



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

DIRECCIÓN DE POSTGRADO

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

**CLONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA
REGIÓN PROMOTORA DE LA REDUCTASA DE ÁCIDO
DESHIDROASCÓRBICO GLUTARREDOXINA-1**

(Cloning and functional characterization of the promoter region of the dehydroascorbic acid reductase, Glutaredoxin-1)

Pablo Antonio Binder Saldaña

CONCEPCIÓN-CHILE

2011

Profesor Guía: Dra. Coralia Rivas Rocco

Dpto. de Fisiopatología, Facultad de Cs. Biológicas

Universidad de Concepción

5. RESUMEN

La Vitamina C es un potente antioxidante que se presenta en dos formas biológicamente activas, su forma reducida o ácido ascórbico (AA) y su forma oxidada llamada ácido deshidroascórbico (DHA). Ambas formas son capaces de ingresar a la célula por medio de dos familias de transportadores, lo cual dependerá del estado redox de la vitamina C. La forma reducida de la vitamina C ingresa por medio de la familia de co-transportadores de sodio-ascorbato (SVCT) y la forma oxidada ingresa por medio de los transportadores facilitativos de glucosa (GLUT). El ácido deshidroascórbico que ha ingresado a la célula por medio de los GLUTs o que ha sido originado producto de la oxidación de ácido ascórbico, es rápida y eficientemente reducido por acción de enzimas de actividad reductasa de ácido deshidroascórbico, las cuales han sido clasificadas en dependientes de glutatión y dependientes de NADPH para su función catalítica. La totalidad de estas enzimas de actividad reductasa de ácido deshidroascórbico son expresadas en modelos de cáncer prostático. Sin embargo, si bien se conoce bastante acerca del metabolismo de la vitamina C en células normales, es muy poco se sabe acerca de su rol antioxidante en células tumorales. Datos previos de nuestro laboratorio demuestran que células tumorales de próstata son capaces de transportar y acumular más vitamina C que células normales, y que esta acumulación es altamente dependiente de la concentración de glutatión (GSH) intracelular. Lo anterior sugiere que enzimas con actividad de reductasas de ácido deshidroascórbico de localización citoplasmática y dependientes de GSH, como Glutarredoxina-1 (Grx1), serían elementos claves en la regulación del metabolismo de la vitamina C. Más aun, se propone que estas enzimas participarían en la acumulación y

reciclaje de la vitamina C en mecanismos asociados a la respuesta frente a estrés oxidativo, mediante su regulación a nivel transcripcional.

Con el fin de estudiar a nivel transcripcional la regulación de la expresión de la reductasa de ácido deshidroascórbico Grx1 en modelos de cáncer de próstata, se ha propuesto el estudio funcional de la región promotora para el gen de esta enzima en la línea celular DU-145. Considerando como primera aproximación, la región correspondiente a 2.0 kb corriente arriba de este gen, conteniendo la totalidad de su región 5'UTR se ha logrado el clonamiento de esta región promotora y el subclonamiento en el vector comercial pGL3-basic, obteniendo un constructo funcional, en el cual el promotor de Grx1 es capaz dirigir la expresión del gen reportero luciferasa. A partir de este vector, fueron generados 22 constructos conteniendo deleciones progresivas y selectivas para el promotor de Grx1, mediante los cuales se ha determinado un promotor mínimo funcional de 139 pb contenido en la región ubicada entre las posiciones -79 y +59 pb con respecto al sitio de inicio de transcripción (TSS) y un promotor conteniendo la secuencia mínima requerida para actividad basal en la región ubicada entre las posiciones -129 y +59 pb respecto al TSS. Utilizando como modelo la línea celular de cáncer prostático DU-145 para ensayos funcionales en conjunto con las herramientas MatInspector y ModuleInspector se determinó la presencia de sitios de unión a las familias de factores de transcripción involucrados a la respuesta frente a estrés oxidativo AP-1, NFκB, SP-1 y ETS, los cuales se proponen, de acuerdo a los ensayos funcionales, como los principales moduladores de la respuesta transcripcional para este gen en modelos de cáncer de próstata.