



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN AP-1, NFkappaB Y
SP-1 EN CÉLULAS NEURONALES SOMETIDAS A
ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR GLUTAMATO”**

Tesis que presenta:

Médico Cirujano Sandra Rosas Madrigal

para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de Biomedicina Molecular

Tutores

Dra. Esther López-Bayghen Patiño,

Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN.

Dr. Miguel Angel Vargas,

Departamento. Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN

México, D. F.

Diciembre, 2004

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular y en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Esther López-Bayghen Patiño y el Dr. Miguel A. Vargas.

Este trabajo fue financiado en parte gracias al apoyo económico otorgado por CONACyT (41273-A).

Durante la realización de este trabajo la autora fue becaria de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (beca número 172748).

Este trabajo contó con la asesoría de:

DRA. ROSAURA HERNANDEZ. Depto. Biomedicina Molecular, CINVESTAV.

DRA. REBECA MANNING CELA. Depto. Biomedicina Molecular, CINVESTAV

DR. SAÚL VILLA TREVIÑO. Depto Biología Celular, CINVESTAV

DEDICATORIAS:

Este trabajo está dedicado con cariño a mi madre porque esta cerca de mi a pesar de la distancia.

A Bruno, por ser el sol de cada día.

A Alejandro, por todo tu apoyo y paciencia.

A la Dra. Esther por sus enseñanzas, su dedicación, apoyo y toda su comprensión.

A todos mis compañeros.

Y a los miembros del comité por sus valiosas aportaciones durante la revisión de este trabajo.

ÍNDICE

Página

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	7
❖ Factores de Transcripción	9
❖ Los factores de la familia Sp	10
<u>Características estructurales</u>	10
□ <u>Relación evolutiva</u>	12
□ <u>Propiedades funcionales individuales</u>	12
▪ Sp1 es el prototipo de la familia.	12
▪ Sp2	12
▪ Sp 3	13
▪ Sp4: el miembro de la familia Sp tejido específico	15
□ <u>Regulación de la proporción de Sp1 y Sp3.</u>	15
□ <u>Funciones fisiológicas de las proteínas Sp.</u>	15
❖ Las proteínas Rel: NFκB	16
□ Estrés Oxidativo mediado por la activación de NF-κB.	18
❖ El factor de transcripción AP-1.	19
Inhibición de factores de transcripción bajo condiciones de Estrés oxidativo	21
Activación de factores de transcripción bajo condiciones de hipoxia y estrés oxidativo	22
Glutamato	23
SH-SY5Y: un modelo para el estudio de las respuestas transcripcionales generadas por el estrés oxidativo	25
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	
Generales	28
Particulares	28
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

NºFigura		Pagina
1	Estructura de las regiones promotoras de algunos genes.	8
2	Características estructurales de las proteínas Sp.	11
3	Sp1 y las tres isoformas de Sp3.	13
4	Miembros de la familia de proteínas Rel/NF- κ B e I κ B.	17
5	Clasificación de los receptores Ionotrópicos.	24
6	Clasificación de los receptores Metabotrópicos.	25
7	Actividad trasncricional del plásmido Sp1-CAT en respuesta al tratamiento con glutamato.	37
8	Sp3 aumenta su afinidad por la secuencia consenso Sp tras el estímulo con glutamato.	39
9	Proteínas Sp: respuesta al peróxido de hidrógeno.	40
10	Ap-1 no muestra una respuesta al tratamiento con glutamato.	42
11	AP-1 no muestra modificaciones significativas en actividad de unión tras la estimulación con glutamato.	43
12	NF κ B aumenta su afinidad por su secuencia consenso en el DNA.	44
13	Respuesta de NF κ B al H ₂ O ₂ .	45
14	Especificidad de los complejos NF κ B.	46
15	Efecto del glutamato y del H ₂ O ₂ en la viabilidad celular (MTT) en células SH-SY5Y.	47
16	Efecto del peróxido de hidrógeno y glutamato en la inducción de la formación de Diclorofluorescein.	48

AGRADECIMIENTOS

Durante el presente trabajo se contó con la asistencia técnica de:
T.de I. Gerardo Marmolejo González.

QBP Ma. Guadalupe Aguilar (Unidad de Ácidos Nucléicos, DGBM).

A QFB. Matilde Corona Reyes por sus enseñanzas y su amistad.

A todos mis compañeros con quienes compartí momentos agradables, en especial Miriam,
gracias a todos.

RESUMEN

La respuesta celular al estrés oxidativo (EO) incluye la inducción de enzimas involucradas en detoxificar a las especies reactivas de oxígeno (ROS) para evitar y reparar el daño. La sobre-activación de receptores al glutamato (glu) en neuronas produce acumulación intracelular de calcio, fenómeno implicado en la generación de EO y asociado con el desarrollo de procesos neurodegenerativos.

Estas respuestas son mediadas por factores de transcripción, cuyas identidades y actividades no se han estudiado suficientemente para los diversos tipos celulares. Reportamos aquí los efectos del EO inducido por glu en la regulación de los factores de transcripción NF κ B, Sp1 y Ap-1 en la línea celular SH-SY5H de neuroblastoma, que expresa receptores para glutamato (ionotrópicos y metabotrópicos). Se realizaron ensayos de transfección transitoria usando vectores reporteros que poseen repetidos de los sitios consenso de unión al DNA para los factores NF κ B, Sp1 y Ap-1 así como ensayos de retardamiento en gel para determinar la actividad de unión de los mismos factores. Encontrando, en ensayos de retardamiento en gel, la presencia de un segundo complejo correspondiente al factor represor Sp3, el cual aumenta significativamente en respuesta al glutamato. Esto correlaciona con la disminución en actividad transcripcional observada en los ensayos funcionales.

Ap-1 no mostró una respuesta significativa al glutamato bajo nuestras condiciones experimentales. NF κ B, en cambio mostró un aumento en su afinidad por su secuencia consenso cuando se induce estrés oxidativo y en respuesta al glutamato en ensayos de retardamiento en gel.

ABSTRACT

The cellular responses to oxidative stress include the induction of enzymes involved in detoxify reactive species of oxygen (ROS) in order to avoid and repair cell damage. The over activation of glutamate receptors in neurons produce an intracellular accumulation of calcium, phenomenon implicated in generation of oxidative stress and associated with the development of neurodegenerative processes. Cell responses to stress are mediated by transcription factors, whose identity and activity have not study sufficiently for each cell type. We report here the effect of the oxidative stress induced by high levels of glutamate over the regulation of the transcription factors NF κ B, Sp1 and AP-1 using as a model the cell line SH-SY5H from human neuroblastoma. These cells express both kind of glutamate receptors, ionotr3pic and metabotr3pic.

To this aim, SH-SY5Y cells where transiently transfected using reporter plasmids, TR-CAT construct with five AP-1 sites, cloned in front the TK promoter and the CAT reporter gene; NF κ B-LUC, with three NF κ B sites, cloned in front the a minimal promoter and the Luciferase reporter gene and the Sp1CAT. with three Sp1 sites, cloned in front the SV40 minimal promoter and the CAT reporter gene. We performed mobility shift assays to determine binding activity for each factor.

We observed a reduction in the binding activity of Sp1 and identify a second complex corresponding to the repressive factor Sp3, which was increases significantly in response to glutamate. This correlates with a diminution in transcriptional activity observed in the functional assays done with Sp1CAT reporter.

Finaly, we were not able to detect a significant response to glutamate with the transcription factor Ap-1. NF κ B show a increase in the affinity for the consensus site in oxidative stress conditions and in response to 10 mM glutamate in EMSA assays.

ABREVIATURAS

AP-1	Activator Protein
AMPA	ácid α -amino 3-hidroxi-5metil-4-isoxasol propionic
ATP	Adenosine 5'-Triphosphate
ATF	Activating Transcription Factor
Bcl-3	B cell Chronic Lymphocytic leukemia
C/EBP	CCAAT/Enhancer-binding Protein
CAT	Cloramphenicol Acetil Transferase
CO ₂	Bióxido de carbono
COX 2	Cyclooxygenase-2
CRE	Cyclic-AMP responsive element-binding protein
CRSP	Cofactor required for Sp1 activation
DCFH-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMEM	Dulbecco's Médium Eagle Modified
DNA	Deoxirribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
E2F	Factor mediated the transcriptional activation of the viral E2A Promoter.
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGTA	Ethylene Glycol-bis (β -aminoethyl Ether)
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Ets	E-26-specific (Ets) domain
FRK	Fos Related Cinasa
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
GTPase	Guanosine-5'-triphosphatease
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid]
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HOX 1	Hemooxygenase1
I κ B	IkappaB

I κ K	IkappaB kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
K ⁺	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
LB	Luria Broth
Lys	Lysine
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MMP1	Matrix metalloproteinase 1
MOPS	3-[N-Morpholino] butanesulfonic Acid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide
Na ²⁺	Sodio
NAD(P)H	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogenase
Na ₂ HPO ₄	Fosfato ácido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NF κ B	Nuclear factor kappa B
NMDA	N-methyl-d-aspartate
NO ₂	Óxido nitroso
Nrf 1	Nuclear Respiratory Factor 1
Nrf 2	Nuclear Respiratory Factor 2
O ₂ ⁻	Superóxido
O ₂	Oxígeno
O ₃	Ozono
PAGE	Protein Acrylamide Gel Electrophoresis
PI3-K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethylsulphonyl Fluoride
RNA	Ribonucleic Acid

rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodium duodecyl sulphate
Sp1	Specificity protein 1
Sp2	Specificity protein 2
Sp3	Specificity protein 3
Sp4	Specificity protein 4
SV40	Simian Virus 40
TCR α	T-cell antigen receptor α
TK	Thymidine Kinase
TBP	TATA-box binding protein
TNF α	Tumor necrosis factor α
TPA	12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TPE	Responsive element to TPA
UV	Ultravioleta
UDP	Uridine diphosphate
YY1	Ying-Yang1

INTRODUCCIÓN

Una de las paradojas de la vida es que, moléculas que mantienen la vida aeróbica como el oxígeno, fundamentales para la respiración, metabolismo y energía, también se asocian con diversas enfermedades degenerativas (Marx 1987).

Un elemento común en dichas enfermedades es la participación de formas parcialmente reducidas de oxígeno.

En células de organismos aeróbicos no menos del 95% del oxígeno consumido es reducido por una oxidasa del citocromo mitocondrial, mientras que el resto es reducido por varias oxidasas y deshidrogenasas aeróbicas. Las especies de oxígeno provienen tanto de la generación interna de radicales libres tales como superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno así como agentes exógenos. Estos agentes incluyen NO_2 y O_3 , compuestos genobióticos como drogas derivadas de quinonas y el O_2 por sí mismo, cuando se usa terapéuticamente a altas concentraciones. Mientras que, la mayoría de los investigadores se enfocan en los efectos de daño causados por estos oxidantes, también se han realizado estudios acerca de como el H_2O_2 y los productos de oxidación no enzimática de constituyentes celulares, pueden actuar como segundos mensajeros fisiológicos o mimetizando esta función y entonces afectar el metabolismo normal de las células (Forman HJ y E Cadenas 1997). Para la reducción completa de una molécula de O_2 se requiere la transferencia simultánea de cuatro electrones para producir dos moléculas de agua. La reducción del oxígeno en menos de cuatro electrones tiene como consecuencia la generación de metabolitos inestables que son llamados especies de oxígeno reactivas (ROS).

La producción de ROS dentro de la célula puede ser aumentada por acción de hormonas, citocinas y otros estímulos fisiológicos y factores externos tales como genobióticos o radiación UV. En altas concentraciones, las ROS son extremadamente tóxicas para las células debido al daño que ocasionan en lípidos de membranas, proteínas celulares y modificaciones irreversibles al DNA. En cambio cuando las ROS se producen en niveles moderados, actúan como moléculas activadoras de diversas vías de señalización involucradas en el control de procesos inmunes, circulación

sanguínea y regulación de sistema endócrino. La respuesta celular al estrés oxidativo incluye la inducción de enzimas involucradas en detoxificar a las ROS para evitar el daño así como las enzimas necesarias para reparar cualquier daño sufrido. Esta respuesta es mediada por factores de transcripción, cuyas identidades no se han estudiado y establecido suficientemente bien para los diversos tipos celulares. Las ROS activan en las células, la expresión de genes sensibles a los cambios en el estado redox, muchos de los cuales son requeridos como parte de la defensa celular contra los efectos tóxicos del estrés oxidativo (Turpaev 2002).

Las regiones promotoras de genes inducibles por ROS poseen sitios de unión para diversos factores de transcripción como son AP-1, ATF-CREB, Ets, C/EBP y NF-κB (Turpaev 2002) (Figura 1). El efecto de activación de factores de transcripción en células eucariontes, generado por las ROS, es mediado por complejos sistemas redox-sensibles. Estos sistemas están organizados jerárquicamente y consisten en múltiples elementos incluyendo GTPasas, fosfolipasas, protein fosfolipasas así como MAP cinasas.

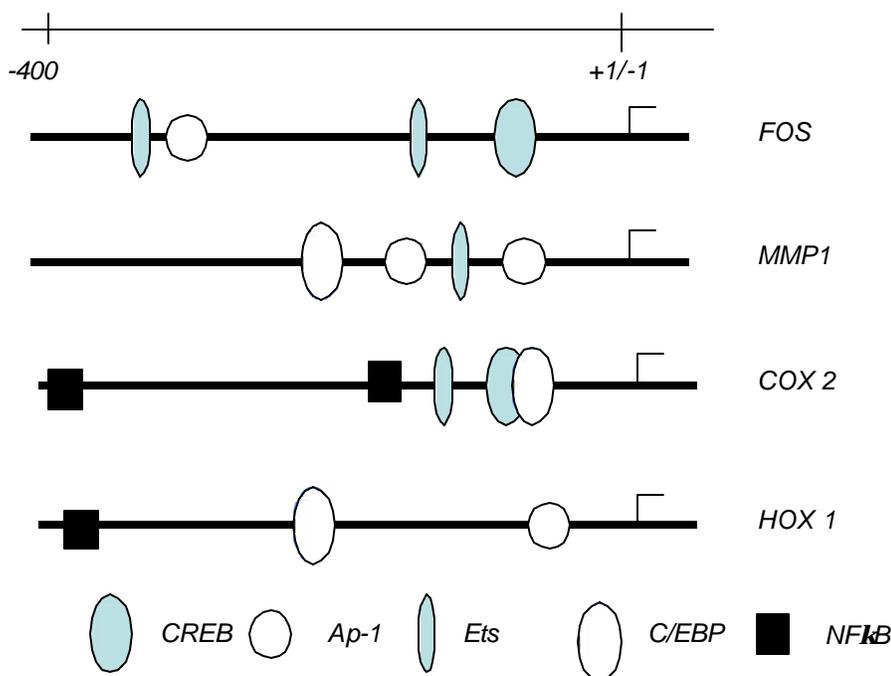


Figura 1.
Estructura de
regiones
promotoras de
algunos genes
humanos que
responden a ROS.
 MMP1,
 Metaloproteasa 1
 COX 2,
 ciclooxigenasa 2
 HOX 1,
 hemoxigenasa 1

Las MAP cinasas (“Mitogen-Activated Protein”) son uno de los principales sistemas reguladores que median el control de la expresión génica en respuesta a diversos estímulos externos. Esta superfamilia consiste en tres subgrupos principales designados por incluir serin-proteína-cinasas como ERK, p38 y JNK. Las ROS activan a las MAP cinasas, sin embargo la respuesta es distinta y específica para diferentes miembros de esta familia dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, una vía de activación de JNK por ROS se basa en la inactivación reversible de JNK mediada por la formación de su complejo dimérico con la transferasa S-glutation redox-sensible. De todos los miembros de la familia de las MAP cinasas, la cascada JNK es la más sensible a las ROS, activando por largos periodos (varias horas) a JNK. Los factores de transcripción c-Jun y ATF-2 (sinónimos: CREB-2 y CREBP-1) son los principales sustratos para la proteína-cinasa JNK. Además de su papel en la regulación de factores de transcripción y en la expresión de genes, JNK afecta el sistema de regulación celular que controla la apoptosis (Forman HJ y E Cadenas 1997).

Factores de Transcripción

Una proporción muy importante de la regulación transcripcional es ejercida por la acción combinada de proteínas (factores de transcripción) que se unen a diferentes elementos denominados promotores y potenciadores. En el inicio de la síntesis del RNA mensajero es en donde se da la mayor regulación de la expresión génica en eucariotas. Como paso inicial, la RNA polimerasa en asociación con algunos factores se une reversiblemente al promotor, para posteriormente abandonar la región promotora e iniciar el alargamiento del transcrito. La eficiencia de cada paso está sujeta a la regulación por proteínas activadoras o represoras denominadas factores de transcripción, quienes influyen el proceso a través de la interacción proteína-proteína con los factores generales de iniciación, produciendo un aumento en el reclutamiento o la estabilización del complejo basal con su templado. Así, la unión de proteínas activadoras a su sitio consenso estimula la transcripción vía un dominio activador el cual es funcionalmente diferente y se encuentra usualmente separado estructuralmente del dominio de unión al DNA. Un grupo de factores de transcripción son expresados en una célula de manera específica de tejido, otros como Sp1 se

expresan ubicuamente y son requeridos para la expresión constitutiva e inducible de una gran variedad de genes (Lania et al 1997).

◆ **LOS FACTORES DE LA FAMILIA Sp**

El factor general de transcripción Sp1 (“Stimulatory protein 1”) puede unirse y actuar a través de cajas GC y es generalmente aceptado que esta proteína es extremadamente versátil, y está involucrada en la expresión de diferentes genes documentados en más de 2600 citas. Adicionalmente, ha quedado claro que Sp1 no es la única proteína que actúa a través de “sitios de unión tipo Sp1”, simplemente representa la primera proteína identificada y clonada de una familia de cuatro proteínas pequeñas designadas Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4 (Suske 1999).

Sp1 fue originalmente identificado como el factor de transcripción que se une a cajas GC en el promotor temprano del virus 40 de simio (SV40) (Dyan & Tjian 1983) y que se une también al promotor de timidina cinasa (TK) (Jones et al 1985). La clonación del cDNA parcial de Sp1 humano a partir de células HeLa fue descrita en 1987 (Kadonaga et al 1987). La proteína Sp1 humana completa tiene 778 aminoácidos. Los factores de transcripción Sp3 y Sp4 (originalmente designados como SPR-2 y SPR-1) fueron clonados al buscar el sitio que reconocían usando cajas GT del promotor de la uteroglobina (Hagen et al 1992).

• **Características estructurales**

Todos los miembros de la familia Sp poseen dominios estructurales bien definidos. Tres dedos de zinc cercanos a el extremo C-terminal y dominios ricos en glutamina adyacentes a residuos serina/treonina en su región N-terminal. Los 81 aminoácidos de la región de dedos de zinc, los cuales representan el dominio de unión a DNA, constituyen la parte más conservada de estas proteínas. El alineamiento de la región entre proteínas Sp muestra que las proteínas Sp1, Sp3 y Sp4 están más cercanamente relacionadas entre sí que con Sp2. Además se ha podido predecir que los aminoácidos KHA en el primer dedo de zinc, RER en el segundo y RHK en tercero contactan con bases específicas en el DNA. Estos aminoácidos críticos se encuentran conservados en Sp1, Sp3 y Sp4 pero no en Sp2. Consistentemente Sp1, Sp3 y Sp4

reconocen el sitio Sp1 o caja GC clásica con la misma afinidad (Hagen et al 1992). En Sp2 el residuo importante de histidina, localizado en el primer dedo de zinc es reemplazado por un residuo de leucina como se muestra en la Figura 2.

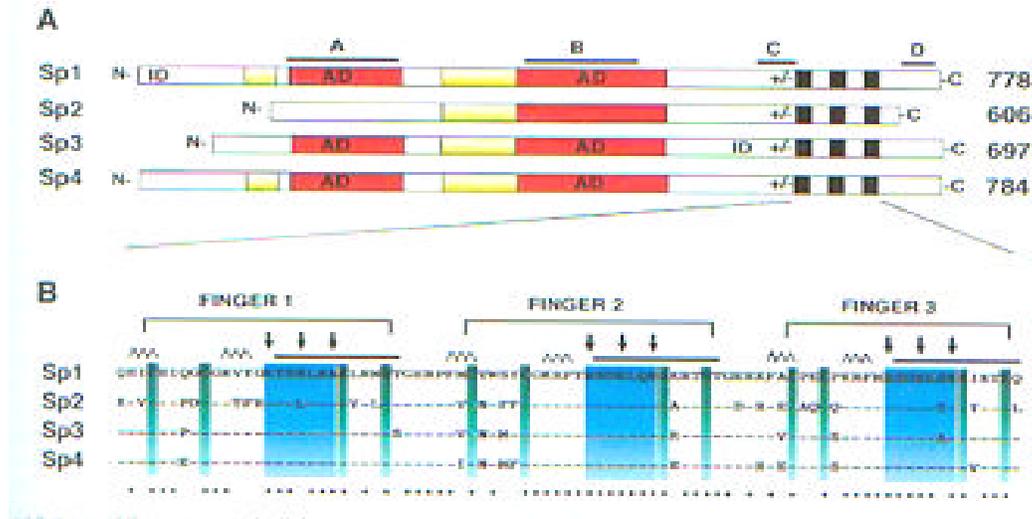


Figura 2. Características estructurales de las proteínas Sp. **A)** Representación esquemática de los cuatro miembros de la familia Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4. La longitud en aminoácidos está indicada a la derecha. La longitud de Sp3 se refiere a la isoforma completa de acuerdo con (Kingsley & Winoto 1992). Las cajas de colores indican regiones de las proteínas, ricas en residuos de glutamina (rojo) y serina/treonina (amarillo). La región que precede el primer dedo de zinc (+/-) es rica en aminoácidos cargados. Las cajas negras representan dedos de zinc. Las líneas sobre el dibujo de la proteína Sp1 indican la extensión de 4 regiones (A,B,C y D) las cuales contribuyen a las propiedades de Sp1. Se indican los dominios conocidos de activación (AD) y los inhibidores (ID). **B)** Alineamiento de la secuencia proteica de los dominios dedos de zinc. Las estrellas debajo de la secuencia indican identidad de secuencia. Los residuos de cisteína e histidina los cuales coordinan iones de zinc en verde y las regiones de proteínas las cuales interactúan con el DNA en azul. Las flechas apuntan a los aminoácidos responsables de la especificidad del reconocimiento en el contacto con bases específicas en el DNA. Las líneas negras y las líneas en zig-zag indican regiones α -helice y β -plegadas respectivamente.

De acuerdo con esta diferencia estructural se demostró que Sp2 no se une a una caja GC pero si lo hace a un elemento rico en GT dentro de la región que flanquea al 5' del gen del receptor de células T (Kingsley & Winoto 1992).

- **Relación evolutiva**

La similitud estructural entre las cuatro proteínas Sp sugiere que están relacionadas evolutivamente de forma muy cercana. Estudios de unión y caracterización bioquímica

in vitro han demostrado la existencia de proteínas unidas a cajas GC en peces, que comparten propiedades inmunológicas con Sp1 y Sp3. En *Drosophila melanogaster* la proteína específica de cabeza “buttonhead” (btd) codifica para un factor de transcripción tipo dedo de zinc con función y secuencia significativamente similar a las proteínas Sp.

- **Propiedades funcionales individuales**

- ✓ Sp1 es el prototipo de la familia.

El mapeo del dominio de activación reveló que la mezcla de aminoácidos hidrofóbicos es esencial para la activación transcripcional y no los residuos de glutamina por si mismos. Sp1 puede ser fosforilado y glucosilado y es capaz de formar interacciones homotípicas permitiendo la formación de complejos multiméricos (Suske 1999).

Además se han reportado muchas interacciones heterotípicas con diferentes clases de proteínas nucleares. Incluyendo factores que pertenecen a la maquinaria general de transcripción como la proteína de unión a cajas TATA (TBP) y los factores asociados a TBP, dTAFII110/hTAFII130 y hTAFII55. Otras proteínas que han mostrado interacción con Sp1 son reguladoras de ciclo celular como la proteína relacionada con retinoblastoma p107, el factor de transcripción YY1 (Lee et al 1993), E2F (Karlseder et al 1996, Lin et al 1996) ó NF- κ B (Mao et al 2002). Sp1 puede unirse a su secuencia blanco en nucleosomas ensamblados (Li et al 1994). A este respecto es interesante notar la interacción con un gran complejo coactivador llamado CRSP (Cofactor requerido para la activación de Sp1) el cual estimula la transcripción *in vitro* mediada por Sp1 (Ryu et al 1999).

- ✓ Sp2

Es poco lo que se conoce de este miembro de la familia Sp. La presencia de un dominio activador rico en glutamina sugiere que pudiera actuar como activador. El gen del receptor para el antígeno de células T α (TCR α) puede ser un blanco para Sp2 debido a que este se une *in vitro* a un elemento promotor con caja GT en el promotor TCR α (Kingsley & Winoto 1992).

✓ Sp 3

El papel de Sp3 es complicado desde el hecho de que existen 3 isoformas, una proteína Sp3 de 110-115 kDa y dos de aproximadamente 60-70 kDa. Probablemente la longitud completa de Sp3 es derivada de un inicio de la traducción en un codon no-AUG el cual ha sido designado de forma arbitraria como codón AUU. Sin embargo otro codón de inicio potencial se encuentra presente. Las dos especies de Sp3 más pequeñas provienen de los dos codones AUG internos. Consistentemente, anticuerpos contra la región N-terminal de Sp3 reconocen en ensayos de retardamiento en gel a los complejos que migran más lentamente los cuales representan la isoforma completa de Sp3 como se muestra en la Figura 3.

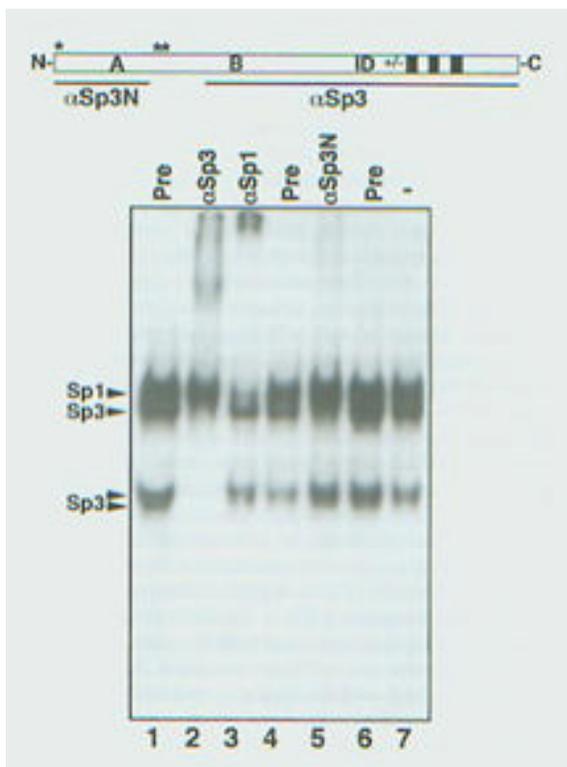


Figura 3. Sp1 y las tres isoformas de Sp3 son visibles en un ensayo de retardamiento en gel (EMSA). Arriba se muestra la representación esquemática de Sp3, los dominios de activación A y B, el dominio inhibidor (ID), la región cargada (+/-), el dominio de unión al DNA y los 3 dedos de zinc (cajas negras). Los asteriscos indican el N-terminal de las 3 isoformas. Las líneas negras indican los segmentos de Sp3 usados para la generación de anticuerpos α Sp3N y α Sp3. El EMSA fue realizado con un oligonucleótido marcado con 32 P y que incluye una caja GC y con extractos nucleares de células CV-1. El antisuero contra Sp1 (α Sp1, línea3), la parte N-terminal de Sp3 (α Sp3N, línea 5), la parte C-terminal de Sp3 (α Sp3, línea 2), ó el correspondiente a suero preinmune (Pre, líneas 1, 4 y 6) respectivamente. Los complejos correspondientes a Sp1 y Sp3 se indican a la izquierda. El anticuerpo dirigido contra el C-terminal retarda a los 3 complejos que contienen a Sp3 (línea 2) mientras en anticuerpo dirigido contra el extremo N-terminal retarda sólo el complejo que migra lentamente (línea 5).

El antisuero contra Sp1 (α Sp1, línea3), la parte N-terminal de Sp3 (α Sp3N, línea 5), la parte C-terminal de Sp3 (α Sp3, línea 2), ó el correspondiente a suero preinmune (Pre, líneas 1, 4 y 6) respectivamente. Los complejos correspondientes a Sp1 y Sp3 se indican a la izquierda. El anticuerpo dirigido contra el C-terminal retarda a los 3 complejos que contienen a Sp3 (línea 2) mientras en anticuerpo dirigido contra el extremo N-terminal retarda sólo el complejo que migra lentamente (línea 5).

Los reportes acerca de la actividad de Sp3 parecen ser contradictorios. En algunos experimentos parece actuar como activador al igual que Sp1, en otros en cambio pareciera inactivar la transcripción. Muchos de estos reportes están basados en experimentos de co-transfección con Sp1, Sp3 o ambos al mismo tiempo. Una estrategia usando antisentidos, en la cual se bloqueó la expresión endógena de Sp3 en la línea celular de mielomonocitos HL60 reveló que Sp3 participa en la activación de los promotores CD11c y CD11b (Noti 1997). Las condiciones experimentales necesarias para que Sp3 actúe como un activador fuerte o una molécula transcripcionalmente inactiva capaz de reprimir la activación mediada por Sp1, no están completamente claras. La estructura y el arreglo de los sitios de reconocimiento parecen determinar si Sp3 es transcripcionalmente inactiva o si puede reprimir la activación mediada por Sp1. Los promotores que poseen un sólo sitio de unión son activados, mientras que promotores que presentan múltiples sitios de unión frecuentemente no son activados o responden débilmente a Sp3 (Birnbbaum et al 1995). Si Sp3 actúa como un activador o como un represor de la activación mediada por Sp1, este fenómeno debe entonces depender del contexto celular. La transfección de Sp3 estimula la transcripción de HERV-H en la línea celular de teratocarcinoma Ntera2-D1 pero actúa como un represor en HeLa y en células de insecto (Sjottem et al 1996).

Además, se ha sugerido que las dos pequeñas isoformas de Sp3 pueden actuar como moléculas represoras mientras que la isoforma Sp3 completa puede actuar como activador (Kennett et al 1997). La expresión exclusiva de la secuencia completa de Sp3 por una secuencia líder artificial puede también reprimir la activación mediada por Sp1.

Ahondando en las bases moleculares que expliquen la inactividad de Sp3 bajo ciertas condiciones, se ha descrito un dominio inhibitorio localizado entre el segundo dominio de activación rico en glutamina y el primer dedo de zinc. El triplete de aminoácidos KEE, es este dominio absolutamente esencial para la función de represión (Dennig et al 1996). No se sabe aún como funciona mecánicamente este dominio, aunque se piensa que proteínas adicionales, actuando como co-represoras están involucradas en la función inhibitoria de este dominio.

✓ Sp4: el miembro de la familia Sp tejido específico

En contraste con Sp1 y Sp3 que son factores de transcripción ubicuos, la expresión de Sp4 parece estar restringida a algunos tejidos como el cerebro. Consistentemente con su alta expresión en sistema nervioso central, la disrupción del gen Sp4 de ratón por recombinación homóloga produce defectos conductuales (Suske 1999)

Sp4 presenta propiedades funcionales específicas distintas a las de Sp1 y Sp3. La función de transactivación de Sp4 reside, como en Sp1 en la región N-terminal rica en glutamina. En contraste con Sp1, Sp4 no es capaz de actuar sinérgicamente a través de sitios de unión adyacentes, sin embargo Sp4 puede funcionar como un blanco para los dominios de activación de Sp1 en un ensayo de super-activación, lo que sugiere que los dominios de activación de Sp1 y Sp4 están relacionados funcionalmente (Suske 1999).

✓ Regulación de la proporción de Sp1 y Sp3

Está claro que en un tipo celular dado, la co-expresión de Sp1 y Sp3 ocurre y asumimos que compiten por los mismos sitios de unión *in vivo*. La caracterización inicial de Sp1 y Sp3 muestra que existen diferencias en su capacidad de activación y represión transcripcional. Independientemente de si Sp3 actúa como un represor de la activación mediada por Sp1 la abundancia relativa de Sp1 y Sp3 debe permitir la regulación de la actividad transcripcional. La abundancia de Sp1 y Sp3 es variable en los diferentes tipos celulares, por ejemplo en células endoteliales las cuales poseen altos niveles de ambos, la proporción Sp1/Sp3 es mayor que en células no endoteliales.

✓ Funciones Fisiológicas de las proteínas Sp.

Dado que Sp1 esta implicada en la activación de un gran número de genes tales como genes tejido específicos, genes de mantenimiento y aquellos que regulan ciclo celular, y además se ha visto que son proteínas requeridas para prevenir la metilación de islas CpGs, sería razonable esperar que las células que carecieran de Sp1 no sobrevivieran, pero este no fue el caso. Philipsen y colaboradores encontraron que al interrumpir el gen de Sp1 en ratón las células madre embrionarias deficientes en Sp1

son viables, tienen un crecimiento normal y pueden ser inducidas a diferenciarse y formar cuerpos embrionicos tan eficientes como las células madre silvestres. Sin embargo, los embriones “knock out” para Sp1 presentan un retardo severo en su desarrollo y todos ellos mueren alrededor del día 11 de gestación. Presentan un fenotipo marcadamente heterogéneo indicando que Sp1 tiene una función general en muchos tipos celulares. Interesantemente los defectos en ratones Sp1 $-/-$ son causados por un mecanismo celular autónomo. Las células madre Sp1 $-/-$ inyectadas en un blastocisto contribuyeron de forma eficiente con embriones quiméricos hasta etapas tempranas pero después del día 11 declinaron rápidamente y no contribuyeron al término y nacimiento de estos.

Así Sp1 parece ser un factor de transcripción cuya función es esencial para células diferenciadas después del día 10 del desarrollo en ratón. El “knock out” de Sp1 demostró que este factor no es esencial para la expresión de muchos genes tempranos que previamente se había demostrado podían ser activados por Sp1. Podría ser que otro miembro de la familia Sp actúe como compensador. Sp4 en cambio se expresa de forma predominante en cerebro pero también se detecta en epitelios, testículos y en el desarrollo de dientes (Suske 1999).

◆ LAS PROTEÍNAS REL: NF κ B

El factor nuclear κ B (NF- κ B) está compuesto de homo y heterodímeros de los miembros de la familia de factores de transcripción Rel, los cuales han sido suficientemente bien caracterizados en el control de la expresión de numerosos genes de respuesta inmune e inflamatoria. Las isoformas menos frecuentes poseen a las proteínas c-Rel, RelB y p52. El heterodímero más frecuente está formado por una subunidad de 50kDa (p50) y otra de 60-kDa (p65) que es secuestrada en el citoplasma por una proteína inhibidora de la familia I κ B, de la cual se han identificado siete isoformas, siendo I κ B- α el miembro mejor caracterizado de esta familia (Turpaev 2002). En células no estimuladas, los dímeros NF- κ B son retenidos en el citoplasma en una forma inactiva y como consecuencia de su asociación con los miembros de la familia de proteínas llamadas I κ B (inhibidores de κ B). Esta familia

incluye $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, $\text{I}\kappa\text{B}\beta$, $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$, Bcl-3 y las regiones carboxilo terminal de $\text{NF-}\kappa\text{B}_1$ (p105) y $\text{NF-}\kappa\text{B}_2$ (p100) (Figura 4).

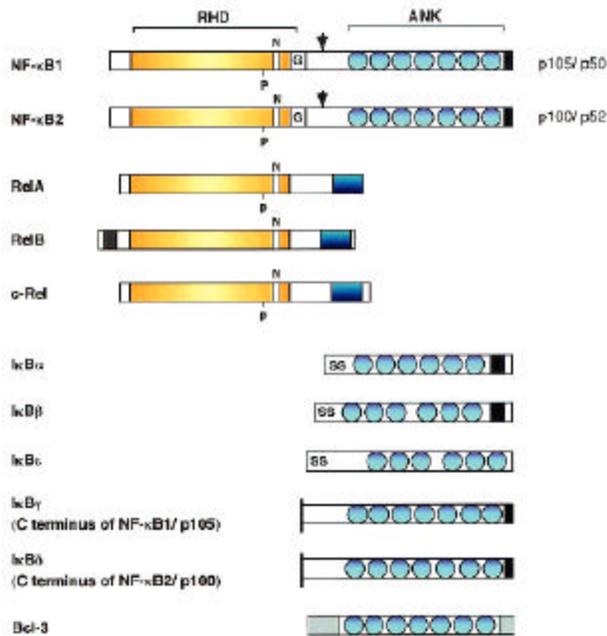


Figura 4. Miembros de la familia de proteínas Rel/NF- κ B e I κ B.

Las flechas indican los sitios de corte endoproteolítico de p105 y p100 los cuáles dan origen a p50 y p52, respectivamente. Las cajas negras indican los dominios PEST, las cajas sombreadas en Bcl-3 indican los dominios de transactivación y las cajas grises en RelB indican los dominios de zipper de leucina.

Abreviaturas: RHD, dominio homólogo a Rel; ANK, repetidos ankyrin ;

SS, sitios de fosforilación inducidos por señales.

Las proteínas $\text{I}\kappa\text{B}$ se unen con diferentes afinidades y especificidades a los dímeros $\text{NF}\kappa\text{B}$. Así que no sólo existen diferentes dímeros $\text{NF}\kappa\text{B}$ en un tipo celular específico sino hay un gran número de combinaciones entre $\text{I}\kappa\text{B}$ y dímeros $\text{NF}\kappa\text{B}$ ilustrando lo sofisticado del sistema.

La activación de $\text{NF}\kappa\text{B}$ se da a través de diversas vías mediadas por no-receptores como son el estrés oxidativo o la radiación UV, así como en eventos mediados por receptor. La unión de un ligando al receptor induce una serie de eventos que involucran a proteínas-cinasas, quienes producen el reclutamiento y activación de las cinasas de $\text{I}\kappa\text{B}$ (IKKs) que fosforilan a $\text{I}\kappa\text{B}$.

Existen por lo menos 3 componentes: $\text{IKK}\alpha$, $\text{IKK}\beta$ y NEMO/ $\text{IKK}\gamma$. Algunos estudios indican que $\text{IKK}\beta$ es el blanco de estímulos pro inflamatorios, mientras $\text{IKK}\alpha$ debe ser más importante en señales morfogénicas (Delhase et al 1999, Hu et al 1999, Takeda et al 1999). Así, la fosforilación de dos residuos de serina en el NH_2 terminal de

moléculas κB , por ejemplo, Ser³² y Ser³⁶ en $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, permite la poli-ubiquitinización en Lys²¹ y Lys²² de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y su subsecuente degradación por el proteosoma 26S.

La degradación de $\text{I}\kappa\text{B}$ expone la secuencia de localización nuclear y permite que los dímeros de NF- κB se transloquen al núcleo, uniéndose a motivos κB presentes en los promotores de muchos genes y regulando la transcripción. Además la unión de NF κB induce la transcripción de genes de $\text{I}\kappa\text{B}$ proporcionando así un mecanismo de limitación de activación de actividad de NF κB (Brown et al 1993, Sun et al 1993).

- **Estres Oxidativo mediado por la Activación de NF- κB**

La generación de ROS activa a NF- κB en la mayoría de las células, mientras que la acción de los antioxidantes atenúa su actividad dependiendo de la línea celular y el agente que lo ha inducido. NF- κB regula la expresión de muchos genes encargados de mantener la resistencia celular al estrés, participando así en el control de apoptosis y regulación de la inmunidad celular (Turpaev 2002).

Los agentes inductores de NF- κB como citocinas, virus RNA de doble cadena, ésteres de forbol y luz UV activan a una proteína-cinasa IKK ("I- κB Kinase") produciendo la fosforilación y degradación de la proteína inhibitoria ($\text{I}\kappa\text{B}$) permitiendo a NF- κB quedar libre para entrar al núcleo y unirse a su secuencia blanco (secuencia de DNA de 10 pb 5'-GGGRNNYYCC-3' donde G= guanina, R= purina, N= cualquier nucleotido Y= pirimidina, C= citosina) e inducir la transcripción de genes blanco (Heck et al 1999).

La actividad constitutiva de NF- κB en el cerebro se da en las neuronas y terminales sinápticas en donde aumenta después de generarse un daño por trauma e infarto cerebral, jugando así un papel crítico en la recuperación de la función. La activación de NF- κB puede entonces ser inducida por hipoxia, H_2O_2 y TNF- α (Tong et al 2002). Finalmente una de las vías de regulación de NF- κB está basada en la activación redox dependiente de la proteína G p21 y la subsecuente activación de la PI3-K (3-fosfatidilinositol cinasa) de igual forma se encuentran implicados algunos miembros de la cascada de MAP cinasas JNK y p38 (Turpaev 2002). Así pues, la activación del factor NF κB puede tomarse como un indicador de la inducción de un proceso de

estrés oxidativo en diversos sistemas. Particularmente hablando de sistemas neuronales, en la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos encontrados en la literatura que apoyan esta afirmación.

Tabla 1. Inducción de NFκB como respuesta a estrés oxidativo en células de origen neuronal

Tipo celular	Factor de transcripción activado.	Inductor empleado	Referencia
<ul style="list-style-type: none"> • GT1-7 (neuronal) • Cultivo primario de neuronas (cerebelares) 	NFκB	H ₂ O ₂	(Heck et al 1999)
<ul style="list-style-type: none"> • SH-SY 5Y • PC12 	NFκB	6-OHDA	(Levites et al 2002)
<ul style="list-style-type: none"> • HT22 	NFκB AP-1	GLUTAMATO	(Savaskan et al 2003)
<ul style="list-style-type: none"> • Cultivo primario neuronas de hipocampo • Células granulares (cerebelo) 	NFκB	KCN	(Shou et al 2000)
<ul style="list-style-type: none"> • SH-SY5Y 	NFκB AP-1	BSO H ₂ O ₂	(Li et al 1998)

◆ El factor de transcripción AP-1

AP-1 (Activator Protein 1) se une a secuencias palindrómicas específicas con estructura similar, como TGACTCA y TGACGTCA. Estas secuencias homólogas son designadas frecuentemente como el elemento regulador TPE (elemento responsivo a TPA, tetradecanoyl forbol-acetato) y CRE (elemento responsivo a cAMP). La superfamilia AP-1 está constituida por dos familias de proteínas, la familia Jun (*v-jun*, *c-jun*, *junB* y *junD*) quién recibió este nombre porque originalmente fue aislado del virus del sarcoma de las aves AVS 17, la palabra junana significa 17 en Japones, y la

familia Fos (c-Fos, Fos-B, Fra1, Fra2). El factor AP-1 como tal puede ser formado también en combinación con algún miembro de la familia ATF (“Activating Transcription Factor”). La composición de las subunidades AP-1 determina la afinidad por la secuencia de DNA y de su interacción con otros factores de transcripción, durante el ensamble del promotor completamente funcional. Así el homodímero c-Jun-c-Jun tiene una mayor afinidad a la secuencia TPE, mientras que el heterodímero c-Jun-ATF-2 tiene una mayor afinidad a la secuencia CRE. Los dímeros JunB-c-Fos y c-Jun-c-Fos se unen a ambas secuencias operadoras con eficiencia similar. La unión de c-Jun y ATF-2 con subunidades Fra1, Fra2 y ATF-3 suprime la actividad funcional de este factor de transcripción en algunos sistemas. El factor AP-1 es activado por varios efectores: factores de crecimiento, citocinas, hormonas, metales pesados, genotóxicos, radiación ultravioleta, estrés osmótico y mecánico, despolarización de membrana, estrés oxidativo e hipoxia. La respuesta de ciertos genes dependientes a AP-1 a cada uno de estos estímulos no es la misma. Estas variaciones están determinadas parcialmente por el activador efector-específico de AP-1 y de la diferente composición de los dímeros (Turpaev 2002).

A nivel postraduccional la actividad de los factores, ya existentes o sintetizados *de novo* es modulada por la fosforilación, ejercida por cinasas como la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa A (PKA), la cinasa activada por mitógenos (MAPK), la cinasa específica de Fos llamada FRK (“Fos Related Kinase”) y la cinasa específica de Jun (JNK) (Turpaev 2002).

JNK fosforila y activa a c-Jun y ATF-2, constituyentes de AP-1 y promueve la inducción del factor de transcripción del factor ATF-3. Debido a que varios sitios de unión de AP-1 están localizados en la región promotora del gen de *c-jun*, la fosforilación y la subsecuente activación del factor c-Jun resulta en la inducción de su propio gen. Tal regulación de la actividad de c-Jun permite una activación por largos periodos (varias horas) del factor de transcripción AP-1 y por un incremento de los niveles de expresión de los genes abatidos bajo condiciones de estrés oxidativo (Turpaev 2002). La expresión y activación de factores de transcripción como c-Jun o c-Fos son los pasos finales de una reacción enzimática en cadena, de las mejor definidas y relevantes que convergen en la cinasa N-terminal de c-Jun (JNK) quién

finalmente activa a c-Jun en el núcleo. Junto con ERK y p58, las JNKs pertenecen a la familia de las proteína-quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). La familia JNK comprende 3 isoformas (JNK1, JNK2 y JNK3) con un total de 10 variantes por procesamiento alternativo. Las JNKs son activadas por MAPK cinasas río arriba y río abajo deben ser traídas a la proximidad por proteínas que aseguren la activación y señalización específica. Una vez activadas las JNKs son capaces de unirse y fosforilar un sustrato en el núcleo (c-Jun, ATF-2, Elk-1), en el citoesqueleto (proteínas asociadas a microtubulos, tau, neurofilamentos) y en la mitocondria (vgr BIM). La traslocación intranuclear de JNK2 y JNK3, pero no JNK1 es una característica de la cascada JNK activada bajo condiciones patológicas (Turpaev 2002).

Un grupo de factores de transcripción involucrados en la protección celular al estrés oxidativo incluye a los factores de la familia Nrf (“Nuclear Respiratory Factor”). Los factores Nrf1 y Nrf2 controlan la expresión de genes sensibles a la antioxidación tales como NAD(P)H: quinona oxidoreductasa, glutathione-S transferasa, UDP-glucuronosyl transferasa y epóxido hidrolasa. Los productos de estos genes están implicados en el metabolismo de genobióticos y previenen su participación en reacciones intracelulares generadores de ROS. El sitio de unión de los factores de la familia Nrf a DNA es RTGACNNGCA (R, nucleótido purina) y esta secuencia es llamada ARE (Antioxidant-Responsive Element) (Turpaev 2002).

Inhibición de Factores de Transcripción bajo condiciones de Estrés Oxidativo

Los factores c-Jun, c-Fos y la proteína p50 (una subunidad de NF- κ B) contienen en sus dominios de unión a DNA residuos de cisteína altamente sensibles a las ROS (Cys252, Cys154 y Cys61, respectivamente). La oxidación de su grupo SH inactiva reversiblemente a AP-1 y NF- κ B. La reducción de estos grupos está mediada por el grupo tiol activo contenido en el factor protéico Ref-1 (“Redox Factor-1”), el cual es entonces reducido sin enzimas en la reacción de intercambio del grupo tiol con thioredoxin (Turpaev 2002). La inactivación oxidativa de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B ocurre con concentraciones más altas de ROS, comparado con los

niveles requeridos para la activación de las MAP cinasas. El estrés oxidativo intenso es acompañado por una disminución en las actividades de AP-1 y NF- κ B y una atenuación de la transcripción de los genes de respuesta. Los productos de muchos de estos genes están involucrados en sistemas antiestrés de protección celular. Esto sugiere que la movilización del sistema de protección celular se atenuará después de cierto nivel de ROS, mientras la intensidad de estimulación de apoptosis se incrementará. Las ROS están igualmente involucradas en la oxidación de grupos SH activos y en la inhibición de los factores de transcripción constitutivos NF-1, Sp1, USF y MyoD. Como resultado, la expresión de varios genes es suprimida. Las ROS también inhiben a las tirosina-fosfatasas por oxidación de los residuos de cisteína en los centros catalíticos de estas enzimas (Turpaev 2002).

Activación de Factores de Transcripción bajo Condiciones de Hipoxia y estrés oxidativo

AP-1 es igualmente activado bajo condiciones de hipoxia y estrés oxidativo. Esto debido a que la hipoxia promueve la acumulación de semiquinonas y flavinas reducidas que causan el incremento de la generación de ROS en mitocondria y una activación subsecuente de JNK (sistema MAP cinasa). Los constituyentes de AP-1 difieren en su sensibilidad a la hipoxia y al estrés oxidativo. Bajo normoxia ROS activa c-Jun, ATF-2 y c-Fos mientras los factores JunB y c-Fos son más sensibles a ROS generados bajo condiciones de hipoxia (Turpaev 2002).

Los aspectos críticos de las señales de transducción relacionados con estrés oxidativo se pueden catalogar en tres niveles: 1) respuestas celulares inmediatas al estrés oxidativo y la producción de segundos mensajeros, 2) la inducción y la activación de la expresión de genes mediada por el trabajo de segundos mensajeros y factores de transcripción y finalmente 3) la expresión de genes en respuesta secundaria al estrés oxidativo (Forman HJ y E Cadenas 1997).

El estrés oxidativo está fuertemente asociado con la muerte neuronal que se observa en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de *Alzheimer*. Inclusive se postula que los mecanismos que permiten una respuesta reparadora al estrés

oxidativo están alterados en estas enfermedades, ya que tanto en pacientes como en modelos animales se nota un incremento en el daño oxidativo (Coyle & Puttfarcken 1993). En estas enfermedades neurodegenerativas, las concentraciones elevadas de glutamato parecen jugar un papel relevante en la generación de daño mediado por estrés oxidativo.

GLUTAMATO

El glutamato (glu) es el neurotransmisor excitatorio más abundante de SNC en mamíferos. Tiene un efecto excitador muy rápido y produce cambios en la organización sináptica, la migración neuronal durante el desarrollo y la viabilidad neuronal. Se sabe que aminoácidos excitatorios, como es el caso de glutamato, son capaces de producir neurodegeneración debido a una liberación sináptica excesiva. Estudios de neurotoxicidad en cultivos de neuronas han establecido papeles patológicos importantes para esos cambios iónicos intracelulares causados por el glu, especialmente el influjo de Ca^{2+} , así como el del Na^+ , Zn^{2+} y el eflujo de K^+ .

La actividad neuronal permite un incremento marcado en la concentración de Ca^{2+} citosólico, el cual funciona como segundo mensajero mediando respuestas celulares. El influjo excesivo de Ca^{2+} extracelular aunado a la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares puede elevar el calcio libre citosólico neuronal a niveles que exceden la capacidad de los mecanismos reguladores de Ca^{2+} , permitiendo alteraciones metabólicas tales como la formación de radicales libres y finalmente la muerte celular. El glutamato ejerce su efecto por activación de una familia heterogénea de receptores acoplados a sistema de segundos mensajeros, los cuales se clasifican desde el punto de vista funcional en ionotrópicos (ligados a canales iónicos) y metabotrópicos (acoplados a proteínas G por medio de proteínas de fijación de GTP) con diversos mecanismos efectores.

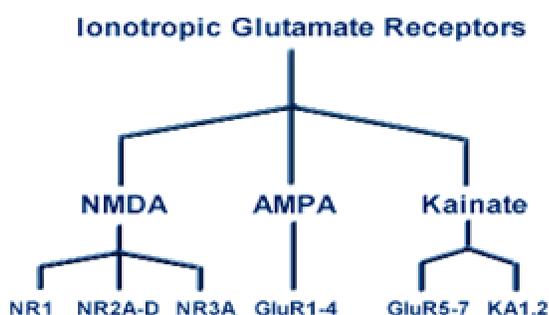


Figura 5. Clasificación de los receptores ionotrópicos.

- **Ionotrópicos:** conformados por complejos multiméricos de 4 ó 5 subunidades y se subdividen en tres grupos en base a la identidad de los agonistas farmacológicos que activan cada subtipo de receptor: AMPA (ácido α -amino 3-hidroxi-5metil-4-isoxasol propionico), NMDA (N-metil-D aspartato) y Kainato. Todas las subunidades de los receptores ionotrópicos comparten una estructura común básica. Cuatro porciones hidrofóbicas ubicadas en la región central de su secuencia.
 - ✓ Los receptores AMPA son heterómeros de subunidades codificadas por 4 genes GluR1-4, presentan una alta afinidad por AMPA y glutamato no así por el Kainato. GluR1-3 se expresa en todo el CNS, GluR4 en cambio presenta un patrón de expresión temporal y espacial mas restringida. Cada subunidad presenta 4 dominios membranales hidrofóbicos y uno citoplásmica localizada en el C-terminal. Presenta un gran número de isoformas debido a procesamiento alternativo que sufren.
 - ✓ Los receptores Kainato, están constituidos por subunidades homologas a las del receptor AMPA: GluR5-7, KA1 y KA2. Presentan una alta afinidad por Kainato seguida por glutamato y muy baja afinidad por receptores AMPA.
 - ✓ Los receptores NMDA están compuestos de las subunidades NR1 y NR2 las cuales pueden ser 1 de 4 productos génicos (NR2A-D) se requiere la expresión de ambas subunidades para para formar un canal funcional. El dominio de unión a glutamato esta formado por la unión de las subunidades NR1 y NR2, además del glutamato el receptor NMDA requiere de un co-agonista, glicina, que se una permitiendo funcionar al receptor. El sitio de unión a glicina se encuentra en la subunidad NR1. La subunidad NR2B también posee un sitio de unión pero para poliamidas, moléculas reguladoras que modulan el funcionamiento del receptor NMDA. La actividad de los receptores NMDA es sensible al pH y depende también de moduladores endógenos

como Zn^{2+} , neuroesteroides, ac. araquidónico, reactivos redox, poliamidas como la espermina, entre otros. El Mg^{2+} bloquea los receptores NMDA a nivel de potencial de membrana en reposo.

- **Metabotrópicos:** Se subdividen en 3 grupos, basados en similitud de secuencias, mecanismos farmacológicos y de señalización intracelular. Poseen siete dominios transmembranales. Su estructura esta dividida en 3 regiones: la región extracelular, siete regiones transmembranales y la región citoplásmica. La región extracelular es además dividida en la región de unión al ligando y la región rica en cisteínas.

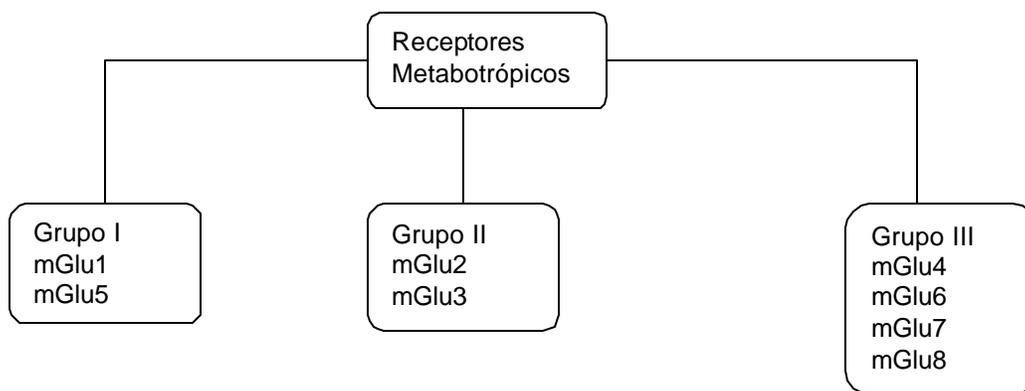


Figura 6. Clasificación de los receptores metabotrópicos

SH-SY5Y: un modelo para el estudio de las respuestas transcripcionales generadas por el estrés oxidativo

Resulta particularmente interesante el hecho de que existen líneas celulares que pueden ser utilizadas como modelos para estudiar los efectos del estrés oxidativo sobre células de origen neuronal como la línea SH-SY5Y. Esta es una línea celular de neuroblastoma humano que crece bajo condiciones de cultivo estándar, en una forma relativamente indiferenciada. El neuroblastoma es un tumor maligno común en la infancia derivado del sistema nervioso autónomo. Tanto *in vivo* como *in vitro* las células derivadas de neuroblastomas humanos expresan múltiples fenotipos celulares.

Algunos estudios en la línea celular SK-N-SH han demostrado dos diferentes tipos de células con un origen ancestral común, en donde sólo una de ellas expresa propiedades neuronales (Ross & Biedler 1985). Varias de las líneas celulares de neuroblastomas establecidas comprenden al menos dos tipos celulares morfológicamente diferentes. La morfología predominante es generalmente neuroblástica con un cuerpo celular redondo, pequeño con procesos neuríticos, vesículas densas y actividad enzimática para la síntesis de neurotransmisores. En contraste las menos frecuentes, células sustrato-adherente, con morfología epitelial o tipo fibroblasto que no extienden procesos neuríticos y muestran poca o nula actividad de la síntesis de neurotransmisores. Así las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, creciendo en condiciones de laboratorio, nos ofrecen una oportunidad única para estudiar el comportamiento de células humanas con un fenotipo neuronal (Rettig et al 1987). Adicionalmente, varias líneas de evidencia desarrolladas durante la última década indican que diversos insultos neurodegenerativos agudos como la isquemia y el estrés oxidativo, están asociados con la disminución del sistema de incorporación de glutamato (Danbolt 2001, Trotti et al 1998). Las células SH-SY5Y presentan tanto receptores como transportadores para el glutamato (Naarala et al 1993, Nair et al 1996, O'Neill et al 1994) por lo que pueden ser usadas como un modelo para determinar los efectos neurotóxicos ocasionados por el exceso de glutamato y determinar cual es la respuesta oxidativa ante este fenómeno.

JUSTIFICACIÓN

La sobre-activación de receptores a glutamato en neuronas produce la acumulación intracelular de calcio, el cual se ha visto implicado en la generación de estrés oxidativo, asociado con procesos neurodegenerativos, por lo que es de nuestro particular interés estudiar las consecuencias del estrés oxidativo en la regulación de los factores de transcripción Sp1, NF κ B y Ap-1.

De esta forma, en el presente trabajo nos proponemos establecer un perfil transcripcional generado como parte de una respuesta de estrés oxidativo al exponer directamente a las células SH-SY5Y a concentraciones neurotóxicas de glutamato o peróxido de hidrógeno.

HIPÓTESIS

Altas concentraciones de glutamato son capaces de inducir un estado de estrés oxidativo y con ello conducir a cambios en la regulación y expresión de los factores de transcripción Sp1, NF κ B y Ap-1 en células neuronales SH-SY5Y.

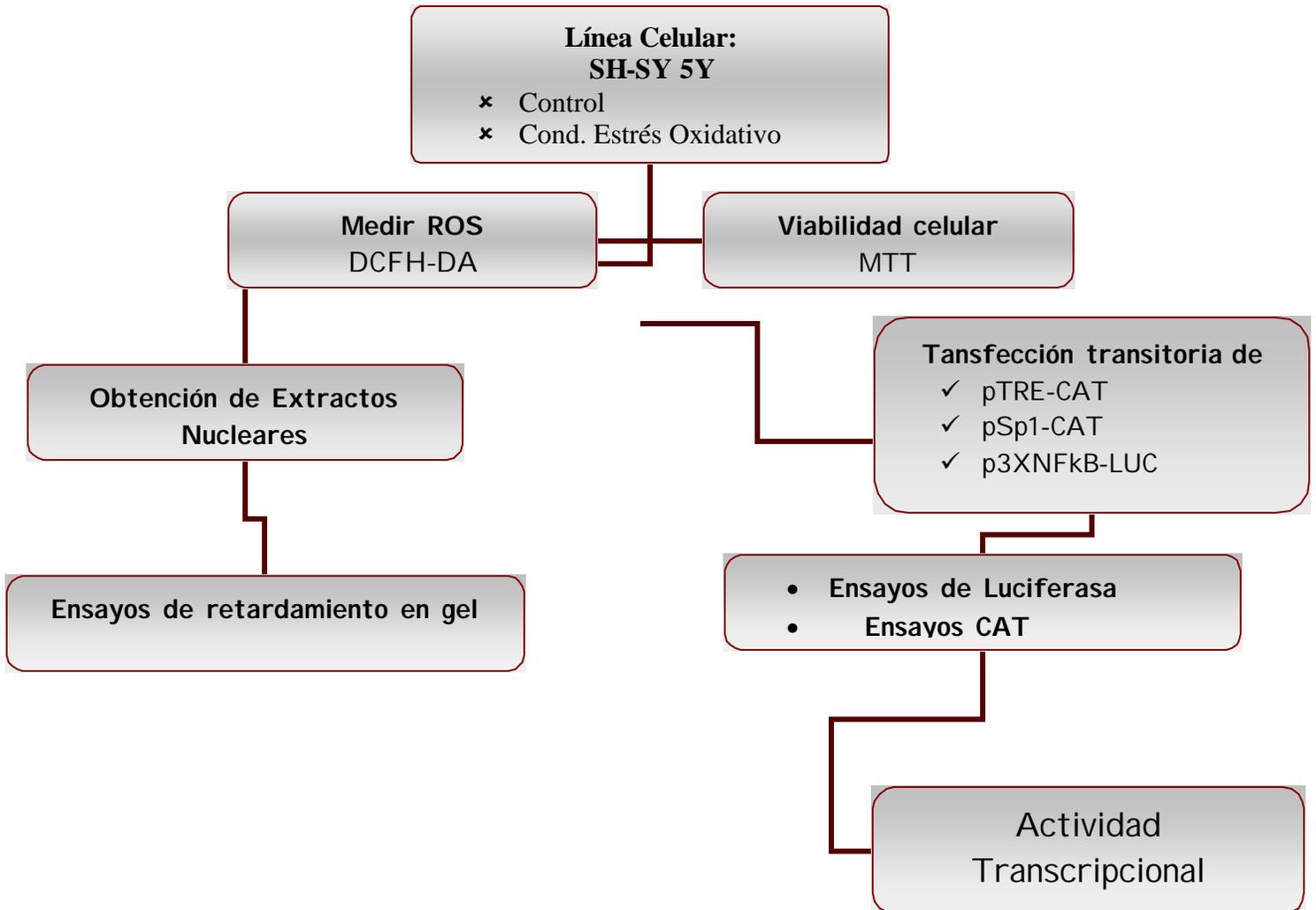
OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia y actividad de los factores de transcripción Ap-1, Sp-1 y NF κ B en una línea celular de neuroblastoma bajo condiciones de estrés oxidativo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar de forma comparativa la actividad transcripcional, en células no tratadas y tratadas, de los factores de transcripción mencionados en los cultivos de células inmortalizadas SH-SY5Y sometidas a estrés oxidativo.
- Determinar la actividad de unión de los factores de transcripción Sp1, NF κ B y Ap-1 por su secuencia consenso en células inmortalizadas SH-SY5Y sometidas a estrés oxidativo.

ESQUEMA EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos Celulares

SH-SY5Y es una línea celular derivada de neuroblastoma, obtenida en 1981 a partir de una metástasis de médula ósea de un niño con un neuroblastoma embrional pobremente diferenciado. El ácido retinóico inhibe parcialmente la proliferación y las células pueden diferenciarse. Las condiciones de cultivo para estas células son: medio de cultivo, DMEM HIGH Glucosa con 4 mM L-glutamina ajustado para contener 1.5 g/L bicarbonato de sodio y 4.5 g/L, glucosa 90%; Piruvato de sodio a una concentración final de 220 µg/ml, aminoácidos no esenciales 1X de Sigma Chemical.CO; suero fetal bovino 15% y como antibióticos Penicilina procainica a una concentración final de 100 µg/ml y estreptomycin a 15 µg/ml. Las células se incuban a 37⁰ C. en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

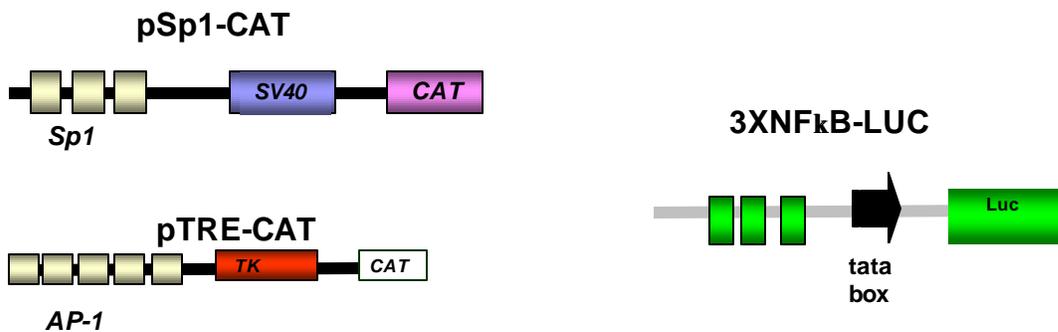
Maxipreparación de DNA de alta pureza.

Para realizar la transfección de los plásmidos en cuestión se realizó la extracción utilizando el Kit "QIAGEN plasmid purification". Se crecieron cada una de las bacterias en 100ml de medio LB con ampicilina incubando a 37°C por 16 horas en agitación vigorosa (300 rpm). Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 8500 rpm por 5 minutos y la pastilla se resuspendió en el buffer P1 (Tris HCl 50mM, pH 8.0; EDTA 10mM; RNAsa A 1µg/ml). Inmediatamente se le agregó el "buffer" de lisis P2 (NaOH 200 mM, SDS al 1%) y se mezcló por inversión. Se agregó el Buffer de neutralización P3 frío (acetato de potasio 3.0 M, pH 5.5), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente se centrifugo a 8500 rpm por 50 minutos. El sobrenadante se agregó a una columna QIAGEN-tip 100 previamente equilibrada con el buffer QBT (NaCl 750mM; MOPS 50 mM, pH 7.0; isopropanol al 15%; Tritón X-100 al 0.15%). Una vez que el sobrenadante entró en la resina, la columna se lavó dos veces con el buffer QC (NaCl 1.0 M; MOPS 50 mM, pH 7.0; isopropanol al 15%) para eliminar contaminantes de la preparación de DNA. Posteriormente el DNA fue eluido de la columna con el buffer QF (NaCl 1.25M; Tris 50mM, Tris-Cl pH 8.5 isopropanol al 15%). Finalmente el DNA se precipitó con

isopropanol y la pastilla que se obtuvo después de centrifugar a 8500 rpm por 1 hora se lavó con etanol al 80%, se centrifugó por 10 minutos a 8500 rpm y se retiró el etanol. La pastilla se dejó secar 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 μ l de agua estéril. Por último se cuantificó el DNA tomando como alícuota 5 μ l de DNA realizando una dilución 1:200 con agua estéril. Con el fin de determinar su pureza se determinó su absorbancia a 260 nm y su calidad fue confirmada por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Transfecciones Transitorias

Se sembraron las células en placas multipozos 6 (superficie 962mm²) y se transfectaron con 3 μ g de DNA de cada plásmido (TRE-CAT, 3XSp1-CAT, 3XNF κ B-LUC) y sus correspondientes plásmidos conteniendo sólo el promotor, ver mapas adelante) mediante el *método de fosfato de calcio*.



Método de Fosfato de Calcio: En placas multipozos de 6 con células SHSY5Y al 80% de confluencia, fueron transfectadas. En un tubo Eppendorf se colocaron 3 μ g de DNA del plásmido en cuestión (pSp1-CAT, pTRE-CAT y 3XNF κ B-LUC) además de 250 μ l de agua estéril y 30 μ l de CaCl₂ /2M. Esta mezcla se agregó gota a gota con agitación constante sobre 250 μ l de buffer HEBS (NaCl 275mM, KCl 10mM, Na₂HPO₄ 1.4 mM, glucosa 10mM y HEPES 50mM; pH 7.05), se dejó incubando por 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente agregar la mezcla sobre el medio de cultivo, lentamente, e incubar a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ durante 5 horas. Posteriormente se realizó cambio de medio de cultivo y se incubaron por 48 hrs. A 37°C y 5% de CO₂.

Se cosecharon 48 hr. post-transfección para realizar posteriormente ensayos para detectar el gen reportero, CAT ó 24 hrs. para detectar luciferasa.

Ensayos CAT

Las células transfectadas se cosechan 48 hr post-transfeccion en solución TEN (40mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 15 mM de NaCl). Se lisaron empleando 5 ciclos de lisis (congelación a -70° C, descongelación a 37° C). Se cuantificó la concentración de proteínas utilizando el método Bradford (Bradford, 1976) y en base a ella se normalizaron los extractos celulares entre sí, se incubaron con 0.25 μ Ci de 14 C cloranfenicol y 3 μ l acetil-CoA (20mM) (Sigma). Las reacciones de acetilación se llevarán a cabo a 37° C durante 4 hrs. Las muestras se extrajeron con acetato de etilo y se cargaron las placas de cromatografía en capa fina (Sigma Chemicals Co.). La cromatografía se realizó utilizando una mezcla de solventes cloroformo-metanol (97:3). La radioactividad contenida en las placas de cromatografía se cuantificó para determinar el porcentaje de conversión en cloranfenicol acetilado utilizando el analizador de imágenes Thypoon (Molecular Dynamics).

Ensayos de Actividad de Luciferasa

Una vez cosechadas las células en “reporter lysis buffer” a 1x se obtienen los extractos proteicos por lisis celular empleando un ciclo de congelación (-70° C) y descongelación (37° C). Se cuantifica la concentración de proteínas por el método de Bradford normalizando en base a ella los extractos entre sí. Se agrega el reactivo de luciferasa al extracto y se cuantifica por medio de un luminómetro (Acsent Fluoroscan 1600).

Detección de Factores de Transcripción.

Extractos Nucleares

Se obtuvieron extractos nucleares a partir de células SH-SY5Y tratadas y no tratadas por el método de Schreiber et. al. 1989. La cosecha de células se realizó lavando las células dos veces con el amortiguador Tris-Dulbeco (TD) (0.7M NaCl, 5mM KCl, 0.8mM Na_2HPO_4 , 50mM Trizma-base pH 7.45); posteriormente las células se

centrifugaron y la pastilla celular se resuspendió en 400 µl de buffer A (10 mM HEPES pH 7.9; 10 mM KCl; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0.5 mM PMSF). Posteriormente se incubaron 15 min. a 4°C y se adicionó 25 µl de Nonidet NP40 (Sigma®) al 10% y se agitó 10 segundos en un agitador a presión. El homogenizado se centrifugó por 1 min a 4°C en una microcentrifuga a 15000rpm. Se colectó la pastilla de núcleos y se resuspendió en 50 µl de buffer C (20 mM HEPES pH 7.9; 0.4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) y se somete a agitación constante por 40 min a 4°C. Finalmente se centrifuga por 5 min a 4°C y se colecta el sobrenadante el cual contiene las proteínas nucleares. Las proteínas se alicuotan y guardaron a -70°C. La concentración de proteínas se determinará por el método de Bradford (Bradford 1976).

Marcaje terminal de oligonucleotidos

El marcaje de los oligonucleótidos de doble cadena se realizó empleando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Se marcaron 100ng de DNA, en un volumen final de 10µl, con 1µl de nucleótidos (10mM de los nucleótidos de dGTP, dTTP, dCTP) y 10µCi de α -³²P-dATP, además se adicionó 1µl de regulador de marcaje TM 10X (100mM Tris pH 8.5, 50mM MgCl₂). Esta mezcla se incubó con 1U de enzima Klenow (Life Technologies) por 30-45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se diluyo la sonda marcada en agua ultrapura para obtener una concentración final de 1ng/µl. Las secuencias de los oligonucleotidos de doble cadena utilizados se enlistan a continuación:

5'-CTAGATTCGATCGGGGCGGGCGA-3' **Sp-1**

5' CTAGCGCTTGATTGACTCAGCCGGAA 3' **Ap-1**

5' CTAGAGTTGAGGGACTTTCCCAGGC 3' **NFκB**

Ensayos de retardamiento

Los extractos nucleares obtenidos de células SH-SY5Y se incubaron en presencia de solución de unión de proteínas BDG 1X (12mM Hepes, pH 7.8, 10% de glicerol, 0.05 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1mM dithiothreitol, 2 mM de espermidina) y 1µg de poly-(dI-dC) (Pharmacia Blotech) durante 10minutos a 4°C. Posteriormente se agregó 1ng de oligonucleótido marcado con ³²P-dATP y se incubó la mezcla 10minutos a 4°C.

Las mezclas de reacción se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida al 7% a 140 V por dos horas y media y se secaron al vacío exponiéndolos en placas radiográficas (Kodak Eastman) toda la noche a -70°C.

Ensayos de viabilidad por MTT.

El ensayo consiste en la habilidad de células vivas de reducir un colorante amarillo soluble en agua, MTT, a un producto formazan de coloración morada insoluble en agua. La absorbancia del sustrato y producto nos da diferencias en longitud de onda. Así en células sembradas en placas multipozos de 22 pozos. previamente tratadas bien con Glutamato o bien con H₂O₂, se agregan 40 µl de MTT disuelto en PBS (5 mg/ml), se incuban 4 horas en oscuridad, posteriormente son resuspendidas por pipeteo, se colocan en tubos ependorf y se centrifuga a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante y se agrega 100 µl de Alcohol isopropanol-KCl al 5% en donde son resuspendidas. Finalmente se lee en lector de ELISA a 630nm de longitud de onda utilizando como blanco el mismo medio de cultivo y MTT en la misma concentración utilizada para las células (Plumb et al 1989). Los valores obtenidos fueron graficados utilizando el programa Sigma plot.

Medición de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

La formación de especies reactivas de oxígeno fue medida usando 2',7'-diclorofluorescein diacetato (DCFH-DA) (Oyama et al 1994); (Jakubowski & Bartosz 2000). Este reactivo difunde a través de la membrana y es enzimáticamente hidrolizado por esterasas intracelulares a diclorofluorescein no fluorescente (DCFH) el cual reacciona con especies reactivas de oxígeno, específicamente con H₂O₂, para

formar un compuesto altamente fluorescente 2',7'-diclorofluorescein (DCF). Las células se incuban con 5 μ M de 2',7'-diclorofluorescein diacetato por 20 minutos a 37° C, después de haber sido sometidas a tratamiento con glutamato o bien con el inductor de estrés H₂O₂. Posteriormente se realizan lavados y se toman lecturas del porcentaje de fluorescencia.

Inducción de Estrés Oxidativo: H₂O₂ y Glutamato

Para la inducción de estrés oxidativo se utilizó H₂O₂ (SIGMA) al 30% en una concentración final de 100 μ M, considerando la necesidad de estandarizar los tiempos de exposición (0', 5', 10' 15' y 30 minutos, estableciendo una curva de dosis-respuesta). Así mismo, utilizamos glutamato en concentraciones de 1, 2 y 10 mM, consideradas neurotóxicas, con tiempo de exposición de 2 horas (para las células transfectadas el tratamiento se dió 24 hrs. postransfección).

RESULTADOS

Diversos estudios han demostrado que la liberación excesiva de glutamato se asocia con la muerte de células neuronales en diversos estados patológicos (Fritz et al, 1999). Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran la excitotoxicidad del glutamato, sin embargo los mecanismos moleculares de esta excitotoxicidad no se conocen del todo. Dentro de las respuestas celulares al exceso de glutamato, hay diversas respuestas de tipo transcripcional, cuyos efectores son distintos factores de transcripción. Tomando en consideración que las células SH-SY5Y muestran un fenotipo neuronal, nos dimos a la tarea de medir la respuesta transcripcional en estas células, cuando son expuestas a concentraciones excesivas de glutamato.

- ***Actividad Transcripcional de los factores de la familia Sp***

Con la finalidad de conocer la actividad transcripcional de los factores de la familia Sp en respuesta al tratamiento de las células SH-SY5Y con glutamato se realizaron a lo largo de este trabajo, dos tipos de ensayos: los bioquímicos en los que detectamos los cambios en la interacción de los factores de transcripción a su secuencia consenso y por otro lado, los cambios de la funcionalidad de estos factores usando vectores reporteros, cuya actividad puede cambiar en respuesta al tratamiento.

Iniciamos con ensayos de transfección transitoria con el plásmido pSp-1CAT, con el cual la determinación de los niveles de la cloranfenicol acetil transferasa nos indica la actividad de factores Sp (Sp1 a Sp4). Este vector reportero posee tres sitios de respuesta a Sp, frente al promotor del virus SV40, dirigiendo la transcripción del gen reportero CAT (Figura 7 a). Para determinar la cantidad óptima de DNA a transfectar, se realizó una cinética en la que se transfectaron de forma transitoria, las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, con diferentes cantidades de pSp-1CAT, utilizando las células cultivadas en placa de 6 pozos (superficie de 962 mm²) con una confluencia del 70% y con el método de fosfato de calcio.

Encontramos que 3µg es la concentración óptima para estos ensayos (Figura 7 b). Una vez establecidas las condiciones de transfección, las células transfectadas fueron

estimuladas con 1, 2 y 10 mM de glutamato 24 hr post-transfección. A las 48 hr post-transfección las células fueron cosechadas siendo importante mencionar que aún cuando no fueron realizados ensayos para determinar el porcentaje de transfección, se cuantificó la concentración de proteínas utilizando el método Bradford (Bradford, 1976) y en base a ella se normalizaron los extractos celulares entre sí para dar inicio al ensayo de CAT. Finalmente la radioactividad contenida en las placas de cromatografía (Figura 7 c) se cuantificó para determinar el porcentaje de conversión a cloranfenicol acetilado utilizando el analizador de imágenes Thypoon (Molecular Dynamics). Las gráficas fueron realizadas a través del programa de cómputo Sigma Plot. Así en la Figura 7 d, observamos que disminuye 20% de la actividad transcripcional de este plásmido cuando las células son estimuladas con concentraciones de 1, 2 y 10 mM de glutamato.

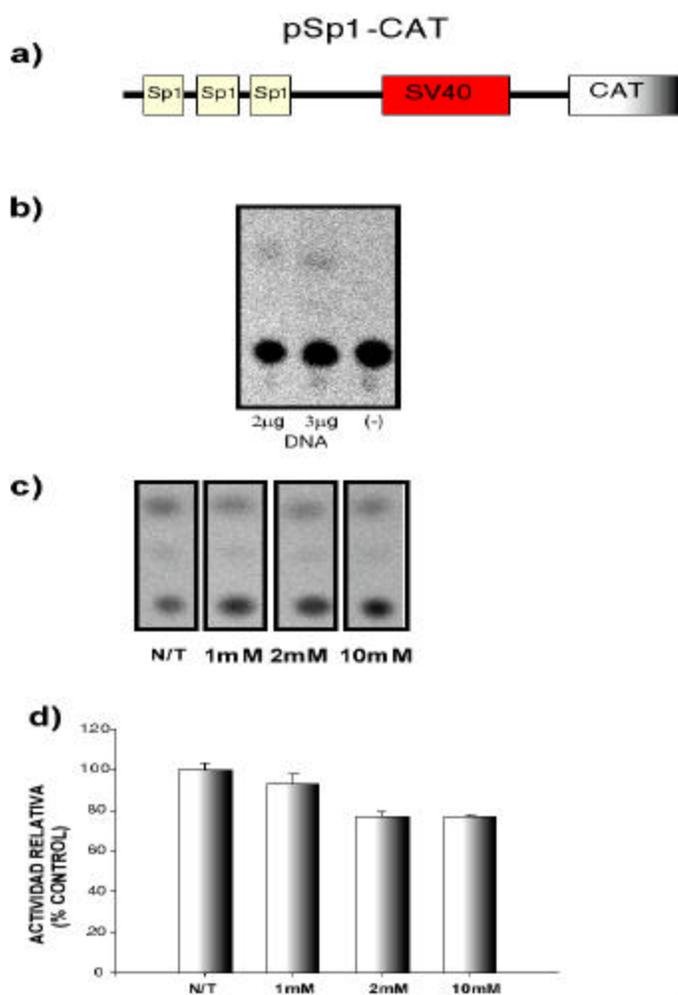


Figura 7. Actividad transcripcional del plásmido Sp-1CAT en respuesta al tratamiento con glutamato. Panel a) Mapa del plásmido pSp1-CAT, en amarillo se indican los 3 repetidos de la secuencia consenso de unión para factores de la familia Sp. **Panel b)** Las células SH-SY5Y se transfectaron con diferentes concentraciones de este plásmido y se realizaron los ensayos CAT. **Panel c)** 3µg de DNA plasmídico se transfectaron en las mismas condiciones que en el panel b), 24 hr post-transfección las células fueron tratadas con glutamato a concentraciones finales de 1, 2 y 10 mM por 2 horas. Para realizar los ensayos de actividad CAT las células se cosecharon a las 48 hr post-transfección. Se muestra la imagen representativa de la cromatografía de capa fina en donde N/T denota a las células no tratadas. **Panel d)** Representación gráfica de la actividad transcripcional, expresada con respecto a la actividad de las células no tratadas. Las barras representan la media ± el error estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos realizados al menos con 3 repeticiones independientes.

Al observar dicho efecto sobre la actividad nos preguntamos si la afinidad del factor de transcripción por su secuencia específica en el DNA se encontraba afectada. Realizamos ensayos de retardamiento en gel utilizando extractos nucleares obtenidos a partir de células previamente tratadas con las mismas concentraciones de glutamato, durante 2 hr, tratamiento realizado en medio de cultivo al 0.5% de suero. Observamos en la Figura 8 b que además de la presencia del complejo que corresponde clásicamente a Sp1, que no muestra cambios significativos, se identificó un segundo complejo correspondiente al factor Sp3. Este factor de transcripción pertenece a la misma familia de Sp, y que presenta afinidad por la misma secuencia consenso en el DNA, quién además muestra actividad represora debido a que carece del dominio de activación. El complejo correspondiente a Sp3 aumenta significativamente, hecho que correlaciona con la disminución de la actividad observada en los ensayos de actividad CAT. Para determinar si la interacción del factor Sp1 con el oligonucleótido empleado es específica, se realizaron los ensayos de competencia con la versión mutada de Sp1 (mSp1) y con un oligonucleótido heterólogo no relacionado con la secuencia de unión para el factor C/EBP (Figura 8 c), demostrando así su especificidad.

Enseguida nos preguntamos si observaríamos la misma respuesta en las células SH-SY5Y al inducir estrés oxidativo con un inductor clásico como es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se ha reportado en múltiples trabajos que la sensibilidad al peróxido depende del tipo celular utilizado y de las condiciones de exposición a dicho reactivo. Por esta razón estudiamos la respuesta a diferentes dosis y tiempos, utilizando extractos nucleares de células tratadas con concentraciones de 5, 10, 50 y 100 μM de H_2O_2 por 30 minutos. Realizamos ensayos de retardamiento en gel empleando el oligonucleótido correspondiente al factor Sp1 marcado terminalmente. Como se observa en la Figura 9 b, mientras que el complejo asociado con Sp1 no muestra cambios significativos, una de las isoformas de Sp3 (complejos en la parte inferior) aumenta su afinidad por la secuencia consenso de forma significativa, cuando es estimulada con 100 μM de H_2O_2 lo que correlaciona con los resultados ya obtenidos tras la estimulación con glutamato. Cuando realizamos los ensayos de retardamiento

empleando extractos nucleares provenientes de células tratadas con 100µM de H₂O₂ por 5',10',15' y 30 minutos observamos que a 30 minutos la formación del complejo de Sp3 aumenta de manera notoria (Figura 9 a).

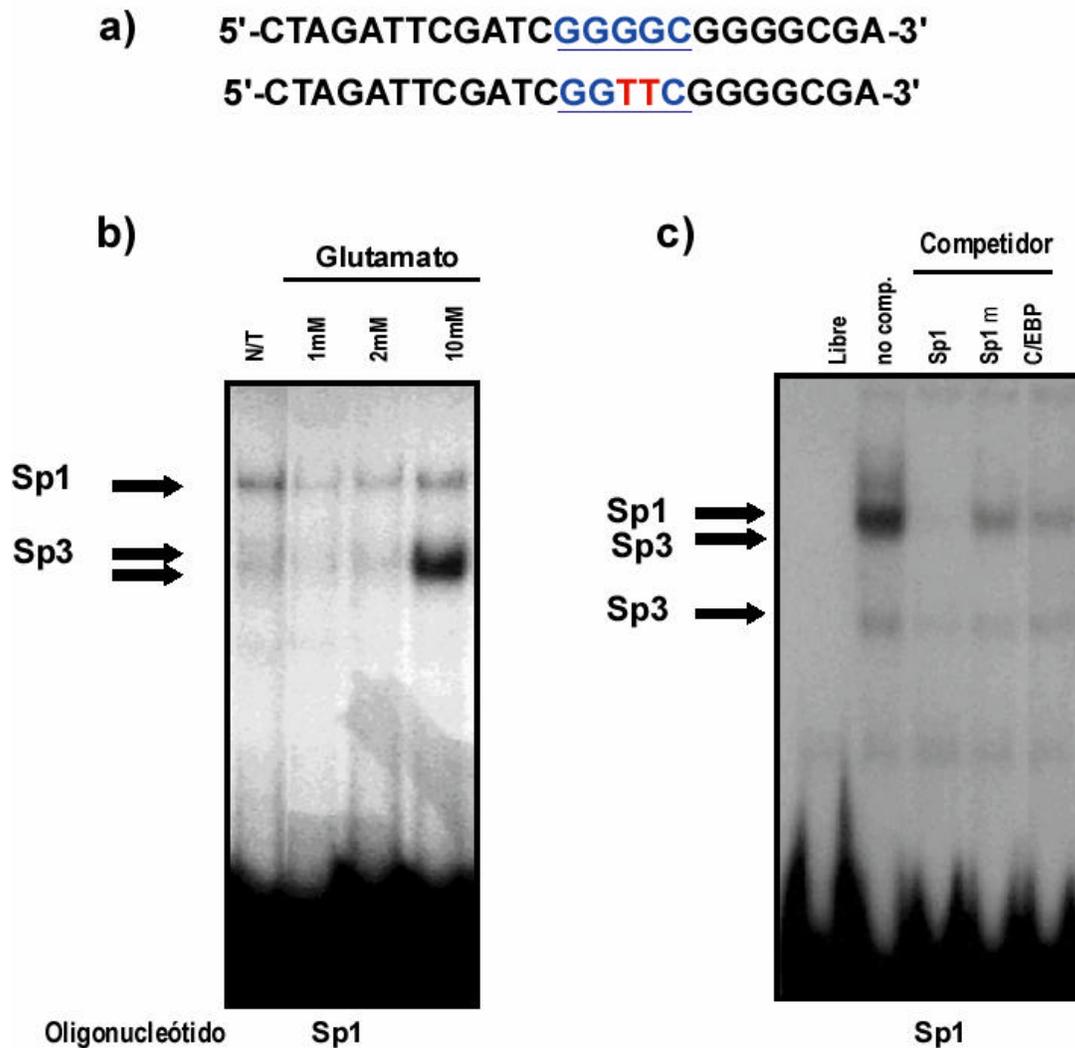


Figura 8. Sp-3 aumenta su afinidad por la secuencia consenso Sp tras el estímulo con Glutamato. Panel a) Secuencia del oligonucleótido Sp empleado en los ensayos de retardamiento en gel correspondiente a la secuencia consenso para el factor de transcripción Sp-1 mismo que fue marcado terminalmente con ³²P-dATP y secuencia del oligonucleótido Sp mutado empleado en los ensayos de competencia.

Panel b) Ensayo de retardamiento en gel usando extractos nucleares obtenidos apartir de células SH-SY5Y cosechadas tras ser estimuladas con concentraciones finales de 1, 2 y 10 mM de Glutamato por 2 hr. Las flechas negras indican los complejos correspondientes a Sp-1 y a Sp-3, de acuerdo a los reportado en la literatura (Suske1999). **Panel c)** Ensayos de competencia con extractos nucleares obtenidos de células SH-SY5Y sin tratamiento y

agregando el oligonucleótido homólogo, la versión mutada del mismo y un oligonucleótido heterólogo o no relacionado, todos no marcados y en un exceso molar de 100 veces.

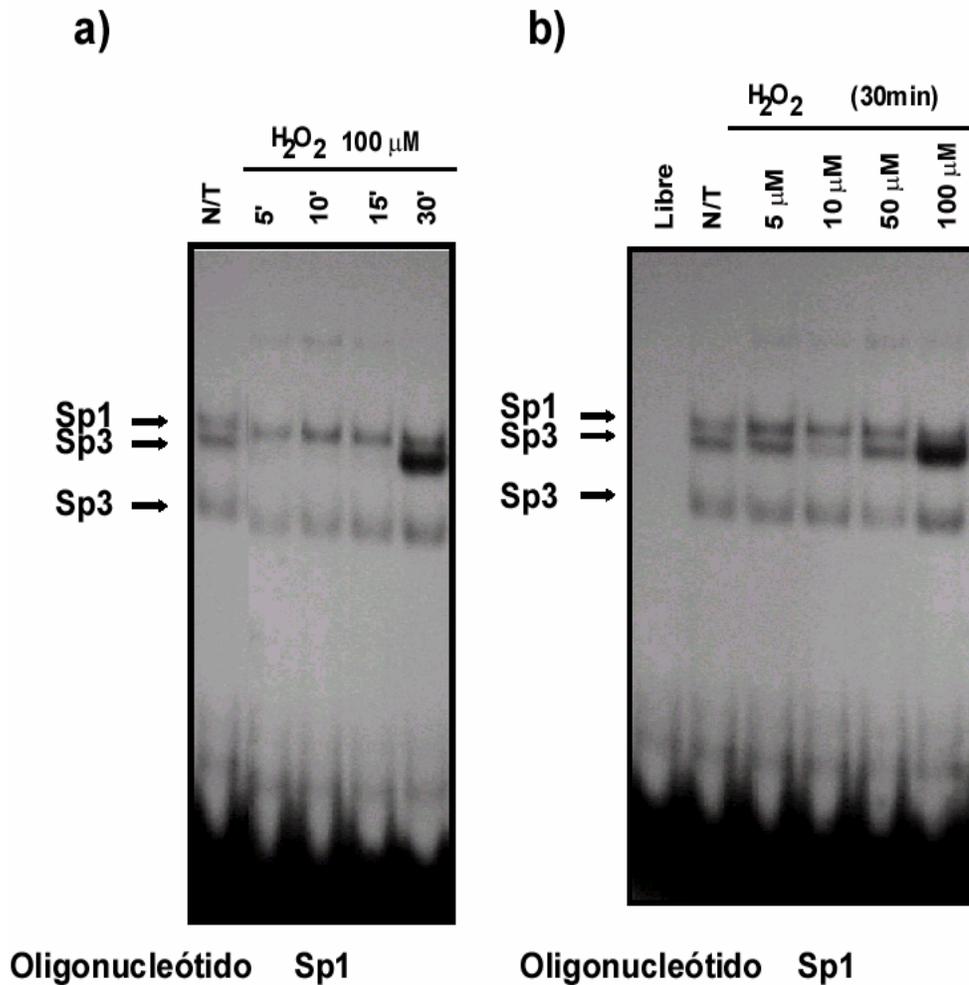


Figura 9. Proteínas Sp: respuesta al peróxido de hidrógeno. Panel a) Ensayo de retardamiento en gel realizado tras la obtención de extractos nucleares obtenidos a partir de células SH-SY5Y tratadas con 100 μM de H₂O₂ por 0, 5, 10, 15 y 30 minutos y utilizando el oligonucleótido Sp-1 marcado terminalmente con ³²P-dATP. **Panel b)** Ensayos de retardamiento en gel tras la obtención de extractos nucleares realizados a partir de células SH-SY5Y tratadas con 0, 5, 10, 50 y 100 μM de H₂O₂ por 30 minutos.

- **Actividad Transcripcional de los factores de la familia AP-1**

El factor de transcripción AP-1 (“Activator Protein 1”) se une a secuencias palindrómicas específicas con estructura similar TGA₃CTCA y TGACGTCA, designadas frecuentemente como el elemento regulador TRE (elemento responsivo a TPA, tetradecanoyl-forbol-acetato) ó CRE (elemento responsivo a cAMP).

Al realizar el mismo tipo de ensayos funcionales y bioquímicos para detectar tanto la presencia como la activación del factor Ap-1, medimos la actividad transcripcional en ensayos de transfección transitoria usando el plásmido denominado TRE-CAT, el cual posee 5 sitios de respuesta a AP-1, ubicados frente al promotor de la timidina cinasa de Herpes virus (TK), y dirige la transcripción del gen reportero CAT. 24 hr post-transfección, las células transfectadas fueron estimuladas con 1, 2 y 10 mM de glutamato y a las 48 hr, fueron cosechadas para el ensayo CAT.

Como se muestra en la Figura 10 d, la actividad de este plásmido no muestra cambios significativos cuando las células son estimuladas con diferentes concentraciones de glutamato. Como un control de la capacidad de este vector para responder diferentes estímulos, dentro del mismo contexto celular, realizamos la transfección transitoria del plásmido TRE-CAT estimulando a las células con TPA 100nM (12-O-tetradecanolforbol 13-acetato), 12 hr antes de ser cosechados los cultivos. El TPA es un activador de la proteína cinasa C (PKC), cuya activación conduce al incremento en la actividad del factor AP-1 (Chen et al 2002). En la Figura 10 e, puede observarse que efectivamente el plásmido TRE-CAT es capaz de responder a un estímulo diferente en un mismo contexto celular.

Cuando realizamos el ensayo de retardamiento con el fin de investigar si la afinidad del factor AP-1 por su secuencia consenso se encontraba modificada, utilizando extractos nucleares de células SH-SY5Y previamente tratadas con las mismas concentraciones de glutamato ya mencionadas por 2 hr y el oligonucleótido consenso para el factor AP-1 marcado radiactivamente (Figura 11 a), tampoco observamos cambios significativos en la afinidad, lo que corresponde al resultado obtenido al evaluar la actividad en los ensayos de transfección (Figura 11 b).

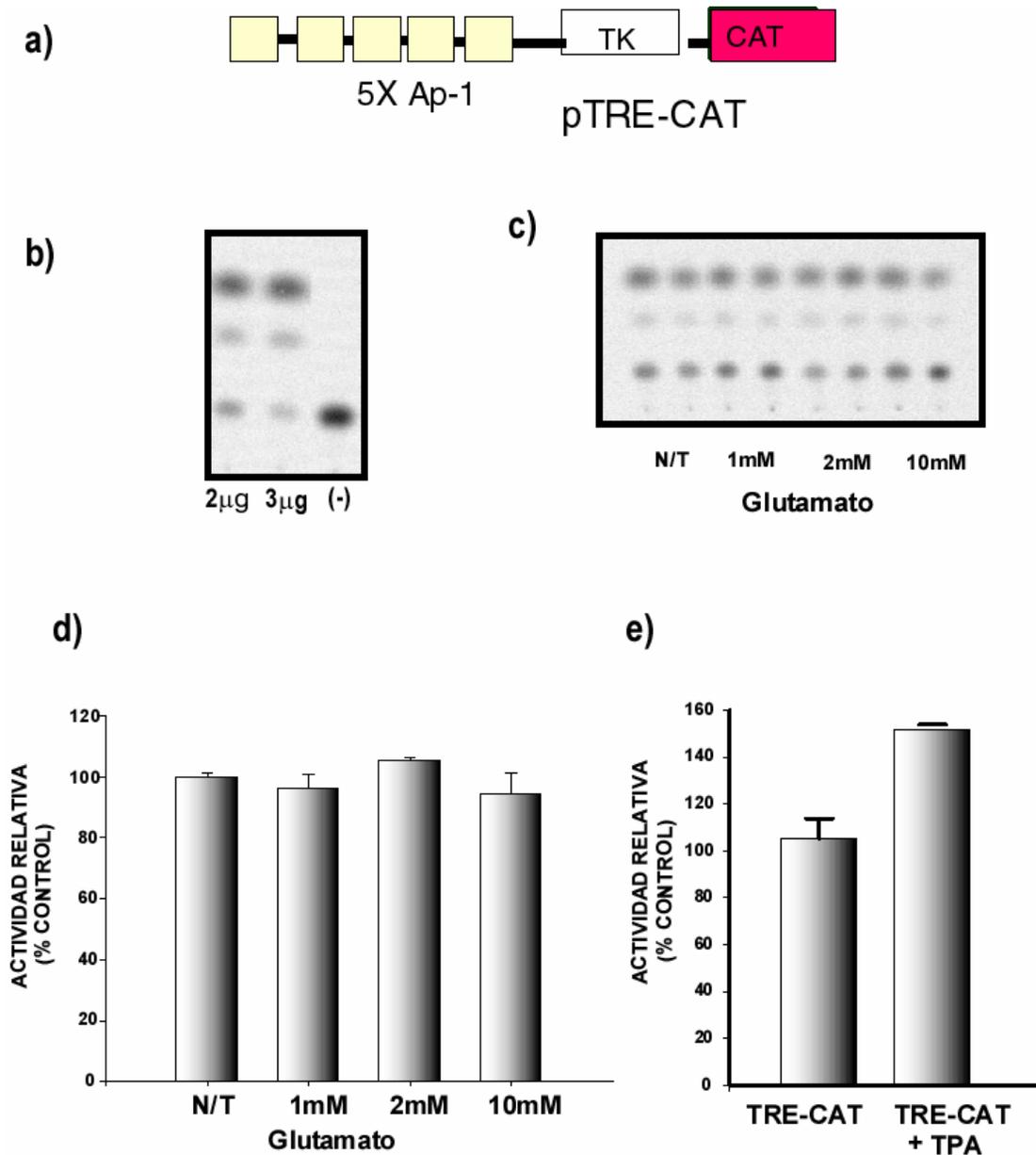


Figura 10. AP-1 no muestra una respuesta al glutamato. **Panel a)** Mapa del plásmido TRE-CAT con 5 sitios AP-1 frente al promotor de SV40. **Panel b)** Las células SH-SY5Y se transfectaron con diferentes concentraciones de este plásmido para determinar la concentración adecuada de DNA. **Panel c)** En células SH-SY5Y se transfectaron 3 μ g del plásmido pTRE-CAT, y fueron tratadas 24 hr post-transfección con concentraciones finales de 1, 2 y 10 mM de glutamato por 2 hr, para finalmente realizar ensayos de actividad CAT. Se muestra la imagen representativa de la cromatografía de capa fina en células no tratadas (NT) y tratadas con 1, 2 y 10 mM de glutamato. Las barras representan la media \pm error estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos realizados al menos con 3 repeticiones independientes. **Panel d)** Representación gráfica de la actividad transcripcional, expresada con respecto a la actividad de las células no tratadas. **Panel e)** En células SH-SY5Y se transfectaron 3 μ g del plásmido pTRE-CAT y fueron tratadas con TPA a una concentración final de 100nm por 12 hrs., para finalmente realizar ensayos de actividad CAT. Las barras representan la media \pm error estándar de los resultados obtenidos en un experimento realizado con 3 repeticiones independientes.

a)

5' CTAGCGCTTGATTGACTCAGCCCGGAA 3'

b)

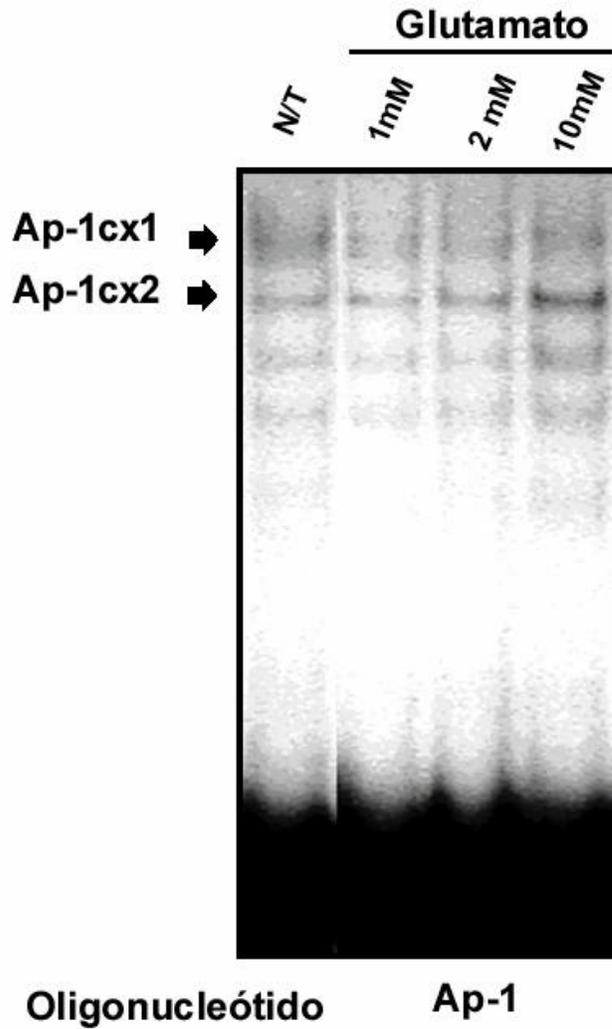


Figura 11. AP-1 no muestra modificaciones significativas en la actividad de unión tras la estimulación con glutamato. Panel a) Oligonucleótido correspondiente a la secuencia consenso para el factor de transcripción AP-1 marcado terminalmente con ^{32}P -dATP. **Panel b)** Ensayo de retardamiento en gel utilizando extractos nucleares obtenidos de células SH-SY5Y cosechadas tras ser estimuladas con concentraciones finales de 1, 2 y 10 mM de Glutamato por 2 hrs. Las flechas negras indican los complejos típicos.

- **Actividad Transcripcional de los factores de la familia NFκB**

El factor nuclear κB está compuesto de homo y heterodímeros de los miembros de la familia de factores de transcripción Rel. El heterodímero más frecuente esta formado por una subunidad de 50-kDa (p50) y otra de 60-kDa (p65), secuestrada en el citoplasma por una proteína inhibitoria de la familia IκB, de la cual se han identificado siete isoformas siendo IκB-α el miembro mejor caracterizado de esta familia (Turpaev 2002). A través de diversas vías mediadas por no-receptores como el estrés oxidativo o la radiación UV, se da la activación de NFκB. Igualmente algunos eventos mediados por receptor resultan en la activación de este factor de transcripción.

Cuando realizamos los ensayos de retardamiento para investigar cambios de afinidad o en la actividad de unión de NFκB a su secuencia consenso (Figura 12 a), observamos que a concentraciones de 1mM de glutamato existe una disminución importante en la afinidad de este factor por su secuencia pero a 2 y 10mM se aprecia un aumento paulatino en la formación del complejo (Figura 12 b).

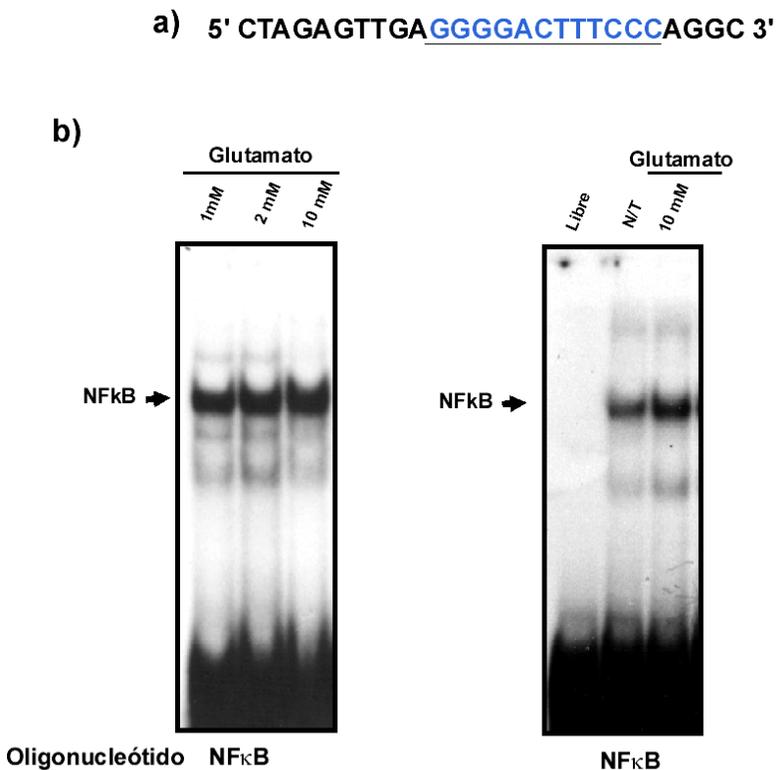


Figura 12. NFκB aumenta su afinidad por su secuencia consenso en el DNA en respuesta al tratamiento con glutamato. Panel a) Oligonucleótido con la secuencia consenso de NFκB. **Panel b)** En este ensayo de retardamiento en gel utilizamos nuevamente extractos nucleares obtenidos a partir de células SH-SY5Y cosechadas tras ser estimuladas con concentraciones finales de 1, 2 y 10 mM de Glutamato por 2 hrs, así como el oligonucleótido NFκB marcado terminalmente con ³²P-dATP. Las flechas negras indican la formación del complejo.

Enseguida al investigar la respuesta al H_2O_2 (usado aquí como un inductor de estrés oxidativo) y realizar los ensayos de retardamiento en gel utilizando extractos nucleares de células tratadas a diferentes dosis y tiempos crecientes (concentraciones de 5,10, 50 y 100 μM de H_2O_2 por 30 minutos) empleando el oligonucleótido que es reconocido por el factor $NF\kappa B$ marcado terminalmente. Se observa, en la Figura 13 b, que $NF\kappa B$ aumenta tras ser tratadas las células con 100 μM de H_2O_2 lo que correlaciona con los resultados ya obtenidos tras la estimulación con glutamato. Cuando realizamos ahora los ensayos empleando extractos nucleares provenientes de células tratadas con 100 μM de H_2O_2 por 5', 10', 15' y 30 minutos observamos que a 30 minutos el complejo de $NF\kappa B$ aumenta de manera notoria (Figura 13 a).

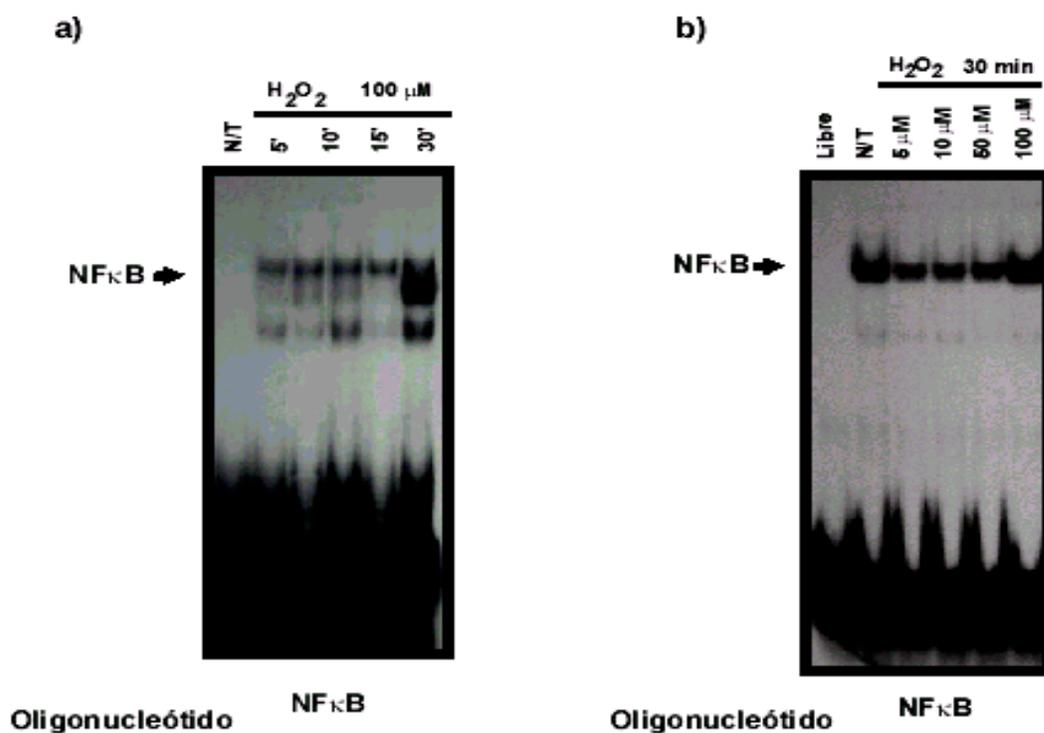


Figura 13. Respuesta de $NF\kappa B$ al H_2O_2 . Panel a) Ensayo de retardamiento en gel realizado con extractos nucleares obtenidos a partir de células SH-SY5Y tratadas con 100 μM de H_2O_2 por 0, 5,10,15 y 30 minutos utilizando el oligonucleótido $NF\kappa B$ marcado terminalmente con ^{32}P -dATP. Panel b) Ensayos de retardamiento en gel realizado con extractos nucleares obtenidos a partir de células SH-SY5Y tratadas con 0, 5, 10, 50 y 100 μM de H_2O_2 por 30 minutos.

Para determinar si la interacción del factor NFκB con el oligonucleótido empleado en los ensayos es específico, se realizaron ensayos de competencia con la versión mutada de NFκB (mNFκB) y con un oligonucleótido heterólogo o no relacionado (Figura 14) demostrando así la especificidad del complejo en el cual observamos los cambios.

De esta forma, es posible decir que los factores de transcripción Sp-3 y NFκB están respondiendo al glutamato en una forma similar a lo que ocurre cuando las células se someten a estrés oxidativo directamente (usando H₂O₂).

- a) 5' CTAGAGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC 3'
- b) 5' CTAGAGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC 3'

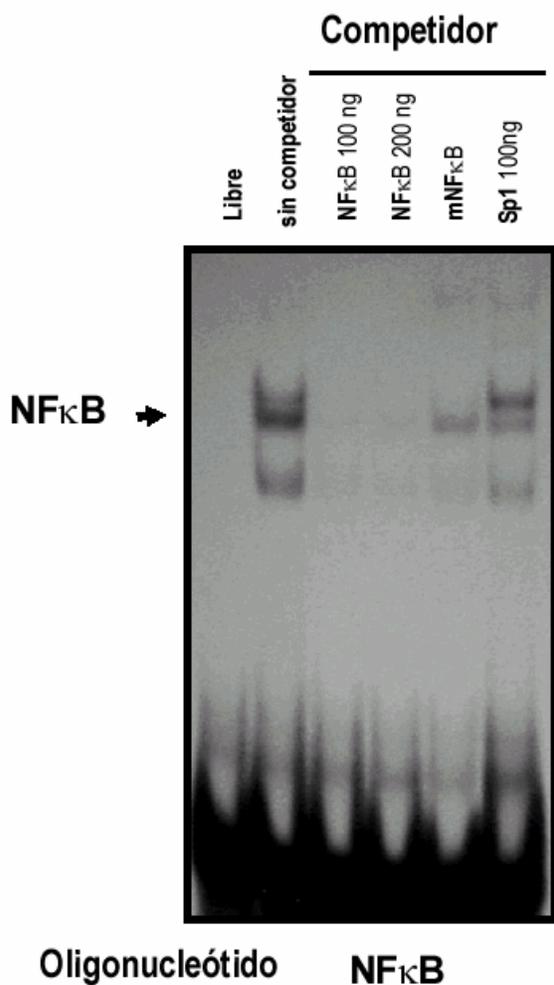


Figura 14. Especificidad de los complejos NFκB. Ensayos de retardamiento en gel tras la obtención de extractos nucleares a partir de células SH-SY5Y sin tratamiento alguno utilizando el oligonucleótido correspondiente a la secuencia consenso de NFκB marcado terminalmente con ³²P-dATP, sometido a competencia agregando un exceso 100 veces mayor de oligonucleótido homólogo, la versión mutada y un oligonucleótido heterólogo o no relacionado, no marcados.

Viabilidad Celular.

Por otro lado, se determinó la viabilidad celular tanto para las células tratadas con glutamato como en las condiciones en las que usamos peróxido, utilizando la técnica denominada MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide-Formazan) (Plumb et al 1989).

Así en células previamente tratadas con glutamato, tras obtener los valores de las absorbancias, graficamos los resultados, mismos que se muestran en la Figura 15, panel a), en donde observamos una disminución en la viabilidad celular de aproximadamente el 15% lo que se traduce en un 85% de sobrevivencia celular, porcentaje suficiente para la realización de los ensayos requeridos. Cuando realizamos los mismos ensayos para el análisis en células tratadas con H_2O_2 observamos una reducción de la viabilidad bajo las condiciones de 5, 10, 50 y 100 μM de H_2O_2 hasta en un 25% aproximadamente (Panel b), permitiendo una sobrevivencia celular del 75%, suficiente para nuestros propósitos.

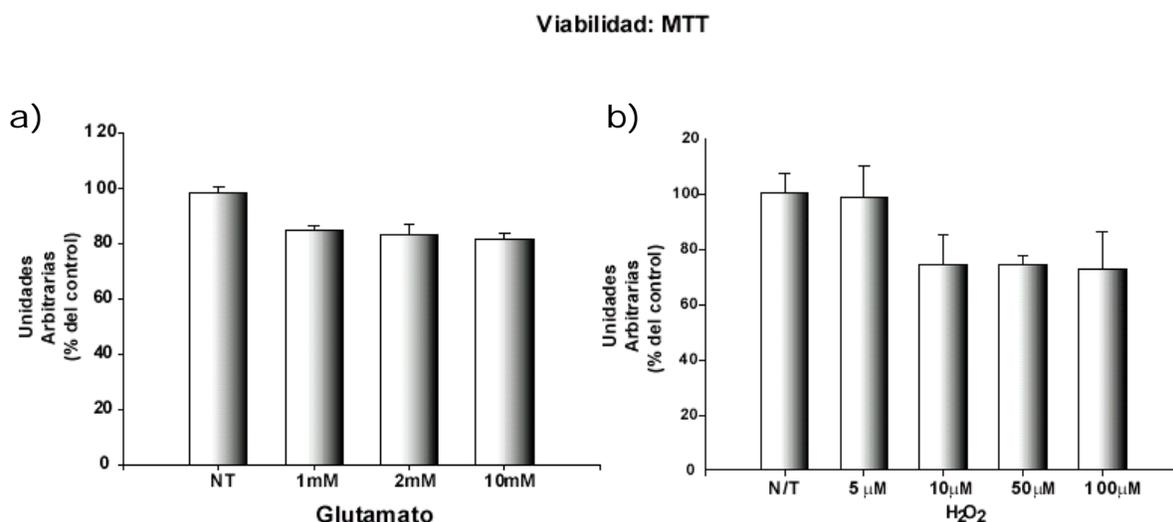


Figura 15. Efecto del glutamato y el peróxido de hidrógeno sobre la Viabilidad Celular (MTT) en células SH-SY5Y. Las células SH-SY5Y fueron cultivadas en multipozos (24 pozos) y tratadas con 1, 2 y 10 mM de glutamato por 2 hr (**Panel a**) ó bien tratadas con 5, 10, 50 y 100 μM de H_2O_2 por 30 min. (**Panel b**). El porcentaje de células que redujeron el MTT a formazan fue cuantificado midiendo la absorbancia en lector de ELISA a 630nm de longitud utilizando como blanco el mismo medio de cultivo adicionado de MTT a la misma concentración utilizada para las células. Los valores obtenidos fueron graficados utilizando el programa Sigma Plot. Datos representativos de al menos 3 experimentos independientes.

- **Especies Reactivas de oxígeno**

Así mismo, cuando realizamos ensayos para determinar la generación de especies reactivas de oxígeno en estas células bajo la influencia de los mismos tratamientos, exposición al glutamato y al peróxido de hidrógeno. Se puede notar en las imágenes obtenidas tras la aplicación de diclorofluorescein diacetato (DCFH-DA) una fluorescencia mayor cuando las células están expuestas al glutamato o al peróxido (Figura 16). Esto indica la generación de especies reactivas como una respuesta a las concentraciones elevadas de glutamato.

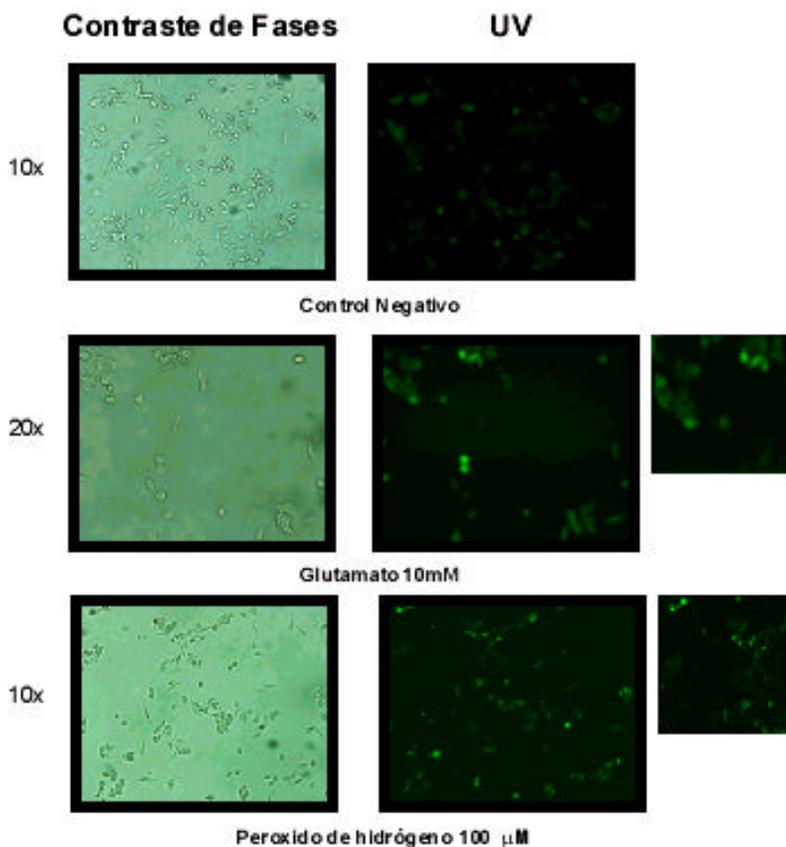


Figura 16. Formación de Diclorofluorescein inducida por glutamato y H₂O₂. Efectos del pretratamiento con ambos reactivos detectados por microscopia de fluorescencia. Las células fueron pretratadas con 100 μM de H₂O₂ por 30 minutos y 10mM de glutamato por 2 hr. antes del tratamiento con DCFH-DA 5 μM por 15 min. Los niveles intracelulares de ROS fueron detectados por el DCFH-DA y analizados usando microscopia de fluorescencia.

DISCUSIÓN

Las neuronas son células particularmente vulnerables a los efectos deletéreos del estrés oxidativo, el cual parece estar involucrado en diferentes condiciones neurodegenerativas como el envejecimiento. Una gran variedad de estudios indican que el estrés oxidativo probablemente contribuye al déficit de la función neuronal en enfermedades como Alzheimer y otras patologías neurodegenerativas (Li et al 1998). Eimerl y Schramm en 1994 demostraron que la muerte neuronal inducida por glutamato (neurotoxicidad) es dependiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular, y de la inducción de un flujo de este ión a través de los canales que se abren al activar receptores glutamatérgicos del tipo ionotrópico, corroborando esto al observar el hecho de que la toxicidad puede prevenirse con antagonistas del glutamato. Esto indica que el aumento del calcio libre intracelular juega un papel importante en la neurotoxicidad inducida por el glutamato, el neurotransmisor más abundante en sistema nervioso central (Rajdev y Reynolds, 1994, Khodorov et al 1993). En rebanadas de cerebro se ha demostrado por ejemplo, que la capacidad de la mitocondria para secuestrar Ca^{2+} está determinada por el influjo de Ca^{2+} a través del canal receptor de glutamato (Kannurpatti, 2000).

Dentro de una neurona expuesta a concentraciones elevadas de glutamato se generan diversas respuestas. La activación de enzimas que permiten el manejo de los cambios en el potencial redox y los cambios en las concentraciones intracelulares de calcio, median también respuestas transcripcionales muy diversas. Diferentes factores de transcripción son modulados en condiciones de estrés oxidativo. La variedad de estos así como la clase y extensión de la respuesta depende de las condiciones dadas en un cierto contexto celular. Se ha sugerido que el estrés oxidativo es el factor que contribuye a neurotoxicidad mediada por glutamato, pero el nexo entre la señalización de Ca^{2+} estimulada por receptores de glutamato y otros eventos celulares y su relación con la muerte celular aún no es del todo claro (Coyle y Puttfarcken, 1993, Reynolds y Hastings 1995).

La correlación entre la pérdida de señalización en enfermedades como el Alzheimer y el daño en la señalización en células SH-SY5Y inducido por estrés oxidativo, en conjunto con la evidencia acumulada sugieren que el estrés oxidativo contribuye a la disfunción neuronal en la enfermedad de Alzheimer y aumenta la posibilidad de que el estrés oxidativo pudiera contribuir en dicha enfermedad (Li et al 1998). Sobre esta línea de pensamiento Mao y cols. (Mao et al 2002), demostraron por ensayos de retardamiento en gel que la unión del factor de transcripción Sp1 al DNA en neuronas neocorticales se encuentra influenciada por el glutamato de manera dependiente del tiempo de exposición y de la dosis, cuando Sp1 se une a secuencias tipo κ B, observando una supresión de la actividad de unión al DNA. Sp3 y Sp4 parecen ser inactivas o inhibitorias en este sistema.

La familia Sp, como recordamos, esta constituida por 4 proteínas designadas Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4. Sp1 y Sp3 son factores de transcripción ubicuos que se unen a secuencias ricas en GC. Estudios recientes indican que Sp1 es el responsable del reclutamiento de la proteína de unión a caja TATA. Existen 3 isoformas de Sp3 reportadas, una proteína Sp3 de 110-115 kDa y dos de aproximadamente 60-70 kDa. Se ha sugerido que las dos isoformas pequeñas de Sp3 pueden actuar como moléculas represoras mientras que la isoforma Sp3 completa puede actuar como activador. La estructura y el arreglo de los sitios de reconocimiento parecen determinar si Sp3 es transcripcionalmente inactiva y si pueda reprimir la activación mediada por Sp1. Que Sp3 actúe como un activador o como un represor de la activación mediada por Sp1 parece depender del contexto celular (Kennett 1997).

En nuestros resultados mostrados en la Figura 7 y 8 es posible notar que hay una correlación de eventos. Mientras la actividad transcripcional disminuye significativamente, la interacción de Sp3 con su secuencia consenso en el DNA aumenta. Se sabe por ensayos de super-retardamiento que los complejos inferiores están relacionados clásicamente con las isoformas pequeñas de Sp3 (Suske 1999). Dichos hallazgos concuerdan con los datos reportados en el modelo de Mao y cols. Existen múltiples reportes que muestran que el oligonucleótido que contiene la caja GC que nosotros usamos para estos ensayos, es blanco de la interacción de los factores Sp1 y Sp3.

Sin embargo, aún cuando lo ya reportado apoya la identidad de los complejos formados en los ensayos de retardamiento resulta esencial corroborar este mismo aumento en respuesta al glutamato utilizando ensayos de super-retardamiento con un anticuerpo dirigido contra Sp3 para corroborar la identidad del complejo inferior, o inclusive determinar los niveles nucleares de la proteína Sp3.

Para confirmar que es dicho factor el responsable de la disminución en la actividad transcripcional, podríamos realizar además ensayos de cotransfección, transfectando un plásmido que nos permitiera sobre-expresar a Sp3 y el plásmido reportero p-Sp1CAT, censando así la actividad de Sp1/Sp3. Al incrementar los niveles de Sp3, siendo este el factor responsable de la represión, si esto fuera así, la actividad transcripcional de Sp1 (y del vector por lo tanto) podría verse aún más abatida. Por último la realización de ensayos de Western blot y un anticuerpo dirigido contra Sp3 confirmaría el incremento de los niveles de proteína de este factor de transcripción tras ser estimulado con glutamato.

Por otra parte, el factor de transcripción AP-1 ("Activator Protein 1") se une a secuencias palindrómicas específicas con estructura similar TGACTCA y TGACGTCA, designadas frecuentemente como el elemento regulador TRE (elemento responsivo a TPA, tetradecanoyl-forbol-acetato) y CRE (elemento responsivo a cAMP). El factor AP-1 es activado por varios efectores: factores de crecimiento, citocinas, hormonas, metales pesados, genotóxicos, radiación ultravioleta, estrés osmótico y mecánico, despolarización de membrana, estrés oxidativo e hipoxia. La respuesta de ciertos genes dependientes a AP-1 a cada uno de estos estímulos no es la misma. Estas variaciones están determinadas parcialmente por el activador efector-específico de AP-1 y de la diferente composición de los dímeros. Es importante mencionar que los constituyentes de AP-1 difieren en su sensibilidad a la hipoxia y al estrés oxidativo (Turpaev 2002). Se sabe además que a nivel post-traduccional la actividad de los factores ya existentes es modulada por la fosforilación (Turpaev 2002).

Diferentes estudios han revelado que el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ induce la activación del factor de transcripción AP-1 (Li et al 1998). Sin embargo la actividad del plásmido utilizado no muestra cambios significativos tras el estímulo de células con las diferentes concentraciones de glutamato y bajo nuestras condiciones de

trabajo. Sin embargo, estimulando a las células con TPA (12-0-tetradecanolforbol 13-acetato, 100nM por 12 hr), un activador de la proteína cinasa C (PKC), que conduce clásicamente al incremento en la actividad del factor AP-1 (Chen et al 2002) muestra que el plásmido TRE-CAT es capaz de responder a un estímulo diferente en un mismo contexto celular. Lo que indica que el plásmido TRE-CAT es eficaz en nuestro modelo de estudio.

Los ensayos de retardamiento que nos indicarían si la afinidad del factor AP-1 por su secuencia consenso se encontraba modificada, al tratar las células con glutamato, no mostraron cambios significativos en la afinidad, resultado que corresponde al obtenido al evaluar la actividad en los ensayos de transfección. Ambos resultados nos indican que tal vez las condiciones de estímulo con glutamato, no conduce a la activación de AP-1 como se ha demostrado para otros sistemas neuronales. Por otra parte, es claro que determinados dímeros AP-1 que se forman en una respuesta dada no necesariamente son los que presentan mayor afinidad por la secuencia de SV40 utilizada en el presente trabajo. Por lo que quizá una secuencia AP-1 presente en un gen neuronal regulado por este factor de transcripción hubiera podido ser más adecuada para censar cambios en esta línea celular. Un ejemplo de este tipo de comportamiento se ha reportado ya para AP-1 en células gliales de Bergmann (Aguirre 2000, Aguirre 2002). Demostrando que mientras la estimulación de PKC en este sistema induce fuertemente al complejo detectado con el sistema SV40 (usado en el presente trabajo), el sitio AP-1 que media la respuesta al glutamato que presenta el promotor de la proteína KBP, no responde a PKC en lo absoluto.

El factor nuclear κ B está compuesto de homo y heterodímeros de los miembros de la familia de factores de transcripción Rel. El heterodímero mas frecuente está formado por una subunidad de 50-kDa (p50) y otra de 60-kDa (p65) la cual es secuestrada en el citoplasma por una proteína inhibitoria de la familia I κ B, de la cual se han identificado siete isoformas siendo I κ B- α el miembro mejor caracterizado de esta familia (Turpaev 2002) .

Es importante recordar que, en células no estimuladas, los dímeros NF- κ B son retenidos en el citoplasma en una forma inactiva como consecuencia de su asociación

con los miembros de la familia de proteínas llamadas I κ B (inhibidores de κ B). El papel de las especies reactivas de oxígeno como segundo mensajero en la activación de NF κ B está bien establecido. A pesar de los crecientes datos que involucran a NF κ B en neuropatías en cerebro, existen algunos reportes que indican que la expresión constitutiva de NF κ B en neuronas corticales y del área del hipocampo también puede tener un papel neuroprotector, (Levites et al 2002). En el grupo de Li y cols., (Li et al 1998), utilizando como modelo celular la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, encuentran que existe una fuerte correlación entre la inhibición de la hidrólisis de fosfoinositol inducida por carbachol y la actividad de la fosfolipasa C así como la activación del factor de transcripción NF κ B. Debido entonces a la existencia de múltiples reportes que asocian la activación del factor NF κ B bajo condiciones de estrés oxidativo es que este factor podría ser considerado de manera indirecta como un control positivo de estrés oxidativo bajo el estímulo de glutamato.

En los ensayos de retardamiento encontramos que, tras estimular a las células con concentraciones arriba de 1mM de glutamato, existe un aumento en el complejo, si las células son expuestas al glutamato en concentraciones neurotóxicas 2mM o 10 mM. Sólo en condiciones en las que las células fueron tratadas con las glutamato 10mM en un medio con 0.5% de suero fetal bovino, puede notarse claramente la diferencia con las no tratadas. Se ha reportado ya que las células en G0 emplean la respuesta de genes tempranos para activar genes que codifican para algunos factores de transcripción como *c-fos* o *junB*, los cuales subsecuentemente regulan cascadas de genes que permiten la progresión a G1. Esta transición de G0 a G1 es inducida normalmente por la adición o deprivación de suero. La respuesta de genes tempranos muestra un perfil de activación génica muy rápida y de forma transitoria que no requiere biosíntesis de proteínas *de novo*, en su lugar utilizan componentes de señalización celular y factores de transcripción preexistentes. Las cascadas de señalización que median la respuesta de genes tempranos incluyen la red de proteínas-quinasas activadas por mitógenos (MAP), vías dependientes de Ca²⁺, y señalización de NF κ B lo que explica la diferencia entre los complejos en presencia de suero sin glutamato y la aparente reducción observada tras el estímulo de 1mM (Schratt et al 2001). En cambio, volviendo a nuestros resultados, a concentraciones

de 2 y 10 mM de glutamato, se aprecia un aumento paulatino en la formación del complejo.

Cuando usamos un inductor de estrés oxidativo, como H_2O_2 , observamos en los ensayos de retardamiento que al incrementar la dosis y tiempos de tratamiento, la formación del complejo $NF-\kappa B$ aumenta de manera notoria tras tratar a las células con 100 μM de H_2O_2 y a los 30 minutos. Hecho que correlaciona con los resultados ya obtenidos tras la estimulación con glutamato y con lo ya reportado en la literatura. La confirmación de estos resultados podrían realizarse mediante ensayos de Western blot empleando un anticuerpo dirigido contra p50 y p65 que confirmaría el incremento de los niveles de proteína de este factor de transcripción tras ser estimulado con glutamato.

Por otro lado, aún cuando los ensayos de competencia muestran la especificidad del oligonucleotido utilizado, resultaría interesante realizar ensayos de super-retardamiento utilizando los anticuerpos dirigidos contra los miembros del heterodímero mas frecuente formado: p50 y p65 para así determinar la identidad de los miembros de la familia Rel involucrados en la respuesta a glutamato.

De particular interés resultaría analizar el comportamiento de la proteína κB bajo nuestras condiciones de estudio. Es importante recordar que, en células no estimuladas, los dímeros $NF-\kappa B$ son retenidos en el citoplasma en una forma inactiva como consecuencia de su asociación con los miembros de la familia de proteínas llamadas $I\kappa B$ (inhibidores de κB), la fosforilación de residuos de serina en las moléculas $I\kappa B$, permite su poli-ubiquitinización y su subsecuente degradación por el proteosoma 26S. La degradación de $I\kappa B$ expone la secuencia de localización nuclear y permite que los dímeros de $NF-\kappa B$ se transloquen al núcleo, uniéndose a motivos κB a transcripción

Por lo que sería sumamente interesante determinar por técnicas como inmunodetección en fase sólida en células no tratadas y células tratadas con glutamato en donde yo esperarí en base a los resultados encontrados en este trabajo, si $NF-\kappa B$ se esta activando al ser estimulada con glutamato, los niveles de la

proteína Ikb tendrían que disminuir ya que tendría que estar siendo degradada por el proteosoma 26S en citoplasma.

Por otra parte la viabilidad celular determinada, como ya mencionamos tanto para las células tratadas con glutamato como en las condiciones en las que usamos peróxido, utilizando la técnica denominada MTT, que es un ensayo ampliamente utilizado, el cual consiste en la habilidad de las células vivas de reducir un colorante amarillo soluble en agua MTT, a un producto formazan de coloración morada insoluble en agua, mostró, en células previamente tratadas con glutamato una disminución en la viabilidad celular de aproximadamente el 15% en las concentraciones 1, 2 y 10 mM, con respecto a las células no tratadas. El análisis de la viabilidad en células tratadas con 5, 10, 50 y 100 μM de H_2O_2 mostró que existe una reducción de un 25% aproximadamente, obteniendo entonces, una sobrevivencia celular tras el tratamiento con glutamato, de un 85% y con H_2O_2 de un 75% siendo ambos porcentajes suficientemente altos para la realización de los ensayos de respuesta transcripcional en nuestro modelo de estudio. Por otra parte, los ensayos para determinar la generación de especies reactivas de oxígeno en estas células bajo la exposición al glutamato y al peróxido de hidrógeno. Notoriamente observamos en las imágenes obtenidas tras la aplicación de diclorofluorescein diacetato (DCFH-DA) una fluorescencia mayor cuando las células están expuestas al glutamato o al peróxido. Esto indica la generación de especies reactivas como una respuesta a las concentraciones elevadas de glutamato aunque resulta primordial realizar la cuantificación de la fluorescencia generada para confirmar los hallazgos observados en las imágenes y determinar que el fenómeno se da en la mayor parte de la población celular.

Así pues, sería sumamente interesante el análisis de la o las vías de señalización que pudieran activarse por glutamato y eventualmente utilizar los factores de transcripción para su activación. De igual manera, resulta relevante investigar los efectos del glutamato sobre genes específicos que pueden ser el blanco de los factores de transcripción estudiados en el modelo aquí propuesto. Finalmente, otro aspecto

relevante que habrá que analizar en trabajos posteriores, será ver si en el modelo de neuroblastoma utilizado en este estudio, al ser diferenciadas dichas células en neuronas con ácido retinoico, la actividad transcripcional de los factores en cuestión se modificarán sustancialmente. Todo lo anterior con miras hacia estudios más profundos en la regulación de genes específicos, en respuesta a daños como la neurotoxicidad del glutamato.

CONCLUSIONES:

- ✓ En ensayos de retardamiento en gel identificamos la presencia de un segundo complejo correspondiente al factor represor Sp3, el cual aumenta significativamente en respuesta al glutamato. Esto correlaciona con la disminución en la actividad transcripcional observada en los ensayos funcionales.
- ✓ Ni la actividad ni la unión del factor Ap-1 manifestó una respuesta significativa al glutamato bajo nuestras condiciones experimentales.
- ✓ NFκB mostró un aumento en su afinidad por su secuencia consenso cuando se induce estrés oxidativo y en respuesta al glutamato en ensayos de retardamiento en gel.

REFERENCIAS:

- Birnbaum MJ, van Wijnen AJ, Odgren PR, Last TJ, Suske G, et al. 1995. Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry* 34: 16503-8
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G, Siebenlist U. 1993. Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2532-6
- Chen Y, Wu Q, Song SY, Su WJ. 2002. Activation of JNK by TPA promotes apoptosis via PKC pathway in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 8: 1014-8
- Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-95
- Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65: 1-105
- Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. 1999. Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 284: 309-13
- Dennig J, Beato M, Suske G. 1996. An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *Embo J* 15: 5659-67
- Dynan WS, Tjian R. 1983. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35: 79-87
- Forman HJ y E Cadenas. 1997.
- Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G. 1992. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* 20: 5519-25
- Heck S, Lezoualc'h F, Engert S, Behl C. 1999. Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 274: 9828-35
- Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck T, et al. 1999. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science* 284: 316-20
- Jakubowski W, Bartosz G. 2000. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int* 24: 757-60
- Jones KA, Yamamoto KR, Tjian R. 1985. Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter in vitro. *Cell* 42: 559-72

- Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. 1987. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51: 1079-90
- Karlseder J, Rotheneder H, Wintersberger E. 1996. Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol Cell Biol* 16: 1659-67
- Kennett SB, Udvardia AJ, Horowitz JM. 1997. Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res* 25: 3110-7
- Kingsley C, Winoto A. 1992. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12: 4251-61
- Lania L, Majello B, De Luca P. 1997. Transcriptional regulation by the Sp family proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1313-23
- Lee JS, Galvin KM, Shi Y. 1993. Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6145-9
- Levites Y, Youdim MB, Maor G, Mandel S. 2002. Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. *Biochem Pharmacol* 63: 21-9
- Li B, Adams CC, Workman JL. 1994. Nucleosome binding by the constitutive transcription factor Sp1. *J Biol Chem* 269: 7756-63
- Li X, Song L, Jope RS. 1998. Glutathione depletion exacerbates impairment by oxidative stress of phosphoinositide hydrolysis, AP-1, and NF-kappaB activation by cholinergic stimulation. *Brain Res Mol Brain Res* 53: 196-205
- Lin SY, Black AR, Kostic D, Pajovic S, Hoover CN, Azizkhan JC. 1996. Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction. *Mol Cell Biol* 16: 1668-75
- Mao X, Moerman AM, Barger SW. 2002. Neuronal kappa B-binding factors consist of Sp1-related proteins. Functional implications for autoregulation of N-methyl-D-aspartate receptor-1 expression. *J Biol Chem* 277: 44911-9
- Marx JL. 1987. Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science* 235: 529-31
- Naarala J, Nykvist P, Tuomala M, Savolainen K. 1993. Excitatory amino acid-induced slow biphasic responses of free intracellular calcium in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 330: 222-6
- Nair VD, Niznik HB, Mishra RK. 1996. Interaction of NMDA and dopamine D2L receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 66: 2390-3

- Noti JD. 1997. Sp3 mediates transcriptional activation of the leukocyte integrin genes CD11C and CD11B and cooperates with c-Jun to activate CD11C. *J Biol Chem* 272: 24038-45
- O'Neill CM, Ball SG, Vaughan PF. 1994. Effects of ischaemic conditions on uptake of glutamate, aspartate, and noradrenaline by cell lines derived from the human nervous system. *J Neurochem* 63: 603-11
- Oyama Y, Hayashi A, Ueha T, Maekawa K. 1994. Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain Res* 635: 113-7
- Plumb JA, Milroy R, Kaye SB. 1989. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res* 49: 4435-40
- Rettig WJ, Spengler BA, Chesa PG, Old LJ, Biedler JL. 1987. Coordinate changes in neuronal phenotype and surface antigen expression in human neuroblastoma cell variants. *Cancer Res* 47: 1383-9
- Ross RA, Biedler JL. 1985. Presence and regulation of tyrosinase activity in human neuroblastoma cell variants in vitro. *Cancer Res* 45: 1628-32
- Ryu S, Zhou S, Ladurner AG, Tjian R. 1999. The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* 397: 446-50
- Savaskan NE, Brauer AU, Kuhbacher M, Eyupoglu IY, Kyriakopoulos A, et al. 2003. Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. *Faseb J* 17: 112-4
- Schratt G, Weinhold B, Lundberg AS, Schuck S, Berger J, et al. 2001. Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 21: 2933-43
- Shou Y, Gunasekar PG, Borowitz JL, Isom GE. 2000. Cyanide-induced apoptosis involves oxidative-stress-activated NF-kappaB in cortical neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 164: 196-205
- Sjottem E, Anderssen S, Johansen T. 1996. The promoter activity of long terminal repeats of the HERV-H family of human retrovirus-like elements is critically dependent on Sp1 family proteins interacting with a GC/GT box located immediately 3' to the TATA box. *J Virol* 70: 188-98
- Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC. 1993. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259: 1912-5
- Suske G. 1999. The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238: 291-300

- Takeda K, Takeuchi O, Tsujimura T, Itami S, Adachi O, et al. 1999. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science* 284: 313-6
- Tong L, Toliver-Kinsky T, Edwards M, Rassin DK, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR. 2002. Attenuated transcriptional responses to oxidative stress in the aged rat brain. *J Neurosci Res* 70: 318-26
- Trotti D, Danbolt NC, Volterra A. 1998. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* 19: 328-34
- Turpaev KT. 2002. Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry (Mosc)* 67: 281-92

EL JURADO DESIGNADO POR EL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (CINVESTAV-IPN), APROBO ESTA TESIS EL DIA DE DICIEMBRE DEL AÑO 2004, EN LA CIUDAD DE MÉXICO D.F. PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR DE LA MÉDICO CIRUJANO SANDRA ROSAS MADRIGAL.

Dra. Esther López-Bayghen Patiño

Dr. Miguel Angel Vargas.

Dra. Rosaura Hernández Rivas

Dra. Rebeca Manning Cela