su funcionamiento se refleja en la presencia de receptores de transferrina en las células capilares endoteliales cerebrales. El transporte de hierro hacia el cerebro es regulado de manera que en condiciones de altas concentraciones de hierro, las células capilares endoteliales disminuyen la tasa de extracción de hierro, aunque los mecanismos por los que ocurre ésta "extracción" y como el hierro es transportado a través de las barreras propias del cerebro o llevado hacia el espacio extracelular cerebral aun es desconocido (Moos., 2002).

El rol citoprotector de HO-1 viene dado por su capacidad de sacar Fe de la célula, al degradar el grupo hem del citocromo C (Kutty y Maines, 1982) o indirectamente porque se ha demostrado que la bilirrubina – que se genera a partir de la biliverdina producida durante la degradación del grupo hem- tiene un efecto inhibitor en la fosforilación de proteínas, e inhibe a la proteína kinasa C, proteína kinasa A y a proteínas quinasas dependientes de AMP cíclico (Kwak y col., 1991), las cuales mientras están activadas regulan la cascada de enzimas que participan en la muerte celular programada (Panahian y col., 1999) entre otras funciones. Dadas las

características citoprotectoras que confiere la HO-1, se esperaba un incremento de su expresión a medida que aumenta la concentración de Fe extracelular, posiblemente hasta un punto en que el ambiente sea tan oxidante que se inhiba su función. Nuestro resultado, una fuerte expresión de HO-1 a concentraciones en el rango 8- 15 μM y luego una disminución drástica, puede ser explicado por: i) La respuesta de HO-1 frente a estrés oxidativo ocurre en el rango 8-15 μM de Fe, a concentraciones mayores de Fe, HO-1 no es capaz de proteger a las células de éste ambiente oxidante, lo que se refleja en una disminución en la viabilidad celular a esas concentraciones de Fe. ii) que las células de neuroblastoma presentarían un mecanismo de manejo más eficiente del Fe, específicamente del sistema IRE/IRP antes mencionado, con lo cual el Fe presente en la célula no es capaz de inducir la expresión de HO-1.

En células SH-SY5Y que han recibido tratamiento de Fe-NTA, se ha observado que existe una parte de la población que sobrevive al tratamiento, en las cuales la expresión del transportador de metales divalentes DMT-1 disminuye, y se produce un aumento en los niveles de Fn y un aumento en la expresión de IREG1, transportador de salida de Fe que se encuentra principalmente en enterocitos, regulando su salida durante el proceso de absorción intestinal (Aguirre y col., 2005). Entonces, al aumentar el almacenaje de hierro en la célula (en Fn), la salida de hierro de ésta (aumento en la expresión de IREG 1) y disminuir la entrada de hierro (al disminuir expresión de DMT-1) disminuiría el estrés oxidativo en la célula. Si bien es cierto que HO-1 es una enzima inducible por estrés y por Fe hemínico, pareciera no ser entonces inducible por Fe-NTA y por lo tanto es comprensible una disminución en su transcripción frente a una sobre-respuesta del sistema de regulación de entrada de Fe a la célula.

6.3 Estudios de localización y co-localización subcelular de HO-1, Bax y Bcl-2.

Al incubar células SH-SY5Y con 50 μ M de Fe-NTA no se observó un cambio en la localización subcelular de la HO-1 en comparación con células controles cultivadas en condiciones basales (8 μ M Fe) (Figuras 7 y 8). Este resultado difiere de resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, donde se observó que en células Caco-2 sin tratamiento de hierro hemínico, HO-1 se localizó preferentemente perinuclear, y en las células expuestas a Fe, se localizó preferentemente cercana a la membrana celular. En nuestro estudio, en ambas condiciones se observó que la proteína HO-1 se dispone de forma nuclear en la célula. Se ha descrito que ésta enzima se encuentra anclada a la membrana del retículo endoplásmico, y frente a estrés oxidativo, se transloca al núcleo para activar factores de transcripción de genes relacionados con la respuesta anti oxidante de la célula (Lin y col., 2007). Con respecto a esto, esperaríamos que en las células control la disposición de HO-1 sea más bien perinuclear.

Por otro lado, la localización intracelular de Bcl-2 (Figuras 9 y 10) cambia por efecto del tratamiento con Fe, desde una localización perinuclear, a una posición nuclear o mucho más próxima al núcleo, éste resultado es consistente con antecedentes que indican que frente al inicio del proceso apoptótico, Bcl-2 cambia su localización citoplasmática y se ubica próxima a mitocondrias para así interactuar con Bax y bloquear su oligomerización y posterior inserción en la membrana mitocondrial externa (Kowaltowski y col., 2000). Este cambio en la localización de Bcl-2, podría facilitar una posible co-localización con HO-1, que en condiciones de estrés oxidativo se transloca al núcleo, y es capaz de activar factores de transcripción relevantes en estrés oxidativo, como AP-1, AP-2, entre otros (Lin y col., 2007)

Algo muy distinto ocurre con Bax (Figuras 11 y 12), que en las células control se localiza preferentemente en el núcleo y frente al aumento en la concentración de Fe cambia su distribución hacia una forma perinuclear. Esta proteína se encuentra normalmente en el citoplasma, próxima a las mitocondrias. Frente a estrés oxidativo, se transloca hacia la membrana externa mitocondrial, se inserta y produce la salida del citocromo C desde allí. Esto no se puede apreciar en las fotografías ya que se encuentran en un plano 2D. Al observar el eje z utilizando el programa LSM 5 Image Browser, observamos que se mantiene la misma distribución. Pensamos que sería adecuado repetir éste experimento utilizando además marcadores mitocondriales.

Al estudiar si efectivamente existe co-localización de HO-1 y Bcl-2 (Figura 13), vemos que ambas proteínas se localizan en el citosol, aunque ya se había observado una localización principalmente nuclear de Bcl-2 a esa concentración de Fe. Esto podría deberse a que por razones desconocidas estas células no estaban estresadas oxidativamente y por lo tanto no hubo cambio en la localización de Bcl-2 con respecto a las células control. Antecedentes de Kim y col (2004) indican que en células de fibroblastos de ratón, Bcl-2 se encuentra asociada tanto a la membrana externa mitocondrial, como a la membrana de Retículo Endoplásmico. Este resultado es consistente con experimentos de Edlich y col (2005) que muestran en células SH-SY5Y una distribución subcelular similar. La forma estrellada de las células de la Figura 14, propia de células no estresadas, apoya la idea de carencia de estrés oxidativo. Por otro lado, HO-1 debería encontrarse en el núcleo, según nuestros resultados anteriores, lo cual no ocurre, posiblemente por que las células no se encuentran estresadas –como se mencionó anteriormente– y por lo tanto no se ha propiciado el cambio de localización subcelular de HO-1. En literatura existen antecedentes contradictorios sobre la localización de ésta proteína, mientras que Lin y col., (2007) proponen que

HO-1 se localiza anclada a la membrana de Retículo Endoplásmico Liso en el linaje celular HEK293. Por otro lado, Oates & West (2007) obtienen resultados poco concluyentes acerca de la localización subcelular de HO-1 en enterocitos, ya que observan células con disposición citoplasmática, perinuclear y nuclear de ésta proteína. En vista de estos antecedentes y nuestros resultados, nos es imposible concluir con certeza que exista colocalización entre HO-1 y Bcl-2. Es necesario entonces realizar estudios que nos permitan determinar el posible locus de interacción entre éstas proteínas y su implicancia en la apoptosis.

Con éstos experimentos observamos que existe un evidente cambio en la morfología de éstas células al ser sometidas a estrés oxidativo. En todas las células que recibieron el tratamiento de Fe-NTA, se observó un cambio en la morfología, desde una forma estrellada y con prolongaciones muy similares a los procesos de células neuronales a una forma alargada, fusiforme. Esto es debido a que durante el proceso apoptótico ocurre una reorganización de los filamentos de actina, probablemente mediada por la acción de las proteínas Pak (P-21 activated kinase 2) y SLK (Ste20-related kinase) (Hacker G., 2000), y además del clivaje de proteínas como laminina A, que forma parte del esqueleto celular (Fan y col., 2007).

6.4 Estudios de co-inmunoprecipitación de las proteínas HO-1/Bax y HO-1/Bcl-2.

Para determinar la posible interacción entre HO-1 y/o Bax y Bcl-2 se realizaron estudios de co-inmunoprecipitación de HO-1/Bcl-2 y HO-1/Bax, incubando las células con 75 μM de Fe y 150 μM de Fe y se utilizaron células control incubadas solamente con medio basal. Para la co-inmunoprecipitación HO-1/Bcl-2, se observó que utilizando como anticuerpo de detección anti-Bcl-2, es posible detectar la proteína Bcl-2 en el

precipitado realizado con el anticuerpo anti-HO-1 a una concentración de Fe de 75 μ M (Figura 15). A una concentración de 150 μ M de Fe no fue posible determinar co-inmunoprecipitación de éstas proteínas (datos no mostrados). Este resultado, junto a la inmunolocalización, sugiere que frente a estrés oxidativo, podría existir una interacción entre ambas proteínas. Sin embargo, nuestros resultados no nos permiten determinar cual es el rol fisiológico de esta interacción y su implicancia en el proceso de apoptosis.

No fue posible detectar una co-inmunoprecipitación entre Bax y HO-1 utilizando anti HO-1 como anticuerpo de detección, por lo cual, a pesar de su aparente co-localización en la célula, por lo que no se puede afirmar una posible interacción entre ambas proteínas. Una explicación posible para la co-localización entre HO-1 y Bax, es que Bax co-localizaría con HO-1, debido a que ésta interactuaría con Bcl-2. Como se ha descrito, Bcl-2 interactúa con Bax previniendo su oligomerización y posterior inserción en la membrana externa mitocondrial durante la apoptosis. Sin embargo, son necesarios otros experimentos para apoyar esta hipótesis, como por ejemplo, curvas de viabilidad y medición de actividad de caspasas. Frente a los resultados obtenidos en la coimmunoprecipitación, se sugiere una posible interacción entre las proteínas HO-1 y Bcl-2 frente a estrés oxidativo mediado por Fe.

Frente a los resultados obtenidos en ésta tesis, es posible proponer un modelo que nos permita entender cuál es la relación que existe entre las proteínas HO-1, Bcl-2 y Bax (Figura 16). En condiciones fisiológicas, Bax y Bcl-2 se encuentran en el citosol, próximas a la mitocondria, mientras que HO-1 se encuentra próxima al núcleo, probablemente anclada al Retículo Endoplásmico Liso. Frente a estrés oxidativo mediado por hierro, Bcl-2 se traslada hacia la mitocondria e interactúa con Bax para impedir su oligomerización y posterior inserción en la membrana mitocondrial. HO-1, al

interactuar con Bcl-2, podría debilitar la interacción Bcl-2/Bax, ya sea porque Bcl-2 sufre un cambio conformacional producto de ésta interacción, o debido a un impedimento estérico de HO-1 que impide que Bcl-2 ejerza su acción eficazmente. Si esto ocurre, la interacción HO-1/BCL-2 sería parte del desencadenamiento del proceso apoptótico.

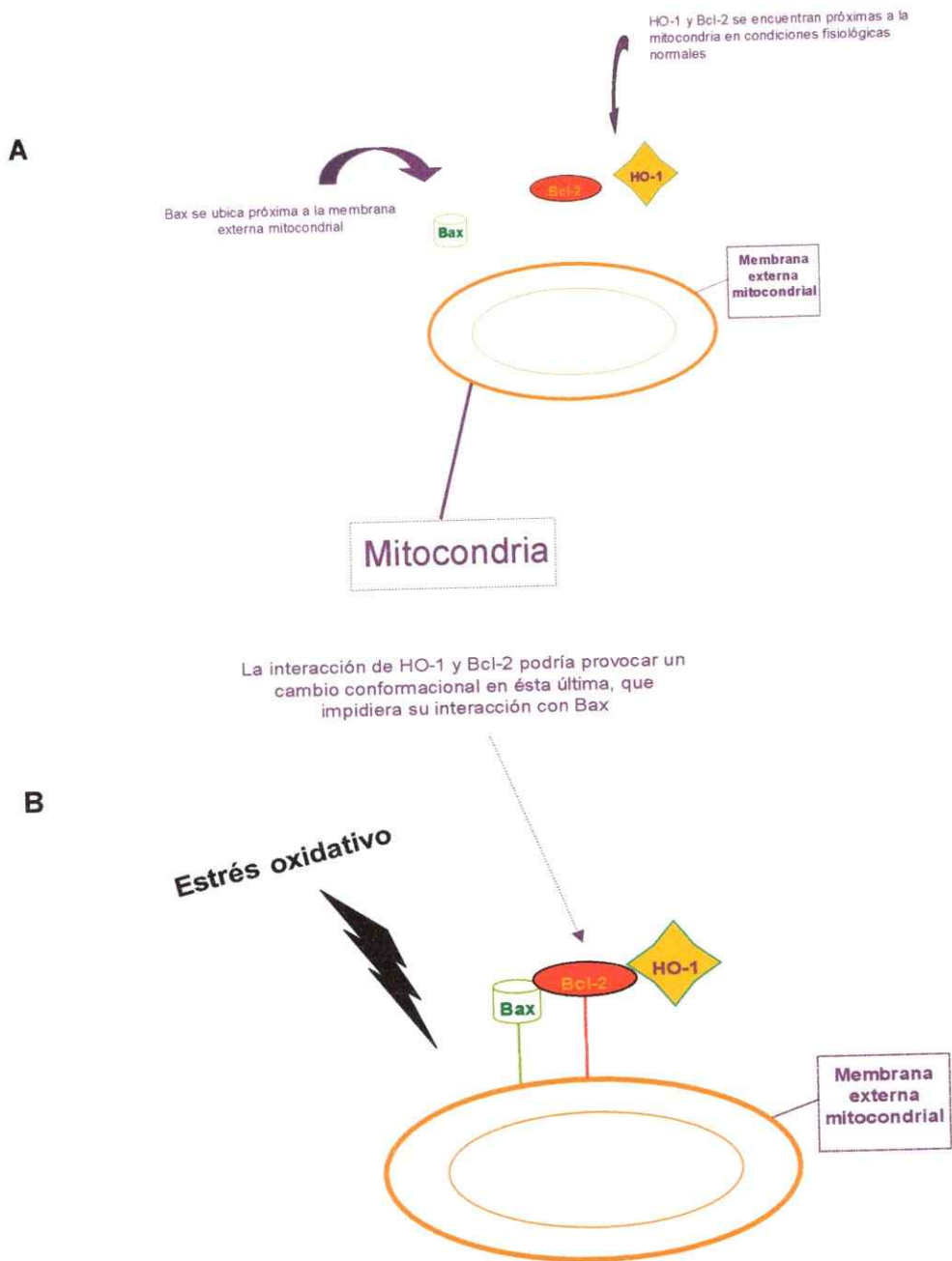


Figura 16. Modelo explicativo de la interacción entre la enzima HO-1 y las proteínas Bcl-2 y Bax.

- A. En condiciones fisiológicas, las proteínas se encuentran en la región perinuclear/mitocondrial próximas entre sí.
- B. Al someter a células SH-SY5Y a estrés oxidativo mediado por hierro, HO-1 interactúa con Bcl-2, posiblemente cambiando su conformación y debilitando la interacción de ésta con Bax, o evitando ésta interacción mediante impedimento estérico.

7.- CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

Los resultados obtenidos en este Seminario de Título indican que:

- 1) Incrementos en el hierro intracelular induce una respuesta en la expresión de las proteínas HO-1, Bcl-2 y Bax
- 2) Incrementos en el hierro intracelular induce el cambio desde una localización citosólica a una localización nuclear de las proteínas HO-1 y Bcl-2, pero no de la proteína Bax
- 3) Cuando las células SH-SY5Y son sometidas a estrés oxidativo mediado por hierro aparentemente se induce una interacción molecular entre HO-1 y Bcl-2.
- 4) Es posible que el papel de HO-1 en la apoptosis está relacionado con la interacción con la proteína anti-apoptótica Bcl-2.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, N.G. (1995) Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effects against heme and hemoglobin toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 6798-6802.

Adams, J.M. & Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cellular survival. *Science*, 281: 1322-1326.

Aguirre P, Mena N, Tapia V, Arredondo M, Nuñez M. (2005) Iron homeostasis in neuronal cells: a role for Ireg 1. *BMC Neuroscience*, 6:3.

Behl C. (2000) Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 107: 1325-1344.

Bodles AM, Guthrie DJ, Greer B, Irvine GB. (2001) Identification of the region of non-Abeta component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity. *J Neurochem*, 78: 384-395.

Boldin M, Varfolomeev E, Pancer Z, Mett I, Camonis J, Wallach D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *JBC*. Vol 270. N° 14. pp 7795-7798

Carraway M, Ghio A, Tylor J. and Piantadosi, C. (1998) Induction of ferritin and heme oxygenase-1 by endotoxin in the lung. *Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol)*, 275: L583-L592.

Carraway M, Ghio A, Carter J and Piantadosi C. (2000) Expression of heme oxygenase 1 in the lung in chronic hypoxia. *Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol)*, 287: L806-L812.

Celec P, Prihodova M. (2003) Pathogenesis of Alzheimer's disease and the role of heme oxygenase. *Folia Neuropathol*, 41: 155-160.

Cisternas F, Tapia G, Arredondo M, Cartier-Ugarte D, Romanque P, Sierralta W, Vial M, Videla L, Araya M. (2005) Early histological and functional effects of chronic copper exposure in rat liver. *BioMetals*, 18: 541-551.

Danial N, Korsmeyer S. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, Vol. 116, 205–219.

Datta P, and Lianos E. (1999) Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. *Kidney Int*, 55: 1734-1739.

Eisenstein R, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Munro H. (1991) Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc Natl Acad Sci USA*. Febrero 1; 88(3): 688–692.

Eisenstein RS. (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr*, 20: 627–662.

Edlich F, Weiwad M, Erdmann F, Fanghanel J, Jarczowski F, Rahfeld J, Fischer G. (2005) .Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca^{2+} /calmodulin. *The EMBO Journal*. 24, 2688–2699

Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, Martinoy JC. (1998) Bax- induced Cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg^{+2} ions. *J Cell Biol*, 143: 217-224.

Eyssen-Hernandez R, Ladoux A and Frelin C. (1996) Differential regulation of cardiac heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor RNAm expressions by hemin, heavy metals, heat shock and anoxia. *FEBS Lett*, 382: 229-233.

Fan T, Han L, Cong R, Liang J. (2005) Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37: 719-727.

Greenslade FC, Newquist KL. (1978) In vitro measurement of the beta-adrenergic blocking properties of ORF 12592, the 5-hydroxy analog propranolol. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 233: 270-280.

Gross A, McDonnell J, Korsmeyer S. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 13: 1899-1911.

Hacker G. (2000) The morphology of apoptosis. *Cell tissues Res*, 301: 5-17.

Jankovic T. (2004) Neurodegenerative disease and iron storage in the brain. *Curr Opin Neurol*, 17: 437-42.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basis biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257

Kim P, Annis M, Dlugosz P, Leber B, Andrews D. (2005) During Apoptosis Bcl-2 Changes Membrane Topology at Both the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria. *Molecular Cell*, Vol. 14, 523-529.

Kowaltowski A, Vercesi A, Fiskum G. (2000). Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. *Cell Death and Differentiation*. N°7, 903 - 910

Keyse S. and Tyrrel R. (1989) Heme oxygenase is the major 32 kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *PNAS* 86: 99-103.

Kitamuro, T, Takahashi K, Ogawa K, Uono-Fujimori R, Takeda K, Furuyama K, Nakayama M, Sun J, Fujita H, Hida W, Hattori T, Shirato K, Igarashi K and Shibahara S. (2003) Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *J Biol Chem*, 278: 9125-9133.

Kutty RK, Kutty G, Rodriguez IR, Chader GJ and Wiggert B. (1994) Chromosomal localization of the human heme oxygenase genes: heme oxygenase-1 (HMOX1) maps to chromosome 22q12 and heme oxygenase-2 (HMOX2) maps to chromosome 16p13.3. *Genomics*, 20: 513-516.

Kwak J, Takeshige K, Cheung B, Minakami S. (1991) Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. *Biochim Biophys Acta*, 1076: 369-73.

Lavrovsky Y, Schwarzman M, Levere R, Kappas A, Abraham N. (1994) Identification of binding sites for transcription factors NF- κ B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *PNAS*, 91: 5987-5991.

Lee GR, Nacht S, Lukens JN, Cartwright GE. (1968) Iron metabolism in copper-deficient swine. *J Clin Invest*, 47: 2058-2069.

Lin Q, Weis S, Yang G, Weng Y, Helston R, Rish K, Smith A, Bordner J, Polte T, Gaunitz F, Dennery P. (2007). Heme Oxygenase -1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *JBC* (En prensa) <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M607954200>

Lowe S, Lin A. (2000) Apoptosis in Cancer. *Carcinogenesis*, 21: 485-495.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent *J Biol Chem*; 193:265-75.

Maeshima H, Sato M, Ishikawa K, Katagata Y. and Yoshida T. (1996) Participation of altered upstream stimulatory factor in the induction of rat heme oxygenase 1 by cadmium. *Nucleic Acids Res*, 24: 2959-2965.

Maines M, Trakshel G, Kutty R. (1986) Characterization of Two Constitutive Forms of Rat Liver Microsomal Heme Oxygenase. *J Biol Cell*, 261: 411-419.

McCoubrey W, Huang J, Maines M. (1997). Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem*, 247: 725-732

Martini L, Tchack L and Wood R. (2002) Iron treatment downregulates DMT1 and IREG1 mRNA expression in Caco-2 cells. *J Nutr*, 132: 693-696

McCoubrey WK, Huang TJ and Mines MD. (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemo-protein heme oxygenase 3. *Eur J Biochem*, 247: 725-732.

Meio L, Agrawal R, Zhang L, Rezvani M, Mangi A, Ehsan A, Griese D, Dell'Acqua G, Mann M, Oyama J, Yet S, Layne M, Perrilla M, Dzau V. (2002) Gene Therapy Strategy for Long-Term Myocardial Protection Using Adeno-Associated Virus-Mediated Delivery of Heme Oxygenase Gene. *Circulation*, 105: 602-607.

Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek D, Dong Z, Venkatalacham M, Saikumar. (2001) Bcl-2 prevents Bax Oligomerization in the Mitochondrial Outer membrane. *J Biol Chem*, 276: 18361-18374.

Miret S, Simpson R, McKie A. (2003) Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu Rev Nutr*, 23: 283-301

Moos T. (2002) Brain iron homeostasis. *Dan Med Bull*, 49: 279-301.

Motohashi H, Shavit J, Igarashi K, Yamamoto M, Engel J. (1997) *Nucleic Acids Research*, 25: 2953-2959.

Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M. and Lock RB. (2000) Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ*, 7: 102-11.

Núñez M, Gallardo V, Muñoz P, Tapia V, Esparza A, Salazar J, Speisky H. (2004) Progressive iron accumulation induces a biphasic change in the glutathione content of neuroblastoma cells. *Free Rad Biol & Med* 37:953-960

Oates P, West A. (2007). Subcellular location of heme oxygenase 1 and 2 and divalent metal transporter 1 in relation to endocytotic markers during heme iron absorption. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Online Early Articles)*. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.05047.x

Ossola J. and Tomaro M. (1998) Heme oxygenase induction by UVA radiation. A response to oxidative stress in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 30: 285-292.

Otterbein L, Chin B, Otterbein S, Lowe V, Fessler H, Choi A. (1997) Mechanism of hemoglobin-induced protection against endotoxemia in rats: a ferritin-independent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 272: L268-L275

Panahian N, Yoshiura M, Maines M. (1999) Overexpression of heme oxygenase 1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J Neurochem*, 72: 1187-203.

Poss K. and Tonegawa S. (1997) Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *PNAS* 94: 10919-10924.

Quinlan G, Chen Y, Evans T, Gutteridge J. (2001) Iron signalling regulated directly and through oxygen: implications for sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Clin Sci (Lond)*, 100: 169-182

Rizzardini M, Terao M, Falciani F, Cantoni L. (1993) Cytokine induction of haem oxygenase RNAm in mouse liver: Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase gene. *Biochem J*, 290: 343-347.

Rizzardini M, Zappone M, Villa P, Gnocchi P, Sironi M, Diomedea L, Meazza C, Monshouwer M and Cantoni L. (1998) Kupffer cell depletion partially prevents hepatic heme oxygenase 1 messenger RNA accumulation in systemic inflammation in mice: role of interleukin 1beta. *Hepatology*, 27: 703-710.

Roshal M, Zhu Y, Planelles V. (2001) Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 6: 103-16.

Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. (1983) *J Natl Cancer Inst.* ;71:741-747

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli K, Debatin K, Krammer P, Peter M. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal* Vol.17 No.6 pp.1675-1687,

Shangary S, Jonson D. (2002) Peptides Derived from BH3 Domains of Bcl-2 Family Members: A Comparative Analysis of Inhibition of Bcl-2, Bcl-xL and Bax Oligomerization, Induction of Cytochrome c Release, and Activation of Cell Death. *Biochemistry*, 41: 9485 -9495.

Shibahara S, Muller R. and Taguchi H. (1987) Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem*, 262: 12889-12892.

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh A, Glazer A, Ames B. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235: 1043-1046.

Stewart A. (1998) Alzheimer's disease: a review of current economic perspectives. *Ageing & Society*, 18: 585-600.

Takeda A, Perry G, Abraham N, Dwyer B, Kutty R, Laitinen J, Petersen R, Smith M. (2000). Overexpression of Heme Oxygenase in Neuronal Cells, the Possible Interaction with Tau. *J Biol Chem*, Vol. 275, Vol 8, 5395-5399.

Tatton W, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N, (2003) Apoptosis in Parkinson's Disease: Signals for Neuronal Degradation. *Ann Neurol* ;53 (suppl 3):S61-S72

Taylor J, Carraway M, Piantadosi C. (1998) Lung-specific induction of heme oxygenase-1 and hyperoxic lung injury. *Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol)*, 274: 582-590.

Tenhunen R, Marver H, Schmid R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 61: 748-755.

Tenhunen R, Marver H, Schmid R. (1969) Microsomal Heme Oxygenase. Characterization of the enzyme. *J. Biol Chem*, 244: 6388-6394.

Theil E, Eisenstein R, (2000) Combinatorial mRNA regulation: Iron regulatory proteins and Iso - iron-responsive elements. *J Biol Chem*, 275: 40659-40662.

Vile GA and Tyrrel R. (1993) Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem*, 268: 14678-14681.

Wang Y, Santa-Cruz K, DeCarli C, Johnson JA (2000) NAD(P)H: quinone oxidoreductase activity is increased in hippocampal pyramidal neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 21: 525-531.

Wardman P, Candelais L. (1996) Fenton Chemistry: an introduction. *Radiat Res*, 145: 523-531.

Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N. and Kaneda H. (1999) Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase 1 deficiency. *J Clin Invest*, 103: 129-135.

Yoshinaga T, Sassa S, Kappas A. (1982) The Occurrence of Molecular Interactions among NADPH-Cytochrome c Reductase, Heme Oxygenase, and Biliverdin Reductase in Heme Degradation (1982). *J Biol Chem*, 257: 7786-7793.