



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL
PROMOTOR DEL GEN DEL
TRANSPORTADOR DE AMINOÁCIDOS
NEUTROS CORTOS (SISTEMA A)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:
VICTOR MANUEL ORTIZ ORTEGA



Tutor: DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO

MÉXICO, D. F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN DEL TRANSPORTADOR DE AMINOÁCIDOS NEUTROS CORTOS (SISTEMA A)

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Armando Roberto Tovar Palacio en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Jesús Adolfo García Sainz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Angel Zarain Herzberg	Facultad de Medicina, UNAM

Esta tesis fue defendida en examen presentado en Enero de 2012

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Dr. Armando Tovar y de la Dra. Nimbe Torres del departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su apoyo y facilidades otorgadas durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

Se agradece a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, miembros de mi comité tutorial, por sus valiosas contribuciones durante el desarrollo de este trabajo.

Se agradece la colaboración del Dr. Félix Recillas Targa del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en la realización del presente trabajo.

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Martín Escamilla Del-Arenal del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en la clonación de los fragmentos genómicos de la región promotora.

Se reconoce la colaboración de la Dra. Gabriela Alemán del departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en la determinación del sitio de inicio de la transcripción.

Se agradece a los integrantes del jurado por la revisión crítica de esta tesis.

Se agradece a todos mis compañeros y amigos del departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán con quienes compartí momentos de alegría y de frustración durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (212226-5-25637M).

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a toda mi familia, especialmente a mis padres, por el cariño y apoyo que siempre me han brindado. A todos los amigos que me han acompañado a lo largo de mi vida y con quienes he compartido infinidad de vivencias.

Y a Alberto, por el tiempo compartido.

Abreviaturas

AMPc	monofosfato cíclico de 3,5-adenosina
BRE	elemento de reconocimiento a TFIIB (TFIIB recognition element)
ChIP	ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina
CRE	elemento de respuesta a AMP cíclico
CREB	proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico
DCE	elemento río debajo de la región core (downstream core element)
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
DPE	elemento río abajo del promotor (downstream promoter element)
EMSA	ensayo de retardo de movilidad electroforética
MeAIB	metil aminoisobutirato
MAPK	proteína cinasa activada por mitógeno
M-MLV	virus de leucemia murino-Moloney
PKA	proteína cinasa dependiente de AMP cíclico
PKC	proteína cinasa C
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RACE	amplificación de los extremos de DNAc
RNA_m	ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa
SFB	suero fetal bovino
SLC	acarreadores de solutos
SNAT	transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio
V_{max}	velocidad máxima

Indice

1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	4
3.1 Sistemas de transporte de aminoácidos	5
3.2 Sistema A	6
3.3 Subfamilia del sistema A (Isoformas)	8
3.4 Mecanismos de regulación del sistema A	11
3.4.1 Sensibilidad osmótica	11
3.4.2 Regulación adaptativa	12
3.4.3 Regulación hormonal del sistema A	12
3.5 Papel funcional (fisiológico) del sistema A	14
4. Justificación	17
5. Objetivos	20
6. Hipótesis	20
7. Materiales y Métodos	21
7.1 Materiales	21
7.2 Animales y dietas	21
7.2.1 Efecto de proteína dietaria	21
7.2.2 Efecto de la administración de glucagon	22
7.3 Determinación de la concentración de glucagon en suero	22
7.4 PCR cuantitativo	22
7.5 Análisis Computacional. Identificación de las secuencias de los elementos de respuesta potenciales	23
7.6 Identificación del sitio de inicio de la transcripción	23
7.6.1 Extracción de RNA total	23
7.6.2 Obtención de RNA mensajero	23
7.6.3 Técnica de “primer extensión”	24
7.6.4 Técnica de amplificación de los extremos de DNAC (5' RACE)	24
7.7 Obtención de DNA genómico	26

7.8 Amplificación de fragmentos de DNA genómicos de SNAT2 por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
7.9 Clonación de la región promotora y generación de construcciones con delecciones progresivas unidireccionales 5'	26
7.9.1 Análisis de las clonas por digestión con Bgl II	29
7.10 Purificación de DNA de plásmidos	29
7.11 Confirmación de las construcciones por secuenciación	29
7.12 Cultivo celular, transfección transitoria y ensayos reporteros de luciferasa	30
7.13 Cultivo primario de hepatocitos de rata	30
7.14 Mutagénesis de sitio dirigido	31
7.15 Preparación de extractos nucleares y ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)	31
7.16 Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	32
7.17 Análisis estadístico	32
8. Resultados	33
8.1 Efecto de una dieta alta en proteína sobre la expresión del gen SNAT2 en ratas	33
8.2 Efecto del glucagon sobre la expresión del gen SNAT2 en ratas	34
8.3 Sitio de inicio de la transcripción del gen SNAT2 de rata	35
8.3.1 Análisis <i>in silico</i> de la región promotora	35
8.3.2 Determinación del sitio de inicio de transcripción	36
8.4 Identificación de los sitios potenciales de unión a factores de transcripción	38
8.5 Predicción de islas CpG	39
8.6 Identificación de la región que regula la transcripción del gen SNAT2 de rata	40
8.7 Identificación de los elementos potenciales de respuesta a AMPc (CRE) funcionales en la región promotora del gen SNAT2	41
8.8 Mutagénesis de sitio dirigido de los sitios CRE de la región promotora del gen SNAT2 de rata	43
8.9 Unión de CREB al sitio CRE localizado a -48 bp en la región promotora del gen SNAT2 <i>in vitro</i>	43
8.10 Unión de CREB al sitio CRE -48 del gen SNAT2 en células HepG2	45

8.11 Efecto del dominante negativo de CREB sobre la actividad promotora de SNAT2	44
8.12 El sitio CRE -48 se encuentra conservado en las secuencias genómicas de diferentes especies	48
9. Discusión	51
10. Conclusiones	59
11. Perspectivas	60
12. Referencias	61
13. Anexo. Producción científica generada durante la realización de esta tesis	72

1. RESUMEN

Más allá de su papel como sustratos para la síntesis de proteínas, los aminoácidos tienen múltiples e importantes funciones. Pueden ser precursores de hormonas, nucleótidos, neurotransmisores o actuar como sustratos glucogénicos. Los aminoácidos también actúan como activadores de diversas cascadas de señalización que regulan estos procesos y mantienen la homeostasis celular. De esta manera, es de gran importancia mantener el balance en la concentración de aminoácidos libres intracelulares. El tamaño y composición de la poza de aminoácidos libres intracelulares está determinado, en parte, por la síntesis y actividad de diferentes transportadores localizados en la membrana celular. El transportador de aminoácidos neutros dependiente de sodio 2 (SNAT2) es el más abundante y ubicuo de los transportadores para aminoácidos zwitteriónicos (carga neta neutra) de cadena lateral corta. La actividad de este transportador es estimulada *in vivo* e *in vitro* por glucagon o por análogos de AMP cíclico (AMPc). Sin embargo, no se ha demostrado si el incremento de la actividad se debe a un aumento en la transcripción del gen SNAT2. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si AMPc estimula la expresión del gen SNAT2, así como, localizar y caracterizar la presencia de elementos de respuesta a AMPc (CRE) en la región promotora que controla la expresión del gen SNAT2. Se encontró que el consumo de una dieta alta en proteína, la cual incrementó la concentración de glucagon en suero, o la administración de glucagon o la incubación de cultivo de hepatocitos primario con forskolina; incrementó los niveles de RNAm de SNAT2. Entonces, se procedió a aislar la región 5' reguladora del gen SNAT2 y se determinó que el sitio de inicio de transcripción se localiza a 970 bp río arriba del codón de inicio de la traducción. Posteriormente, se identificaron dos sitios potenciales CRE localizados a -354 bp y -48 bp del sitio de inicio de transcripción. Nuestros resultados, a través del análisis de deleciones progresivas unidireccionales de la región 5' reguladora del gen SNAT2 de rata, revelaron que el sitio CRE localizado a -48 bp es completamente responsable de la regulación de la transcripción del gen SNAT2 por AMPc. Esto se determinó a través de estudios por medio de la mutación dirigida del sitio CRE y el análisis de EMSA (ensayo de retardo de movilidad

electroforética) y ChIP (inmunoprecipitación de la cromatina). El alineamiento de las secuencias de rata, ratón y humano revelaron que este sitio CRE está altamente conservado en estas especies, indicando su papel primordial en la regulación transcripcional del gen SNAT2 por AMPc.

2. ABSTRACT

Besides their role as substrates for protein synthesis, amino acids have multiple and important functions. Amino acids are key precursors for synthesis of hormones, nucleotides, neurotransmitters and also can act as glucogenic substrates. Additionally, amino acids regulate these processes by modulating several signal transduction cascades. In addition, amino acid homeostasis has to be finely maintained by a balance in the free intracellular amino acid pool. The size and composition of the free intracellular amino acid pool will depend in part on the expression and activity of a multitude of amino acid transporters in the plasma membrane. Small neutral amino acid transporter (SNAT)-2 is the most abundant and ubiquitous transporter for zwitterionic (neutral net charge) short chain amino acids. The activity of this amino acid transporter is stimulated *in vivo* or *in vitro* by glucagon or cAMP analogs. However, it is not known whether the increase in activity at the protein level is due to an increase in SNAT2 gene transcription. Thus, the aim of the present work was to study whether cAMP was able to stimulate SNAT2 gene expression and to localize and characterize the presence of cAMP response elements (CRE) in the promoter that controls the expression of the rat SNAT2 gene. We found that consumption of a high protein diet that increased serum glucagon concentration, or the administration of glucagon, or incubation of hepatocytes with forskolin increased the SNAT2 mRNA level. We then isolated the 5' regulatory region of the SNAT2 gene and determined that the transcriptional start site was located 970 bp upstream of the translation start codon. We identified two potential CRE sites located at -354 bp and -48 bp. Our results, using deletion analysis of the 5' regulatory region of the SNAT2 gene, revealed that the CRE site located at -48 bp was fully responsible for SNAT2 regulation by cAMP. This evidence was strongly supported by mutation of the CRE site, EMSA (electrophoretic mobility shift assay) and ChIP (chromatine immunoprecipitation) analysis. Alignment of rat, mouse, and human sequences revealed that this CRE site is highly conserved among species, indicating its essential role in the regulation of SNAT2 gene expression.

3. INTRODUCCIÓN

Los mamíferos realizan adaptaciones metabólicas para hacer frente a cambios en la disponibilidad de nutrientes de su medio ambiente. Las variaciones en la abundancia y tipo de proteína en la dieta proporcionan señales para el crecimiento y/o ajustes en las funciones metabólicas del organismo (1, 2).

Las concentraciones de aminoácidos libres en el plasma se afectan, en gran medida, por variaciones en la ingesta de proteína. Después de su consumo, las proteínas de la dieta son degradadas hasta sus aminoácidos libres constituyentes los cuales se absorben en el intestino. Una vez absorbidos, los aminoácidos libres se transportan hasta el hígado por la vena porta. Una parte de estos aminoácidos son liberados a la circulación general, donde forman una poza común de aminoácidos libres junto con los aminoácidos que provienen del recambio proteínico para finalmente ser liberados (transportados) a todas las células del organismo. Dependiendo de las necesidades de la célula, los aminoácidos se canalizarán preferentemente para la síntesis de proteínas y otros compuestos nitrogenados y, su exceso será oxidado a través de las enzimas degradadoras de aminoácidos ya que, a diferencia de los lípidos y los hidratos de carbono, el organismo no tiene un verdadero almacén de aminoácidos o proteínas (3).

Así, el tamaño y la composición de la poza intracelular de aminoácidos libres está determinada por la actividad de procesos que remueven o adicionan aminoácidos a este compartimento como son 1) la síntesis y degradación de proteínas celulares, 2) la carga de aminoacil tRNAs, 3) la degradación y biosíntesis de aminoácidos y, 4) el transporte de aminoácidos a través de la membrana celular (4-6). Este proceso será determinante para mantener la poza de aminoácidos celulares considerando las fluctuaciones que ocurren a lo largo del tiempo debido a los periodos de ayuno que se dan a lo largo de un día. Sin embargo, el transporte de aminoácidos no ocurre a través de un solo transportador de aminoácidos, sino por medio de un grupo de sistemas de transporte de aminoácidos.

3.1 Sistemas de transporte de aminoácidos

La capacidad de mantener los aminoácidos intracelulares en concentraciones mayores o iguales a las encontradas en el medio ambiente extracelular se facilita ampliamente por medio de la presencia de una multitud de transportadores de aminoácidos en la membrana plasmática, algunos de los cuales funcionan activamente concentrando los aminoácidos dentro de la célula, mientras que otros pueden facilitar el eflujo celular por mecanismos de intercambio (5, 7).

Dentro de sus características, se conoce que los transportadores de aminoácidos son estereoselectivos por la serie L y que pueden dividirse en dos grupos, los dependientes y los independientes de sodio. Esto no excluye la posibilidad de que otros iones participen activamente en el proceso, como el H^+ , K^+ , Cl^- , OH^- y HCO_3^- (8).

Los transportadores de aminoácidos presentan tres tipos de operación: el transporte por difusión facilitada, en el cual el aminoácido es transportado a través de la membrana sin ningún requerimiento adicional; el transporte paralelo o cotransporte, llamado así porque el transporte de un aminoácido está acoplado al de un ión inorgánico el cual se desplaza en el mismo sentido que el aminoácido y, finalmente, el transporte antiparalelo o antiporte, en donde el ión y el aminoácido se transportan en sentidos opuestos con respecto a la membrana (9).

Adicionalmente, los estudios cinéticos han permitido la subdivisión de los transportadores de aminoácidos en neutros o zwitteriónicos, catiónicos o básicos y aniónicos o ácidos, dependiendo de la carga neta de sus sustratos (10).

Sin embargo, en eucariontes superiores, algunos aminoácidos pueden ser sustratos de varios transportadores. Tradicionalmente, varios de estos transportadores de aminoácidos o "sistemas" se clasificaron sobre la base de sus características que reflejan aspectos de su mecanismo de transporte (p. ej. dependencia de sodio), especificidad de sustrato y las características reguladoras

(p. ej. sensibilidad a hormonas o factores que inducen estrés) (7). En el Cuadro 1 se presentan las principales características de algunos de los sistemas de transporte de aminoácidos.

Dentro de los sistemas de transporte dependientes de sodio específicos para los aminoácidos aniónicos, el de mayor importancia es el denominado X_{AG}^- (específico para glutamato y aspartato) por su amplia distribución y por su papel en la neurotransmisión mediada por el glutamato, uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso central (11). Para el caso de los aminoácidos catiónicos lisina y arginina, se han descrito cuatro sistemas de transporte diferentes; de los cuales ninguno es específico para estos aminoácidos ya que también pueden transportar aminoácidos zwitteriónicos bajo condiciones normales en el organismo. Finalmente, los aminoácidos zwitteriónicos constituyen el grupo con mayor número de sistemas de transporte debido a la diversidad química del grupo alquilo lateral presente en su estructura. Los sistemas de este grupo mejor estudiados son el ASC, el N, el L y el sistema A. Este último, es el que se estudió en el presente proyecto de investigación.

3.2 Sistema A

El sistema de transporte A se encuentra en todas las células de los mamíferos, con excepción de los reticulocitos y los eritrocitos (12). Christensen fue quien identificó este sistema en las células Ehrlich del líquido de ascitis murino y lo designó como A debido a su preferencia por el aminoácido alanina (13). Los aminoácidos sustratos de este transportador abarcan a la alanina, la glicina, la serina, la prolina y la glutamina. La característica particular de este sistema es la de tolerar sustratos N-metilados y de ahí se sintetizó el compuesto metil aminoisobutirato (MeAIB), el cual es un análogo de la alanina que no es metabolizable y por esta razón es considerado el sustrato modelo del sistema para su caracterización (14).

Cuadro 1. Características de los sistemas de transporte de aminoácidos

Sistema	Proteína	Gene	Aminoácidos Sustrato (código de una letra)	Observaciones
Transportadores de aminoácidos neutros dependientes de sodio.				
A	SNAT1	SLC38A1	G,A,S,C,Q,N,H,M,T, MeAIB,P,Y,V	Transporte de aminoácidos neutros de cadena corta.
	SNAT2	SLC38A2	G,P,A,S,C,Q,N,H,M,MeAIB	Sensible a pH bajo. Expresión ubicua.
	SNAT4	SLC38A4	G,P,A,S,C,N,M,H,K,R	También transporta aminoácidos catiónicos independiente de sodio.
ASC	ASCT1	SLC1A4	A,S,C	Intercambiador de aminoácidos de cadena corta de alta afinidad.
	ASCT2	SLC1A5	A,S,C,T,Q	Expresión ubicua.
BETA	GAT1	SLC6A1	GABA	Transportadores de GABA, betina, taurina, dependientes de cloro. Expresados ampliamente.
	GAT2	SLC6A13	GABA, betaína, P, β -A	
	GAT3	SLC6A11	GABA, betaína, taurina	
	BGT1	SLC6A12	GABA, betaína	
	TAUT	SLC6A6	Taurina	
Gly	GLYT1	SLC6A9	G, sarcosina	Transportador de glicina de alta afinidad dependiente de Sodio y cloro.
	GLYT2	SLC6A5	G, sarcosina	Se expresa en cerebro y otros tejidos no neuronales.
N	SN1	SLC38A3	Q,N,H	Transporte tolerante de Litio
	SN2	SLC38A5	Q,N,H,S,G	Transporte intolerante de litio
Transportadores de aminoácidos neutros independientes de sodio.				
L ⁺	LAT1	SLC7A5	H,M,L,I,V,F,Y,W,Q	Intercambiador de aminoácidos hidrofobicos largos expresado ubicuamente
	LAT2	SLC7A8	A,S,C,T,N,Q,H,M,L,I,V,F,Y,W	
T	TAT1	SLC16A10	F,Y,W	Transportador de aminoácidos aromáticos.
Transportadores de aminoácidos aniónicos dependientes de sodio				
X _{AG} ⁻	EAAT1	SLC1A3	E,D	Expresión ubicua. Transporte reverso de K ⁺
	EAAT2	SLC1A2	E,D	
	EAAT3	SLC1A1	E,D,C	
	EAAT4	SLC1A6	E,D	
	EAAT5	SLC1A7	E,D	
Transportadores de aminoácidos aniónicos independientes de sodio				
X ⁻	xCT	SLC7A11	E,Ci	
Transportadores de aminoácidos catiónicos dependientes de sodio				
B ^{0,+}	ATB(o,+)	SLC6A14	K,R,A,S,C,T,N,Q,H,M,I,L,V,F,Y, W	
y ⁺ L ⁺	y+LAT1	SLC7A7	K,R,Q,H,M,L	Transportador electro neutro
	y+LAT2	SLC7A6	K,R,Q,H,M,L,A,C	
Transportadores de aminoácidos catiónicos independientes de sodio				
B ^{0,+*}	B(o,+*)AT	SLC7A9	K,R,A,S,C,T,N,Q,H,M,I,L,V,F,Y, W,Ci	
y ⁺	Cat-1	SLC7A1	R,K,H	
	Cat-2	SLC7A2	R,K,H	
	Cat-3	SLC7A3	R,K	
	Cat-4	SLC7A4	Desconocido	

El transporte de aminoácidos por el sistema A es dependiente de sodio, con una estequiometría Na^+ /aminoácido 1:1. Es un transportador electrogénico acoplado funcionalmente con la ATPasa de Na^+/K^+ (15, 16).

Dentro de las propiedades que caracterizan al sistema A se encuentra el llamado fenómeno de *trans*-inhibición, definido como la reducción en la actividad del transporte como respuesta a la acumulación transmembranal de sus sustratos. En otras palabras, no ocurre el eflujo de aminoácidos *trans*-estimulado a través del sistema A (17, 18). Este fenómeno es poco común entre los transportadores de aminoácidos, la mayoría de los cuales por el contrario, exhiben el fenómeno cinético opuesto que es la *trans*-estimulación. Otra característica del sistema A es su baja tolerancia a sustituir Li^+ por Na^+ y su alta sensibilidad al pH, ya que disminuye marcadamente su actividad al disminuir el pH (19).

3.3 Subfamilia del sistema A (Isoformas)

Como se mencionó anteriormente, los transportadores de aminoácidos o “sistemas” fueron clasificados, tradicionalmente, con base en las características que reflejaban aspectos de su mecanismo de transporte, especificidad del sustrato y regulación. Sin embargo, en la década pasada hubo un progreso significativo en la identificación molecular de las proteínas transportadoras. Los transportadores de aminoácidos que hasta la fecha han sido clonados se han reclasificado y organizado en familias que forman parte del grupo de proteínas de transporte membranal denominados acarreadores de solutos o SLC (por sus siglas en inglés solute-linked carrier) (7).

Las proteínas SLCs representan el mayor grupo de transportadores en el genoma humano (20, 21). Los miembros SLC han sido categorizados en al menos 46 diferentes familias con diferentes propiedades bioquímicas (22). Dentro de estas familias se ha postulado que existen cerca de 100 transportadores para aminoácidos del grupo SLC en el genoma humano, de los cuales, alrededor de 60 han sido caracterizados con respecto a su sustrato y el resto son postulados como

probables transportadores de aminoácidos (22). Este gran número indica la importancia de tener un transporte de aminoácidos regulado sobre la membrana celular, así como también sobre las membranas vesicular y mitocondrial. En los mamíferos, la clasificación filogenética de los miembros SLC muestran que las proteínas SLC forman cuatro principales grupos filogenéticos, llamados grupo- α , grupo- β , grupo- γ y grupo- δ , con proteínas dentro de cada grupo que tienen un origen evolutivo común. En el grupo- β incluyen a las familias SLC32, SLC36 y SLC38 que constituyen el segundo grupo filogenético mayor de transportadores de aminoácidos.

A pesar de que la actividad de transporte del sistema A fue una de las primeras en caracterizarse, la clonación de su DNAC ha sido uno de los últimos. Los primeros datos moleculares acerca del sistema A han sido obtenidos a partir del año 2000.

En el año 2000 tres grupos de investigación independientes clonaron el DNAC que codifica para un transportador de aminoácidos provisto con características operacionales típicas de la actividad del sistema A (23-25). El producto de este gen se nombró SNAT2 (sodium-dependent neutral amino acid transporter-2) y se clasificó como un miembro de la familia *SLC38* el cual incluye dos subgrupos: transportadores del tipo del sistema N y transportadores del tipo del sistema A (26).

La familia *SLC38* consiste de 11 miembros y codifican para los transportadores de aminoácidos denominados SNATs. Se conoce que existen dentro de esta familia transportadores huérfanos (*SLC38A7-11*) los cuales se identificaron recientemente pero hasta la fecha no se han caracterizado respecto al sustrato que transportan (27, 28), mientras que los otros miembros (*SLC38A1-6*) se han clasificado funcionalmente. Las proteínas SNAT1 [*SLC38A1*, (29, 30)], SNAT2 [*SLC38A2*, (23-25)] y SNAT4 [*SLC38A4*, (31, 32)] han sido reclasificadas dentro del sistema A mientras que SNAT3 (*SLC38A3*), SNAT5 (*SLC38A5*) y SNAT7 (*SLC38A7*) pertenecen al sistema N (28, 33-35). La clasificación del sistema N/A depende de

las propiedades funcionales y patrones de reconocimiento de sustratos. SNAT6 (*SLC38A6*) y los otros miembros de la familia recientemente descubiertos no se han clasificado de acuerdo al sistema N/A (28).

Debido a que la nomenclatura de los transportadores de aminoácidos ha sido compleja y la clasificación del transportador SNAT2 dentro de la familia *SLC38* es reciente, con la finalidad de evitar confusiones, a lo largo de todo el texto se refiere al “gen SNAT2”, aunque el transportador de aminoácidos SNAT2 es codificado por el gen *SLC38A2*.

Los tres subtipos del sistema A difieren marcadamente en su patrón de expresión tisular. El patrón de expresión de SNAT1 (previamente referido como ATA1, GlnT, SA2, SAT1 o NAT2 de ratón) abarca principalmente al cerebro, retina, placenta y corazón; y en menor grado al pulmón, músculo esquelético, bazo e intestino (29, 30). SNAT1 transporta aminoácidos zwitteriónicos y exhibe preferencia hacia glutamina, alanina, asparagina, cisteína, histidina y serina (26).

La expresión de SNAT2 (previamente ATA2, SA1 o SAT2) es más amplia que la de los otros subtipos del sistema A. SNAT2 se expresa en prácticamente todos los tejidos excepto eritrocitos (23, 36). Este subtipo del sistema A tiene preferencia por la alanina, asparagina, cisteína, glutamina, glicina, histidina, metionina, prolina y serina (26). Las diferencias en el perfil de sustratos entre los subtipos del sistema A son muy sutiles, sin embargo, prolina es un mejor sustrato para SNAT2 que para SNAT1 o SNAT4.

SNAT4 (previamente ATA3, NAT3 o SAT3) es abundante en el hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas y placenta (31, 32). El perfil de sus sustratos es alanina, asparagina, cisteína, glicina, serina y treonina. No transporta glutamina (26).

Se ha demostrado que SNAT2 es la principal isoforma inducida por privación de aminoácidos y hay una relación directa entre la abundancia del RNAm de SNAT2 y la actividad del sistema A (37). La clonación de las tres isoformas del sistema A abre la posibilidad de estudiar los mecanismos moleculares que regulan la transcripción de este transportador.

3.4 Mecanismos de regulación del sistema A

Durante más de 30 años de investigación, desde su descubrimiento, se han reportado una gran variedad de mecanismos que regulan la actividad del sistema A. Algunos mecanismos de regulación parecen ser tejido-específico como por ejemplo las hormonas, sin embargo, existen dos principales mecanismos de regulación de la actividad del sistema A presentes en todos los modelos celulares o tejidos estudiados; estos son la sensibilidad osmótica y la regulación adaptativa.

3.4.1 Sensibilidad osmótica

En la década de los 80's, aparecieron publicados algunos reportes que indican que la actividad del sistema A se estimula por una prolongada incubación de las células bajo condiciones hipertónicas (19, 38). El fenómeno de osmosensibilidad del sistema A fue originalmente descrito en cultivo de fibroblastos de aves (39) y posteriormente se demostró en otros modelos celulares como células del epitelio renal (40), células del músculo liso (41) y linfocitos (42) entre otros. El incremento en la actividad del transportador es un proceso lento, dependiente de síntesis de proteína, que corresponde a un aumento en la V_{max} y requiere de algunas horas para que ocurra (38). Los cambios en la actividad del sistema A bajo condiciones hipotónicas han sido menos estudiados. Sin embargo, al menos en cultivo de fibroblastos humanos, el hinchamiento hipotónico causa la inhibición de la actividad del sistema A (43). El papel funcional de la sensibilidad osmótica del sistema A parece ser fundamental en la recuperación del volumen celular del encogimiento hipertónico (44, 45).

3.4.2 Regulación adaptativa

El mecanismo de regulación más característico que afecta al sistema A es el gran incremento en su actividad que se observa cuando las células se incuban en un medio libre o carente de los aminoácidos sustratos del transportador. Este mecanismo, originalmente descrito en células del mesénquima de aves por Gazzola (46) y posteriormente en otros modelos celulares (47), consiste en un lento incremento de la V_{max} del transporte que requiere de síntesis de RNAm y de proteína para su completo desarrollo y es completamente reversible si se añaden los aminoácidos al medio de incubación de las células (48, 49). La presencia, aún de un solo sustrato del sistema A, bloquea el incremento (18, 48-50). Se cree que este mecanismo proporciona una respuesta fundamental a las necesidades nutrimentales de las células promoviendo una mayor actividad del transportador para hacer frente a una limitada disponibilidad de sustratos extracelular. Estos cambios en la actividad de transporte del sistema A fueron usualmente interpretados como adaptaciones nutricionales a cambios del medio ambiente, de aquí el término de “regulación adaptativa”. La regulación adaptativa rápidamente se volvió una marca característica del sistema A.

3.4.3 Regulación hormonal del Sistema A

En estudios realizados con diferentes tipos celulares se ha demostrado que el sistema A se regula por la acción de diversas hormonas que incluyen al cortisol, el estradiol, el glucagón y la insulina.

La acción de los glucocorticoides sobre la actividad del sistema A difiere dependiendo del tipo celular. Gelehrter y McDonald (51) demostraron que la exposición de cultivo celular de hepatoma de rata a dexametasona o cortisol inhibe la actividad del transportador. Sin embargo, en fibroblastos la exposición a cortisol resulta en un incremento en la captación de MeAIB (52). Recientemente, Jones y colaboradores (53), utilizando la línea celular b30 BeWo de coriocarcinoma demostraron que bajas concentraciones de cortisol incrementan la actividad del sistema A, efecto que está asociado con la relocalización del

transportador SNAT2 hacia la membrana plasmática. En cambio, observaron un incremento en la abundancia del RNAm y síntesis de la proteína únicamente a niveles de cortisol $>1 \mu\text{M}$.

El estradiol es otra hormona que regula al sistema A. Utilizando un modelo de explantes de glándula mamaria de rata López y colaboradores (54) demostraron que la abundancia de RNAm de SNAT2 en este tejido varía en las diferentes etapas de diferenciación de la glándula mamaria, siendo mayor durante la gestación y en menor grado durante la lactancia. Asimismo, ellos comprobaron que la hormona β -estradiol, pero no la progesterona, incrementa los niveles de RNAm de SNAT2 en este tejido.

Se ha informado que, tanto glucagon como insulina, estimulan la actividad del sistema A en células de hígado (55-57). La acción de la insulina y del glucagon sobre la actividad del sistema A del hígado es una excepción del efecto opuesto clásico que estas hormonas tienen sobre el metabolismo hepático. El mecanismo por el cual estas hormonas inducen la actividad del sistema A aún no es claro.

El glucagon incrementa la captación de aminoácidos o MeAIB en hepatocitos de rata en un período de 30 minutos. Se ha sugerido que esta estimulación a corto plazo se debe a una hiperpolarización de membrana asociada a un incremento en AMP cíclico (AMPC). El AMPC ejerce su efecto a través de la estimulación del sistema de intercambio Na^+/H^+ en la membrana del hepatocito lo cual causa un incremento en el Na^+ intracelular con la consecuente estimulación de la ATPasa de Na^+/K^+ , produciendo hiperpolarización de la membrana y estimulación del cotransporte $\text{Na}^+/\text{alanina}$ (58). Esta regulación hormonal del transporte de aminoácidos vía hiperpolarización de la membrana probablemente tenga importancia fisiológica en el control a corto plazo de la gluconeogénesis.

La insulina también estimula la actividad del sistema A. Al parecer la acción principal de la insulina sobre el sistema A se realiza en el músculo, donde la

hormona estimula rápidamente la actividad del transportador. En células de parénquima del hígado el efecto de la insulina depende de la transcripción de su gen, así como de la traducción de este y de la glicosilación de la proteína formada.

En músculo esquelético, la insulina estimula la actividad del sistema A a través de un incremento en el reclutamiento del transportador en la membrana plasmática a partir de un compartimento endosomal. Este incremento depende de la fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3K) (59). Utilizando la línea celular 3T3-L1 de fibroblastos de ratón, Hatanaka y colaboradores (60) demostraron que el sitio de almacenamiento de SNAT2 se encuentra específicamente asociado con la red *trans*-Golgi y no con el sistema de reciclamiento endosomal general, por lo cual, la vía de translocación de SNAT2 estimulada por insulina es diferente a la del transportador de glucosa GLUT4.

La cicloheximida y la actinomicina D inhiben la captación de MeAIB estimulada por insulina en células musculares sugiriendo que el incremento en la actividad del sistema A esta asociado no solo a un rápido reclutamiento del transportador de un compartimento intracelular a la membrana plasmática sino también con la síntesis *de novo* de RNAm y de la proteína del transportador (61).

Estos datos reflejan la compleja regulación *in vivo* del sistema A, que depende de la adecuada interacción de diferentes hormonas y factores de crecimiento que son capaces de modular su actividad.

3.5 Papel funcional (fisiológico) del sistema A

La principal función del sistema A parece ser la de mantener los niveles citosólicos de aminoácidos dispensables elevados. Estos aminoácidos son sintetizados en abundancia por la misma célula o son captados a partir de fuentes nutrimentales.

Es importante enfatizar que el papel del sistema A en la formación de la poza intracelular de aminoácidos no solo se restringe a sus sustratos preferidos, aunque

sistemas de transporte ASC y L abasteciendo el influjo de otros aminoácidos neutros como la valina o la isoleucina. A su vez, el flujo trans-membrana de los sustratos del sistema L afecta el de los aminoácidos catiónicos a través del mecanismo de intercambio del sistema y^+L . Esto nos indica que la actividad del sistema A influye en la concentración de aminoácidos intracelular a través de su interacción con otros sistemas de transporte (19).

La identificación molecular de las isoformas *SLC38* proporciona una valiosa herramienta para poder evaluar el papel que juega cada uno de ellos en diferentes procesos fisiológicos (26). Por ejemplo, la distribución celular y propiedades funcionales de SNAT1 sugieren un papel en la captación de glutamina. SNAT1 exhibe una preferencia para la glutamina. En neuronas, la enzima mitocondrial glutaminasa cataliza la hidrólisis de glutamina a glutamato el cual puede servir como un precursor directo de GABA. En el hígado, se sugiere un papel para SNAT2 en la provisión de aminoácidos que pueden entrar a la vía de la gluconeogénesis como la alanina.

4. JUSTIFICACIÓN

Todos los organismos regulan la expresión de genes en respuesta a cambios en el medio ambiente externo. La regulación de la expresión de genes en respuesta a cambios en el medio ambiente nutricional es un evento bien documentado en procariontes y eucariontes inferiores (62, 63). Estos organismos unicelulares, son capaces de ajustar su capacidad metabólica en respuesta a variaciones en el suministro de nutrimentos en el medio de cultivo. Sin embargo, la respuesta de los organismos multicelulares a las variaciones de nutrimentos es muy compleja y no se comprende completamente.

Los mamíferos deben ajustar su metabolismo a la ingesta intermitente de alimento. La regulación del metabolismo se logra a través de mecanismos que regulan la expresión de genes específicos en la presencia o ausencia de nutrimentos apropiados. En los organismos multicelulares el control de la expresión de genes involucra interacciones complejas de factores hormonales y neuronales.

Se ha demostrado que constituyentes dietarios como carbohidratos y ácidos grasos participan en la regulación de la expresión de genes en mamíferos (64-69). En contraste, existe considerablemente menos información disponible concerniente al control de la expresión de genes por aminoácidos (1, 70).

Los mamíferos deben regular en forma precisa la homeostasis de los aminoácidos debido a que: 1) los organismos multicelulares son incapaces de sintetizar todos los aminoácidos y, 2) no existen almacenes importantes de aminoácidos dispensables (en contraste con los lípidos o la glucosa). Recientemente, se ha demostrado que cambios en la disponibilidad de aminoácidos tiene profundos efectos sobre algunos aspectos de la función celular no solo a nivel de la regulación de la expresión de genes y señalización celular (6, 71), sino también, en el transporte y metabolismo de los propios aminoácidos (72). Sin embargo, aún no se sabe cómo las células eucarióticas sensan la presencia de un medio rico o

privado en aminoácidos, ni tampoco se conoce como se transduce esta señal al núcleo para el inicio de la transcripción de genes blanco.

Actualmente se sugiere que el transportador SNAT2 funciona como un “transceptor”, es decir, una proteína con función dual de transportador/receptor de aminoácidos (7). Existe evidencia que SNAT2 puede regular la señalización de nutrimentos no solamente a través de modular la poza de aminoácidos libre intracelular sino a través de su capacidad de “sensar” o percibir cambios en la disponibilidad extracelular de aminoácidos (73).

En algunos estudios realizados durante la década pasada se demostró que diversas vías de señalización están involucradas en la regulación transcripcional del gen SNAT2. López-Fontanals y colaboradores encontraron que la respuesta adaptativa y la respuesta a choque hipertónico de este transportador se regulan por dos mecanismos separados. La capacidad del sistema A de responder a hiperosmolaridad involucra a los complejos CDK-ciclina lo que sugiere que está relacionada con el incremento de volumen celular que necesita la célula antes de entrar en un nuevo ciclo celular. En cambio, la regulación adaptativa está regulada por dos rutas independientes ERK1/2 y JNK de la MAPK (74). La activación de ERK juega un papel central en la señalización de la proliferación celular inducida por factores de crecimiento que actúan a través de proteínas cinasas de tirosina o de receptores acoplados a proteínas G. La proteína cinasa C (PKC) también puede activar la ruta ERK. Además, las rutas de Ca^{2+} y de AMPc intersectan con la señalización de ERK, estimulando o inhibiendo la ruta ERK, respectivamente.

Asimismo, estudios realizados con explantes de glándula mamaria de rata demuestran que la expresión del sistema A se induce por compuestos como forskolina y ésteres de forbol (PMA) lo que involucra rutas de transducción de señales como PKA y PKC, respectivamente, en la regulación de la transcripción del gen de este transportador (54). En este mismo estudio, también se comprobó

que existe una regulación hormonal por parte del estradiol en la expresión del gen de SNAT2.

La capacidad de distinguir y monitorear entre la cantidad y calidad de aminoácidos intracelular y extracelular capacita a las células para poder responder apropiadamente a cambios en el estado nutricional. Por lo tanto, el estudio de la región promotora ayudará a comprender los diferentes mecanismos que regulan la transcripción de SNAT2 y, a su vez, proporcionar indicios acerca de cómo este transportador mantiene la homeostasis celular bajo diferentes condiciones fisiológicas.

Debido al poco conocimiento que se tiene sobre los mecanismos moleculares que regulan la expresión del gen SNAT2, la visión inicial para entender cómo es que se regula la expresión de este gen es la de conocer que elementos de respuesta presenta en la secuencia promotora que respondan a cambios en la concentración sérica de glucagon, hormona que se libera en situaciones de ayuno, o cuando se consumen dietas altas en proteína. Se ha demostrado, que la actividad del sistema A incrementa en cultivos celulares en la presencia de glucagon. Las vías de señalización activadas por glucagon son las de PKA o PKC. Particularmente, la vía de PKA, la cual se estimula por el AMPc. Como se ha indicado anteriormente los activadores de estas vías incrementan el RNAm del SNAT2. Sin embargo, en la actualidad no se conoce que elementos de respuesta son los que llevan a cabo este aumento en la transcripción del gen SNAT2 bajo el estímulo de estas vías de señalización.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Clonar, identificar y analizar la región promotora del gen SNAT2 de rata para identificar los mecanismos moleculares que regulan su transcripción en presencia de glucagon o de activadores de su vía de señalización vía AMPc.

5.2 Objetivos Específicos

- Identificar el sitio de inicio de la transcripción del gen SNAT2 de rata.
- Identificar los elementos de respuesta potenciales “*cis*-acting” que regulan la transcripción del gen SNAT2 de rata.
- Aislar fragmentos de DNA de diferentes tamaños de la región promotora del gen SNAT2 por medio de deleciones específicas y determinar su actividad por medio de ensayos de genes reporteros activados por AMPc.
- Identificar el (los) elemento(s) de respuesta involucrado(s) en la activación transcripcional de SNAT2 por AMPc.
- Determinar los factores de transcripción involucrados en la regulación del gen a través de ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA) y de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) por AMPc.

6. HIPÓTESIS

El glucagon regula la transcripción del transportador de aminoácidos SNAT2 a través de la vía de señalización de PKA promoviendo la unión del factor de transcripción CREB a un sitio CRE en la región promotora de este gen.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Materiales

Todos los reactivos utilizados en este estudio fueron de la mayor pureza disponible. El kit SMART rapid amplification of cDNA end (RACE) cDNA amplification fue obtenido de la compañía BD Biosciences-Clontech (Palo Alto, CA). Los sistemas Luciferase Assay Dual System, Primer Extension system-AMV reverse transcriptase, “Gel Shift Assay Systems”, así como los vectores pRL-TK Renilla expression vector y pGL3-basic firefly luciferase vector fueron de la compañía Promega (Madison, WI). Los vectores de expresión para los dominantes negativos de CREB, pCMV-CREB133 (dn-CREB133) y pCMV-KCREB (dn-KCREB) fueron de Clontech (Palo Alto, CA). La enzima de restricción Bgl II, la T4 DNA ligase y el cocktail de inhibidores de proteasas fue de Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Los medios de cultivo RPMI 1640, DMEM y el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 fueron de Invitrogen/Gibco (Grand Island, NY). El sistema de mutagénesis QuikChange site-directed mutagenesis fue de Stratagene (Cedar Creek, TX). El anticuerpo específico anti-CREB1 fue de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

7.2 Animales y dietas

7.2.1 Efecto de proteína dietaria

Diez ratas Wistar macho de 180 g de peso se dividieron en dos grupos y se colocaron en cajas de alambre de acero inoxidable con periodos de luz-oscuridad de 12 horas. Cada grupo recibió una de las dietas experimentales que contenían 20% o 50% de proteína dietaria durante 10 días y agua ad libitum. La composición de las dietas experimentales se presenta en el Cuadro 2. Al final del estudio, se realizó la eutanasia de los animales para obtener sangre e hígado. Las muestras de sangre fueron centrifugadas para separar el suero el cual se almacenó en congelación hasta su uso. Por otro lado, las muestras de hígado se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.

Cuadro 2. Formulación de las dietas experimentales

Ingrediente	10% de proteína (g/Kg dieta)	20% de proteína (g/Kg dieta)	50% de proteína (g/Kg dieta)
Caseína ^a (90.8% proteína)	110.1	220.3	550.7
Almidón	364.1	309.0	143.8
Dextrosa	364.1	309.0	143.8
Aceite de soya	100.0	100.0	100.0
Mezcla de minerales ^b	50	50	50
Mezcla de vitaminas (AIN-93-VX) ^c	10	10	10
Citrato de colina	1.7	1.7	1.7

^a Caseína “libre de vitamina”, Harlan Teklad research diets, Madison, WI.

^b Rogers-Harper, Harlan Teklad research diets, Madison, WI.

^c AIN-93-VX, Harlan Teklad research diets, Madison, WI.

7.2.2 Efecto de la administración de glucagon

Se utilizaron diez ratas Wistar macho de 180 g de peso las cuales tuvieron libre acceso a una dieta con 10% de proteína dietaria (Cuadro 2) durante 5 días. Entonces, las ratas se dividieron en dos grupos. Las ratas del grupo experimental se inyectaron intraperitonealmente con glucagon (Sigma Aldrich) (0.6 mg/100 g de peso corporal) y las ratas del grupo control se inyectaron únicamente con agua. Tres horas después de la inyección el hígado se removió para la obtención de RNA total con el reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Estos estudios fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

7.3 Determinación de la concentración de glucagon en suero.

La concentración de glucagon en el suero de las ratas se determinó con un estuche comercial utilizando la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) (Linco Research Immunoassays, St Charles, MO).

7.4 PCR cuantitativo

Se utilizaron 300 nanogramos de RNA total para sintetizar DNAc por medio de la enzima transcriptasa reversa MMLV. Posteriormente se realizó el PCR cuantitativo utilizando la sonda y oligonucleótidos TaqMan para SNAT2 de rata

(Rn00710421_m1) y de β -actina como gen estructural (Rn00667869_m1) para el equipo ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, CA).

7.5 Análisis computacional. Identificación de las secuencias de los elementos de respuesta potenciales.

Se realizó un análisis computacional para la predicción de la región promotora utilizando los programas Proscan (www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan) y el Neural Network Promoter Prediction (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). La predicción de los sitios de unión a factores de transcripción se realizó con el programa MatInspector (www.genomatix.de). La presencia de islas CpG fue analizado con el programa EMBOSS CpGplot (www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/).

7.6 Identificación del sitio de inicio de la transcripción

El estudio de la regulación a nivel transcripcional de un gen comienza con la identificación de su región promotora. La localización de la región promotora puede ser identificada simplemente mapeando el sitio de inicio de la transcripción. La identificación de este sitio se realizó por medio de las técnicas de primer extension y de 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends).

7.6.1 Extracción de RNA total

Se extrajo RNA total de hígado de rata de la cepa Wistar por gradiente de densidad con cloruro de cesio y tiocianato de guanidina (75).

7.6.2 Obtención de RNA mensajero

La purificación del RNA mensajero a partir de RNA total se realizó por medio del mRNA Purification kit (Amersham Pharmacia Biotech) el cual está diseñado para la rápida purificación de RNA poliadenilado (RNA poli(A)⁺) a partir de RNA total eucariótico. La purificación se basa en la separación por afinidad del RNA poliadenilado con el uso de columnas pre-empacadas de celulosa-oligo(dT).

7.6.3 Técnica de “primer extension”

Esta técnica requiere una muestra de RNAm y un oligonucleótido marcado radiactivamente complementario a una secuencia dentro de las primeras 150 bases del sitio de inicio del RNAm. El oligonucleótido marcado en su posición 5' terminal es hibridado con el RNA y es utilizado como cebador por la transcriptasa reversa en la presencia de desoxinucleótidos. El RNA se transcribe a DNAc y se analiza por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. La longitud del DNAc refleja el número de bases entre el nucleótido marcado del primer y la posición 5' del RNA.

El ensayo de “primer extension” se realizó usando el estuche Primer Extension System-AMV Reverse Transcriptase (Promega, Madison USA) de acuerdo a las especificaciones indicadas. Brevemente, un oligonucleotido anti-sentido (la secuencia se muestra en el Cuadro 3) correspondiendo a las posiciones +22 a +42 del inicio del RNAm se marcó con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ usando la enzima T4 polinucleótido cinasa. El oligonucleótido marcado se incubó con 1 μg de RNA poli(A)⁺ de glándula mamaria de rata por 20 min a 58°C y posteriormente se extendió por la transcriptasa reversa por 30 min a 42°C. El producto se analizó en un gel de secuencia.

7.6.4 Técnica de amplificación de los extremos de DNAc (5' RACE)

El ensayo 5' RACE se realizó usando el estuche comercial “BD Smart RACE, cDNA amplification kit” (BD Biosciences-Clontech) de acuerdo a las especificaciones indicadas. Brevemente, la primer hebra de DNAc se sintetizó a partir de 1 μg de RNA poli(A)⁺ de hígado de rata con oligo d(T) y con un oligonucleótido SMART II A. Posteriormente, el 5'-RACE se realizó con un oligonucleótido universal proporcionado en el estuche y con un oligonucleótido anti-sentido específico del gen (gen specific primer; GSP) (la secuencia se muestra en el Cuadro 3). El producto final amplificado se analizó en un gel de agarosa/EtBr, se clonó y secuenció.

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Nombre	Oligonucleótido (5'-3')	Localización
<i>Oligonucleótidos utilizados en los ensayos Primer Extension and RACE</i>		
PE anti-sentido	AGC AGA GAC TAA GGG GTG GTG	+25/+45
RACE anti-sentido (GSP)	CGCGGGCTGTCTCGGTCACAC	+245/+265
<i>Oligonucleótidos utilizados en la generación de las construcciones reporteras del promotor</i>		
pS-872 sentido	TCT CCT CGG GGG TCT TTG TTC	-872/-852
pS-336 sentido	CGC GGG CTG GGG GTG GTT	-336/-319
pS-276 sentido	TGT CCC CGA AAC GCA GCG TTG	-276/-256
pS-192 sentido	CCA CGG GGC TGC GGT GCC A	-192/-176
pS-63 sentido	CCG CGC CCC GCC CAC TGA C	-63/-45
pS-22 sentido	CGC GCT CCG GAG GCA GCT C	-22/-4
pS-8 sentido	AGC TCC ACA CCG CGC CAC GC	-8/+11
pS anti-sentido	CGC GGG CTG TCT CGG TCA CAC	+245/+265
<i>Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de EMSA</i>		
CRE consenso sentido	AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG	
CRE consenso anti-sentido	TCT CTA ACG GAC TGC AGT CTC TCG ATC	
CRE 354 sentido	GAA AAA CCC TTA ACG TAA ATC TTA AGT C	-363/-336
CRE 354 anti-sentido	GAC TTA AGA TTT ACG TTA AGG GTT TTT C	-363/-336
CRE 48 sentido	GCC CAC TGA CGC GGC TCC AGG CC	-54/-32
CRE 48 anti-sentido	GGC CTG GAG CCG CGT CAG TGG GC	-54/-32
CRE 354 mut sentido	GAA AAA CCC TTA <u>TGG</u> TAA ATC TTA AGT C	-363/-336
CRE 354 mut anti-sentido	GAC TTA AGA TTT <u>ACC</u> <u>ATA</u> AGG GTT TTT C	-363/-336
CRE 48 mut sentido	GCC CAC <u>TGT</u> <u>GGC</u> GGC TCC AGG CC	-54/-32
CRE 48 mut anti-sentido	GGC CTG GAG CCG <u>CCA</u> CAG TGG GC	-54/-32
<i>Oligonucleótidos utilizados para mutagénesis del promotor</i>		
CRE mut354 sentido	TGC GGG AGA AAA ACC CTT <u>ATG</u> GTA AAT CTT AAG TCG CGG G	-369/-331
CRE mut354 anti-sentido	CCC GCG ACT TAA GAT TTA <u>CCA</u> TAA GGG TTT TTC TCC CGC A	-369/-331
CRE mut48 sentido	CCC CGC CCA CTG <u>TGG</u> CGG CTC CAG GC	-58/-33
CRE mut48 anti-sentido	GCC TGG AGC CGC <u>CAC</u> AGT GGG CGG GG	-58/-33

7.7 Obtención de DNA genómico

El DNA genómico se obtuvo a partir de hígado de rata el cual se utilizó como templado para la amplificación de fragmentos de DNA de la región promotora del gen SNAT2 de rata. El tejido se congeló rápidamente y se aplastó para producir pedazos que fueran fácilmente digeridos. Posteriormente se colocó en una solución con proteinasa K y SDS y se incubó hasta que la mayoría de la proteína celular es degradada. Esta digestión se desproteinizó a través de extracciones sucesivas con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se recuperó por precipitación con etanol, se secó y se resuspendió en una solución amortiguadora o agua (76).

7.8 Amplificación de fragmentos de DNA genómicos de SNAT2 por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó el sistema Expand High Fidelity PCR System (Roche Applied Science) el cual está compuesto de una mezcla de enzimas que contiene una Taq DNA polimerasa termoestable y una Tgo DNA polimerasa que es una DNA polimerasa termoestable con actividad de corrección (proofreading). Esta mezcla de polimerasas genera productos de PCR con un rendimiento, fidelidad y especificidad elevados a partir de todo tipo de DNA. Este sistema está optimizado especialmente para amplificar eficientemente fragmentos de DNA de hasta 5 kb.

7.9 Clonación de la región promotora y generación de construcciones con deleciones progresivas unidireccionales 5'

La región promotora del gen de SNAT2 de rata se amplificó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos (las secuencias se presentan en el Cuadro 3) diseñados con base en el análisis *in silico* de la región 5' no traducida. El fragmento de DNA de 1137 pb del promotor se clonó en el vector pGL3-basic (Promega) el cual correspondió a la construcción de mayor longitud del gen reportero SNAT2-Luc (-872/+265). Las deleciones progresivas 5' de la región promotora se obtuvieron por PCR y se clonaron en el mismo vector. A continuación se describe, brevemente, el procedimiento general para la obtención de cada una de las construcciones.

A todos los oligonucleótidos se les agregó la secuencia para el sitio de restricción de la enzima Bgl II para poderlo insertar en el vector reportero de luciferasa pGL3 basic. Se seleccionó este sitio de restricción con base en un análisis de sitios de restricción de la región genómica a estudiar y su comparación con la región de clonación múltiple de pGL3 basic la cual tiene 8 sitios de restricción (**Figura 2**). De estos 8 sitios solamente Sac I, Mlu I y Bgl II no cortaban ninguno de los fragmentos de DNA de SNAT2 que se deseaban clonar.

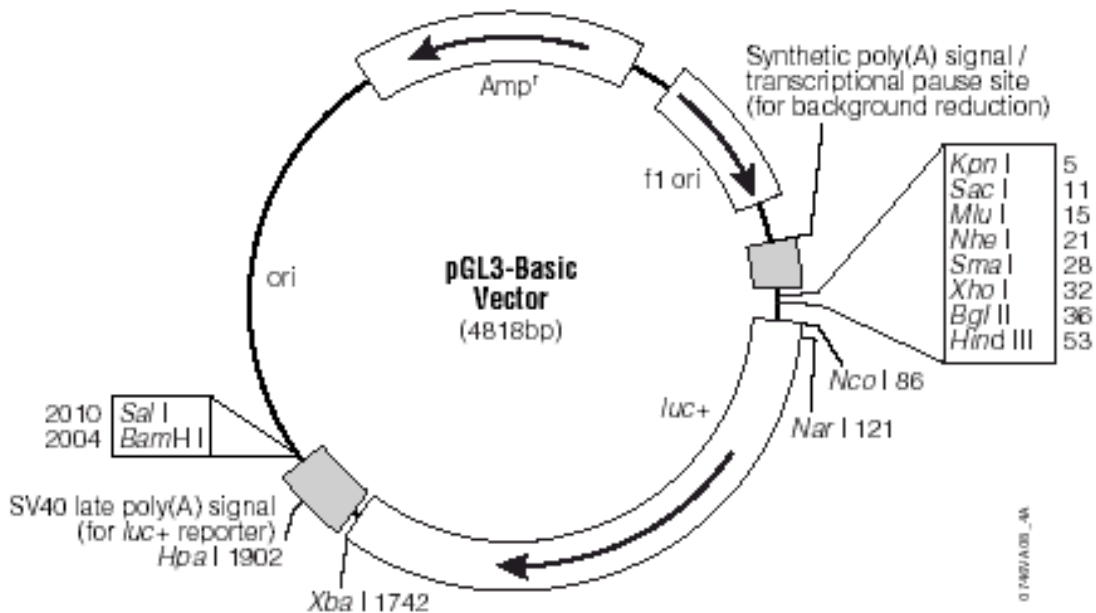


Figura 2. Mapa circular del vector pGL3 basic (Promega)

En la siguiente secuencia se presentan las posiciones marcadas de los oligonucleótidos (sentido y anti-sentido) utilizados para amplificar los fragmentos de DNA de la región promotora a analizar:

>ref|NW_047784.1|Rn7_WGA2308_3:c2105960-2104360 Rattus norvegicus chromosome 7 genomic contig, whole genome shotgun sequence

```

GGTGATCACACCCAGCCCTTTCCTCTCTGCCAGCCCAATCTCTCCCACGTCCCCCAAAGGAAGAGAGCA
CTAGGTCAAACCTGTTTTGTTTATTCCTCCATTCAAGCAGCATTTTTCTCTCTCTCGGGGTCCTTTGTTTC S-872 -872/+265 (1135 pb)
AACCCAAAAGGGAAGGGCCCTCGCCTTTCGGCAGCACCAGTAATTTCTAGTCTCAGGGGCTCCCCGGGTC
GCCCCACTCTGCAAGACCACAGCTCCACCAGGGATCCGGGCCGAGAGAAAGTCCAGGCCTACATTC
AACGAGGGCGCGCTCGCTGGAAGCTGGAGGAGACGCTAACACCAGGGGTGGGGTGGAGGCAGGAGGGA
AAGTGTCCGGCAAGAGGGAACAGGGCGCCCTAGGCGGCTCGGAAGGGCTGGGTCTCCCATCCCCGAAC
CCCTTTTAAAGGGCTTGCTGGTCCAACGCAACCGTCCCTAGTACGCTGTGACACGTGCAACCCCAAAGTCT
ATCCCGCCACGGAAGTGCAGCGCCCTCATTACACAGGCTAGTTGTGGAGAGTGAAGCACATCTAGG
TGGAAAGATCGAGAACACAACCGGGCCCTCCGGGCAGCGTGGCAGCGCTGGCTCAAGTTCTGCGGGAGA
AAAACCCTTAACGTAAATCTTAAGTCCGCGGGCTGGGGGTGGTTTGGGGTGTCTGGGGGTGTAGGGTACCG S-336 -336/+265 (601 pb)
CACACACGCCGGATGTTGTCGCCGAAACGCAGCGTTGGAGACCGCTGGGAGGGAATCTAAGGAGCTGGC S-276 -276/+265 (541 pb)
TCCTTACGGCAGCCGCGGGTGGCGCCACCCACGGGGCTGCGGTGCCACGGCAGCCGGAGCCACGGGAAA S-192 -192/+265 (457 pb)
GCGGGGTGCGGCTGGCCCCCGACTCGGGGTGCGGGGCAGCAGCAGGGAGGCGGAGCCAGGTGCTGTTG S-63 -63/+265 (328 pb)
ATACACAAAGACGAACGCCTCGCGCCCGCCACTGACGCGGCTCCAGGCGCTATAACTCCGCGCTCCGGA S-22 -22/+265 (287 pb)
GGCAGCTCCACACCGCGCCACGCGCTCGCCCGCGCCACCACCCCTTAGTCTCTGCTGGAGGATCGTGACC
+1
GCCATTCCCCTTTTCTTTTATAATCTTTGAAATAATTAATCTAAGAAAGAAAAAATCCAT
CTCTTGTGCTGTGGATTGCGGGGATTTCTTTTCTTTTAAATTTAAAAAGAAAGAAAAAAGGGG
GGGGACTCCGACCACACTTATTTTGCCTCGTTTTACAATCTGTTGTGACCGAGACAGCCCGGGAG
ACGCTGCCGTGAGGTGGCCAGCTCGCAGGAAGAGCACCGAGGTGAGCGGGGGATGGGCGGTAGCGGG
ACGCGGGCGCGCCGCGGGGAGAGAGTGGGGCTTGCGGGCACCCGGCCGCAACCTCCCGTTAGGGGG
AGGGGAGCCGCGCGGGTCTCTTGTCTGCTGCAAGCCGGGCTTTGTGACTCCATTGGCTTGGAAACC
CATCGTGGAGTCCGGGCTGGGGAGAGCGAGCCGAGAGGGCTTGACAATCGCCCTCGGTATTGCATCA
GTTCTCCCGGGGAGAGGGGGCCGCGGGCTACCCGGGCAGCCGCGCCGCGGGAGGGCTCGG
CGTGTGCCCTGTAACAAGCCCGGCTGGGGCGGGGGGACCGGGCTCGCGCCGGGGCGCTGGAGGGG
CGCCGCGCGGGCATCTTTGTTCTCGCGCCCGCGCTCGGTACTTTTCCGCCCTCTCCGCGCCCGG
CCCTCGCTCGCTGGTACTTTTCCACTCGCTGGCGGGGATGAATCAGCCGCGCTGCGCCCGCGGCG
GCGTACGTGGTGGGGGCGGGCGGGCGCCAGTCTGACGCGCCGCTTCTACCTTTCGAGGCAGCCT
CGAGGGCCAGTGCGCCCAAGGACAAAAGGAAGCTCGCGCCGCGCTGAACACCGTTTCTCCGGATCA
GCATG

```

S-336 -336/+265 (601 pb)
S-276 -276/+265 (541 pb)
S-192 -192/+265 (457 pb)
S-63 -63/+265 (328 pb)
S-22 -22/+265 (287 pb)
S-8 -8/+265 (273 pb)
Exón 1
Oligonucleótido anti-sentido
Intrón 1

Los fragmentos de DNA genómicos de SNAT2 amplificados por PCR (Figura 3) se purificaron y posteriormente se digirieron con la enzima Bgl II. Una vez digeridos, los fragmentos se volvieron a purificar y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

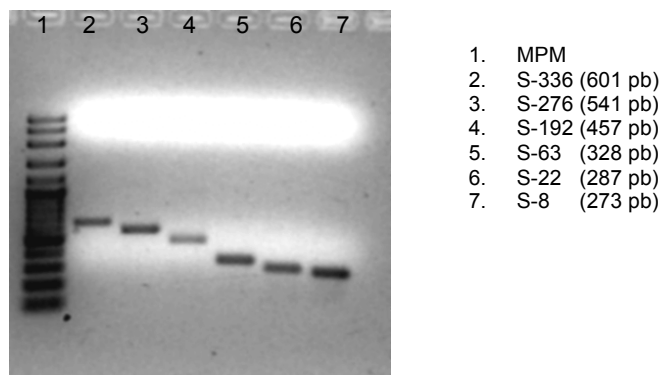


Figura 3. Productos de amplificación por PCR de los diferentes fragmentos de DNA de SNAT2.

En cuanto al vector, también se digirió con la enzima Bgl II. Una vez digerido se purificó por extracción con fenol/cloroformo y posteriormente se defosforiló con la enzima fosfatasa alcalina. Finalmente, el vector digerido y defosforilado se purificó nuevamente. Una vez digeridos y purificados los productos de amplificación y el vector reportero se procedió a realizar la ligación. Para la reacción de ligación se probaron tres diferentes relaciones vector:inserto, 1:7, 1:3 y 1:1 respectivamente, partiendo de una concentración de 100 ng de vector, utilizando la enzima T4 DNA ligasa y a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se transformaron células electrocompetentes XL-1 blue (por electroporación) con las ligaciones y se sembraron en placas con medio LB y ampicilina (ya que el vector proporciona resistencia a ampicilina). Las placas se incubaron a 37°C. Al otro día se examinaron las placas buscando crecimiento de colonias aisladas. Se seleccionaron entre 10 y 15 colonias aisladas de cada placa y se obtuvo el DNA plasmídico por la técnica de miniprep alcalina.

7.9.1 Análisis de las clonas por digestión con Bgl II

Los productos de miniprep se digirieron con la enzima Bgl II para identificar las clonas positivas, es decir, aquellas que tuvieran el fragmento de DNA genómico insertado en el vector.

7.10 Purificación de DNA de plásmidos

La purificación de los plásmidos de las bacterias transformadas se realizó utilizando el kit “pure yield plasmid midiprep system” (Promega)

7.11 Confirmación de las construcciones por secuenciación

Debido a que utilizamos la misma enzima de restricción tanto en el extremo 5' como 3' de los fragmentos de DNA amplificados, fue necesario determinar si el fragmento de DNA insertado estaba en la orientación correcta. Por lo tanto, cada una de las construcciones se secuenció para verificar la orientación del fragmento de DNA así como para asegurar que el producto amplificado no tuviera errores en la secuencia. Todas las construcciones se verificaron por secuenciación utilizando

el sistema Dye terminator cycle sequencing with Quick Start kit (Beckman coulter) en el secuenciador automático CEQ 8800 marca Beckman Coulter.

7.12 Cultivo celular, transfección transitoria y ensayos reporteros de luciferasa

Las células HepG2 se crecieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 8%, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) a 37°C y 5% de CO₂. Las células se sembraron en cajas de cultivo de 35 mm a una confluencia del 80% y se transfectaron utilizando el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones indicadas por el proveedor. Brevemente, las células HepG2 se co-transfectaron con 0.25 µg de cada plásmido reportero de luciferasa y 0.01 µg del vector de expresión de renilla (pRL-TK) el cual se usó como un control interno para normalizar la eficiencia de la transfección. Las condiciones de transfección se resumen en el siguiente cuadro.

Línea celular	Placa cultivo	Área por pozo (cm ²)	Células/pozo	Volumen de medio (ml)	DNA(µg) y volumen de dilución (µl)	Renilla (µg)	Lipofectamina 2000 (µl) y volumen de dilución (µl)
HepG2	12 pozos	4.5	150 000	1.0	0.25 en 50	0.01	2.0 en 50

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se lisaron y se determinó la actividad de la luciferasa usando el Luciferase Assay Dual System (Promega). Las actividades de luciferasa se normalizaron con renilla y se expresaron como la relación Luciferasa/Renilla.

7.13 Cultivo primario de hepatocitos de rata

Los hepatocitos de rata se aislaron utilizando la técnica de perfusión con colagenasa (77) y se separaron por centrifugación de otras células hepáticas diferentes del parénquima y del debris celular. La viabilidad celular se determinó por exclusión con azul Tripano la cual siempre fue >85%. Las células (60,000/cm²)

se sembraron en placas de cultivo tratadas para máxima adherencia (cell bind) y se mantuvieron en DMEM suplementado con glucosa, L-glutamina, piridoxina, piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor. El medio se reemplazó 4 horas después para eliminar las células muertas. El RNA total se obtuvo con el reactivo de Trizol.

7.14 Mutagénesis de sitio dirigido

La mutagénesis se realizó con el estuche QuikChange site directed mutagenesis (Stratagene) siguiendo las especificaciones indicadas por el proveedor. Para generar las secuencias mutantes se utilizó un plásmido que contenía la secuencia promotora del gen SNAT2 de rata de -872 a +265 como el templado natural (silvestre) y un par de oligonucleótidos específicos con los sitios mutados (las secuencias se presentan en el Cuadro 3). La identidad y fidelidad de las construcciones se verificó por secuenciación (Equipo CEQ, Beckman Coulter).

7.15 Preparación de extractos nucleares y ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)

El ensayo de retardo de movilidad electroforética proporciona un método rápido y sencillo para detectar la unión de proteínas a secuencias específicas de DNA, tales como factores de transcripción. Los extractos nucleares se obtuvieron de la línea celular HepG2 utilizando el estuche comercial Nuclear Extract (SIGMA). La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry, et al. (78).

El ensayo de retardo de movilidad electroforética se llevó a cabo utilizando el sistema Gel Shift Assay System (Promega) siguiendo las especificaciones del proveedor. Brevemente, los oligonucleótidos de doble hebra se marcaron con [γ - 32 P]ATP utilizando la enzima T4 polinucleótido cinasa. Esta sonda marcada se incubó con 10 μ g de extracto nuclear de HepG2 y amortiguador de unión por 30 min a temperatura ambiente. Para el análisis de super shift, se incubó 1 μ g de anticuerpo específico para CREB (Santa Cruz Biotechnology) con el extracto nuclear 15 min antes de la adición de la sonda marcada. Los complejos se

separaron en un gel de poliacrilamida al 4% en condiciones no-desnaturalizantes y se visualizaron por autorradiografía.

7.16 Ensayo de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)

Los cultivos primarios de hepatocitos de rata se mantuvieron por 24 horas en medio de cultivo D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Posteriormente, las células se incubaron en ausencia o presencia de forskolina (10 μ M) por 30, 60, 90 o 120 minutos y se fijaron con formaldehído al 1% por 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con glicina 0.125 M y se realizaron dos lavados con PBS frío. Las células se cosecharon, se lisaron y se sonicaron para obtener fragmentos de DNA de aproximadamente 400-500 bp. La cromatina soluble se inmunoprecipitó utilizando 4 μ g de un anticuerpo específico anti-CREB1 (Santa Cruz Biotechnology) y proteína A agarosa/esperma de salmón. El complejo proteína A agarosa/anticuerpo/DNA se lavó con una solución salina amortiguada de baja concentración de sales (150 mM), seguida de un lavado con solución salina amortiguada con alta concentración de sales (500 mM), un lavado con solución amortiguada de LiCl y, finalmente, dos lavados con solución amortiguada de TE. El complejo DNA/anticuerpo se eluyó con una solución amortiguada de NaHCO₃ 0.1 M y SDS 1%. La fijación con formaldehído fue revertida incubando el complejo con una solución de NaCl 5 M a 65°C por 18 horas. Finalmente, se desproteinizó con proteinasa K (10 mg/ml) y se recuperó el DNA para analizarlo por PCR. Para el análisis por PCR se utilizaron 4 μ l de templado de DNA, MgCl₂ 3 mM y un par de oligonucleótidos específicos para el sitio CRE -48 (la secuencia se presenta en el Cuadro 3).

7.17 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Los datos se analizaron por medio de una prueba t de student y se consideró una diferencia significativa a una $p < 0.05$. Los datos se analizaron con el software Statview (Abacus Concepts, San Francisco, CA).

8. RESULTADOS

8.1 Efecto de una dieta alta en proteína sobre la expresión del gen SNAT2 en ratas

En primer lugar evaluamos el efecto que tiene el consumo de una dieta alta en proteína sobre la expresión de SNAT2 en el hígado de ratas. Se encontró que las ratas alimentadas con una dieta que contenía 50% de caseína (dieta alta en proteína) incrementó la abundancia del RNAm de SNAT2 casi al doble ($p < 0.05$) con respecto a las ratas control las cuales se alimentaron con una dieta que contenía 20% de caseína (**Figura 4A**).

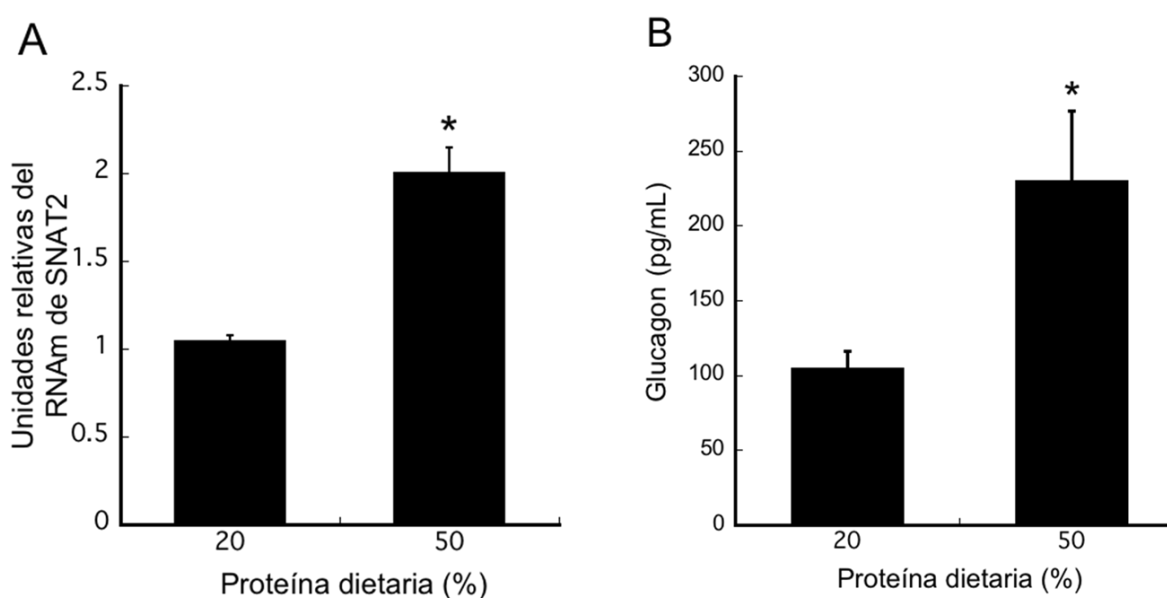


Figura 4. Expresión del gen SNAT2 en hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en proteína. (A) Efecto de la concentración de proteína dietaria sobre la abundancia del RNAm del gen SNAT2. Las ratas se alimentaron con una dieta conteniendo 20% o 50% de caseína durante 10 días. (B) Concentración de glucagon en el suero de ratas alimentadas con una dieta conteniendo 20% o 50% de caseína. Se determinó β -actina como gen estructural para normalizar los resultados de la expresión de SNAT2. Los resultados están expresados como la media \pm SE; n = 5 ratas /grupo. * Diferencia significativa ($P < 0.05$).

El cambio en los niveles de expresión del gen SNAT2 se acompañó por un incremento significativo en la concentración de glucagon en suero en las ratas alimentadas con la dieta al 50% de caseína respecto al grupo control (**Figura 4B**). Estos resultados sugieren que el glucagon podría estar regulando la expresión del gen SNAT2.

8.2 Efecto del glucagon sobre la expresión del gen SNAT2 en ratas

Con la finalidad de comprobar si el glucagon tiene algún efecto en la regulación de la expresión del gen SNAT2, ratas alimentadas con una dieta al 10% de caseína por 5 días se inyectaron intraperitonealmente con una dosis de glucagon (0.6 mg/Kg de peso corporal). Se encontró un incremento significativo en la abundancia del RNAm de SNAT2 en estas ratas en comparación a las ratas inyectadas solo con vehículo (grupo control) (**Figura 5A**).

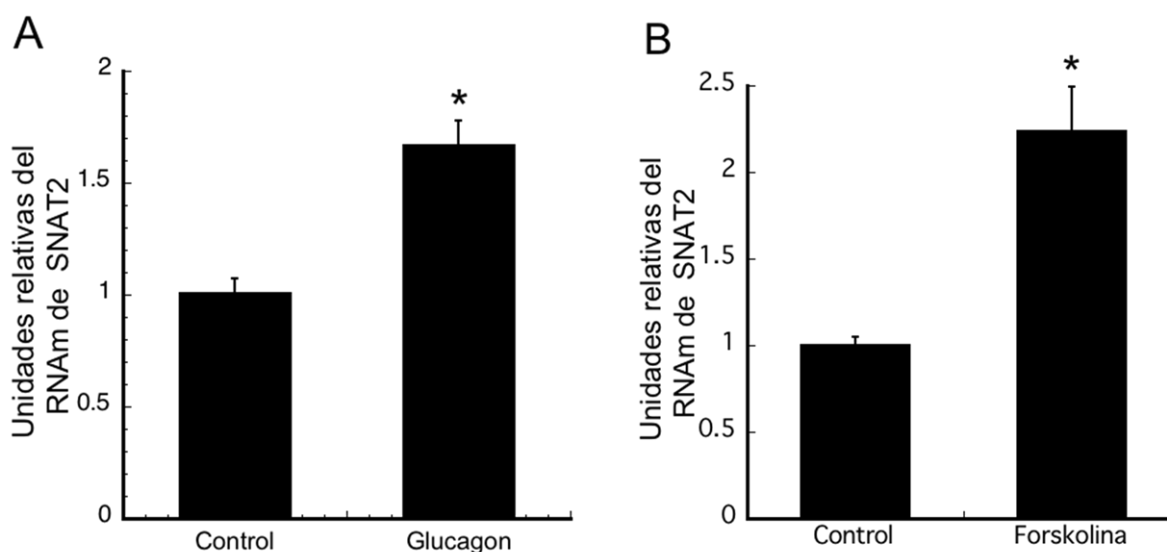


Figura 5. Efecto del glucagon y de forskolina sobre la expresión del gen SNAT2 en ratas. (A) Las ratas se alimentaron con una dieta conteniendo 10% de caseína durante 5 días y posteriormente se les administró una dosis intraperitoneal de glucagon (0.6 mg/Kg de peso corporal). Tres horas después se extrajo el RNA total y se determinó la expresión del gen SNAT2. (B) El cultivo primario de hepatocitos de rata se incubó en presencia o ausencia de forskolina (10 μ M) durante 4 horas. Posteriormente se extrajo RNA total para determinar la expresión del gen SNAT2. Se determinó β -actina como gen estructural para normalizar los resultados de la expresión de SNAT2. Los resultados están expresados como la media \pm SE; n = 5 ratas /grupo. * Diferencia significativa (P < 0.05).

El incremento de RNAm de SNAT2 con glucagon fue similar al observado después del consumo de una dieta alta en proteína. Ya que el glucagon media algunos de sus efectos a través de la vía de señalización del AMPc decidimos probar el efecto que tiene la forskolina (10 μ M), el cual es un inductor de AMPc, sobre la expresión del gen SNAT2 en cultivo primario de hepatocitos de rata. Se encontró que la forskolina también fue capaz de incrementar al doble la abundancia de RNAm de SNAT2 (**Figura 5B**). Estos resultados en conjunto apoyan la hipótesis de que el glucagon, a través del AMPc, regula la transcripción del gen SNAT2.

8.3 Sitio de inicio de la transcripción del gen SNAT2 de rata

Para estudiar el papel que tiene el AMPc en la regulación de la expresión del gen SNAT2 fue necesario analizar la región 5' no traducida (UTR) del mismo. La secuencia a analizar se obtuvo de la base de datos de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). La región correspondió a las posiciones 2107160-2104360 (2800 nucleótidos en total) del cromosoma 7 de rata (número de acceso: NW_047784.1) la cual incluyó la región 5' no traducida y el primer exón.

8.3.1 Análisis *in silico* de la región promotora

Con la secuencia obtenida de la base de datos de NCBI se llevó a cabo un análisis *in silico* para la predicción de la región promotora utilizando los programas Proscan y Neural Network Promoter prediction. El programa Proscan predijo una región promotora en la secuencia ubicada entre 2105423-2105173. Como se puede observar, el resultado obtenido con este programa es muy robusto pues la región predicha de 250 nucleótidos se localiza entre el inicio de la región 5' UTR y el primer exón.

El programa Neural Network Promoter prediction reportó varias secuencias promotoras más delimitadas (50 nucleótidos de longitud) con diferentes rangos de probabilidad. Este programa, además, reportó el sitio de inicio probable de la

transcripción (el cual se muestra con una letra de mayor tamaño entre la secuencia):

Start	End	Score	Promoter Sequence
2106684	2106634	0.98	AGCACAGATTTATAAAGTTGGGACACCCCAAAGTTTAGAA A ACAGAACTG
2106599	2106549	0.98	AAGGGAGGCTGAAAAAAGGGCGTTCCTGGTTCTTAAATCT A AAGCGACAG
2105370	2105320	0.99	CTCCAGGCCGCTATAACTCGCGCTCCGGAGGCAGCTCCACACCGCCAC
2105161	2105111	0.98	TAATTTAAAAAAGAAAGGAAAAAAGGGGGGGGGACTCC G ACCACACTT
2105152	2105102	1.00	AAAGAAAGGAAAAAAGGGGGGGGGACTCCGACCACACT T ATTTTTGCC
2104710	2104660	1.00	GTGTGCCCTGTAAACAAGCCCCGGCTGGGGCGGGGGGAC C GGGCTCGGC
2104539	2104489	0.98	TGGCGGGGATGAATCAGCCGCGCTGCGCCGCCCGGGCGGC G TCACGTGGT

8.3.2 Determinación del sitio de inicio de transcripción

Con base en los resultados obtenidos *in silico* procedimos a determinar experimentalmente el sitio de inicio de transcripción del gen SNAT2 por medio de la técnica de “primer extension”. El ensayo se realizó utilizando RNA total de rata y un oligonucleótido anti-sentido localizado en el primer exón. Como puede observarse en la **Figura 6A**, detectamos tres bandas, indicando la presencia de múltiples sitios de inicio. Una banda superior de aproximadamente 46 nucleótidos y otras dos bandas de menor tamaño que pueden ser posibles dímeros del oligonucleótido. El mismo patrón de bandeo se obtuvo utilizando RNA poli(A⁺) lo cual nos confirma la reproducibilidad del resultado y que no se debe a una posible degradación de la muestra de RNA total. La secuenciación de los productos, utilizando el mismo oligonucleótido, determinó que el sitio de inicio de transcripción corresponde a una **C** que se localiza a 968 nucleótidos río arriba del codón del inicio de la traducción (ATG).

La técnica de “primer extension” es un método común para determinar el sitio de inicio de transcripción de un gen. Sin embargo, una de sus principales desventajas es la obtención de múltiples productos de extensión. Esto se debe a que la transcriptasa reversa se pausa o termina en varios sitios antes de alcanzar el extremo 5’ del RNAm, lo cual, dificulta la determinación del verdadero sitio de

inicio de la transcripción. Debido a esto, se recomienda determinar el sitio de inicio de la transcripción, al menos, por dos técnicas diferentes.

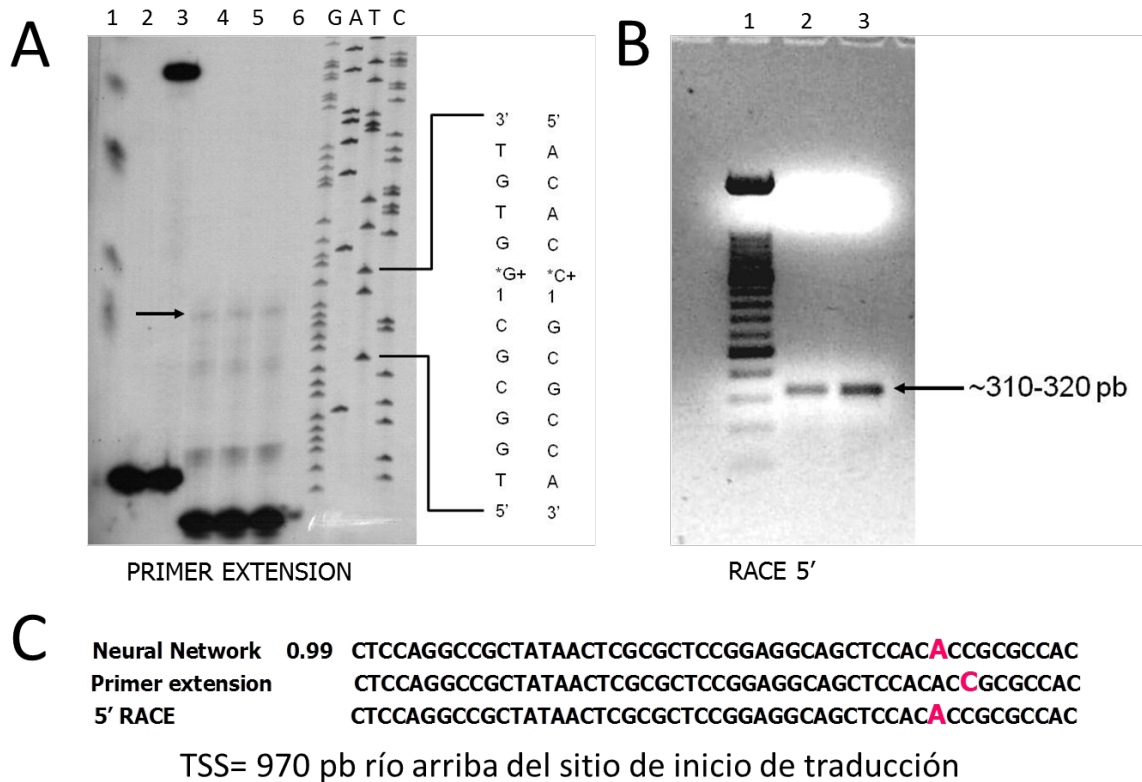


Figura 6. Mapeo del sitio de inicio de transcripción del gen SNAT2 de rata. (A) primer extension. El RNA total o poli(A⁺) de hígado de rata se hibridó con un oligonucleótido marcado con ³²P y se extendió con una transcriptasa reversa. El producto se secuenció en el mismo gel. Línea 1, escalera del marcador de peso molecular; línea 2, control negativo; línea 3, control positivo; línea 4, RNA total; líneas 5 y 6, RNA poli(A⁺). (B) Ensayo 5' RACE utilizando un oligonucleótido específico del gen SNAT2 localizado en la posición +265 del DNAC. Se obtuvo una sola banda de amplificación lo que nos indica que el gen SNAT2 de rata tiene un sitio único de transcripción. Línea 1, escalera del marcador de peso molecular; líneas 2 y 3, muestras de RNA poli(A⁺). (C) Comparación de los sitios de inicio de transcripción obtenidos por las técnicas de primer extension y 5' RACE con el sitio de predicción utilizando el software neural network. Las flechas indican el producto extendido. TSS = sitio de inicio de transcripción.

Para confirmar si el gen SNAT2, efectivamente, tiene tres sitios de inicio de la transcripción se decidió realizar un ensayo de 5' RACE. En este caso se utilizó un oligonucleótido complementario a una secuencia ubicada dentro del primer exón (la secuencia se muestra en el cuadro 3). Con este oligonucleótido se sintetizó el DNA complementario (DNAC) a partir de dos diferentes muestras de RNAm obtenido de rata y posteriormente se amplificó por PCR. El producto amplificado se analizó en un gel de agarosa al 1.2%. La amplificación por PCR produjo una sola banda de aproximadamente 320 pb demostrando claramente que el gen SNAT2 tiene un único sitio de inicio de transcripción (**Figura 6B**). La secuencia del producto obtenido determinó que el sitio de inicio de transcripción corresponde a una **A** localizada a 970 nucleótidos río arriba del codón del inicio de la traducción. Este resultado coincidió con el sitio de inicio de transcripción predicho por el programa Neural Network (**Figura 6C**).

8.4 Identificación de los sitios potenciales de unión a factores de transcripción

Se realizó el análisis de un fragmento de DNA de aproximadamente 1100 bp con el programa MatInspector de Genomatix que incluyó 1030 bp río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Se encontró la presencia de una caja TATA, algunos sitios potenciales de unión a los factores de transcripción AP-1, AP-2 y SP1/GC box, algunos elementos de respuesta a glucocorticoides y un elemento de respuesta a carbohidratos (ChoRE). Además, se pudieron identificar algunos sitios para diferentes miembros de la familia Krüppel-like factors en esta región y, de forma importante, dos elementos de respuesta a AMPc (CRE) potenciales localizados a -354 y -48 nucleótidos del sitio de inicio de transcripción (**Figura 7**).

-1111	ATGGGGTCT	GCCCTGTCAA	TCACGAACAC	TGGCACAGGC	TGAAGGCACC	CCAAGTCTTA	CGTGCCACGG
-1041	AAATAGCCAG	CGTTACAGAT	TTCCTCAGGA	AAACATTGAA	GGCAAAAAAC	GGTGATCACA	CCCAGCCCTI
-971	TCCTCTCTGC	CCAGCCCAAT	<u>CTCTCCCAGG</u>	<u>TCCCCCAAAG</u>	<u>GAAGAGAGCA</u>	<u>CTAGGTCAA</u>	CTCGTTTGT
			HIF1	ETSF		RAR- α	
-901	TATTCCTCCA	TTCAAGCAGC	ATTTTCTCT	CTCTCGGGG	GTCTTTGTT	AACCCAAAAG	GGAAGGGCCC
-831	TCGCCTTTCC	<u>GGCAGCACCG</u>	<u>AATATTCTAG</u>	<u>TCTCAGGGGC</u>	<u>TCCCCGGGTC</u>	GCCCAGCTCT	GCAAGACCAC
		HSF2,	GRE	NF-kappa B			
-761	AGCTCCACCG	AGGGATCCGG	GCCGCAGAGA	AAGTCCAGG	CCTACATTCC	AACGAGGGCG	CGCGCTCGCT
-691	GGAAGCTGGA	GGAGAGCTA	<u>ACACCAGGGG</u>	<u>TGGGGTGGAG</u>	<u>GCAGGAGGGA</u>	AAGTGTCCGG	CAAGAGGGAA
			GC-box,	KLF-3			
-621	<u>CAGGGCGCCC</u>	<u>CTAGGCGGCC</u>	TCGGAAGGGC	TGGGTCTCCC	ATCCCCGAAC	<u>CCCTTTTAAG</u>	GGCTTGCTGG
	GRE					HMX	
-551	TCCAACGCAA	CCGTCCCTAG	TACGCTGTGA	<u>CACGTGCAAC</u>	CCCAAAGTCT	ATCCCGCCAC	GGAAGTCCGA
			N-Myc,	USF			
-481	<u>GCCGCCCTC</u>	<u>ATTCACCAGG</u>	CTAGTTGTGG	<u>AGAGTGAAAG</u>	CACATCTAGG	TGGAAGATC	GAGAACACAA
	SP-1, KLF6,	AP-1		IRF2			
-411	CCGGGCCCT	CCGGGCAGCG	TGGCAGCGC	<u>GGCTCAAGTT</u>	CTGCGGGAGA	AAAACCTTA	<u>ACGTAATCT</u>
				AP-1			CRE
-341	<u>TAAAGTCGGG</u>	<u>GCTGGGGTG</u>	<u>GTTTGGGGTG</u>	TCTGGGGTG	TAGGGTACCG	<u>CACACACGCC</u>	<u>GGATGTGTC</u>
	Hmx2/Nkx5-2		AML			C-Ets-1(p54)	
-271	CCGAAACGCA	GCGTTGGAGA	CCGCGCTGGG	AGGGAATCTA	AGGAGCTGGC	<u>TCCTTACGGC</u>	AGCCCGGGT
					AP-1		
-201	<u>GGCGGCCACC</u>	<u>CACGGGCTG</u>	<u>CGGTGCCACG</u>	<u>GCAGCCGGAG</u>	<u>CCACGGGAAA</u>	<u>GCGGGTGCG</u>	<u>GCTGGCCCC</u>
	ATF6,	AP-2		MyoD	ChoRE		AP-2
-131	<u>CGACTCGGGG</u>	<u>TGCGGGCAG</u>	<u>CAGCAGGGAG</u>	<u>GCGGAGCCCA</u>	GGTGTGTTG	ATACACAAAG	ACGAACGCC
		Myf5	SP-1,	GC-box			
-61	<u>GCGCCCCGCC</u>	<u>CACTGACCGC</u>	<u>GCTCCAGGCC</u>	<u>GCTATAACTC</u>	<u>GCGCTCCGGA</u>	<u>GGCAGCTCCA</u>	<u>CACCGGCCA</u>
	SP1, Ap-2	CRE/ATF, AP-1		TATA box	C-Ets-1(p54)		+1
+10	CGCCGTCGCC	CGCGCCACCA	CCCCTAGTC	TCTGCTGGAG	GATCGTGACC	GCCATCCCC	GCTTTTTTTT

Figura 7. Secuencia de la región 5' no traducida (nucleótidos de -1111 a +79) del gen SNAT2 de rata. Los números indican la posición del nucleótido relativa al sitio de inicio de transcripción señalado como +1. El análisis con el programa MatInspector predijo sitios de unión a factores de transcripción potenciales cuyas secuencias están subrayadas. Una secuencia homóloga a caja TATA se localiza a 29 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción.

8.5 Predicción de islas CpG

La detección de regiones genómicas con secuencias ricas en el patrón CpG es importante debido a que tales regiones son resistentes a metilación y tienden a asociarse con genes que se encuentran frecuentemente “encendidos”. Estas regiones ricas en el patrón CpG se conocen como islas CpG. La presencia de islas CpG fue analizado con el programa EMBOSS CpGplot (www.ebi.ac.uk). De acuerdo a este programa, una isla CpG es definida como porciones de DNA en la cual el porcentaje promedio de nucleótidos G más C es mayor del 50%, la razón

calculada de CpG observado/esperado es superior a 0.6 y las condiciones se mantienen por un mínimo de 200 bases.

El programa cpghplot reportó las siguientes regiones con posibles islas CpG:

Isla	Región que abarca	Longitud	Frecuencia G+Cs
1	-870 a -643	233	0.63
2	-599 a +58	658	0.66

8.6 Identificación de la región que regula la transcripción del gen SNAT2 de rata

Con base en el análisis *in silico* de los sitios potenciales de unión a factores de transcripción, se procedió a determinar la actividad promotora de la región 5' no traducida del gen de SNAT2 de rata. Con este propósito, 1137 bp de la región genómica conteniendo las primeras 872 bp río arriba del sitio de inicio de la transcripción (fragmento de DNA de mayor longitud -872/+265) fue amplificado e insertado dentro del plásmido reportero de luciferasa pGL3-basic y, a partir de éste, se generaron una serie de construcciones conteniendo las deleciones progresivas unidireccionales 5' (**Figura 8**).

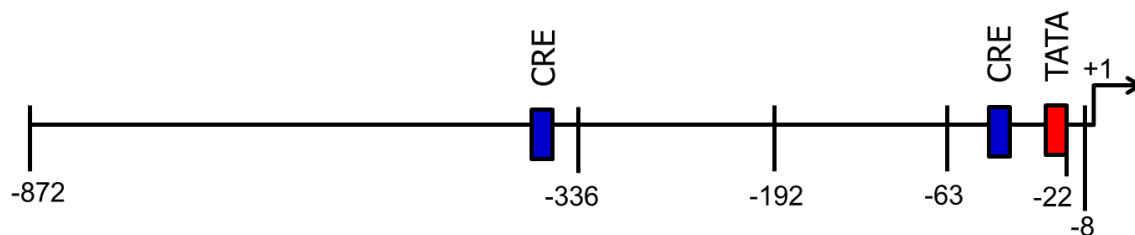


Figura 8. Esquema de la región promotora analizada del gen de SNAT2 de rata. Se señalan los fragmentos de DNA de las construcciones analizadas así como los posibles sitios de unión al factor de transcripción CREB y el sitio homólogo a caja TATA reportados por MatInspector.

Las construcciones se transfectaron en la línea celular HepG2 y se determinaron sus actividades de luciferasa. Como se puede observar en la **Figura 9A**, la construcción con el fragmento de DNA de mayor longitud (-872 a +265) presentó una mayor actividad promotora comparada con el vector vacío pGL3 basic. La remoción de esta región hasta -336 resultó en una reducción del 25% en la actividad promotora. En contraste, la delección a -192 resultó en una significativa disminución de cerca del 86% en la actividad promotora. La remoción a -63 resultó de nuevo en una disminución de la actividad promotora, indicando que este fragmento de DNA contiene el “core promoter” ya que no se observó actividad promotora con los fragmentos más pequeños (-22/+265 y -8/+265).

8.7 Identificación de los elementos potenciales de respuesta a AMPc (CRE) funcionales en la región promotora del gen SNAT2

Para identificar los sitios CRE funcionales, se incubaron células HepG2 transfectadas transitoriamente con las diferentes construcciones generadas del gen SNAT2, en presencia de forskolina a una concentración de 10 μ M.

Como se puede observar en la **Figura 9B**, este inductor de la adenilato ciclasa incrementó la actividad promotora casi al 100%, aunque no se observó diferencia significativa entre las construcciones que contenían los fragmentos de -872/+265 y el de -336/+265.

Interesantemente, a pesar del hecho de que el fragmento de DNA -63/+265 presentó una reducción substancial en la actividad promotora basal, la forskolina aún fue capaz de incrementar la actividad en un 76% ($p < 0.05$). Estos datos sugieren que el sitio CRE localizado a -48 bp con respecto al sitio de inicio de la transcripción es indispensable para mediar los efectos del AMPc sobre el promotor del gen SNAT2 (**Figura 9B**).

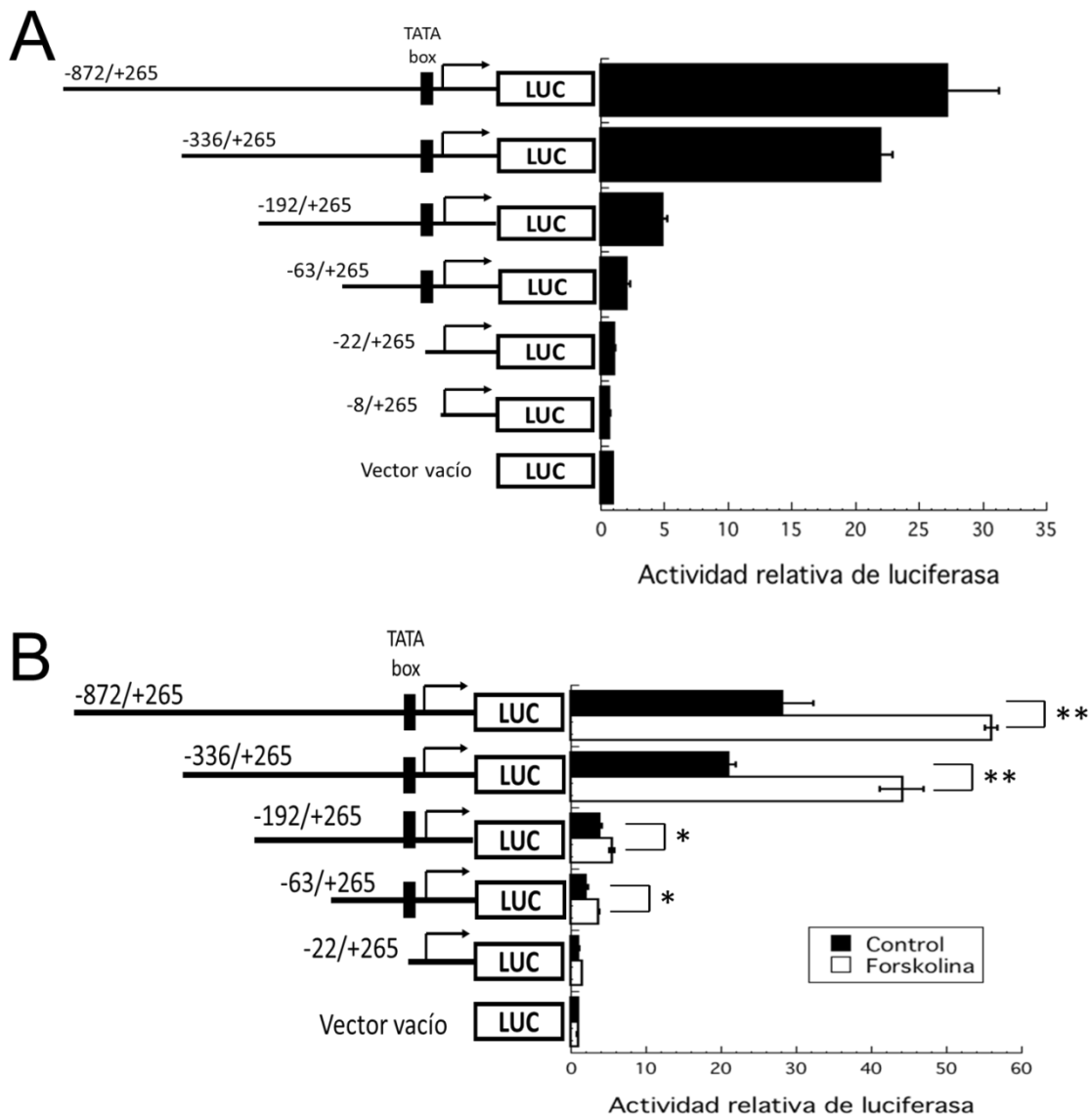


Figura 9. Análisis funcional de la región promotora del gen SNAT2 de rata. Fragmentos de DNA de diferentes tamaños de la región 5' del gen SNAT2 de rata se clonaron en el vector reportero de luciferasa (LUC) pGL3 basic y se transflectaron en células HepG2. (A) Actividad promotora basal del gen SNAT2. (B) efecto de forskolina (10 μ M) sobre la actividad promotora de SNAT2. Las células HepG2 se cotransfectaron con cada una de las construcciones reporteras y pRL-TK (plásmido de renilla) e incubadas en presencia o ausencia de forskolina. La actividad de luciferasa se determinó 48 horas después de la transfección y se normalizó con renilla. Los resultados representan la media \pm SE de tres experimentos independientes por cada construcción. *P < 0.05, **P < 0.01 vs el control respectivo.

Por otra parte, la remoción del fragmento de DNA de -336/+265 a -192/+265 bp redujo significativamente la actividad promotora basal, sugiriendo la presencia de un sitio regulador positivo en esta región, sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar los elementos involucrados en esta respuesta.

8.8 Mutagénesis de sitio dirigido de los sitios CRE de la región promotora del gen SNAT2 de rata

Para comprobar la hipótesis de que el sitio CRE localizado a -48 bp media los efectos de AMPc sobre la regulación del promotor del gen SNAT2, se llevó a cabo una mutación de sitio dirigido en los dos sitios CRE localizados a -354 y -48 bp con respecto al sitio de inicio de la transcripción (**Figura 10A**). Los resultados claramente demostraron que la mutación del sitio CRE a -354 bp no tuvo ningún efecto sobre la respuesta a forskolina, sin embargo, la mutación del sitio CRE localizado a -48 bp dramáticamente redujo la respuesta a forskolina, apoyando la evidencia de que este sitio de unión es fundamental para la regulación de la expresión del gen SNAT2 por AMPc (**Figura 10B**). La mutación de ambos sitios no tuvo un efecto sinérgico en la reducción de la respuesta a forskolina indicando que el sitio CRE a -48 bp es el sitio que media la regulación por AMPc (**Figura 10B**).

8.9 Unión de CREB al sitio CRE localizado a -48 bp en la región promotora del gen SNAT2 *in vitro*

Debido a que se conoce que la activación de la vía de señalización de AMPc involucra la activación del factor de transcripción llamado proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), se llevó a cabo un ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA) para determinar si los sitios CRE de la región promotora del gen SNAT2 son capaces de unir a CREB.

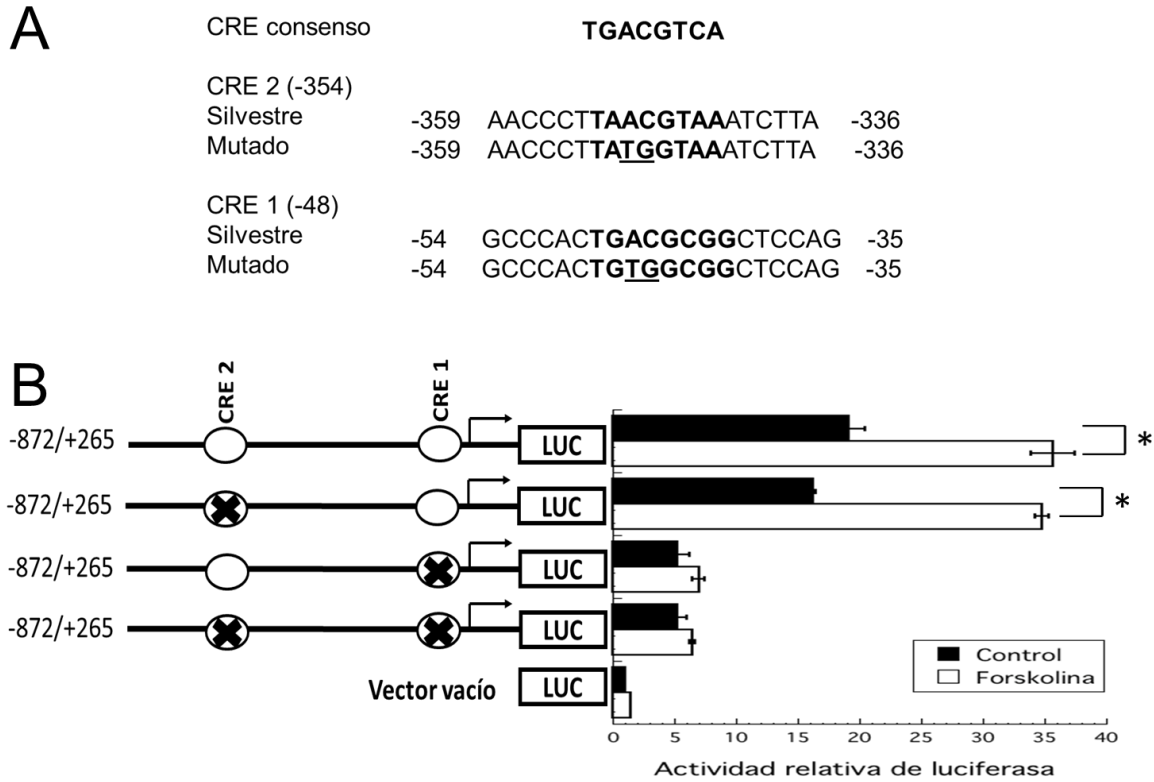


Figura 10. Análisis de mutación dirigida de los sitios potenciales CRE en la región promotora de SNAT2 de rata. (A) Secuencias de oligonucleótidos que contienen los sitios potenciales CRE silvestres o mutados en el gen SNAT2. (B) Actividad de luciferasa de las construcciones con los sitios CRE -48 y/o -354 mutados. Las células HepG2 se transfectaron con un plásmido reportero de luciferasa conteniendo los sitios CRE silvestre o mutados e incubados en presencia o ausencia de forskolina (10 μ M). La actividad de luciferasa se determinó 48 horas después de la transfección y se normalizó con renilla. Los resultados representan la media \pm SE de tres experimentos independientes por cada construcción.

*P < 0.05 vs el control respectivo.

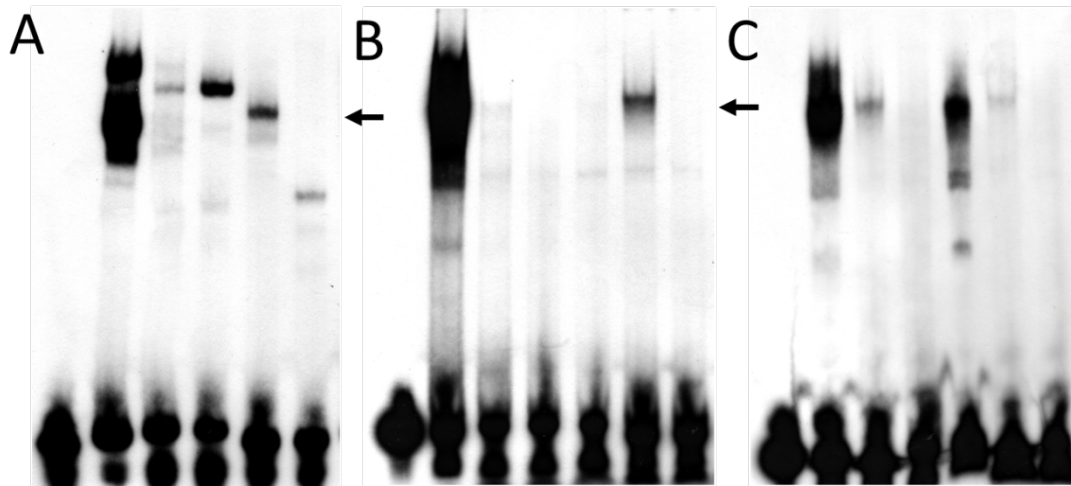
Como se presenta en la **Figura 11A**, ambos sitios CRE -354 y -48 formaron bandas de retardo al incubarlos con extractos nucleares de células HepG2 (líneas 3, 5). Sin embargo, la mutación del sitio CRE -354 (línea 4) incrementó la formación del complejo indicando una unión inespecífica. Mientras que, la mutación del sitio CRE -48 (línea 6) suprimió completamente la formación del complejo sugiriendo que este sitio une CREB.

Para comprobar la especificidad de la unión de CREB al sitio CRE -48 realizamos un ensayo competitivo con un exceso molar (200 veces) de la secuencia CRE consenso no radiactivo. Como se observa en la **Figura 11B**, la especificidad de la unión al sitio CRE -48 se confirmó por la desaparición del complejo de retardo al incubar con un exceso de la secuencia CRE consenso sin marcar (líneas 6, 7). Como control positivo se utilizó la secuencia CRE consenso descrita por Roesler WJ (79) (línea 2), la cual presentó una banda de retardo demasiado intensa que fue competitivamente inhibida por la adición de un exceso de CRE consenso sin marcar (línea 3).

Para identificar si CREB se une al sitio CRE en la región promotora del gen SNAT2, se realizó un ensayo de super-retardo utilizando un anticuerpo específico anti-CREB1. La **Figura 11C** claramente demuestra que la pre-incubación con el anticuerpo disminuyó la intensidad de la banda de retardo para el sitio CRE -48 (línea 6), en forma similar a la secuencia CRE consenso (línea 5), indicando que efectivamente CREB se une específicamente a esta secuencia.

8.10 Unión de CREB al sitio CRE -48 del gen SNAT2 en células HepG2

Para confirmar si CREB se une al sitio CRE -48 de la región promotora del gen SNAT2, un cultivo primario de hepatocitos de rata se estimuló con forskolina y posteriormente se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) a diferentes tiempos.



	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6	7		1	2	3	4	5	6	7	
Sonda libre	+	-	-	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-	-
CRE cons	-	+	-	-	-	-		-	+	+	-	-	-	-		-	+	-	-	+	-	-	-
CRE 354	-	-	+	-	-	-		-	-	-	+	+	-	-		-	-	-	+	-	-	-	-
CRE354m	-	-	-	+	-	-		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
CRE 48	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	-	+	+		-	-	+	-	-	-	+	-
CRE 48m	-	-	-	-	-	+		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-CREB	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	+	+	+
Competidor específico	-	-	-	-	-	-		-	-	+	-	+	-	+		-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 11. Unión del factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP) a los motivos CRE de la región promotora de SNAT2 *in vitro*. Los extractos nucleares de células HepG2 se incubaron con oligonucleótidos de DNA de doble hebra conteniendo la secuencia CRE consenso (CRE cons) o los sitios CRE de SNAT2 -48 (CRE 48) y -354 (CRE 354) marcados con ³²P. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se describen en el Cuadro 3. (A) Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA) para el sitio CRE consenso (línea 2), los sitios CRE 354 y CRE 48 silvestres (líneas 3 y 5) y los sitios CRE 354 y CRE 48 mutados (CRE354m y CRE 48m) (líneas 4 y 6). (B) EMSA competitivo. Los extractos nucleares de células HepG2 se incubaron con los oligonucleótidos CRE consenso, CRE 354 y CRE 48 en presencia de un exceso de la secuencia CRE consenso no marcada (líneas 3, 5 y 7, respectivamente). (C) Ensayo de super-retardo. Los extractos nucleares de células HepG2 se pre-incubaron en presencia o ausencia de 1 µg de anticuerpo específico anti-CREB1 y posteriormente se adicionaron las sondas marcadas con las secuencias CRE consenso (líneas 2 y 5), el sitio CRE 48 (líneas 3 y 6) y el sitio CRE 354 (líneas 4 y 7). La línea 1 de cada panel representa la sonda libre como control negativo. Las reacciones de unión se separaron en geles de poliacrilamida no desnaturizantes al 4%.

Una pequeña señal se obtuvo a los tiempos 0 y 30 minutos, indicando una unión basal de CREB al sitio CRE -48 (**Figura 12A**). Interesantemente, se observó una intensa amplificación de la señal después de 60 minutos de incubación con forskolina la cual se mantuvo hasta los 120 minutos de incubación (**Figura 12A, B**). Estos datos demuestran claramente que CREB reconoció y se unió activamente al sitio CRE -48 del gen SNAT2, apoyando la evidencia del papel de CREB como un inductor de la expresión del gen SNAT2 estimulado por AMPc. No se observó amplificación con el DNA recuperado con IgG.

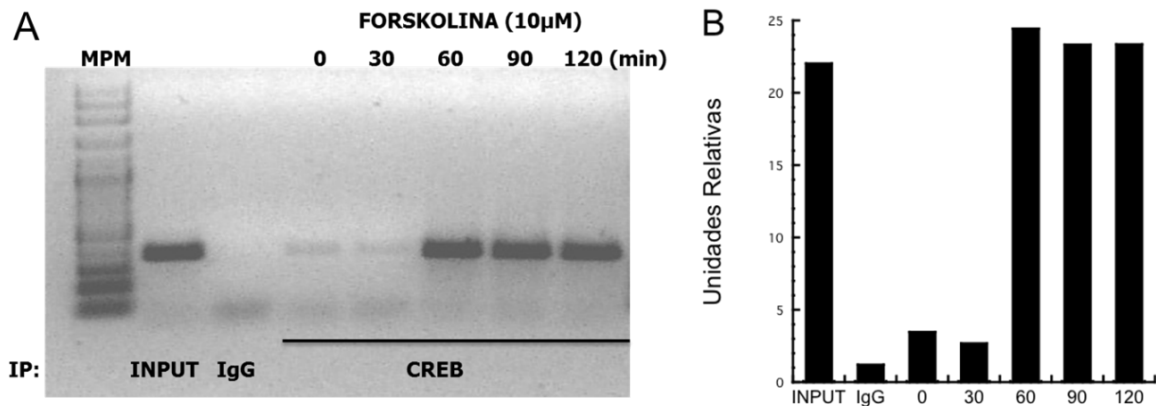


Figura 12. Unión de CREB al sitio CRE -48 del promotor del gen SNAT2 *in vivo*. (A) Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando cultivos primarios de hepatocitos de rata incubados en ausencia o presencia de forskolina (10µM) durante 30, 60, 90 o 120 minutos. Posteriormente, la cromatina soluble se inmunoprecipitó con 4 µg de anticuerpo específico anti-CREB1 y se analizó por PCR con un par de oligonucleótidos específicos para el sitio CRE -48 (ver secuencia en el Cuadro 2). (B) Análisis de densitometría de los productos amplificados en forma gráfica. Esta figura es representativa de tres experimentos independientes.

8.11 Efecto del dominante negativo de CREB sobre la actividad promotora de SNAT2

Con la finalidad de demostrar nuevamente si CREB está involucrado en la regulación transcripcional del gen SNAT2, se estudió si la inhibición de CREB reduciría la actividad promotora de SNAT2 en células HepG2. Como se esperaba, la forskolina incrementó 100% la actividad promotora de la construcción SNAT2-Luc de mayor longitud (-872/+265) con respecto a las células no estimuladas (control). La adición de un dominante negativo dn-CREB-133 o dn-KCREB disminuyó significativamente la estimulación de forskolina en comparación con las células que solo contenían la construcción SNAT2-Luc, indicando que CREB se necesita para estimular la transcripción del gen SNAT2 vía AMPc (**Figura 13**).

8.12 El sitio CRE -48 se encuentra conservado en las secuencias genómicas de diferentes especies

Para identificar si el sitio CRE -48 en la región promotora del gen SNAT2 de rata también se encuentra presente en otras especies, se realizó un alineamiento de las secuencias genómicas de los genes SNAT2 de ratón y de humano con la de rata. Se identificaron dos sitios conservados en la región promotora proximal de SNAT2, una caja TATA (nucleótidos de -29 a -24) y el motivo CRE (nucleótidos de -48 a -41). En cada una de las secuencias de las tres especies, el motivo CRE corresponde a la mitad de la secuencia (half site motif, TGAC) del palíndromo de la secuencia CRE completa (80) (**Figura 14**). Estos resultados sugieren que la regulación del gen SNAT2 por CREB es un mecanismo conservado entre especies.

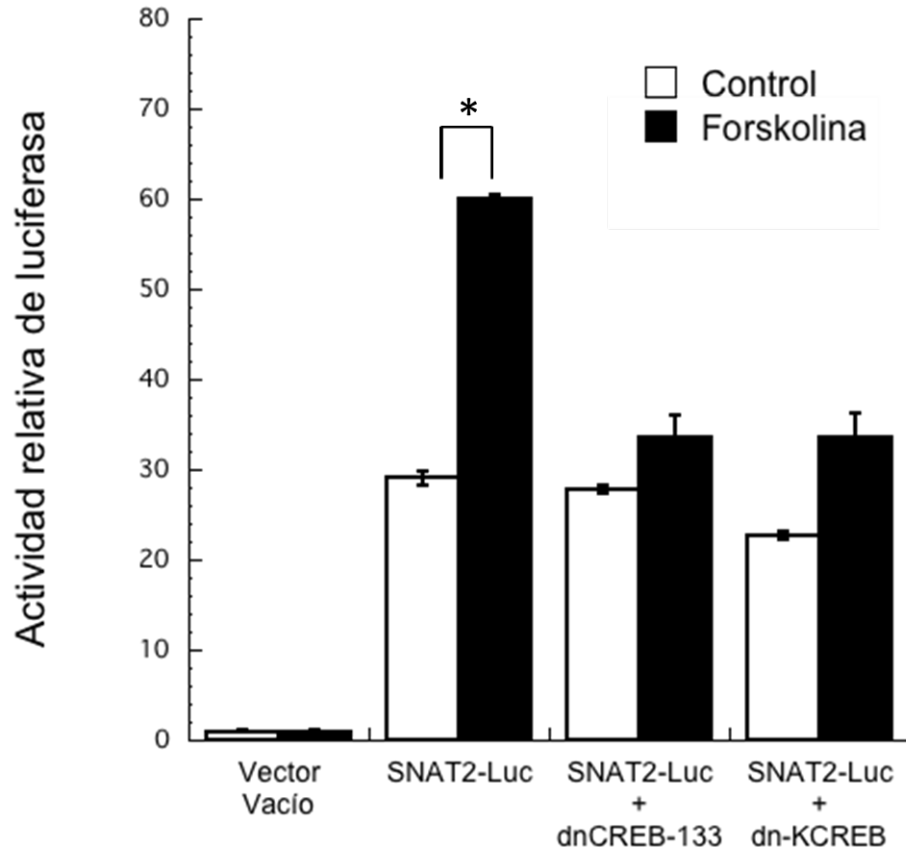


Figura 13. Efecto de la expresión de dominantes negativos CREB (dn-CREB) sobre la actividad promotora basal e inducida por forskolina del gen SNAT2. Las células HepG2 se cotransfectaron con dn-CREB133 o dn-KCREB y la construcción SNAT2-LUC de mayor longitud (-872/+265). 48 horas después de la transfección las células se trataron con forskolina (10 μ M) por 4 horas. Se determinó la actividad de luciferasa. Ambos mutantes CREB bloquearon el efecto estimulador de la forskolina sobre la actividad promotora del gen SNAT2. Los resultados están expresados como la media \pm SE; n = 3 experimentos independientes. *P < 0.05 vs el control respectivo.

```

Mus musculus      CCCAGGTGCTGTTGATACACAAAGG-----CGAACGCCCGCG-CCC
Rattus norvegicus CCCAGGTGCTGTTGATACACAAAGA-----CGAACGCCCGCG-CCC
Homo sapiens      CCCAGGTGGTGTGTTGATACACAAAGAGAAGGCGCCCGGGCGGCCGCGGTCC
*****  *****
                CRE 48                TATA box

Mus musculus      CGCCCAGTGACGCGGCCGCCCG---CCGCTTATAACTCGC-GCTCGGGAAG
Rattus norvegicus CGCCCAGTGACGCGGCTCCAGG---CCGCTTATAACTCGC-GCTCCGGAGG
Homo sapiens      CGCCCAGTGACGCGTTCCCCGGGGTGCCGCTATAACCCGCCGCTCGCAGGG
*****          *  *  *  *****  ***  ****  *

                +1

Mus musculus      CTGCTCCACA-CCGCGCCACGCCGTCGCCCGCGCCGCTACCCCTCAATCT
Rattus norvegicus CAGCTCCACA-CCGCGCCACGCCGTCGCCCGCGCCACCACCCCTTAGTCT
Homo sapiens      CTGCTCCACAGCCGCGGACGCCGCCGCTTAG--AACGCCCTTCCAGTA
*  *****  *****  *****  ****  *  **  *

```

Figura 14. Alineamiento de las secuencias del gen SNAT2 de tres especies diferentes. Se realizó un análisis de alineamiento de la región promotora del gen SNAT2 de rata, ratón y humano utilizando el programa ClustalW. Las regiones para la caja TATA y el sitio CRE 48 altamente conservadas en las tres especies se presentan en las áreas color gris.

9. DISCUSIÓN

SNAT2 es un transportador de aminoácidos que juega un papel fundamental en la formación de la poza intracelular de aminoácidos (19). Por lo tanto, la comprensión de los diferentes mecanismos que regulan la transcripción de este transportador puede proporcionar indicios acerca de cómo SNAT2 mantiene la homeostasis celular bajo diferentes condiciones fisiológicas. Los resultados claramente demostraron que el consumo de una dieta alta en proteína incrementó la expresión de SNAT2 en ratas, sugiriendo que este transportador juega un papel importante en proveer los aminoácidos a las vías oxidativas para su degradación, permitiendo a la célula remover el exceso de aminoácidos proporcionados por la dieta. Además, se ha demostrado que SNAT2 puede jugar un papel en sensar y transportar los aminoácidos proporcionados por la dieta y, por lo tanto, activar algunas vías de señalización con la finalidad de mantener la homeostasis celular (6, 7, 73). Así, un incremento en la expresión del gen SNAT2 por el consumo de una dieta alta en proteína puede amplificar todas estas respuestas.

Los resultados también demostraron que el consumo de una dieta alta en proteína incrementa la concentración de glucagon en suero a la par del incremento en la abundancia relativa del RNAm de SNAT2. Este resultado concuerda con estudios previos realizados en ratas donde se demostró que la ingestión de una dieta alta en proteína induce un incremento en la secreción de glucagon (81, 82).

A diferencia de la glucosa, la cual inhibe la secreción de glucagon y estimula la liberación de insulina, los aminoácidos estimulan la liberación de ambas hormonas y, en general, son estimuladores más efectivos de la secreción de glucagon que de insulina (83, 84). Diversos estudios demuestran que cada aminoácido individual difiere en su capacidad para estimular la secreción de glucagon, sin embargo, la arginina parece ser el estimulador más potente (85, 86). Además, bajo condiciones fisiológicas, los aminoácidos juegan un papel importante en el control de la liberación de glucagon y generalmente tienen poco efecto en la liberación de la

insulina. Sin embargo, la presencia de glucosa aumenta la respuesta de la insulina a los aminoácidos y disminuye la respuesta del glucagon, lo que sugiere que los aminoácidos en conjunto con la glucosa tienen un papel importante en la liberación diferencial de ambas hormonas.

Asimismo, se observó que la inyección intraperitoneal de glucagon también incrementa la abundancia relativa del RNAm de SNAT2. Debido a que los efectos de glucagon están mediados por la activación de la proteína efectora adenilato ciclasa, lo que resulta en un incremento de AMPc intracelular, se decidió probar el efecto que tiene la forskolina, un activador directo de la adenilato ciclasa, sobre la expresión del gen SNAT2.

Se observó que la incubación de células hepáticas con forskolina, también estimuló la expresión del gen SNAT2. Estos resultados sugieren que el incremento en la expresión de SNAT2 es mediado por AMPc. Para confirmar esta hipótesis, procedimos a estudiar la región promotora del gen SNAT2 de rata con el objetivo de encontrar elementos de respuesta potenciales activados por AMPc.

El análisis bioinformático de la región promotora del gen SNAT2 reportó la presencia de dos regiones con características de islas CG. Las islas CG son regiones de DNA genómico en las cuales la frecuencia de la secuencia CG es mayor que en cualquier otra región. También se les denomina islas CpG, donde “p” simplemente indica que la C y la G se encuentran unidas por un enlace fosfodiéster. Aproximadamente el 70% de todos los promotores de genes en los vertebrados están asociados con una isla CG incluyendo a casi todos los genes constitutivos, una proporción de genes tejido-específico y genes que regulan el desarrollo. Estas regiones tienen un papel importante en la regulación transcripcional a través de su metilación. En los genes “activos” la secuencia CG no se encuentra metilada. Por contraste, la secuencia CG en genes “inactivos” usualmente se encuentra metilada para suprimir su expresión (87).

La presencia de dos islas CG en la región promotora del gen SNAT2 posiblemente indica que el gen tiene una alta transcripción, sin embargo, el efecto que tienen sobre la regulación transcripcional de este gen va más allá de los objetivos del presente estudio.

Los primeros estudios sugirieron que los promotores con islas GC carecen de cajas TATA y exhiben sitios de inicio de la transcripción heterogéneo (88). En general las cajas TATA, junto con otros elementos de la región “core” del promotor tales como el BRE, el DPE y el DCE, tienden a estar asociados con sitios de inicio transcripcional enfocados, mientras que las islas GC tienden a carecer de estos elementos y exhiben sitios de inicio transcripcional dispersos. Existen, sin embargo, excepciones a esta generalización. Los genes humanos para α -globina, MyoD1 y eritropoyetina, por ejemplo, tienen promotores con islas CG y poseen cajas TATA. Al parecer, el gen SNAT2 sería parte de estas excepciones ya que el análisis *in silico* indica la presencia de una secuencia con homología a caja TATA.

Mapear de manera precisa el sitio de inicio de transcripción es extremadamente importante para el análisis de la región promotora (89). El punto de partida para estudiar la regulación transcripcional de un gen es la identificación del sitio de inicio de transcripción y región promotora del gen para posteriormente caracterizar los elementos “cis-acting” importantes en dicha regulación. Con este propósito, se mapeó el sitio de inicio de la transcripción del gen SNAT2 de la rata por dos técnicas diferentes: “primer extension” y 5' RACE.

Con la técnica de “primer extension” se obtuvieron múltiples productos de amplificación lo cual pudo deberse a las limitaciones de la técnica. Aunque el método “primer extension” es comúnmente utilizado para mapear el sitio de inicio de transcripción debido a la sencillez del ensayo, tiene la gran desventaja de que la transcriptasa reversa se pausa o detiene en varios sitios antes de alcanzar el extremo 5' del RNAm (90). Este aspecto resulta en la obtención de múltiples productos de extensión lo cual dificulta la determinación del verdadero sitio de

inicio de transcripción. Por este motivo, se definieron los resultados utilizando el método RACE 5'.

Con la técnica de RACE 5' se encontró que el gen SNAT2 tiene un sitio único de inicio de la transcripción localizado a 970 bp río arriba del codón ATG del inicio de la traducción.

Mediante el análisis *in silico* se determinó un sitio con secuencia homóloga a la caja TATA localizada a -29 bp del sitio de inicio de la transcripción. Además, por medio de este análisis se encontraron dos sitios potenciales CRE localizados a -354 bp y -48 bp aunque ninguno de los dos contenía la secuencia CRE consenso canónica (TGACGTCA) (91). Sin embargo, se ha demostrado que la regulación diferencial de genes blanco por AMPc a través de CREB se realiza a través de variantes en la composición de la secuencia y en la localización del sitio CRE entre el promotor. Se conoce, que la mitad de la secuencia del motivo CRE (TGAC) es suficiente para promover la transcripción de genes blanco, aunque puede ser menos activo que la secuencia palindrómica completa (92). Además, se ha encontrado que los sitios con la mitad del motivo CRE también pueden unir a otros factores de transcripción como AP-1, ATF o heterodímeros de CREB con c-Fos o c-Jun, lo que permite una intercomunicación entre CREB y otros factores de transcripción. Esta intercomunicación podría mediar el ajuste fino de los eventos reguladores (93) involucrados en la transcripción del gen SNAT2 como respuesta ante diferentes estímulos.

Se ha demostrado que la presencia de más de un sitio CRE en el promotor de un gen puede potenciar sinérgicamente la expresión de dicho gen activado por CREB (94-96). Sin embargo, este no fue el caso para el gen de SNAT2, ya que el sitio CRE localizado a -354 bp no fue funcional de acuerdo a los ensayos de genes reporteros y el EMSA. Interesantemente, se estableció claramente la presencia de un elemento de respuesta a AMPc funcional localizado a -48 bp del sitio de inicio de transcripción.

Este elemento de respuesta se encuentra dentro de la región “core” del promotor y su mutación significativamente disminuyó no solo la actividad promotora inducida por AMPc sino también la actividad promotora basal, indicando su papel central en la regulación de la transcripción del gen SNAT2. Este resultado coincide con estudios previos en los que se demuestra que CREB media la transcripción basal y la inducida por PKA a través de dos dominios independientes; el dominio de activación constitutiva rico en Gln (Q2) y el dominio inducido por cinasa (KID). El dominio Q2 promueve la transcripción de genes blanco a través de la interacción con los factores asociados a la proteína de unión a la caja TATA (TAFs); uno de los cuales es TAFII 130 el cual es un componente del complejo TFIID (91, 97, 98).

La localización del sitio CRE en el gen SNAT2 también coincide con estudios previos realizados en células de origen humano y de rata que reportaron que la mayoría de los sitios CRE se localizan adyacentes al sitio de inicio de la transcripción y contienen cajas TATA río abajo cercanas (99, 100). Los sitios CRE se vuelven más débiles cuanto más alejado se encuentren río arriba de la caja TATA (91). Asimismo, se ha descrito que la presencia de cajas TATA canónicas son un requerimiento para la inducción transcripcional por AMPc (101).

En el caso del gen SNAT2, la unión al sitio CRE -48 fue menos intensa que la observada con la secuencia CRE consenso como lo demostró el EMSA. Como se indicó previamente, esto puede deberse a que el sitio CRE -48 contiene solo la mitad del motivo CRE (92, 102), sin embargo, su actividad funcional se demostró claramente a través de los ensayos de genes reporteros y el ChIP.

También se pudo evaluar, a través de este trabajo, la cinética de activación del gen SNAT2 después de la incubación de cultivo de hepatocitos primarios con forskolina. Se observó una recuperación significativa del complejo CRE-CREB, por inmunoprecipitación con un anticuerpo específico anti-CREB, después de 60 minutos de incubación con forskolina efecto que se mantuvo hasta 120 minutos de

incubación. Este resultado coincide con evidencias previas que demuestran que la transcripción de genes celulares usualmente tiene un pico de inducción máxima a los 30 minutos después de la estimulación con AMPc, coincidiendo con el tiempo requerido para que la subunidad catalítica activada de PKA alcance sus máximos niveles en el núcleo, y que la actividad de CREB se atenúa después de 2 a 4 horas (91, 103).

Además, el estudio demostró que la fosforilación de CREB es un evento necesario para inducir la transcripción del gen SNAT2 ya que la sobre-expresión del dominante negativo dn-CREB-133, el cual contiene una mutación en la Ser¹³³, el residuo que es fosforilado por PKA para activar a CREB (91, 104), impidió la actividad promotora estimulada por forskolina. Además, como se observó en los resultados de los análisis del EMSA y ChIP, la unión de CREB a su elemento de respuesta es un requisito para la estimulación de la actividad promotora del gen SNAT2, ya que dn-KCREB, el cual tiene una mutación en el dominio de unión al DNA, también disminuyó la actividad del ensayo de genes reporteros.

El alineamiento de las secuencias del gen SNAT2 de rata, ratón y humano reveló que, aparentemente, el sitio de inicio de transcripción, el sitio con homología a caja TATA y el sitio CRE -48 se encuentran altamente conservados, sugiriendo que el mecanismo de regulación del gen SNAT2 por AMPc es similar en estas especies. De hecho, se ha demostrado en células de rata un incremento en la actividad/expresión de SNAT2 por estimulación con glucagon y activadores o análogos de AMPc (105, 106). Interesantemente, las regiones promotoras de los genes de las enzimas degradadoras de aminoácidos también poseen sitios CRE (107-109), sugiriendo que la activación transcripcional vía AMPc puede sincrónicamente modular el metabolismo de aminoácidos bajo diferentes condiciones metabólicas tales como el ayuno o después del consumo de dietas con un exceso de proteína.

Con base en los resultados obtenidos de este estudio se propone un modelo de regulación de la transcripción del gen SNAT2 por AMPc el cual se muestra en la **Figura 15**.

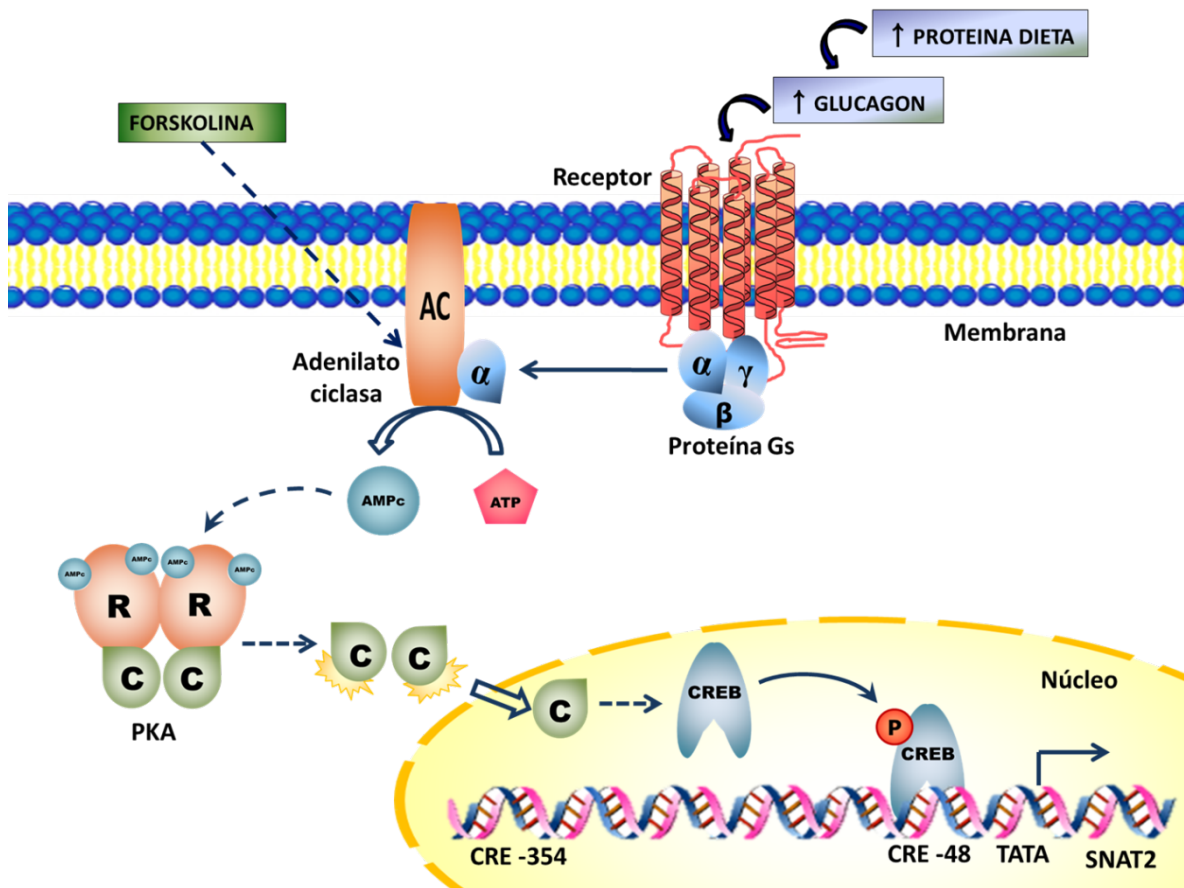


Figura 15. Modelo de la regulación de la expresión del gen SNAT2 mediado por AMPc. La ingestión de una dieta alta en proteína ocasiona un incremento en la concentración de glucagón lo que desemboca en la fosforilación y activación del factor de transcripción CREB el cual se une específicamente al sitio CRE localizado a -48 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de transcripción.

Además del sitio CRE, nosotros también encontramos sitios potenciales de unión para otros factores de transcripción como AP-1, Sp1, GRE (elemento de respuesta a glucocorticoides), ChoRE (elemento de respuesta a carbohidratos) y cajas GC. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para identificar cuáles de estos sitios tienen actividad funcional en la regulación transcripcional del gen SNAT2.

10. CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo que investiga el mecanismo molecular a través del cual AMPc activa la expresión del gen SNAT2. Mientras se ha establecido en estudios previos que el glucagon o análogos de AMPc son capaces de estimular la actividad del sistema A, este trabajo ahora identifica, en la región promotora del gen SNAT2, el elemento de respuesta que lleva a cabo la regulación transcripcional de este transportador de aminoácidos por AMPc.

11. PERSPECTIVAS

El estudio de la región promotora del gen SNAT2 proporciona el medio para conocer y comprender mejor los mecanismos moleculares que regulan su transcripción como respuesta a diferentes estímulos fisiológicos. Por lo tanto, la continuidad del presente estudio es de gran importancia. Resulta de gran interés el estudio de los co-reguladores involucrados en la regulación transcripcional por AMPc. La fosforilación y activación de CREB en su residuo de Ser¹³³ permite el reclutamiento de la proteína de unión a CREB (CBP) o de su parólogo p300 activando la transcripción de genes blancos. Sin embargo, estudios recientes indican que CREB funciona de manera coordinada con una familia de co-activadores citoplásmicos denominados co-activadores transcripcionales regulados por AMPc (CRTC), los cuales son activados a través de desfosforilación. Este requerimiento dual de fosforilación de CREB y desfosforilación del CRTC puede explicar el mecanismo por el cual la interacción entre el activador con su co-activador afín puede proporcionar la regulación fina de la transcripción del gen y poder discriminar entre diferentes estímulos como son las señales de ayuno o de alimentación.

Otro aspecto de gran interés como continuidad del presente estudio sería estudiar la funcionalidad del elemento de respuesta a carbohidratos (ChoRE) potencial reportado en el análisis *in silico*. Se ha demostrado que bajo condiciones fisiológicas, los aminoácidos en conjunto con la glucosa tienen un importante papel en regular la liberación diferencial de las hormonas insulina y glucagón. Una alteración en la regulación de la secreción de ambas hormonas puede tener efectos profundos en la homeostasis del metabolismo. Por lo tanto, resulta interesante estudiar si el sitio ChoRE regula la expresión del gen SNAT2 y su respuesta a diferentes concentraciones de glucosa y aminoácidos.

12. REFERENCIAS

1. Fafournoux P, Bruhat A, Jousse C. Amino acid regulation of gene expression. *Biochem J* 2000; 351: 1-12.
2. Conigrave AD, Hampson DR. Broad-spectrum L-amino acid sensing by class 3 G-protein-coupled receptors. *TRENDS Endocrinol Metab* 2006; 17: 398-407.
3. Bourges H, Torres N, Tovar AR. Proteínas y aminoácidos. En: *Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases fisiológicas. Tomo 2.* Editores: Bourges H, Casanueva E, Rosado JL. Editorial Médica Panamericana. México 2008. pp 103-126.
4. Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signaling in animal cells. *Biochem J* 2003; 373: 1-18.
5. Palacin M, Estevez R, Bertran J, Zorzano A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 1998; 78: 969-1054.
6. Taylor PM. Amino acid transporters: eminences grises of nutrient signaling mechanisms? *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 237-241.
7. Hundal HS, Taylor PM. Amino acid transporters: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E603-E613.
8. Collarini EJ, Ofender DL. Mechanisms of transport of amino acids across membranes. *Annu Rev Nutr* 1987; 7: 75-90.
9. Wolfersberger MG. Uniporters, symporters and antiporters. *J Exp Biol* 1994; 196: 5-6.
10. Guidotti GG, Borghetti AF, Gazzola GC. The regulation of amino acid transport in animal cells. *Biochim Biophys Acta* 1978; 515: 329-366.
11. Kanai Y, Smith CP, Hediger MA. The elusive transporters with a high affinity for glutamate. *TINS* 1993; 16: 365-370.

12. Kilberg MS, Stevens BR, Novak DA. Recent advances in mammalian amino acid transport. *Annu Rev Nutr* 1993; 13: 137-165.
13. Oxender DL, Christense HN. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J Biol Chem* 1963; 238: 3686-3699.
14. Christensen HN, Oxender DL, Liang M, Vatz KA. The use of N-methylation to direct route of mediated transport of amino acids. *J Biol Chem* 1965; 240: 3609-3616.
15. Dall'Asta V, Bussolati O, Guidotti GG, Gazzola GC. Energization of amino acid uptake by system A in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1991; 266: 1591-1596.
16. Geck P, Heinz E. Coupling in secondary transport. Effect of electrical potentials on the kinetics of ion linked cotransport. *Biochim Biophys Acta* 1976; 443:49-63.
17. Kelley DS, Potter VR. Repression, derepression, transinhibition, and trans-stimulation of amino acid transport in rat hepatocytes and four rat hepatoma cell lines in culture. *J Biol Chem* 1979; 254: 6691-6697.
18. Bracy DS, Handlogten ME, Barber EF, Han HP, Kilberg MS. Cis-Inhibition, trans-inhibition, and repression of hepatic amino acid transport mediated by system A. Substrate specificity and other properties. *J Biol Chem* 1986; 261: 1514-1520.
19. Bussolati O, Dall'Asta V, Franchi-Gazzola R, Sala R, Rotoli BM, Visigalli R, Casado J, Lopez-Fontanals M, Pastor-Anglada M and Gazzola GC. The role of system A for neutral amino acid transport in the regulation of cell volume. *Mol Membr Biol* 2001; 18: 27-38.
20. He L, Vasiliou K, Nebert DW. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics* 2009; 3: 195-206.
21. Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2004; 447: 465-468.

22. Fredriksson R, Nordström KJ, Stephansson O, Hägglund MG, Schiöth HB. The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Lett* 2008; 582: 3811-3816.
23. Sugawara M, Nakanishi T, Fei YJ, Huang W, Ganapathy ME, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning of an amino acid transporter with functional characteristics and tissue expression pattern identical to that of system A. *J Biol Chem* 2000; 275: 16473-16477.
24. Yao D, Mackenzie B, Ming H, Varoqui H, Zhu H, Hediger MA and Erickson JD. A novel system A isoform mediating Na⁺/neutral amino acid cotransport. *J Biol Chem* 2000; 275: 22790-22797.
25. Reimer RJ, Chaudhry FA, Gray AT, Edwards RH. Amino acid transport system A resembles system N in sequence but differs in mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 7715-7720.
26. Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2004; 447: 784-795.
27. Sundberg BE, Waag E, Jacobsson JA, Stephansson O, Rumaks J, Svirskis S, Alsiö J, Roman E, Ebendal T, Klusa V, Fredriksson R. The evolutionary history and tissue mapping of amino acid transporters belonging to solute carrier families SLC32, SLC36, and SLC38. *J Mol Neurosci* 2008; 35:179-193.
28. Hägglund MGA, Sreedharan S, Nilsson VCO, Shaik JHA, Almkvist IM, Bäcklin S, Wrangé Ö, Fredriksson R. Identification of SLC38A7 (SNAT7) as a glutamine transporter expressed in neurons. *J Biol Chem* 2011; 286: 20500-20511.
29. Varoqui H, Zhu H, Yao D, Ming H, Erickson JD. Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. *J Biol Chem* 2000; 275: 4049-4054.
30. Chaudhry FA, Schmitz D, Reimer RJ, Larsson P, Gray AT, Nicoll R, Kavanaugh M, Edwards RH. Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system A transporters. *J Neurosci* 2002; 22: 62-72.

31. Sugawara M, Nakanishi T, Fei YJ, Martindale RG, Ganapathy ME, Leibach FH and Ganapathy V. Structure and function of ATA3, a new subtype of amino acid transport system A, primarily expressed in the liver and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1509: 7-13.
32. Desforges M, Lacey HA, Glazier JD, Greenwood SL, Mynett KJ, Speake PF, Sibley CP. SNAT4 isoform of system A amino acid transporter is expressed in human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C305-C312.
33. Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Storm-Mathisen J, Copenhagen DR, Edwards RH. Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 1999; 99: 769-780.
34. Nakanishi T, Kekuda R, Fei YJ, Hatanaka T, Sugawara M, Martindale RG, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V. Cloning and functional characterization of a new subtype of the amino acid transport system N. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C1757-C1768.
35. Cubelos B, Gonzalez-Gonzalez IM, Gimenez C, Zafra F. Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Glia* 2005; 49: 230-244.
36. Hatanaka T, Huang W, Wang H, Sugawara M, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V. Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1467: 1-6.
37. Hatanaka T, Huang W, Martindale RG, Ganapathy V. Differential influence of cAMP on the expression of the three subtypes (ATA1, ATA2, and ATA3) of the amino acid transport system A. *FEBS Lett* 2001; 505: 317-320.
38. Franchi-Gazzola R, Dall'Asta V, Sala R, Visigalli R, Bevilacqua E, Gaccioli F, Gazzola GC, Bussolati O. The role of the neutral amino acid transport SNAT2 in cell volumen regulation. *Acta Physiol* 2006; 187: 273-283.
39. Tramacere M, Petronini PG, Severini A, Borghetti AF. Osmoregulation of amino acid transport activity in cultured fibroblasts. *Exp Cell Res* 1984; 151: 70-79.

40. Soler C, Felipe A, Casado FJ, McGivan JD, Pastor-Anglada M. Hyperosmolarity leads to an increase in derepressed system A activity in the renal epithelial cell line NBL-1. *Biochem J* 1993; 289: 653-658.
41. Chen JG, Klus RL, Steenbergen DK, Kempson SA. Hypertonic upregulation of amino acid transport system A in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1994; 267: C529- C536.
42. Klip A, Mack E, Cragoe EJ Jr, Grinstein S. Regulation of amino acid uptake by phorbol esters and hypertonic solutions in rat thymocytes. *J Cell Physiol* 1986; 127: 244-252.
43. Dall'Asta V, Rossi PA, Bussolati O, Gazzola GC. Regulatory volumen decrease of cultured human fibroblasts involves changes in intracellular amino-acid pool. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1220:139-145.
44. Dall'Asta V, Rossi PA, Bussolati O, Gazzola GC. Response of human fibroblasts to hypertonic stress. Cell shrinkage is counteracted by an enhanced active transport of neutral amino acids. *J Biol Chem* 1994; 269: 10485-10491.
45. Dall'Asta V, Bussolati O, Sala R, Parolari A, Alamanni F, Biglioli P, Gazzola GC. Amino acids are compatible osmolytes for volume recovery after hypertonic shrinkage in vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1999; 276: C865-C872.
46. Gazzola GC, Franchi R, Saibene V, Ronchi P, Guidotti GG. Regulation of amino acid transport in chick embryo heart cells. I. Adaptive system of mediation for neutral amino acids. *Biochim Biophys Acta* 1972; 266: 407-421.
47. Guidotti GG, Gazzola GC, Borghetti AF, Franchi-Gazzola R. Adaptive regulation of amino acid transport across the cell membrane in avian and mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1975; 406: 264-279.
48. Heaton JH, Gelehrter TD. Derepression of amino acid transport by amino acid starvation in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 1977; 252: 2900-2907.

49. Kelley DS, Potter VR. Regulation of amino acid transport systems by amino acid depletion and supplementation in monolayer cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1978; 253: 9009-9017.
50. Gazzola GG, Dall'Asta V, Guidotti GG. Adaptive regulation of amino acid transport in cultured human fibroblasts. Sites and mechanism of action. *J Biol Chem* 1981; 256: 3191-3198.
51. Gelehrter T, McDonald RA. Steroid specificity of the glucocorticoid inhibition of amino acid transport in rat hepatoma cells. *Endocrinology* 1991; 109: 476-482.
52. Russell SB, Russell JD, Trupin JS. Cortisol induction of system A amino acid transport in human fibroblasts from normal dermis and keloid. *J Biol Chem* 1984; 259: 11464-11469.
53. Jones HN, Ashworth CJ, Page KR, McArdle HJ. Cortisol stimulates system A amino acid transport and SNAT2 expression in a human placental cell line (BeWo). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E596-E603.
54. López A, Torres N, Ortiz V, Alemán G, Hernández-Pando R, Tovar AR. Characterization and regulation of the gene expression of amino acid transport system A (SNAT2) in rat mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E1059-E1066.
55. Kilberg MS, Neuhaus OW. Hormonal regulation of hepatic amino acid transport. *J Supramol Struct* 1977; 6: 191-204.
56. Fehlmann M, LeCam A, Freychet P. Insulin and glucagon stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes. Synthesis of a high affinity component of transport. *J Biol Chem* 1979; 254:10431-10437.
57. Kelley DS, Shull JD, Potter VR. Hormonal regulation of amino acid transport and cAMP production in monolayer cultures of rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 1980; 103: 159-168.
58. McGivan JD, Pastor-Anglada M. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem J* 1994; 299: 321-334.
59. Hyde R, Peyrollier K, Hundal HS. Insulin promotes the cell surface recruitment of the SAT2/ATA2 system A amino acid transporter from an

- endosomal compartment in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 2002; 277:13628-13634.
60. Hatanaka T, Hatanaka Y, Tsuchida J, Ganapathy V, Setou M. Amino acid transporter ATA2 is stored at the *trans*-Golgi network and released by insulin stimulus in adipocytes. *J Biol Chem* 2006; 281: 39273-39284.
61. Kashiwagi H, Yamazaki K, Takekuma Y, Ganapathy V, Sugawara M. Regulatory mechanisms of SNAT2, an amino acid transporter, in L6 rat skeletal muscle cells by insulin, osmotic shock and amino acid deprivation. *Amino Acids* 2009; 36: 219-230.
62. Merino E, Jensen RA, Yanofsky C. Evolution of bacterial *trp* operons and their regulation. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11: 78-86.
63. Forsberg H, Ljungdahl PO. Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 2001; 40: 91-109.
64. Gurney AL, Park EA, Liu J, Giralt M, McGrane MM, Patel YM, Crawford DR, Nizielski SE, Savon S, Hanson RW. Metabolic regulation of gene transcription. *J Nutr* 1994; 124: 1533S-1539S.
65. Vaulont S, Vasseur-Cognet M, Kahn A. Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem* 2000; 275: 31555-31558.
66. Towle HC. Glucose and cAMP: adversaries in the regulation of hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 13476-13478.
67. Towle HC. Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 489-494.
68. Towle HC. Metabolic regulation of gene transcription in mammals. *J Biol Chem* 1995; 270: 23235-23238.
69. Girard J, Perdereau D, Foufelle F, Prip-Buus C, Ferré P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J* 1994; 8: 36-42.
70. Kilberg MS, Hutson RG, Laine RO. Amino acid-regulated gene expression in eukaryotic cells. *FASEB J* 1994; 8: 13-19.
71. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids* 2009; 37: 1-17.

72. Averous J, Bruhat A, Mordier S, Fafournoux P. Recent advances in the understanding of amino acid regulation of gene expression. *J Nutr* 2003; 133: 2040S-2045S.
73. Hyde R, Cwiklinski EL, MacAulay K, Taylor PM, Hundal HS. Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transceptor, by amino acid availability. *J Biol Chem* 2007; 282: 19788-19798.
74. López-Fontanals M, Rodríguez-Mulero S, Casado FJ, Dérijard B, Pastor-Anglada M. The osmoregulatory and de amino acid-regulated responses of system A are mediated by different signal transduction pathways. *J Gen Physiol* 2003; 122: 5-16.
75. Farrel, RE Jr. *RNA Methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. Second edition. Academic Press. San Diego, USA. 1998. pp. 67-70.*
76. Strauss WM. *Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons Inc. 1998. 2.2.1-2.2.3*
77. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969; 43: 506-520.
78. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
79. Roesler WJ, Vandenbark GR, Hanson RW. Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem* 1988; 263: 9063-9066.
80. Sloan LS, Schepartz A. Sequence determinants of the intrinsic bend in the cyclic AMP response element. *Biochemistry* 1998; 37: 7113-7118.
81. Eisenstein AB, Strack I, Gallo-Torres H, Georgiadis A, Miller N. Increased glucagon secretion in protein-fed rats: lack of relationship to plasma amino acids. *Am J Physiol* 1979; 236: E20-E27.
82. Eisenstein AB, Strack I. A nonsuppressible increase of glucagon secretion by isolated islets of high-protein-fed rats. *Diabetes* 1976; 25: 51-55.

83. Gerich JE, Charles MA, Grodsky GM. Regulation of pancreatic insulin and glucagon secretion. *Annu Rev Physiol* 1976; 38: 353-388.
84. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. α -Cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocrine Rev* 2007; 28: 84-116.
85. Assan R, Attali JR, Ballerio G, Boillot J, Girard JR. Glucagon secretion induced by natural and artificial amino acids in the perfused rat pancreas. *Diabetes* 1977; 26: 300-307.
86. Eisenstein AB, Strack I. Amino acid stimulation of glucagon secretion by perfused islets of high-protein fed rats. *Diabetes* 1978; 27: 370-376.
87. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987; 196: 261-282
88. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 2011; 25: 1010-1022.
89. Carey M, Smale ST. Transcriptional regulation in eucariyotes. Concepts, strategies and techniques. Transcription initiation site mapping. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2000.
90. Gong B, Ge R. Using the SMART™ cDNA system to map the transcription initiation site. *BioTechniques* 2000; 28: 846-852.
91. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 599-609.
92. Craig JC, Schumacher MA, Mansoor SE, Farrens DL, Brennan RG, Goodman RH. Consensus and variant cAMP-regulated enhancers have distinct CREB-binding properties. *J Biol Chem* 2001; 276: 11719-11728.
93. Manna PR, Stocco DM. Crosstalk of CREB and Fos/Jun on a single cis-element: transcriptional repression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *J Mol Endocrinol* 2007; 39: 261-277.
94. Gottschalk LR, Leiden JM. Identification and functional characterization of the human T-cell receptor beta gene transcriptional enhancer: common nuclear proteins interact with the transcriptional regulatory elements of the T-cell receptor alpha and beta genes. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 5486-5495.

95. Halle JP, Haus-Seuffert P, Woltering C, Stelzer G, Meisterernst M. A conserved tissue-specific structure at a human T-cell receptor beta-chain core promoter. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4220-4229.
96. Lee MR, Chung CS, Liou ML, Wu M, Li WF, Hsueh YP, Lai MZ. Isolation and characterization of nuclear proteins that bind to T cell receptor V beta decamer motif. *J Immunol* 1992; 148: 1906-1912.
97. Felinski EA, Quinn PG. The CREB constitutive activation domain interacts with TATA-binding protein –associated factor 110 (TAF110) through specific hydrophobic residues in one of the three subdomains required for both activation and TAF110 binding. *J Biol Chem* 1999; 274: 11672-11678.
98. Altarejos JY, Montminy M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 141-151.
99. Impey S, McCorkle SR, Cha-Molstad H, Dwyer JM, Yochum GS, Boss JM, McWeeney S, Dunn JJ, Mandel G, Goodman RH. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* 2004; 119: 1041-1054.
100. Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 4459-4464.
101. Conkright MD, Guzmán E, Flechner L, Su AI, Hogenesch JB, Montminy M. Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. *Mol Cell* 2003; 11: 1101-1108.
102. Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH 3rd, Montminy MR. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 1988; 334: 494-498.
103. Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, Karin M, Shenolikar S, Montminy M. Transcriptional attenuation following

- cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 1992; 70: 105-113.
104. Alberts AS, Arias J, Hagiwara M, Montminy MR, Feramisco JR. Recombinant cyclic AMP response element binding protein (CREB) phosphorylated on Ser-133 is transcriptionally active upon its introduction into fibroblast nuclei. *J Biol Chem* 1994; 269: 7623-7630.
 105. Barber EF, Handlogten ME, Kilberg MS. Induction of amino acid transport system A in rat hepatocytes is blocked by tunicamycin. *J Biol Chem* 1983; 258: 11851-11855.
 106. Fafournoux P, Remesy C, Demigne C. Control by amino acids of the activity of system A-mediated amino acid transport in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1985; 231: 315-320.
 107. Alemán G, Ortiz V, Langley E, Tovar AR, Torres N. Regulation by glucagon of the rat histidase gene promoter in cultured rat hepatocytes and human hepatoblastoma cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E172-E179.
 108. Ganss R, Weih F, Schutz G. The cyclic adenosine 3',5'-monophosphate- and the glucocorticoid-dependent enhancers are targets for insulin repression of tyrosine aminotransferase gene transcription. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 895-903.
 109. Su Y, Kanamoto R, Miller DA, Ogawa H, Pitot HC. Regulation of the expression of the serine dehydratase gene in the kidney and liver of the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 892-899.

13. ANEXO

Producción científica generada durante la realización de esta tesis.

- **Ortiz V, Alemán G, Escamilla-Del-Arenal M, Recillas-Targa F, Torres N, Tovar AR.** Promoter characterization and role of CRE in the basal transcription of the rat SNAT2 gene. Am J Physiol Endocrinol Metab 2011; 300: E1092-E1102.

Promoter characterization and role of CRE in the basal transcription of the rat SNAT2 gene

Victor Ortiz, Gabriela Alemán, Martín Escamilla-Del-Arenal, Félix Recillas-Targa, Nimbe Torres and Armando R. Tovar

Am J Physiol Endocrinol Metab 300:E1092-E1102, 2011. First published 8 March 2011;
doi:10.1152/ajpendo.00459.2010

You might find this additional info useful...

This article cites 39 articles, 20 of which can be accessed free at:

<http://ajpendo.physiology.org/content/300/6/E1092.full.html#ref-list-1>

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:

<http://ajpendo.physiology.org/content/300/6/E1092.full.html>

Additional material and information about *AJP - Endocrinology and Metabolism* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpendo>

This information is current as of May 31, 2011.

Promoter characterization and role of CRE in the basal transcription of the rat SNAT2 gene

Victor Ortiz,^{1,2} Gabriela Alemán,¹ Martín Escamilla-Del-Arenal,³ Félix Recillas-Targa,³ Nimbe Torres,¹ and Armando R. Tovar¹

¹Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15; ²Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, and

³Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Submitted 3 August 2010; accepted in final form 7 March 2011

Ortiz V, Alemán G, Escamilla-Del-Arenal M, Recillas-Targa F, Torres N, Tovar AR. Promoter characterization and role of CRE in the basal transcription of the rat SNAT2 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E1092–E1102, 2011. First published March 8, 2011; doi:10.1152/ajpendo.00459.2010.—Small neutral amino acid transporter 2 (SNAT2) is the most abundant and ubiquitous transporter for zwitterionic short-chain amino acids. The activity of this amino acid transporter is stimulated *in vivo* or *in vitro* by glucagon or cAMP analogs. However, it is not known whether the increase in activity at the protein level is due to an increase in SNAT2 gene transcription. Thus, the aim of the present work was to study whether cAMP was able to stimulate SNAT2 gene expression and to localize and characterize the presence of cAMP response elements (CRE) in the promoter that controls the expression of the rat SNAT2 gene. We found that consumption of a high-protein diet that increased serum glucagon concentration or the administration of glucagon or incubation of hepatocytes with forskolin increased the SNAT2 mRNA level. We then isolated the 5' regulatory region of the SNAT2 gene and determined that the transcriptional start site was located 970 bp upstream of the translation start codon. We identified two potential CRE sites located at –354 and –48 bp. Our results, using deletion analysis of the 5' regulatory region of the SNAT2 gene, revealed that the CRE site located at –48 bp was fully responsible for SNAT2 regulation by cAMP. This evidence was strongly supported by mutation of the CRE site and EMSA and ChIP analysis. Alignment of rat, mouse, and human sequences revealed that this CRE site is highly conserved among species, indicating its essential role in the regulation of SNAT2 gene expression.

small neutral amino acid transporter 2; small neutral amino acids; cAMP response element; amino acid transport; gene transcription

THE SYSTEM A AMINO ACID TRANSPORTER is ubiquitous in mammalian cells. This sodium-dependent cotransporter works at the cell membrane to actively internalize small neutral amino acids that are utilized in several metabolic processes. It is now known that there are several isoforms of system A named small neutral amino acid transporter (SNAT)1, SNAT2, and SNAT4, which are distributed in a tissue-specific manner (25). However, SNAT2 is present in most tissues, and it possesses all the classic characteristics of system A (34). SNAT2 expression is upregulated in mammalian cells that are incubated in a medium deprived of amino acids, and it is activated by the transcription

factors activating transcription factor (ATF) and CCAAT/enhancer-binding protein (29). In addition, system A activity is induced by certain hormones such as insulin, glucagon, and glucocorticoids (3–5, 12, 37). Glucagon, which is released during fasting or after the consumption of a high-protein diet, stimulates the activity of system A to a particularly high degree (4, 12). Glucagon binds to a G protein-coupled receptor located in the plasma membrane that transduces signals by increasing cAMP. An increase in cAMP activates protein kinase A (PKA), which in turn phosphorylates its target proteins, including the cAMP response element-binding protein (CREB). Phosphorylated CREB binds to specific sequences located in the promoter regions of its target genes, which results in activation of their transcription (27). In addition, several studies have shown that incubation of cells with cAMP analogs significantly increases the transport activity of system A, an effect that is repressed by the addition of inhibitors of protein synthesis or transcription (20, 36). The increase in system A activity is associated with an increase in the level of SNAT2 mRNA (18).

The upregulation of SNAT2 gene expression is mediated by several different signal transduction pathways. The current evidence shows that SNAT2 gene expression is activated by PKA via cAMP and also by PKC, via MAPK, or even by certain hormones such as estradiol (11, 15, 23). These data suggest that the promoter region of the SNAT2 gene has a complex regulatory mechanism that is largely unknown. Currently, it is known that the increase in the transcription of SNAT2 when cells are incubated in a medium deprived of amino acids is regulated by the presence of an amino acid response element along with a conserved CAAT box (29, 30). However, little is known about other molecular mechanisms involved in the regulation of SNAT2 gene transcription.

An increase in the glucagon concentration in proportion to the increase in dietary protein has been demonstrated in rats (35). The increase in glucagon induces the expression of several amino acid-degrading enzymes via cAMP (2, 33). However, it is not known whether SNAT2 expression is modulated by the amount of dietary protein because the amino acids transported by SNAT2 are substrates of some of the amino acid-degrading enzymes. This will result in a concerted mechanism mediated by cAMP between the activity of SNAT2 and the amino acid-degrading enzymes. Thus, understanding the molecular mechanisms that regulate the promoter region of the SNAT2 gene will give clues as to how this amino acid transporter is controlled under different physiological conditions.

Address for reprint requests and other correspondence: A. R. Tovar, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Depto. Fisiología de la Nutrición, Vasco de Quiroga 15, Mexico City, 14000, D. F. Mexico (e-mail: tovar.ar@gmail.com).

In the present study, we demonstrated that expression of SNAT2 is upregulated by the cAMP pathway. In addition, we identified and partially characterized the promoter region of the SNAT2 gene of the rat. With the use of bioinformatics tools, reporter gene assays, band shift, and chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments, we found that the rat SNAT2 gene is transcriptionally regulated through a proximal regulatory cAMP response element (CRE) located -48 bp upstream of the transcription start site by CREB. Because the amino acids transported by SNAT2 are very important for gluconeogenesis, these results are in agreement with previous studies showing that transcription factors of the ATF/CREB family actively participate in the homeostasis of fuel metabolism.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Switching mechanism at 5' end of RNA template (SMART) rapid amplification of cDNA end (RACE) cDNA amplification kit was purchased from BD Biosciences-Clontech (Palo Alto, CA). Wizard Genomic DNA purification kit, Luciferase Assay Dual System, Primer Extension system-AMV reverse transcriptase, Gel Shift Assay Systems, pRL-TK Renilla expression vector, and pGL3-basic firefly luciferase vector were from Promega (Madison, WI). The dominant negative (dn-CREB) constructs pCMV-CREB133 (dn-CREB133) and pCMV-KCREB (dn-KCREB) were from Clontech. Restriction endonucleases, DNA ligase, the expanded high-fidelity PCR system, the high pure PCR product purification kit, and Complete Mini protease inhibitor cocktail tablets were from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). RPMI 1640, DMEM, and Lipofectamine 2000 transfection reagent were from Invitrogen-GIBCO (Grand Island, NY). QuikChange site-directed mutagenesis kit was from Stratagene (Cedar Creek, TX). CellLytic Nuclear extraction kit and glucagon were from Sigma (St Louis, MO). Sperm DNA/protein A-agarose 50% slurry was from Upstate Biotechnology (Temecula, CA). Anti-CREB antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). All other reagents were of analytical grade.

Animals and Diets

Effect of dietary protein. Ten male Wistar rats weighing 180 g each were divided in two groups and were housed in stainless steel wired cages. Each group received one of the experimental diets containing 20 or 50% dietary protein for 10 days. Composition of the experimental diets is shown in Table 1. At the end of the study, blood was withdrawn to obtain serum, and a liver sample was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C.

Effect of the administration of glucagon. Ten male Wistar rats weighing 180 g had free access to a 10% dietary protein (Table 1) for 5 days. Then, rats were divided in two groups; the experimental group was injected intraperitoneally with glucagon (0.6 mg/100 g body wt) and

the control group with water. After 3 h, livers were removed, and total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). This study was approved by the Animal Care Committee at the Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was extracted from liver according to Chomczynski and Sacchi (8) and pooled. Three hundred nanograms of total RNA was subjected to quantitative real-time PCR using the TaqMan probe and primer sets for rat SNAT2 (Rn00710421_m1) and β -actin (Rn00667869_m1). The ABI PRISM 7000 system was used for the reaction and detection (Applied Biosystems, Foster City, CA). For each 10- μ l TaqMan reaction, 3 μ l of total RNA (100 ng/ μ l) was mixed with 5 μ l of One-Step Master Mix, 0.5 μ l of Multi-Scribe reverse transcriptase, and 1.5 μ l of assay mix containing 200 nM sense and antisense primers and 100 nM TaqMan fluorogenic probe. The PCR scheme used was 48°C for 30 min, 95°C for 10 min, and then 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. β -Actin was used as an invariant control. The relative amounts of all mRNAs were calculated by using the comparative C_T method (User Bulletin no. 2; PE Applied Biosystems).

Serum Glucagon

Serum glucagon was assayed with an RIA kit according to the manufacturer (Linco Research Immunoassays, St. Charles, MO).

Primer Extension

To map the transcription start site of rat SNAT2 gene, a primer extension assay was performed using a primer extension kit according to the manufacturer's instruction. Briefly, an anti-sense primer (see Table 2 for primer sequences) was labeled with [γ -³²P]ATP using T4 polynucleotide kinase. The labeled primer was incubated with 10 μ g of total RNA or 1 μ g of poly(A)⁺ RNA from rat tissue for 20 min at 58°C to anneal the primer and RNA and then extended with AMV reverse transcriptase for 30 min at 42°C. The primer extension product was analyzed on a sequencing gel next to the sequencing reaction product.

RACE

To confirm the transcription start site of the rat SNAT2 gene, a 5'-RACE was performed using a SMART RACE cDNA amplification kit according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 μ g of total RNA extracted from rat tissue was reverse-transcribed with an oligo(dT) anchor primer and a SMART II A oligonucleotide primer to generate RACE-ready cDNA. Then, 5'-RACE was performed with the universal primer provided in the kit and gene-specific primers (Table 2). The final product was analyzed on a 1.2% agarose-EtBr gel and sequenced.

In Silico Sequence Analysis

Human, rat, and mouse genomic DNA sequences were downloaded from the National Center for Biotechnology Information database. The promoter region was predicted by the Neural Network Promoter Prediction program (www.fruitfly.org) and Proscan (www.bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan). Transcription factor binding sites were predicted by the MatInspector program (www.genomatix.de) that uses TRANSFAC matrices (vertebrate matrix; core similarity 1.0 and matrix similarity 0.8). Alignments of the mammalian SNAT2 gene structures were generated by using the program Clustal W. The GeneBank accession numbers for SNAT2 sequences were human, NT_029419.11; mouse, NT_039621.7; and rat, NW_047784.1.

Promoter Cloning and Promoter Deletion Constructs

The rat SNAT2 putative promoter was amplified by polymerase chain reaction (PCR). Genomic DNA was prepared from rat liver

Table 1. Formulation of experimental diets

Ingredient	Protein, g/kg diet(%)		
	10	20	50
Casein (90.8% protein)*	110.1	220.3	550.7
Cornstarch	364.1	309.0	143.8
Dextrose	364.1	309.0	143.8
Soybean oil	100.0	100.0	100.0
Mineral mix†	50	50	50
Vitamin mix (AIN-93-VX)‡	10	10	10
Choline citrate	1.7	1.7	1.7

*"Vitamin-free" casein, Harlan Teklad (Madison, WI) research diets. †Rogers-Harper, Harlan Teklad research diets. ‡AIN-93-VX, Harlan Teklad research diets.

Table 2. *Oligonucleotides used in the study*

Name Construct	Oligonucleotide (5'-3')	Location
<i>Oligonucleotide used in Primer Extension and RACE</i>		
PE reverse	AGC AGA GAC TAA GGG GTG GTG	+25/+45
RACE reverse (GSP)	CGCGGGCTGTCTCGGTACAC	+245/+265
<i>Oligonucleotides used in generation of promoter constructs</i>		
pS-872 forward	TCT CCT CGG GGG TCT TTG TTC	-872/-852
pS-336 forward	CGC GGG CTG GGG GTG GTT	-336/-319
pS-276 forward	TGT CCC CGA AAC GCA GCG TTG	-276/-256
pS-192 forward	CCA CGG GGC TGC GGT GCC A	-192/-176
pS-63 forward	CGG CGC GCC GGC CAC TGA C	-63/-45
pS-22 forward	CGC GCT CCG GAG GCA GCT C	-22/-4
pS-8 forward	AGC TCC ACA CCG CGC CAC GC	-8/+11
pS reverse	CGC GGG CTG TCT CGG TCA CAC	+245/+265
<i>Oligonucleotides used in EMSA experiments</i>		
CRE consensus forward	AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG	
CRE consensus reverse	TCT CTA ACG GAC TGC AGT CTC TCG ATC	
CRE 354 forward	GAA AAA CCC TTA ACG TAA ATC TTA AGT C	-363/-336
CRE 354 reverse	GAC TTA AGA TTT ACG TTA AGG GTT TTT C	-363/-336
CRE 48 forward	GCC CAC TGA CGC GGC TCC AGG CC	-54/-32
CRE 48 reverse	GGC CTG GAG CCG CGT CAG TGG GC	-54/-32
CRE 354m forward	GAA AAA CCC TTA <u>TGG</u> TAA ATC TTA AGT C	-363/-336
CRE 354m reverse	GAC TTA AGA TTT <u>ACC</u> <u>ATA</u> AGG GTT TTT C	-363/-336
CRE 48m forward	GCC CAC <u>TGT</u> <u>GGC</u> GGC TCC AGG CC	-54/-32
CRE 48m reverse	GGC CTG GAG CCG <u>CAG</u> CAG TGG GC	-54/-32
<i>Oligonucleotides used for promoter mutagenesis</i>		
CREm 354 forward	TGC GGG AGA AAA ACC CTT <u>ATG</u> GTA AAT CTT AAG TCG CGG G	-369/-331
CREm 354 reverse	CCC GCG ACT TAA GAT TTA <u>CCA</u> TAA GGG TTT TTC TCC CGC A	-369/-331
CREm 48 forward	CCC CGC CCA CTG <u>TGG</u> CGG CTC CAG GC	-58/-33
CREm 48 reverse	GCC TGG AGC CGC <u>CAC</u> AGT GGG CGG GG	-58/-33

PE, primer extension; GSP, gene-specific primer; RACE, rapid amplification of cDNA end; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; CRE, cAMP response element; CRE 354m and CRE 48m, mutated CRE sites at -354 and -48, respectively. The mutated nucleotides are underlined.

tissue by using Wizard Genomic DNA purification kit and used as a template. The full-length reporter gene construct (-872/+265) and all deletion constructs for promoter characterization were generated by PCR amplification using primers containing a *Bg*III restriction enzyme site (Table 2). Specific primers were designed based on sequence analysis of the 5'-untranslated region and the first exon. PCR reactions were performed using the expanded high-fidelity PCR system as follows: 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were purified with the high pure PCR product purification kit, digested with *Bg*III, and cloned into the pGL3-basic firefly luciferase vector. The sequences of cloned promoter regions were confirmed by sequencing (CEQ 8800; Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Cell culture, Transient Transfection, and Luciferase Reporter Assays

HepG2 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 8% fetal bovine serum, L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml) at 37°C in a 5% CO₂ incubator. HepG2 cells (150,000 cells/well) were plated in 12-well plates 24 h before transfection. Cells were transfected at 80% confluence using Lipofectamine 2000 transfection reagent according to the manufacturer's manual. Briefly, 0.25 µg of each luciferase reporter gene construct was cotransfected with 0.01 µg of pRL-TK Renilla expression vector (Promega), which was used as an internal control to normalize the transfection efficiency. The effect of dn-CREB was assessed in HepG2 cells cotransfected with 0.25 µg of full-length SNAT2 construct and 0.25 µg of dn-CREB-133 or dn-KCREB. Forty-eight hours after transfection, the cells were lysed to measure the luciferase activity using the Luciferase Assay Dual System, and luminometric

measurements were made using a Veritas microplate luminometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA). Each transfection was done in triplicate, and three independent experiments were performed for each construct.

Culture Primary Rat Hepatocytes

Rat hepatocytes were isolated by the collagenase perfusion technique and separated from nonparenchymal liver cells and debris by centrifugation (6). Cell viability was assessed by the Trypan blue exclusion test and was always >85%. Cells (65,000/cm²) were plated on treated culture dishes and maintained in DMEM (GIBCO-BRL) supplemented with glucose, L-glutamine, pyridoxine hydrochloride, sodium pyruvate, and 10% heat-inactivated fetal bovine serum. The medium was refreshed to remove death cells. Total RNA from rat hepatocytes was obtained by using Trizol reagent.

Site-Directed Mutagenesis

To generate the mutant sequences, a plasmid containing the rat SNAT2 sequence from -872 to +265 was used as a wild-type template. The mutagenesis was performed with the QuikChange site-directed mutagenesis kit. The identity and fidelity of the constructs was verified by sequencing. The mutagenic primers used are presented in Table 2 (the mutated nucleotides are underlined).

Preparation of Nuclear Extracts and Electrophoretic Mobility Shift Assay

Nuclear extracts from HepG2 cells were prepared using a nuclear extract kit according to the manufacturer's instructions. Protein concentration was determined by the Lowry method (24). To generate

double-stranded probes, complementary oligonucleotides (sequences in Table 2) were mixed at a 1:1 molar ratio and heated to 95°C for 5 min and then gradually cooled to room temperature. Probes were labeled with [γ -³²P]ATP at the end of oligonucleotide using T4 polynucleotide kinase. DNA mobility shift assays were performed using the gel shift assay system according to the manufacturer's instructions. Reactions were prepared with 5 μ g of HepG2 nuclear extracts, 17.5 fmol of each labeled probe, 0.5–1 μ g of poly(dI-dC), and binding buffer. The reactions were incubated for 30 min at room temperature. For competition electrophoretic mobility shift assay (EMSA), 200-fold (3.5 pmol) excess unlabeled double-stranded probe was added to the binding reaction. For super shift analysis, 1 μ g of antibody specific for CREB1 was added for 15 min before incubation of the probe with the nuclear extract. Binding reactions were terminated with the addition of gel-loading buffer. The complexes were separated on a nondenaturing 4% (wt/vol) polyacrylamide gel and visualized by autoradiography of the dried gel.

ChIP Assay

Rat primary hepatocytes were isolated as described above, and 5 \times 10⁶ cells were grown for 24 h in DMEM containing 10% fetal bovine serum to >90% confluence. Then, cross-linking was performed with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature and quenched with 125 mM glycine for 5 min at 37°C. Cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline, scraped off the plate, and collected by centrifugation for 5 min at 500 g. The cell pellets were resuspended in 400 μ l of SDS lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 10 mM EDTA, 1% SDS) containing a protease inhibitor mixture. Samples were incubated on ice for 10 min and centrifuged at 700 g for 4 min. Pellets were resuspended in 400 μ l of Chen's buffer (ChIP buffer; 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and 0.5% sodium deoxycholate) with protease inhibitor mixture and sonicated twice for 30 s each (Braun Biotech International, Melsungen, Germany), followed by centrifugation at 20,000 g at 4°C for 10 min. The supernatants containing the DNA-protein complexes were diluted twofold in ChIP buffer and precleared with 80 μ l of salmon sperm DNA-protein A-agarose, 50% slurry (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), for 30 min at 4°C with rotation. The supernatant was incubated with 4 μ g of anti-CREB1 antibody at 4°C overnight. To collect the antibody-protein-DNA complex, 60 μ l of protein A-agarose slurry was added for 1 h at 4°C. The protein A-agarose was washed once with 1 ml of each one of the following buffers: low-salt wash buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, and 2 mM EDTA), high-salt wash buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, and 2 mM EDTA), and LiCl wash buffer (250 mM LiCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 500 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, and 2 mM EDTA), followed by two washes with TE buffer (10 mM Tris and 1 mM EDTA, pH 8.0). Complexes were eluted with 250 μ l of elution buffer (1% SDS, 100 mM NaHCO₃), and 20 μ l of 5 M NaCl was added to reverse cross-link at 65°C overnight. Eluates were incubated with 2 μ l of proteinase K (10 mg/ml) for 1 h at 45°C. DNA was recovered by 1 vol of phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. The pellet was resuspended in 50 μ l of water. A total of 8 μ l of purified sample was used for PCR analysis. PCR analysis was performed with specific primers flanking the putative binding sites for CREB in the SNAT2 promoter (pS63-forward and pS-reverse; see Table 2 for sequences) as follows: 95°C for 5 min followed by 30 cycles at 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 10 min. As a negative control, IgG was used. PCR products were analyzed in a 1.5% agarose gel.

Statistical Analysis

Results obtained in this study are presented as means \pm SE. Data were evaluated with Student's *t*-test, and it was considered significant

at $P < 0.05$. Data were analyzed with Statview software (Abacus Concepts, San Francisco, CA).

RESULTS

Effect of a High-Protein Diet and Glucagon on SNAT2 Expression

We studied whether the consumption of a high-protein diet increased SNAT2 mRNA in the liver of rats. We found that rats fed a 50% casein diet (high-protein diet) increased SNAT2 mRNA abundance by almost double ($P < 0.05$) compared with rats fed a 20% casein diet (Fig. 1A). The change in SNAT2 expression was accompanied by a significant increase in serum glucagon in rats fed a 50% casein diet (Fig. 1B). These data suggested that glucagon was able to increase SNAT2 gene expression. To test the effect of glucagon on SNAT2 expression, rats fed a 10% casein diet for 5 days were challenged with an intraperitoneally single dose of glucagon (0.6 mg/kg body wt) (2). This resulted in a significant increase in SNAT2 mRNA abundance compared with rats injected with vehicle (Fig. 1C). The increment in SNAT2 mRNA with glucagon was similar to that observed after the consumption of a high-protein diet. Since glucagon mediates several of its effects through cAMP signaling, we thus incubated primary hepatocytes with forskolin, an inducer of cAMP. Our results showed that forskolin was also able to double SNAT2 mRNA abundance (Fig. 1D), supporting the conclusion that the induction of the SNAT2 gene is mediated via cAMP.

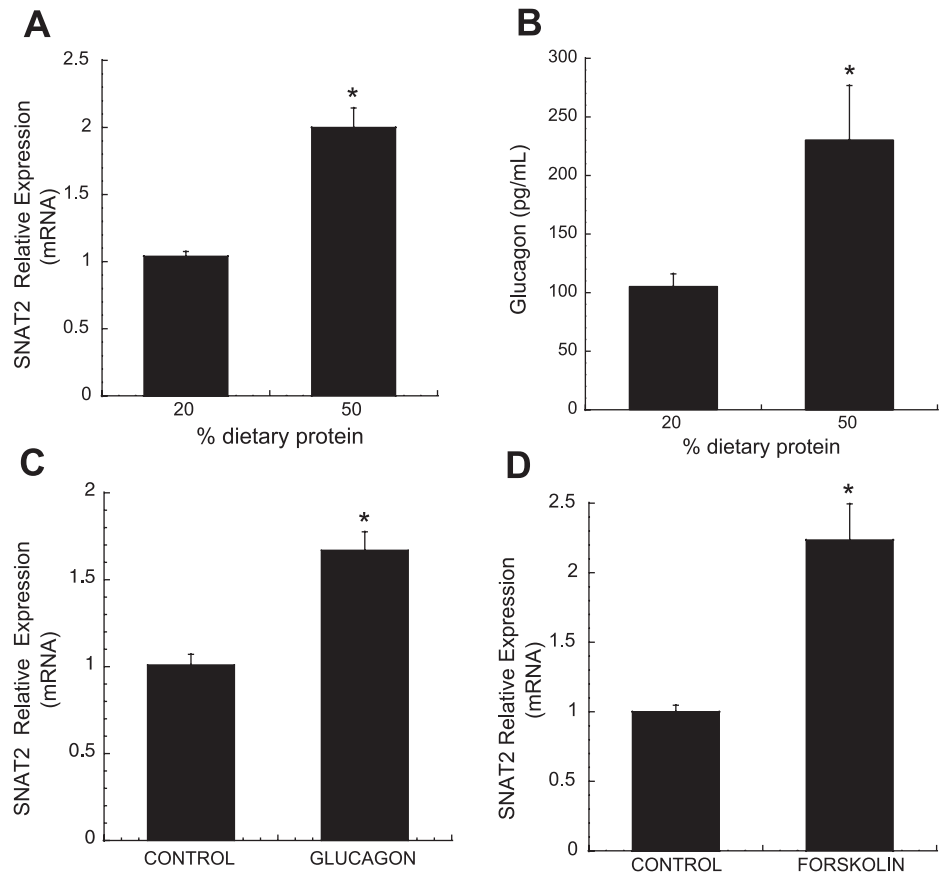
Transcription Start Site of the Rat SNAT2 Gene

To study the role of cAMP on SNAT2 expression, it was necessary to analyze the 5'-regulatory region of the SNAT2 gene. We first had to determine the transcription start site (TSS) of this gene in the rat genome. For this purpose, a primer extension assay was performed using an antisense primer located in the first exon and total RNA from the rat. We detected three bands, indicating the presence of multiple start sites. The upper band was 44 nt and was obtained using either total RNA or RNA poly(A⁺). Sequencing reactions with the same primer determined that the TSS is C, corresponding to position 968 bp upstream of the translation start codon (Fig. 2A). Primer extension is a common method to determine the TSS of a gene. However, a frequently encountered problem of this assay is that the reverse transcriptase pauses or terminates at various sites before reaching the 5' end of the mRNA, which may explain the three bands observed in this study. Thus, to solve this problem, we used a 5' RACE assay to confirm the TSS. Our results clearly showed that the SNAT2 gene has a single TSS (Fig. 2B). Sequencing of this product demonstrated that the TSS is A, located 970 nt from translation start site, and it corresponded to the TSS predicted by the Neural Network software (Fig. 2C).

Identification of Putative Transcription Factor Binding Sites

We analyzed a fragment of \sim 1,100 bp with the MatInspector program from Genomatix that included 1,030 bp upstream of the TSS. The sequence contained a TATA box, several potential AP-1, AP-2, and GC box/specificity protein-1 (SP-1) binding sites, several glucocorticoid response elements, and a carbohydrate response element. In addition, we identified sev-

Fig. 1. Expression of small neutral amino acid transporter 2 (SNAT2) in the liver of rats fed a high-protein diet or injected with glucagon or in primary rat hepatocytes incubated with forskolin. *A*: effect of dietary protein concentration on the abundance of SNAT2 mRNA. Rats were fed a 20 or 50% casein diet for 10 days. *B*: serum glucagon concentration in rats fed a 20 or 50% casein diet for 10 days. *C*: effect of intraperitoneal glucagon injection on the abundance of SNAT2 mRNA. Rats were injected with 0.6 mg/kg body wt, and 3 h later SNAT2 mRNA was measured. *D*: effect of forskolin on the abundance of SNAT2 mRNA. Primary hepatocytes were incubated with 10 μ M forskolin for 4 h. Values are means \pm SE; $n = 5$ rats/group. *Significant differences ($P < 0.05$).



eral sites for different members of the family of Kruppel-like factors in this region as well as two potential CREs located -354 and -48 nt from the TSS (Fig. 3).

Identification of the Transcriptional Regulatory Region of the Rat SNAT2 Gene

Based on the *in silico* analysis of potential transcription factor binding sites, we proceeded to determine the promoter activity of the 5'-flanking region of the SNAT2 gene. For this purpose, 1,137 bp of the genomic region, containing the first 872 bp upstream of the TSS, was amplified and inserted into the promoterless luciferase reporter plasmid ($-872/+265$), and a series of unidirectional 5'-deletion constructs were generated from the total sequence. The constructs were transfected into HepG2 cells, and their luciferase activities were determined. As shown in Fig. 4A, the longest construct (-872 to $+265$) displayed a significantly higher promoter activity in HepG2 cells than that of the promoterless luciferase empty vector pGL3 basic. Deletion up to position -336 resulted in a 25% reduction of promoter activity. In contrast, deletion to -192 resulted in a significant decrease of $\sim 86\%$ of promoter activity. Deletion to -63 resulted in further decrease of promoter activity, indicating that this fragment contains the core promoter, since no promoter activity was observed with smaller fragments (-22 and -8 ; Fig. 4A).

Identification of Potential CRE Functional Elements in the SNAT2 Promoter

To identify potential CRE functional elements, we incubated transfected HepG2 cells with the above constructs of the

SNAT2 gene with 10 μ M forskolin. We observed that this inducer of adenylate cyclase increased promoter activity by $\sim 100\%$, although it was not different between constructs containing the segments -872 to $+265$ and -336 to $+265$. Interestingly, despite the fact that the fragment from -63 to $+265$ showed a substantial reduction in basal promoter activity, forskolin was still able to increase the activity by 76% ($P < 0.05$). These data suggest that the CRE site located -48 bp from the TSS is essential for mediating the effects of cAMP on the SNAT2 gene promoter (Fig. 4B). Interestingly, the deletion of the fragment -336 to -192 bp significantly reduced basal promoter activity, suggesting the presence of a positive regulatory site in this region; however, more studies are needed to determine the elements involved in this response.

Site-Directed Mutagenesis of CRE Sites in the SNAT2 Gene Promoter

To further assess the conclusion that the CRE site located at -48 bp is essential for regulating the effects of cAMP on the SNAT2 promoter, we performed site-directed mutagenesis in the two CRE sites located at -354 and -48 bp from TSS (Fig. 5A). Our results clearly demonstrated that mutation of CRE at -354 bp did not have any effect on the response to forskolin; however, mutation of CRE at -48 bp dramatically reduced the response to forskolin, supporting the evidence that this binding site is essential for the regulation of SNAT2 gene expression by cAMP (Fig. 5B). Mutation of both sites did further reduce the response to forskolin, indicating that the CRE site at -48 bp is essential for mediating cAMP effect (Fig. 5B).

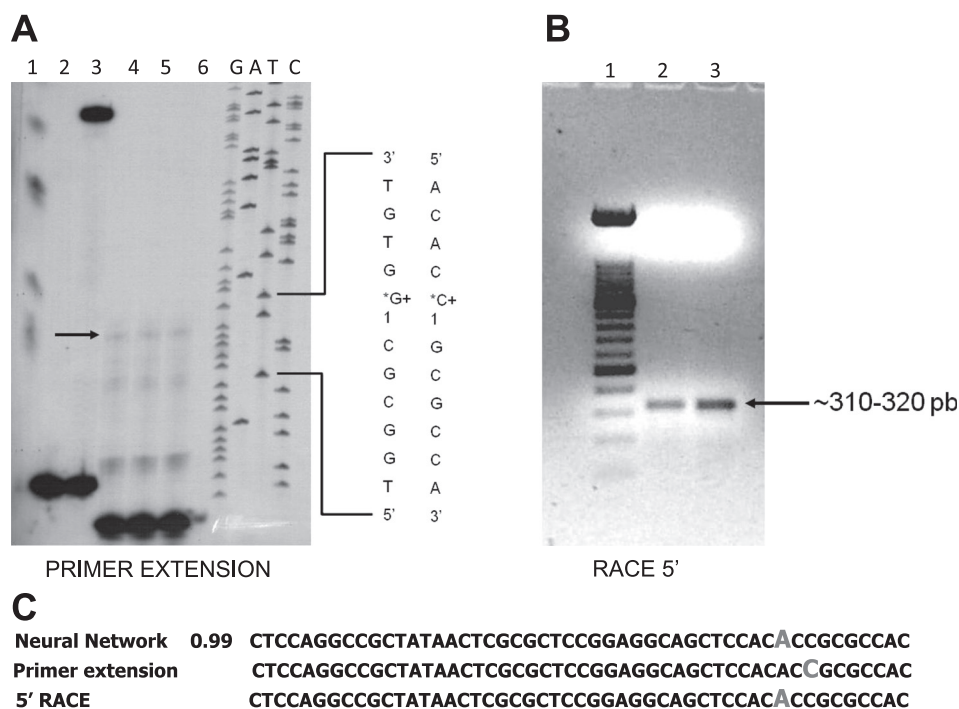


Fig. 2. Mapping of the transcription start site (TSS) of the rat SNAT2 gene. **A:** primer extension. 32 P-labeled primer was annealed to the total or poly(A⁺) RNA from liver tissue and extended with reverse transcriptase. The DNA sequence ladder was obtained using the same primer and separated on the same gel. *Lane 1*, molecular weight (MW) ladder; *lane 2*, negative control; *lane 3*, positive control; *lane 4*, total RNA; *lanes 5 and 6*, poly(A)-RNA. **B:** rapid amplification of cDNA ends (RACE) assay performed with a SNAT2-specific primer starting from cDNA position +265 indicated that only 1 TSS exists in the rat SNAT2 gene. Arrow indicates the extended product. *Lane 1*, MW ladder; *lane 2 and 3*, poly(A)-RNA samples. **C:** comparison of the TSS obtained by primer extension and RACE assays with that predicted by neural network software.

TSS= 970 pb from translation start site

CREB Binding to the SNAT2 CRE Site at -48 bp in Vitro

Because it is known that the cAMP signaling pathway involves the activation of the transcription factor CREB, we conducted EMSA to assess whether the CRE sites were able to bind CREB. As shown in Fig. 6A, *lanes 3 and 5*, both CRE sites at -48 and -354 bp produced retarded bands with HepG2 nuclear extracts. However, mutation of CRE site at -354 bp (Fig. 6A, *lane 4*) enhanced the formation of the complex, indicating an unspecific binding, whereas mutation of CRE at -48 bp (Fig. 6A, *lane 6*) abolished the formation of the complex, suggesting that this binding site binds CREB. To further investigate the specificity of the binding, a competition assay was performed. As shown in Fig. 6B, *lanes 6 and 7*, specificity of the binding at the -48-bp CRE site was confirmed by competition with 200-fold molar excess of wild-type CRE binding site consensus sequence (31). As a positive control, we used the CRE consensus sequence (Fig. 6B, *lane 2*), which showed a very intense retarded band that was competitively inhibited by the addition of an excess of unlabeled consensus CRE (Fig. 6B, *lane 3*). To identify whether CREB was bound to the CRE sequence, we performed a supershift assay using an anti-CREB1 antibody. Figure 6C, *lane 6*, clearly demonstrates that preincubation with the antibody decreased the intensity of the retarded band for the CRE site at -48 bp, similar to the consensus sequence (Fig. 6C, *lane 5*), indicating that CREB was indeed bound to this sequence.

CREB Binding to the SNAT2 CRE Site at -48 bp in HepG2 Cells

To demonstrate whether CREB was bound to the SNAT2 CRE site at -48 bp, intact living HepG2 cells were stimulated with forskolin, and a ChIP assay was performed at different time points. A small signal was obtained at 0 and 30 min, indicating

basal CREB binding to the CRE site at -48 bp (Fig. 7A). Interestingly, we observed an intense amplification of the signal after 60 min of incubation with forskolin that was sustained until 120 min (Fig. 7, A and B). These data clearly demonstrate that CREB recognized and bound actively to the SNAT2 CRE site at -48 bp, supporting the role of CREB as an inducer of SNAT2 gene expression. No signal was observed with DNA recovered from IgG.

Effect of dn-CREB on SNAT2 Reporter Activity

To further demonstrate whether CREB is involved in the SNAT2 transcription regulation, we studied whether inhibition of CREB would reduce SNAT2 promoter activity in HepG2 cells. As expected, forskolin increased the promoter activity of the full-length construct by 100% with respect to unstimulated cells. Addition of either dn-CREB-133 or dn-KCREB significantly prevented the stimulation of forskolin compared with cells containing only the full-length construct, indicating that CREB was necessary to stimulate SNAT2 gene transcription via cAMP (Fig. 8).

The CRE Site at -48 bp is Conserved in the Genomic Sequence of Different Species

To identify whether the CRE site at -48 bp in the rat SNAT2 gene was also present in other species, we performed an alignment of the genomic sequences of the mouse and human SNAT2 genes with the rat SNAT2 gene. We identified two conserved sequences in the proximal promoter, a TATA box (nt -29 to -24) and the CRE motif (nt -48 to -41). In each of the three sequences, the CRE motif is a half-site motif (ATGAC) of the full CRE palindrome (32) (Fig. 9). These results suggest that regulation of the SNAT2 gene by CREB is a conserved mechanism among species.

E1098 TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE RAT SNAT2 GENE							
-1111	ATGGGGTCTCT	GCCCTGTCAA	TCACGAACAC	TGGCACAGGC	TGAAGGCACC	CCAAGTCTTA	CGTGCCACGG
-1041	AAATAGCCAG	CGTTACAGAT	TTCCTCAGGA	AAACATTGAA	GGCAAAAAAC	GGTGATCACA	CCCAGCCCTI
-971	TCCTCTCTGC	CCAGCCCAAT	<u>CTCTCCACG</u>	<u>TCCCCAAAG</u>	<u>GAAGAGAGCA</u>	<u>CTAGGTCAA</u>	CTCGTTTGT
			HIF1	ETSF		RAR-a	
-901	TATTCCTCCA	TTCAAGCAGC	ATTTTCTCT	CTCCTCGGGG	GTCTTTGTTT	AACCCAAAAG	GGAAGGGCCC
-831	TCGCCTTTCC	<u>GGCAGCACCG</u>	<u>AATATTCTAG</u>	<u>TCTCAGGGGC</u>	<u>TCCCCGGGT</u>	GCCCGACTCT	GCAAGACCAC
		HSF2,	GRE	NF-kappa B			
-761	AGCTCCACCG	AGGGATCCGG	GCCGCAGAGA	AAGCTCCAGG	CCTACATTCC	AACGAGGGCG	CGCGCTCGCT
-691	GGAAGCTGGA	GGAGACGCTA	<u>ACACCAGGGG</u>	<u>TGGGGTGGAG</u>	<u>GCAGGAGGGA</u>	AAGTGTCTGGG	<u>CAAGAGGGAA</u>
			GC-box,	KLF-3			
-621	<u>CAGGGCGCCC</u>	<u>CTAGGCGGCC</u>	TCGGAAGGGC	TGGGTCTCCC	ATCCCCGAAC	<u>CCCTTTAAG</u>	GGCTTGCTGG
	GRE					HMX	
-551	TCCAACGCAA	CCGTCCCTAG	TACGCTGTGA	<u>CACGTGCAAC</u>	CCCAAAGTCT	ATCCCGCCAC	GGAAGTCCGA
			N-Myc,	USF			
-481	<u>GCCGCCCTC</u>	<u>ATTCACAGG</u>	CTAGTTGTGG	<u>AGAGTGAAAG</u>	CACATCTAGG	TGAAAAGATC	GAGAACACAA
	SP-1, KLF6,	AP-1		IRF2			
-411	CCGGGCCCTC	CCGGGCAGCG	TGGCAGCGCI	<u>GGCTCAAGT</u>	CTGCGGGAGA	AAAACCCTTA	<u>ACGTAAATCT</u>
				AP-1			CRE
-341	<u>TAAGTCGCGG</u>	<u>GCTGGGGGTG</u>	<u>GTTTGGGGTG</u>	TCTGGGGGTG	TAGGTACCG	<u>CACACACGCC</u>	<u>GGATGTCTCC</u>
	Hmx2/Nkx5-2		AML			C-Ets-1(p54)	
-271	CCGAAACGCA	GCGTTGGAGA	CCGCGCTGGG	AGGGAATCTA	<u>AGGAGCTGGC</u>	<u>TCCTTACGGC</u>	AGCCGCGGGT
					AP-1		
-201	<u>GGCGGCCACC</u>	<u>CACGGGGCTG</u>	<u>CGGTGCCACG</u>	<u>GCAGCCGGAG</u>	<u>CCACGGGAAA</u>	<u>GCGGGGTGCG</u>	<u>GCTGGCCCCC</u>
	ATF6,	AP-2		MyoD	ChREBP		AP-2
-131	<u>CGACTCGGGG</u>	<u>TCCGGGGCAG</u>	<u>CAGCAGGGAG</u>	<u>GCGGAGCCCA</u>	GGTGTGTG	ATACACAAAG	ACGAACGCC
		Myf5	SP-1,	GC-box			
-61	<u>GCGCCCCGCC</u>	<u>CACTGACGCG</u>	<u>GCTCCAGGCC</u>	<u>GCTATAACTC</u>	<u>GCGCTCCGGA</u>	<u>GGCAGCTCCA</u>	<u>CACCGGCCA</u>
	SP1, Ap-2	CRE/ATF, AP-1		TATA box	C-Ets-1(p54)		+1
+10	<u>CGCCGTCGCC</u>	<u>CGGCCACCA</u>	<u>CCCCTAGTC</u>	<u>TCTGCTGGAG</u>	<u>GATCGTGACC</u>	<u>GCCATTCCCC</u>	<u>GCTTTTTTTT</u>

Fig. 3. The sequence of the 5'-flanking region (nt -1,111 to +79) of the rat SNAT2 gene. Numbers indicate the nucleotide position relative to the TSS, denoted as +1. The predicted TATA box at nt -29 is underlined in boldface. Potential transcription factor-binding sites predicted by MatInspector database analysis are underlined. HIF-1, hypoxia-inducible factor-1; ETSF, E-26 factor; Ets, Ets transcription factors; AP-1 and -2, activator protein-1 and -2, respectively; ATF, activating transcription factor; HMX, homeobox protein; CRE, cAMP response element; SP-1, specificity protein-1; Myf5, myogenic factor 5; ChREBP, carbohydrate response element; MyoD, myogenic determination factor 1; AML, acute myeloid leukemia; Hmx2/Nkx5-2, homeobox protein Nkx; IRF2, interferon regulatory factor 2; KLF, Krüppel-like transcription factors; USF, upstream stimulatory factor; N-Myc, member of Myc family (v-myc myelocytomatosis viral related oncogene); GRE, glucocorticoid response element; NF-κB, nuclear factor-κ light-chain-enhancer of activated B cells; HSF2, heat shock transcription factor 2; RAR-a, retinoic acid receptor-α.

DISCUSSION

SNAT2 is an amino acid transporter that plays an essential role in the formation of the amino acid pool of the cell (7). Therefore, understanding the different mechanisms that regulate the expression of this transporter can provide clues as to how SNAT2 maintains cellular homeostasis under different physiological circumstances. Our results clearly showed that feeding rats a high-protein diet increased the expression of SNAT2, suggesting that this transporter plays an important role in providing amino acids to the oxidative pathways for amino acid degradation, allowing the cell to remove the excess of amino acids supplied by the diet. In addition, it has been demonstrated that SNAT2 may play a role in sensing and transporting the amino acids supplied by the diet, thereby activating several signaling pathways to maintain cellular homeostasis (19, 20). Thus, an increase in the expression of SNAT2 by a high-protein diet can amplify all of these responses.

Our results showed that consumption of a high-protein diet increased serum glucagon concentration, and we demonstrated that a glucagon injection increased SNAT2 mRNA abundance. Glucagon effects are mediated by activation of adenylate cyclase. We observed that cells incubated with forskolin, an activator of adenylate cyclase, also stimulated the expression of the SNAT2 gene. These results suggest that the increase in the expression of SNAT2 is mediated via cAMP. To confirm this hypothesis, we studied the promoter region of the SNAT2 gene with the aim of finding potential response elements activated by cAMP.

For this purpose, we mapped the transcription start site of the SNAT2 gene in the rat. Our results showed that it has a single transcription start site localized 970 bp from the ATG codon that initiates translation. A putative TATA box was located -29 bp from the transcription start site. In addition, in silico analysis found two potential CRE elements located at -354 and -48 bp, although neither had the consensus CRE

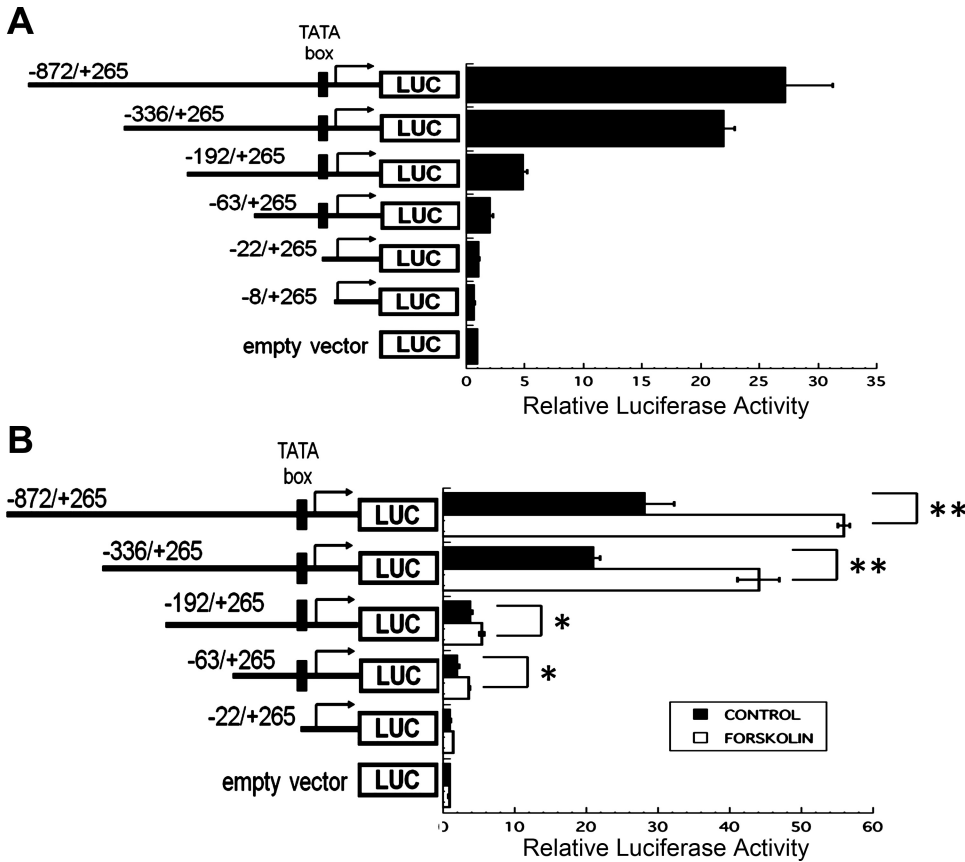


Fig. 4. Functional analysis of the rat SNAT2 gene promoter. Fragments of the indicated sizes in the 5' region of the rat SNAT2 gene were cloned in the pGL3 basic vector and transfected into HepG2 cells. Relative luciferase (Luc) activity was measured 48 h after transfection. *A*: the basal promoter activity of the SNAT2 gene. *B*: effect of 10 μ M forskolin on SNAT2 promoter activity. HepG2 cells were cotransfected with each promoter-reporter construct and pRL-TK and incubated in presence or absence of forskolin. Luc activities were measured 48 h after transfection. The results are means \pm SE of 3 independent experiments per construct. * P < 0.05, ** P < 0.01; significant difference vs. the respective control.

sequence (TGACGTCA) (27). However, it has been demonstrated that differential regulation of target genes by cAMP through CREB is achieved by varying the sequence composition and placement of the CRE site within the promoter. It is known that a half-site motif (ATGAC) is sufficient to promote

transcription of target genes, although it is less active than the full CRE palindrome (9). In addition, it has been reported that half-site motif sequences can also bind other transcription factors such as AP-1, ATF, or heterodimers with c-Fos or c-Jun, thereby allowing cross-talk between CREB and other transcrip-

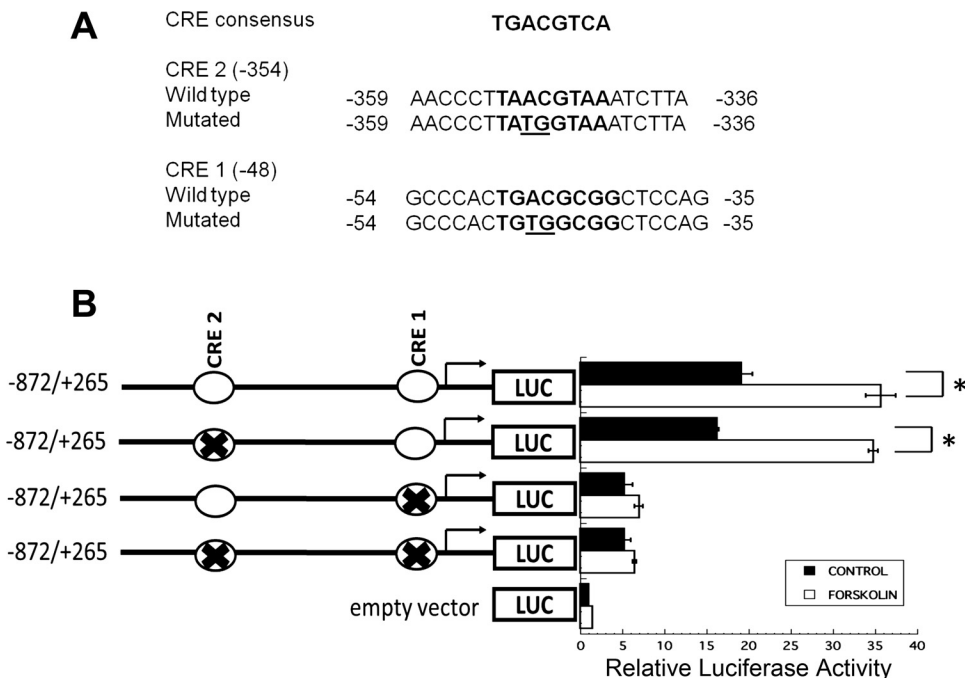


Fig. 5. Mutation analysis of the CRE binding sites in the SNAT2 promoter. *A*: oligonucleotide sequences containing wild-type or mutated CRE sites of SNAT2. *B*: Luc activity of constructs with mutations of the CRE sites at -48 and/or at -354. HepG2 cells were transfected with a Luc reporter plasmid containing wild-type or mutated CRE sites and incubated with or without 10 μ M forskolin. Luc activities were measured 48 h after transfection and normalized to Renilla expression. The results are means \pm SE of 3 independent experiments per construct. * P < 0.05, ** P < 0.01; significant difference vs. the respective control.

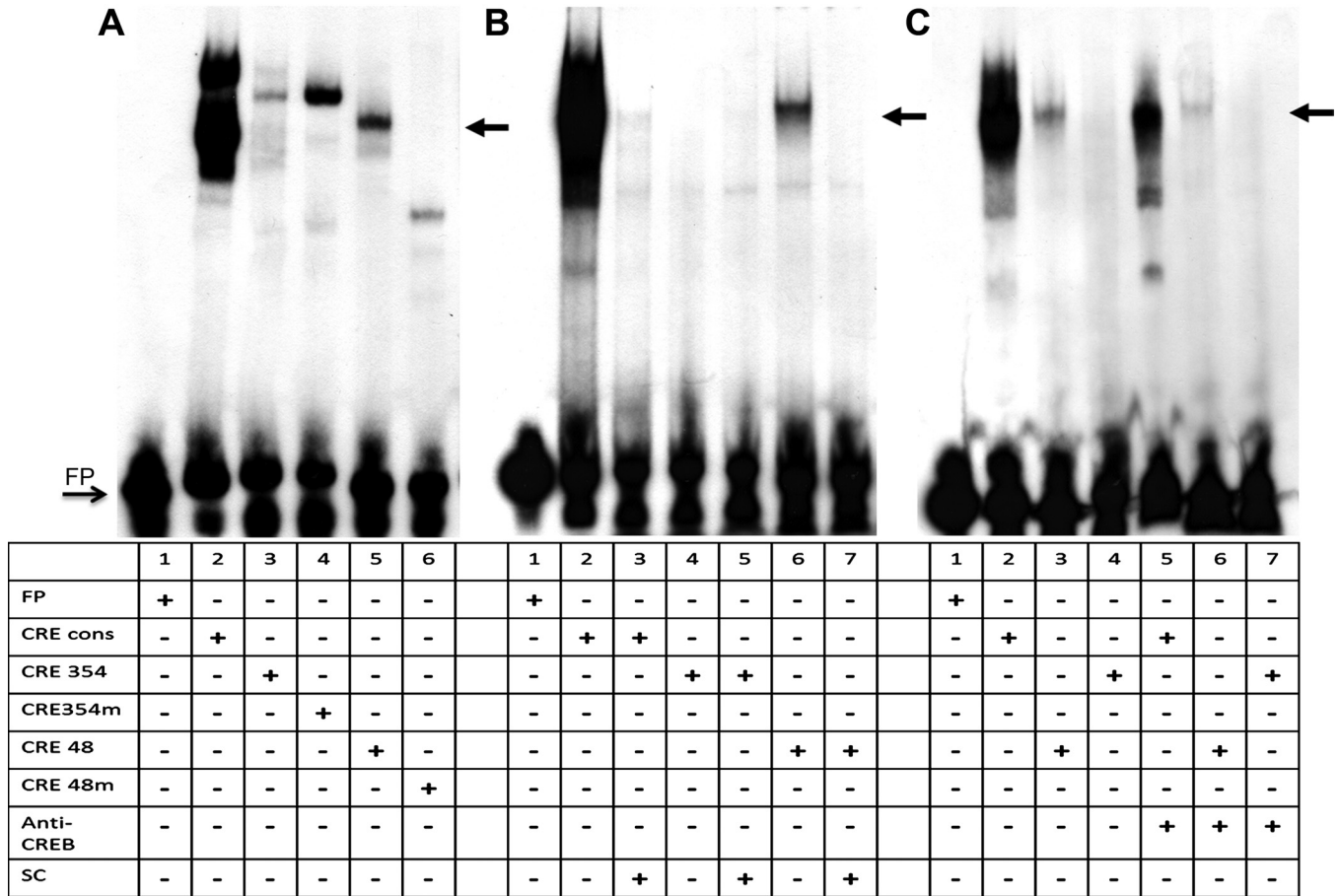


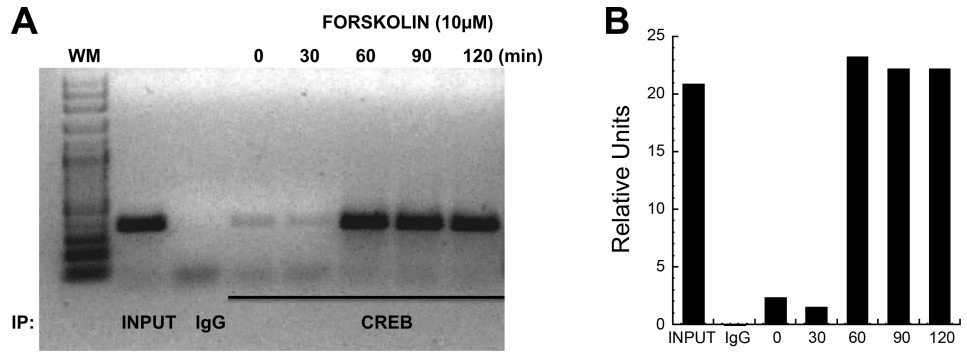
Fig. 6. Binding of cAMP response element-binding protein (CREB) to CRE motifs in the SNAT2 promoter in vitro. Double-stranded DNA oligonucleotides containing the CRE consensus sequence (CRE cons), the SNAT2 CRE site at nt -48, and the SNAT2 CRE site at -354 were incubated with HepG2 nuclear extracts. The DNA sequences of the oligonucleotides used are indicated in Table 2. A: electrophoretic mobility shift assay analysis of HepG2 nuclear extracts with labeled oligonucleotides containing the CRE consensus site (lane 2), the wild-type CRE site at -354 and -48 bp (lanes 3 and 5), and mutated CRE sites at -354 (CRE354m) and -48 bp (CRE48m) (lanes 4 and 6). B: competitive assays with an excess of unlabeled CRE consensus sequence with CRE consensus, CRE -354 site, and CRE -48 site are shown in lanes 3, 5, and 7, respectively. C: supershift assay was performed by preincubating 1 µg of antibody anti-CREB1 with HepG2 nuclear extracts. Probes for the labeled consensus CRE sequence (lanes 2 and 5), the CRE site at -48 (lanes 3 and 6), and the CRE site at -354 (lanes 4 and 7) were added. Lane 1 in each panel corresponds to free probe (FP) as a negative control. The binding reactions were separated using a 4% nondenaturing polyacrylamide gels. SC, specific competitor (unlabeled consensus).

tion factors, which allows for fine-tuning of the regulatory events (26) involved in the transcription of the SNAT2 gene.

It has been demonstrated that the presence of several CRE sites in a promoter can synergistically potentiate the expression of target genes activated by CREB (14, 17, 22). However, this was not the case for the SNAT2 gene, because the CRE site located at -354 bp was nonfunctional according to reporter

assays and EMSAs. Interestingly, we clearly established the presence of a functional cAMP response element located -48 bp from the transcription start site. This response element was located in the core promoter, and its mutation significantly reduced basal promoter activity, indicating the essential role of this CRE site in the expression of SNAT2. This result is in agreement with previous studies in human and rat that reported

Fig. 7. CREB binds to the CRE site at -48 bp in the rat SNAT2 promoter in vivo. A: chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were conducted on primary rat hepatocytes incubated with and without forskolin for 30, 60, 90, or 120 min. Soluble chromatin was immunoprecipitated with 4 µg of anti-CREB1 antibody and subjected to PCR with a primer pair specific to the SNAT2 CRE -48 region (Table 2). B: densitometric analysis of amplified products is shown in graphic form. This figure is representative of 3 independent experiments.



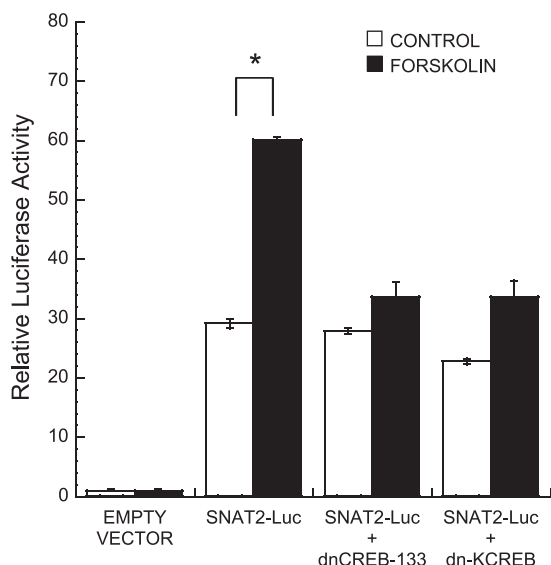


Fig. 8. Effect of dominant negative (dn)-CREB expression on basal and forskolin induced levels of SNAT2 reporter activity. HepG2 cells were cotransfected with either dn-CREB133 or dn-KCREB and the full-length SNAT2-Luc construct. After 48 h, cells were treated with 10 μM forskolin for 4 h, and Luc activity was determined. Both CREB mutants blocked forskolin stimulation of SNAT2 promoter activity. The results are expressed as means ± SE; n = 3 independent experiments. Asterisks indicate *P < 0.05, significant difference vs. the respective control.

that most CRE elements are located adjacent to the transcription start site and have downstream TATA boxes necessary for optimal induction in response to cAMP (21, 39). Nonetheless, binding to the CRE site located at -48 bp was less intense than that observed with the consensus sequence, as determined by EMSA. As indicated above, this is possibly because this element was one-half of the full CRE palindrome sequence (9, 38), however, its functional activity was clearly demonstrated by the reporter and ChIP assays.

We also studied the kinetics of activation of SNAT2 after the incubation of primary hepatocytes with forskolin. We observed significant immunoprecipitation of the CRE-CREB complex after 60 min of incubation with forskolin, which was preserved until 120 min. This is in agreement with previous evidence showing that the transcription of cellular genes usually peaks 30 min after stimulation with cAMP, coinciding with the time required for levels of the C subunit of PKA to reach maximal

levels in the nucleus and the fact that CREB activity attenuates after 2–4 h (16, 27).

In addition, our study showed that phosphorylation of CREB is necessary to induce SNAT2 gene transcription since dn-CREB-133 containing a mutation in Ser¹³³, a residue that is phosphorylated by PKA to induce CREB activity (27), prevented promoter activity stimulated by forskolin. Furthermore, as we observed in the EMSA and ChIP analysis, binding of CREB to its response element site is a requirement for the stimulation of the SNAT2 gene promoter activity since dn-KCREB that has a mutation in the DNA-binding domain also reduced the activity of the reporter assay.

The sequence alignment of the SNAT2 gene in rat, mouse, and human revealed that the apparent transcription start site, the TATA box, and the CRE site are highly conserved, suggesting that the mechanism of regulation of the SNAT2 gene by cAMP is similar in these species. In fact, an increase in SNAT2 activity/expression by stimulation with glucagon, activators, or analogs of cAMP has been demonstrated in rat cells (4, 10); however, it was not observed in placental BeWo cells (28). Interestingly, promoter regions of amino acid-degrading enzymes also possess CRE sites (1, 13, 33), suggesting that activation of transcription via cAMP can synchronically modulate amino acid metabolism under different metabolic conditions, such as fasting or high proteolytic wasting diseases, or after the consumption of diets containing excess protein.

In addition to the CRE element, we also found potential binding sites for several transcription factors such as SP-1, AP-1, glucocorticoid response element, carbohydrate response element, and GC boxes. However, more studies are needed to identify whether these sites have any functional significance for the expression of SNAT2.

This is the first report that investigates the molecular mechanism by which cAMP activates the expression of the SNAT2 gene. Although it has been established by several studies that glucagon or cAMP analogs are able to stimulate the activity of system A, we have now identified, in the promoter region of the SNAT2 gene, the key response element that upregulates the expression of this transporter for small neutral amino acids by cAMP.

GRANTS

This study was supported by the National Council of Science and Technology, Mexico (212226-5-25637M to A. R. Tovar).

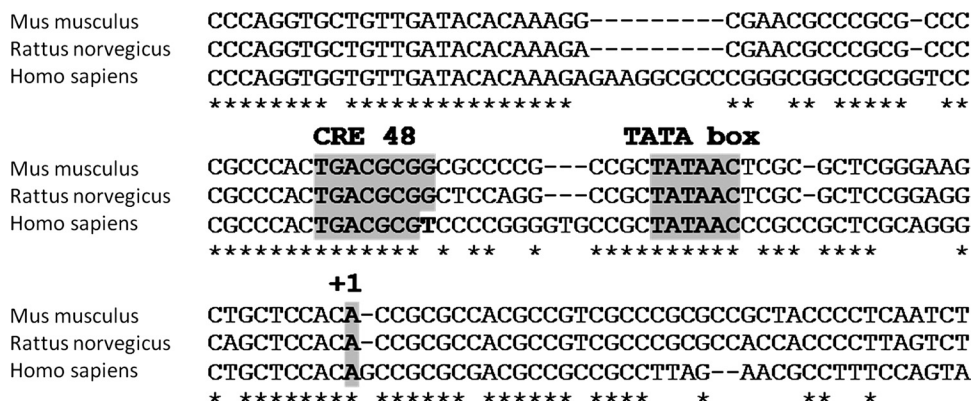


Fig. 9. Alignment of SNAT2 gene sequences from 3 species. Alignment of the SNAT2 promoter region from rat, mouse, and human was performed with Clustal W software. Highly conserved regions for the TATA box and the CRE consensus sequence are indicated by the gray shaded areas.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

REFERENCES

- Alemán G, Ortíz V, Langley E, Tovar AR, Torres N. Regulation by glucagon of the rat histidase gene promoter in cultured rat hepatocytes and human hepatoblastoma cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E172–E179, 2005.
- Alemán G, Torres N, Bourges H, Tovar AR. Regulation of histidase gene expression by glucagon, hydrocortisone and protein-free/high carbohydrate diet in the rat. *Life Sci* 63: 1663–1672, 1998.
- Audette MC, Greenwood SL, Sibley CP, Jones CJ, Challis JR, Matthews SG, Jones RL. Dexamethasone stimulates placental system A transport and trophoblast differentiation in term villous explants. *Placenta* 31: 97–105, 2010.
- Barber EF, Handlogten ME, Kilberg MS. Induction of amino acid transport system A in rat hepatocytes is blocked by tunicamycin. *J Biol Chem* 258: 11851–11855, 1983.
- Barber EF, Handlogten ME, Vida TA, Kilberg MS. Neutral amino acid transport in hepatocytes isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biol Chem* 257: 14960–14967, 1982.
- Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43: 506–520, 1969.
- Bussolati O, Dall'Asta V, Franchi-Gazzola R, Sala R, Rotoli BM, Visigalli R, Casado J, Lopez-Fontanals M, Pastor-Anglada M, Gazzola GC. The role of system A for neutral amino acid transport in the regulation of cell volume. *Mol Membr Biol* 18: 27–38, 2001.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156–159, 1987.
- Craig JC, Schumacher MA, Mansoor SE, Farrens DL, Brennan RG, Goodman RH. Consensus and variant cAMP-regulated enhancers have distinct CREB-binding properties. *J Biol Chem* 276: 11719–11728, 2001.
- Fafournoux P, Remesy C, Demigne C. Control by amino acids of the activity of system A-mediated amino acid transport in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 231: 315–320, 1985.
- Fang J, Mao D, Smith CH, Fant ME. IGF regulation of neutral amino acid transport in the BeWo choriocarcinoma cell line (b30 clone): evidence for MAP kinase-dependent and MAP kinase-independent mechanisms. *Growth Horm IGF Res* 16: 318–325, 2006.
- Fehlmann M, Le Cam A, Freychet P. Insulin and glucagon stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes. Synthesis of a high affinity component of transport. *J Biol Chem* 254: 10431–10437, 1979.
- Ganss R, Weih F, Schutz G. The cyclic adenosine 3',5'-monophosphate- and the glucocorticoid-dependent enhancers are targets for insulin repression of tyrosine aminotransferase gene transcription. *Mol Endocrinol* 8: 895–903, 1994.
- Gottschalk LR, Leiden JM. Identification and functional characterization of the human T-cell receptor beta gene transcriptional enhancer: common nuclear proteins interact with the transcriptional regulatory elements of the T-cell receptor alpha and beta genes. *Mol Cell Biol* 10: 5486–5495, 1990.
- Guma A, Vinals F, Testar X, Palacin M, Zorzano A. Regulation of System A amino-acid transport activity by phospholipase C and cAMP-inducing agents in skeletal muscle: modulation of insulin action. *Biochim Biophys Acta* 1176: 155–161, 1993.
- Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, Karin M, Shenolikar S, Montminy M. Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 70: 105–113, 1992.
- Halle JP, Haus-Seuffert P, Woltering C, Stelzer G, Meisterernst M. A conserved tissue-specific structure at a human T-cell receptor beta-chain core promoter. *Mol Cell Biol* 17: 4220–4229, 1997.
- Hatanaka T, Huang W, Martindale RG, Ganapathy V. Differential influence of cAMP on the expression of the three subtypes (ATA1, ATA2, and ATA3) of the amino acid transport system A. *FEBS Lett* 505: 317–320, 2001.
- Hundal HS, Taylor PM. Amino acid transporters: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E603–E613, 2009.
- Hyde R, Cwiklinski EL, MacAulay K, Taylor PM, Hundal HS. Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transporter, by amino acid availability. *J Biol Chem* 282: 19788–19798, 2007.
- Impey S, McCorkle SR, Cha-Molstad H, Dwyer JM, Yochum GS, Boss JM, McWeeney S, Dunn JJ, Mandel G, Goodman RH. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* 119: 1041–1054, 2004.
- Lee MR, Chung CS, Liou ML, Wu M, Li WF, Hsueh YP, Lai MZ. Isolation and characterization of nuclear proteins that bind to T cell receptor V beta decamer motif. *J Immunol* 148: 1906–1912, 1992.
- López A, Torres N, Ortíz V, Alemán G, Hernández-Pando R, Tovar AR. Characterization and regulation of the gene expression of amino acid transport system A (SNAT2) in rat mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E1059–E1066, 2006.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951.
- Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch* 447: 784–795, 2004.
- Manna PR, Stocco DM. Crosstalk of CREB and Fos/Jun on a single cis-element: transcriptional repression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *J Mol Endocrinol* 39: 261–277, 2007.
- Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 599–609, 2001.
- Novak D, Quiggle F, Haafiz A. Impact of forskolin and amino acid depletion upon System A activity and SNAT expression in BeWo cells. *Biochimie* 88: 39–44, 2006.
- Palii SS, Chen H, Kilberg MS. Transcriptional control of the human sodium-coupled neutral amino acid transporter system A gene by amino acid availability is mediated by an intronic element. *J Biol Chem* 279: 3463–3471, 2004.
- Palii SS, Thiaville MM, Pan YX, Zhong C, Kilberg MS. Characterization of the amino acid response element within the human sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2) System A transporter gene. *Biochem J* 395: 517–527, 2006.
- Roesler WJ, Vandembark GR, Hanson RW. Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem* 263: 9063–9066, 1988.
- Sloan LS, Schepartz A. Sequence determinants of the intrinsic bend in the cyclic AMP response element. *Biochemistry* 37: 7113–7118, 1998.
- Su Y, Kanamoto R, Miller DA, Ogawa H, Pitot HC. Regulation of the expression of the serine dehydratase gene in the kidney and liver of the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 892–899, 1990.
- Sugawara M, Nakanishi T, Fei YJ, Huang W, Ganapathy ME, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning of an amino acid transporter with functional characteristics and tissue expression pattern identical to that of system A. *J Biol Chem* 275: 16473–16477, 2000.
- Tovar AR, Ascencio C, Torres N. Soy protein, casein, and zein regulate histidase gene expression by modulating serum glucagon. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E1016–E1022, 2002.
- Tovar AR, Avila E, DeSantiago S, Torres N. Characterization of methylaminoisobutyric acid transport by system A in rat mammary gland. *Metabolism* 49: 873–879, 2000.
- Varoqui H, Erickson JD. Selective up-regulation of system A transporter mRNA in diabetic liver. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 903–908, 2002.
- Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH 3rd, Montminy MR. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334: 494–498, 1988.
- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Konkright MD, Canetti G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 4459–4464, 2005.