



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN p53 INDUCIDAS
POR HIPERGLUCEMIA DURANTE LA APOPTOSIS DE LAS
CÉLULAS RINm5F**

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctor en Biología Experimental



PRESENTA

M. en Biól. Exp. Luis Antonio Flores López

COMITÉ TUTORAL

Dra. Mina Konigsberg Fainstein (Co-Director interno)

Dra. Clara Ortega Camarillo (Co-Director externo)

Dr. José Luis Gómez Olivares (Asesor interno)

Dra. Margarita Díaz Flores (Asesor externo)

México, D.F., 14 de Mayo de 2013

Comité Tutorial

CO-DIRECTOR INTERNO

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Profesor Titular

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
Email: mkf@xanum.uam.mx

CO-DIRECTOR EXTERNO

Dra. Clara Ortega Camarillo

Investigador Asociado

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades
Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.
Email: clara.ortegacamarillo@gmail.com

ASESOR INTERNO

Dr. José Luis Gómez Olivares

Profesor Titular

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
Email: gool@xanum.uam.mx

ASESOR EXTERNO

Dra. Margarita Díaz Flores

Investigador Asociado

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades
Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.
Email: mardiaz2001@yahoo.com

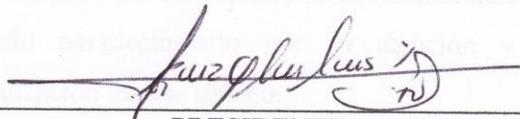
El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I: 0904-0) está incluida en el padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), contando con el apoyo del mismo consejo, mediante el programa PNP-CONACyT- SEP por medio del convenio número 309-0 y la clave del programa C/PFPN-2002-35-32.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACYT a través de la beca con número de registro 171761 y por el Instituto Mexicano del Seguro Social a través de la beca con número de folio 2010032.

Se agradece al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) y a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) por el apoyo proporcionado a través de su convenio de colaboración con la beca otorgada para la conclusión de esta tesis.

Se agradece a la Fundación IMSS A.C. y a la Fundación Río Arronte I.A.P. por el equipo de laboratorio donado a la UIM. Bioquímica, HE. CMNSXXI. IMSS. Este proyecto fue financiado en parte por la Coordinación de Investigación en salud a través del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro social FIS/IMSS/PROT/145] y por CONACYT [54878/FIS/IMSS/PROT/144].

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada **MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN p53 INDUCIDAS POR HIPERGLUCEMIA DURANTE LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS RINm5F** con fecha del 14 de mayo de 2013.



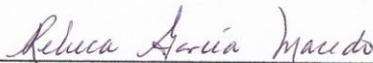
PRESIDENTE:

Dr. José Luis Gómez Olivares
Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa



SECRETARIO:

Dra. Margarita Díaz Flores
Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS



VOCAL:

Dra. Rebeca García Macedo
Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS



VOCAL:

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman
Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Medico Nacional Siglo XXI. IMSS, bajo la Dirección de la Dra. Clara Ortega Camarillo y en el Laboratorio de Bioenergética de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la Dirección de la Dra. Mina Konigsberg Fainstein. Con asesoría de la Dra. Margarita Díaz Flores de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades del Centro Medico Nacional Siglo XXI. IMSS y del Dr. José Luis Gómez Olivares del Laboratorio de Biomembranas de la UAM Iztapalapa. A todos ellos un profundo agradecimiento por su atención y dedicación constantes, fundamentales para la realización de este trabajo.

Dedicatorias

Dedicada a mi hijo Chris Jarod, a mi hija Bailey Mackenzie, a mi pequeña bebé que está con Dios y a mi esposa Keiko Luz que ha estado conmigo a lo largo de mi formación como Doctor en Biología Experimental.

También está dedicada con un profundo agradecimiento y admiración a mis padres por todo el apoyo, sobre todo por la confianza y libertad que me dieron para decidir mi camino.

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Autónoma Metropolitana por haberme dado la oportunidad de formarme como una persona profesionalista de alto nivel.

A la Dra. Clara Ortega Camarillo y a la Dra. Mina Konigsberg Fainstein, por su confianza, infinito apoyo, paciencia, por sus consejos, enseñanzas y sobre todo por su amistad. A la Dra. Margarita Díaz Flores y al Dr. José Luis Gómez Olivares por su apoyo, consejos y por su valiosa amistad. A la Dra. Rebeca García Macedo y a los Drs. Luis Arturo Baiza Gutman y Miguel Cruz por su apoyo en la revisión, orientación y consejos en la presente tesis.

A las Dras. Leticia Manuel Apolinar y Leticia Damasio Santana de la Unidad de Endocrinología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI por su apoyo brindado.

A mis amigos y compañeros, Nayeli, Emilio, Raúl, Blanca, Adriana, Armando, Cristóbal, Viridiana, Gerardo y Noé por su amistad y apoyo.

Índice de cuadros y figuras

Cuadro I. Clasificación de la diabetes	18
Figura 1. Muerte celular por apoptosis.	19
Figura 2. Características y funciones de las mitocondrias.	24
Figura 3. Vías de apoptosis.	25
Figura 4. Vía mitocondrial de la apoptosis.	29
Figura 5. Estructura del gen p53 y dominios funcionales de la proteína p53.	31
Figura 6. Regulación y degradación de p53.	36
Figura 7. Modificación postraduccional de p53.	42
Figura 8. Producción de ERO, marcadores de apoptosis y viabilidad celular.	63
Figura 9. Efecto de la alta glucosa sobre las proteínas Bcl-2, Bax, citocromo c y caspasa 3.	65
Figura 10. Efecto de la alta glucosa sobre las proteínas ERK y CREB.	67
Figura 11. Expresión y distribución intracelular de p53.	69
Figura 12. Análisis por “western blot” de la fosforilación de p53 y ATM en núcleo y citosol.	71
Figura 13. Análisis por “western blot” de la fosforilación de p53 y p38 MAPK en mitocondria.	73
Figura 14. Inhibición de p38 MAPK y de la fosforilación de p53 y efecto sobre la apoptosis.	75
Figura 15. Efecto de la alta glucosa sobre la interacción de p53-Bcl-2 en la mitocondria.	77
Figura 16. Coeficiente de colocalización mitocondrial.	79
Figura 17. Efecto de la alta glucosa sobre la proteína nuclear PARP.	81
Figura 18. Efecto de la alta glucosa sobre la N-acetilglucosaminilación de p53.	82
Figura 19. Modificaciones postraduccionales de p53.	91

Abreviaturas

Ácido aspártico	Asp
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido desoxirribonucleico complementario	cDNA
Ácido glutámico	Glu
Ácido ribonucleico mensajero	RNA_m
Amino terminal de un polipéptido	N-terminal
Asociación Americana de Diabetes	ADA
Canal aniónico dependiente de voltaje	VDAC
Canal de potasio dependiente de ATP	KATP
Carboxilo terminal en un polipéptido	C-terminal
Cisteina aspartato proteasa	CASPASA
Dihidroxiacetona	DHA
Diabetes Mellitus	DM
Diabetes tipo 2	DT2
2'7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína	DCDHF-DA
2'7'-diclorodihidrofluoresceína	DCDHF
2'7'-diclorofluoresceína	DCF
Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido	NADH
Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido	NADPH
Dinucleótido de flavina –adenina reducido	FADH
Difosfato de adenina	ADP
Dodecil sulfato de sodio	SDS
Electroforesis desnaturizante con SDS, en gel de poliacrilamida	SDS-PAGE
Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	ENSANUT
Enzima poli-ADP-ribosa polimerasa	PARP
Especies reactivas de oxígeno	ERO
Factor activador de proteasa 1	Apaf-1

Factor inductor de apoptosis	AIF
Factor de necrosis tumoral	TNF
Fosfato inorgánico	Pi
Federación Internacional de Diabetes	FID
Genes inducidos por p53	PIGs
Gliceraldehído 3 - fosfato deshidrogenasa	GAPDH
Glutación	GSH
Glutación oxidado	GSSG
Factor nuclear κ B	NF-κB
Ioduro de propidio	IP
Isotiocianato de fluoresceína	FITC
Kilodaltones	kDa
Lisina	Lis
N-acetil-D-glucosamina	NAcGluc
Oncoproteína que regula la vida media de p53	MDM2
Pares de bases	Pb
Productos de glicosilación avanzada	AGES
Proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2	Bax, Bad, Bid, Bik
Proteína que interviene en la reparación del DNA	GADD45
Proteína cinasa de ciclinas	Chk2
Proteína tumoral 53	p53
Protooncogén de linfomas	bcl2
Proteína cinasa c	PKC
Proteínas desacoplantes	UCPs
Receptor de muerte	Fas
Serina	Ser
Sociedad Americana de Diabetes	ADA
Suero fetal bovino	SFB
Superóxido dismutasa	SOD

Transportador de glucosa tipo 2

Treonina

Trifosfato de adenosina

Ubiquinona Q

GLUT-2

Tre

ATP

CoQ

Resumen

La proteína p53 está involucrada en la regulación de diversos de procesos metabólicos. Su función está determinada a nivel transcripcional y postranscripcional, así como por su asociación con otras proteínas y su localización subcelular. Se ha propuesto que en condiciones de estrés celular la proteína p53 sufre una variedad de modificaciones postraduccionales que conducen a su estabilización y activación, p53 además de regular el daño, determina el destino celular (reparación del DNA, adaptación al estrés o apoptosis). Se conoce que p53 cuenta con 12 residuos de Ser y 3 de Tre que se fosforilan, 1 residuo de Ser que se N-acetilglucosaminila, además de 2 residuos de Glu y 1 residuo de Asp que se poli-ADP-ribosilan en respuesta a diversos estímulos como: hiperglucemia, estrés oxidante, etc. La hiperglucemia crónica, conduce a la activación de varias vías de señalización, tales como los mencionados anteriormente, que modifican las características físicas y químicas de las proteínas, tales como p53. El objetivo de este estudio fue analizar la expresión, distribución subcelular, la fosforilación, la poli-ADP ribosilación y la N-acetilglucosaminilación de p53, en un cultivo de la línea celular RINm5F con alta glucosa. Los resultados muestran que la alta glucosa induce la apoptosis en las células RINm5F en función del tiempo sin ningún tipo de cambios en la expresión del mRNA de p53, aunque se producen alteraciones en la distribución intracelular y la fosforilación de p53. El aumento de la fosforilación de p53 en Ser 15 y Ser 392 y su localización en la mitocondria se debieron a la alta glucosa y se correlacionaron con un aumentado de especies reactivas del oxígeno (ERO), una disminución en la proporción Bcl-2/Bax, y un aumento en la apoptosis. La fosforilación ERK 1/2 disminuyó con el tiempo. En las mitocondrias, la activación de p38 MAPK coincidió con la fosforilación de p53 de las 24 a 72 horas. Cuando se trata a las células con la alta glucosa durante periodos cortos de tiempo (2 a 16 horas) la concentración de PARP y la poli-ADP-ribosilación de p53 aumentan en la fracción nuclear. A partir de las 24 horas de cultivo, PARP tiende a disminuir al ser fragmentada y permanece inactiva. La N-acetilglucosaminilación de p53 comienza a aumentar en el inicio del tratamiento (4 horas) en la fracción citosólica y a las 24 horas en la mitocondria, lo que coincide con la movilización de p53 a este orgánulo. Nosotros demostramos por primera vez que la alta glucosa induce la apoptosis a través de ERO en las células RINm5F, principalmente a través de la movilización y la fosforilación de p53 en Ser 392 en la mitocondria por la activación de p38 MAPK, lo que probablemente proporciona estabilidad y permite su interacción con las proteínas pro- y/o anti-apoptóticas.

Abstract

Protein p53 is involved in the regulation of cell response at different stimuli. Its function depends on its subcellular location and posttranscriptional changes, as well as its association with other proteins. Under cell stress conditions, p53 is stabilized and activated by posttranslational changes and regulates cell fate (DNA repair, adaptation to stress or apoptosis). p53 has 12 Ser and 3 Thr residues that can suffer phosphorylation; 1 Ser residue can be N-acetylglucosaminylated, additionally, 2 Glu and 1 Asp residues are poly-ADP-ribosylated as a response to several stimuli such as: hyperglycemia and oxidative stress, among others. Chronic hyperglycemia, leads to activation of several signaling pathways such as the ones mentioned above, that change the physical and chemical features of proteins, such as p53. The aim of this study was to analyze the expression, subcellular distribution, phosphorylation, poly-ADP-ribosylation and N-acetylglucosaminylation of p53, in a RINm5F cell culture with high glucose. Results show that high glucose induces apoptosis in RINm5F cells in a time-dependent manner, without any changes of mRNA p53 expression, although alterations occur in intracellular distribution and phosphorylation. The localization and increase in phosphorylation of p53 at Ser 15 and Ser 392 in mitochondria were due to high glucose and correlated with an increase in reactive oxygen species (ROS), a decrease in the Bcl-2/Bax ratio, and an increase in apoptosis. ERK 1/2 phosphorylation decreased with time. In mitochondria, p38 MAPK activation coincided with p53 phosphorylation from 24 to 72 hours. When, cells were treated with high glucose during short periods (2 to 16 hours), PARP concentration and Poly-ADP-ribosylation of p53 in the nuclear fraction increase. At 24 hours, PARP breaks down and remains inactive. N-acetylglucosaminylation of p53 increases at the beginning of treatment (4 hours) in the cytosolic fraction and at 24 hours in the mitochondria, with concurrent mobilization of p53 to this organelle. We demonstrate for the first time that high glucose induces apoptosis via ROS in RINm5F cells, mainly through the mobilization and phosphorylation of p53 at Ser 392 in mitochondria by p38 MAPK activation, which probably provides stability and allows its interaction with pro- and/or antiapoptotic proteins.

Índice

1	Introducción	16
1.1	Características de la diabetes mellitus y sus tipos generales	16
2	Antecedentes	20
2.1	Estrés oxidante en las células β pancreáticas	20
2.2	Características y funciones generales de la mitocondria	21
2.3	Regulación de la apoptosis, las vías extrínseca e intrínseca	25
2.3.1	Vía extrínseca de la apoptosis	26
2.3.2	Vía intrínseca de la apoptosis	26
2.4	Características generales de p53	30
2.5	Funciones y genes regulados por p53	32
2.5.1	Arresto del ciclo celular y reparación del DNA	32
2.5.2	Apoptosis y genes regulados por p53	33
2.5.3	Regulación de la apoptosis por p53 independiente de transcripción	34
2.6	Regulación de p53 por ubiquitinación	35
2.7	Modificaciones postraduccionales de p53	37
2.7.1	Fosforilación	38
2.7.2	Poli-ADP-ribosilación	40
2.7.3	Glucosaminilación y glicación	41
2.8	Regulación de la apoptosis de células β en DT2 por p53	43
3	Planteamiento del problema	47
4	Hipótesis	48

5	Objetivo General	49
5.1	Objetivos particulares	50
6	Materiales y Métodos	51
6.1	Reactivos	51
6.2	Cultivo de células RINm5F	51
6.3	Expresión de p53	52
6.4	Determinación de la viabilidad y apoptosis celular	56
6.5	Detección de especies reactivas de oxígeno (ERO)	57
6.6	Obtención de las fracciones subcelulares	58
6.7	Determinación de los cambios postraduccionales de p53	59
6.8	Inhibición de la fosforilación de p53 por p38 MAPK	61
6.9	Análisis estadístico	61
7	Resultados	62
7.1	La alta glucosa disminuye la viabilidad, aumenta el daño al DNA, la apoptosis y la producción de ERO en las células RINm5F.	62
7.2	Efecto de la concentración alta de glucosa sobre la relación Bcl-2/Bax, liberación del citocromo c y activación de caspasa 3.	64
7.3	Disminución de la fosforilación de ERK y CREB por efecto de la alta glucosa.	66
7.4	Expresión y distribución de p53 en células RINm5F cultivadas con alta glucosa.	68
7.5	Fosforilación de p53 y ATM en núcleo	70
7.6	Fosforilación de p53 y p38 MAPK en células RINm5F cultivadas con alta glucosa.	72
7.7	El SB203580 inhibe la fosforilación de p53 en Ser 392 y Ser 15, así como la liberación de citocromo c por alta glucosa.	74
7.8	Análisis de la interacción de p53 con la proteína Bcl-2 por efecto de la alta glucosa en células RINm5F	76
7.9	Colocalización mitocondrial de fosfo p53Ser392 y fosfo p38 MAPK por microscopía confocal	78

	7.10 Análisis de poli-ADP-ribosilación de p53 y de PARP durante la apoptosis por alta glucosa	80
	7.11 Análisis de N-acetilglucosaminilación de p53 por efecto de la alta glucosa en células RINm5F	82
8	Discusión	83
9	Conclusiones	92
10	Bibliografía	93
11	Premios y distinciones	105
12	Difusión de resultados	106

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Características de la diabetes mellitus y sus tipos generales

La diabetes es un grave problema de salud pública en el ámbito mundial, particularmente en los países en vías de desarrollo o de reciente industrialización, debido al aumento en su incidencia. La Federación Internacional de Diabetes (FID) publicó en el Diabetes Atlas, 2011 que el número de personas con diabetes en el mundo fue de 366 millones y pronosticó que aumentará a 552 millones en el año 2030 (Diabetes Atlas, 2011).

En México, los datos presentados por la Encuesta Nacional de Salud del 2000, estimaron que existen alrededor de 3.6 millones de mexicanos mayores de 20 años que padecen diabetes con prevalencia del 7.5%, ligeramente mayor en las mujeres que en los hombres a partir de los 50 años. En México y en la mayoría de los países la diabetes es la causa más frecuente de ceguera, insuficiencia renal terminal, amputaciones no traumáticas e incapacidad prematura (Olaiz-Fernández y col., 2007).

De conformidad con la información de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT, 2006) la prevalencia de diabetes aumentó a 14%, lo que representa un total de 8 millones de personas con diabetes; siendo la población urbana la más afectada. En México, la diabetes mellitus ocupa el primer lugar en número de defunciones por año, tanto en hombres como en mujeres las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente en ambos con más de 70 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales. Cabe señalar que según la Dirección General de Información en Salud en el 2007 hubo un número mayor de defunciones en el grupo de las mujeres (37,202 muertes) comparado con el de los hombres (33,310), con una tasa 69.2 por 100,000 habitantes en mujeres y de 64 en hombres, diferencias importantes a considerar en las acciones preventivas, de detección, diagnóstico y tratamiento de este padecimiento. La diabetes mellitus es un factor de riesgo cardiovascular, se estima que entre 7 y 8 de cada 10 personas con diabetes mueren por problema macrovascular. Cada hora se diagnostican 38 nuevos casos de diabetes. Cada dos horas mueren 5 personas a causa de

complicaciones originadas por la diabetes. México ocupa el décimo lugar en diabetes mundial y se estima que para 2030 ocupe el séptimo puesto (ENSANUT, 2006; Diabetes Atlas, 2011).

La diabetes comprende un grupo heterogéneo de enfermedades metabólicas caracterizadas por desordenes hiperglucémicos con dependencia genética, que afecta el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, bien por falta de secreción de insulina o por disminución de la sensibilidad tisular a esta hormona. Los síntomas de la hiperglucemia crónica en la diabetes incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, en ocasiones con polifagia y visión borrosa. La diabetes está asociada a complicaciones a largo plazo como retinopatía, neuropatía y problemas vasculares, siendo las causas principales de muerte asociadas con esta enfermedad, la falla renal, gangrena e infarto al miocardio (ECDCDM, 2003; ADA, 2004).

La mayoría de los casos de diabetes caen en dos amplias categorías, diabetes tipo 1 (DT1) y tipo 2 (DT2) (Cuadro I). En la DT1 se presenta un proceso autoinmune que provoca la destrucción progresiva y selectiva de las células β pancreáticas, lo que conlleva a una deficiencia absoluta de insulina. La DT2 abarca alrededor del 90% de los casos, en la mayoría, involucra un estado prediabético con una menor sensibilidad de los tejidos efectores a las acciones de la insulina, que lleva a fallas para internalizar la glucosa en respuesta a concentraciones normales de esta hormona (resistencia a la insulina). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad sobrevienen cuando las células β son incapaces de producir la cantidad extra de insulina para contrarrestar la resistencia a esta hormona (Lebovitz, 1999).

La DT2 es la más frecuente en la población mundial y en particular en la población mexicana. La obesidad es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de esta enfermedad. Actualmente se reconoce que la DT2 en niños se está convirtiendo en un problema de salud pública mundial, claramente vinculado al aumento de la prevalencia de sobrepeso, obesidad y falta de ejercicio (Zimmet P., 2001; Hamman y col., 2006; Alberti y col., 2007).

Cuadro I. Clasificación de la Diabetes

Tipo de Diabetes	Características
1	<ul style="list-style-type: none">- Destrucción total de células β- Mediada por inmunidad idiopática
2	<ul style="list-style-type: none">- Resistencia a la Insulina- Destrucción parcial de células β
Otros tipos específicos	<ul style="list-style-type: none">- Defectos genéticos en la función de la célula β- Defectos genéticos de la insulina- Endocrinopatías- Inducida por químicos o fármacos- Asociada a infecciones
Diabetes gestacional	

(ADA, 2004).

La DT2 se desarrolla como resultado de la disminución progresiva tanto de las funciones como de la masa de células β y de la secreción de insulina por lo que no se puede compensar la resistencia a la insulina. El déficit de la masa de este tipo de células en la DT2 se debe a un incremento de la tasa de apoptosis (Pick y col., 1998; Butler y col., 2003).

La apoptosis es una forma de muerte celular que se presenta tanto en situaciones fisiológicas como patológicas en organismos multicelulares y constituye un mecanismo común de replazamiento celular, remodelación del tejido y renovación de células dañadas. La apoptosis es un proceso complejo caracterizado por encogimiento celular, condensación de la cromatina, fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos (figura 1). Las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas por células vecinas o macrófagos, previniendo así una reacción inflamatoria (Chandra y col., 2001).

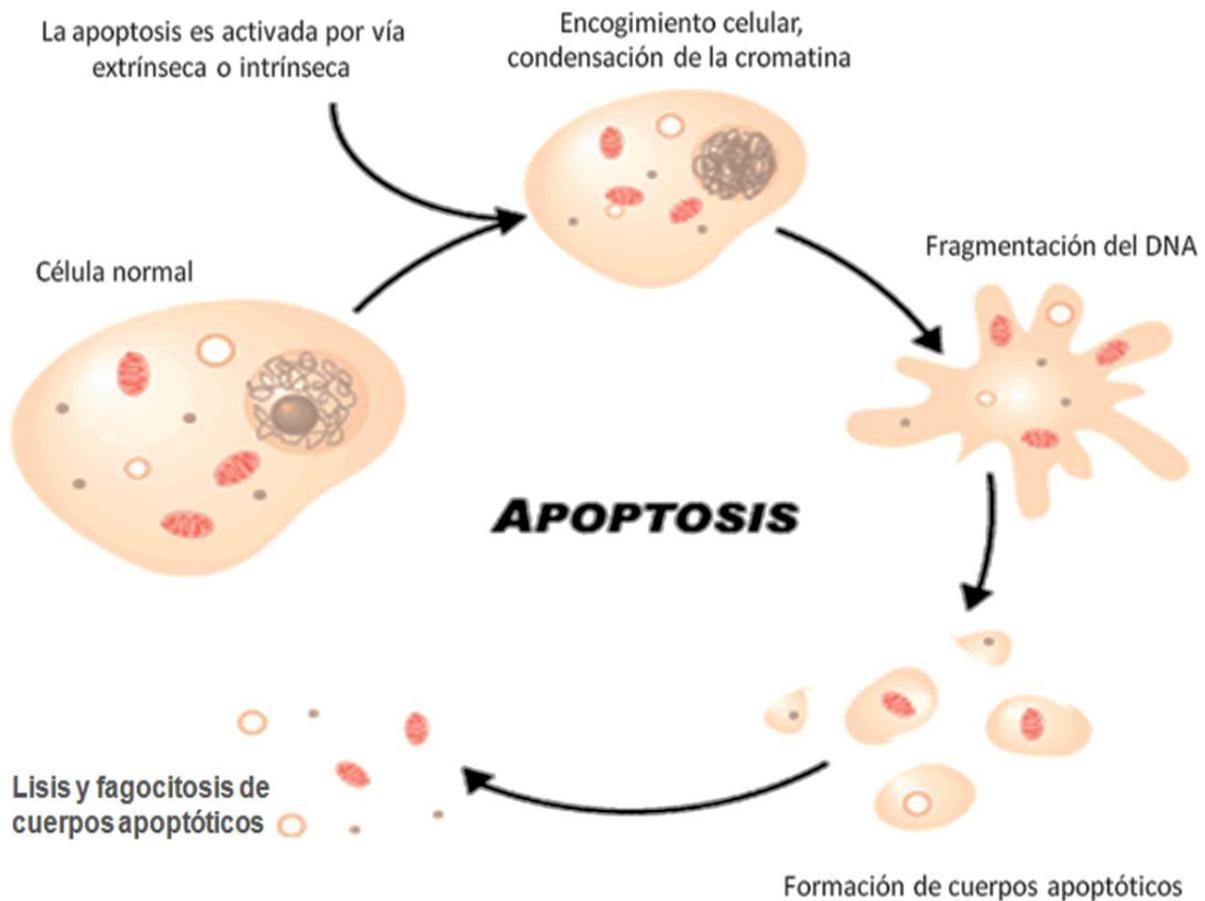


Figura 1. Muerte celular por apoptosis. La apoptosis se define como un mecanismo fisiológico de muerte programada, caracterizado por eventos morfológicos, bioquímicos y moleculares distintivos que requieren una regulación coordinada de genes específicos. Entre las características morfológicas de la apoptosis se puede observar: condensación temprana de la cromatina y desintegración nucleolar, que lleva a la formación de masas de cromatina perinuclear y a la disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma y de organelos (excepto mitocondrias y ribosomas) y alteraciones del citoesqueleto, que llevan a un encogimiento celular. De igual manera ocurre la fragmentación intranuclear del DNA y la pérdida sistemática de diferentes sustratos vitales ambas por efecto de proteasas específicas como caspasas. Todo esto lleva a la fragmentación de la célula, formando pequeñas vesículas llamadas cuerpos apoptóticos aún rodeados de membrana; la cual cambia su composición dándose una translocación de la fosfatidilserina a su superficie la cual sirve de señal de reconocimiento para macrófagos y así los cuerpos son rápidamente fagocitados (Golstein y col., 2003).

La destrucción de las células β pancreáticas en cultivo con concentraciones elevadas de glucosa, se ha asociado a la activación de la apoptosis (Donath y col., 1999; Mandrup-Poulsen, 2001); por lo que los estudios encaminados a detener la apoptosis pueden ser de gran importancia en la prevención y manejo de la diabetes.

2 Antecedentes

2.1 Estrés oxidante en las células β pancreáticas

El paciente diabético descompensado presenta un estado de hiperglucemia crónica que favorece la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) y un estado de estrés oxidante, el cual es considerado como un elemento fundamental en el desarrollo de diversos cambios fisiopatológicos relacionados con algunas de las complicaciones crónicas de la diabetes (Brownlee, 2001).

El estrés oxidante es el desbalance entre la producción de ERO y los antioxidantes que pueden contender con dichas especies. El origen del estrés oxidante en las células β por hiperglucemia, se atribuye principalmente a la interacción del oxígeno molecular con los electrones no apareados producidos vía respiración mitocondrial, lo que resulta en la formación de ERO, como el anión superóxido, el ión hidróxilo y el peróxido de hidrógeno (Brownlee, 2001; Du y col., 2000). Sumado a esto el aumento de Ca^{2+} intracelular necesario para la exocitosis de la insulina, también contribuye a la formación de ERO; éstas moléculas se proponen como responsables de la disfunción de las células β y de las alteraciones en la síntesis y secreción de insulina, (Gottlieb, 2000) así como de la acumulación de metabolitos altamente reactivos capaces de unirse a proteínas y generar estrés oxidante (Grankvist y col., 1981).

Se ha propuesto que el aumento en la producción de ERO constituye uno de los mecanismos que ocurre durante los eventos tempranos de la intolerancia a la glucosa siendo la posible causa de la disfunción de las células β en la diabetes tipo 2 (Sakai y col., 2003). Las células β pancreáticas son altamente sensibles al estrés oxidativo (Marshak, 1999). Estudios *in vitro* han demostrado que las ERO producidas a través de las reacciones de glicación inducen apoptosis en las células β ; otros estudios en los que se utilizaron animales db/db diabéticos y no diabéticos los cuales tuvieron una alimentación suplementada con antioxidantes, demostraron que la hiperglucemia *in vivo*, participa de manera importante en la disminución de las células β

por apoptosis durante la diabetes tipo 2 (Donath y col., 1999). La hiperglucemia crónica puede también dañar la función de las células β a nivel de síntesis y de secreción de insulina. Cuando una línea celular derivada de células β es expuesta a concentraciones altas de glucosa por un período de tiempo largo, la transcripción del gen de la insulina y el contenido de la misma se reducen dramáticamente (Kaneto y col., 1999).

El aumento de apoptosis en las células β tiene un papel muy importante en la aparición y el desarrollo de DT2. Entre los posibles mecanismos que explican el incremento en la tasa de apoptosis en las células β , destaca el incremento en la producción de ERO derivados de la hiperglucemia crónica. Otra consecuencia de la hiperglucemia es la elevación de Ca^{2+} intracelular. Estudios realizados con islotes pancreáticos humanos bajo condiciones de hiperglucemia, demostraron un aumento en las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} , efecto que persiste aún después de normalizar los niveles de glucosa. El aumento persistente de Ca^{2+} puede disparar apoptosis y por lo tanto conducir a un deterioro irreversible de la función de la célula β . En este estudio también observaron que después de 48 horas, se inhibe completamente la secreción de insulina en respuesta a la glucosa, y que esta se acompaña de profundas alteraciones en el flujo de Ca^{2+} (Grill y Björklund, 2001). Es probable que enfoques terapéuticos diseñados para controlar la apoptosis, pudieran ser un importante desarrollo contra la DT2, ya que este enfoque podría revertir la enfermedad y no sólo paliar la glicemia (Butler y col., 2003).

2.2 Características y funciones generales de la mitocondria

Las mitocondrias, del griego mito (hilo) y chondros (cartílago), son organelos citoplasmáticos de aspecto filiforme, con un diámetro comprendido entre 0,5 y 1 μm , con funciones que engloban desde el abastecimiento energético en forma de ATP a la célula, hasta la regulación citoplasmática de los niveles de segundos mensajeros, como el ión Ca^{2+} y las ERO. Su capacidad de asociación a microtúbulos las convierte en orgánulos móviles y plásticos, capaces de desplazarse por el citoplasma y adquirir la morfología y localización celular más

adecuadas, para que el aporte energético celular sea lo más eficiente posible (Bereiter-Hahn, 1990).

En los últimos años, este organelo se está considerando como el lugar donde convergen diferentes vías de señalización apoptótica (Green y Reed, 1998; Kroemer y Reed, 2000) y que, gracias a la capacidad de regulación de la permeabilidad de sus membranas, controla la liberación al citoplasma de señales capaces de activar cascadas proteicas que conducen a la muerte celular.

Las mitocondrias presentan una estructura con dos compartimentos bien definidos, matriz y espacio intermembranal, delimitados por dos membranas, interna y externa, con características morfológicas y funcionales muy diferentes. En la matriz se localizan varias copias del genoma circular mitocondrial, los ribosomas y numerosos complejos enzimáticos necesarios tanto para las funciones energéticas, como para la expresión y la replicación de genes (Gray y col., 1999). En el espacio intermembranal se localizan las enzimas que median el tránsito de sustancias entre la matriz mitocondrial y el citosol, y alguno de estos complejos presenta actividad de cinasa. Del mismo modo, sus membranas ofrecen también diferencias significativas. La membrana interna se caracteriza morfológicamente por presentar unas invaginaciones denominadas 'crestas', con multitud de complejos enzimáticos y proteínas que regulan el paso de metabolitos, como el translocador de nucleótidos de adenina (ANT, del inglés adenine nucleotide translocator). La membrana mitocondrial interna resulta especialmente impermeable a iones gracias a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina, característica esencial que le permite soportar un gradiente electroquímico necesario para el desempeño de la función energética. Por el contrario, la membrana externa carece de crestas mitocondriales y, en condiciones fisiológicas, es permeable al paso de iones y de metabolitos con pesos moleculares de hasta a 10000 Da debido a la presencia de la proteína porina, conocida en la actualidad como canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, del inglés, voltage dependent anion channel) (Gordon y col., 2000).

La estructura mitocondrial permite el paso regulado de proteínas mediante procesos controlados por unos complejos proteicos transmembranales TIM (del inglés, translocase of the inner membrane) en la membrana interna y TOM (del inglés, translocase of the outer membrane) en la externa que son capaces de discriminar entre aquellas proteínas que deben dirigirse a la matriz y las que lo harán hasta el espacio intermembranal (Neupert, 1997); en este proceso intervienen algunos miembros de la familia de las chaperonas que se inducen por calor (HSP, del inglés heat shock proteins), como la HSP 70 y la HSP 60 (Schatz y Dobberstein, 1996).

Una de las principales características fisiológicas de la mitocondria es la generación de un potencial de membrana a través de su membrana interna, como consecuencia directa de reacciones bioquímicas que constituyen la cadena respiratoria, en la que participan como sustratos el piruvato, algunos aminoácidos, y los productos de la β -oxidación de los ácidos grasos que entran al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y mantienen el estado reducido de las coenzimas dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) y dinucleótido de adenina-flavina reducido (FADH₂). La cadena respiratoria aporta los electrones que eventualmente son transferidos al oxígeno, también se transfieren protones que cruzan la membrana interna mitocondrial, los cuales generan un gradiente que se expresa como potencial de membrana mitocondrial, con un valor entre 150 - 180 mV, con carga negativa con respecto al citosol. La energía de este potencial es utilizada para la producción de ATP (Gottlieb, 2000).

El flujo de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial se lleva a cabo por 4 complejos enzimáticos anclados a la membrana, junto con el citocromo c y la ubiquinona Q (CoQ). El NADH proveniente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos dona electrones al complejo I, éste a su vez los transfiere a la CoQ, la cual puede también ser reducida por los electrones donados por varias deshidrogenasas que contienen FADH₂, como la succinato-ubiquinona reductasa (complejo II). Los electrones de la CoQ son transferidos al complejo III. Posteriormente pasan a través del citocromo c, al complejo IV y finalmente al oxígeno molecular. La transferencia de electrones a través de los complejos I, III y IV generan un

gradiente de protones (voltaje), gran parte de la energía de este gradiente, es utilizada para producir ATP a través de la ATP sintasa (complejo V). Así mismo esta energía puede ser disipada en forma de calor a través de las proteínas desacoplantes (UCPs). Cuando hay una sobrecarga de protones, el transporte de electrones en el complejo III se inhibe parcialmente y promueve el retorno de electrones a la coenzima Q y su donación al oxígeno molecular, facilitando así la producción del anión superóxido (figura 2) (Saraste, 1999; Gottlieb, 2000).

De forma adicional a la provisión de ATP, la mitocondria participa en eventos importantes de la fisiología celular. Estos incluyen vías de transducción como la secreción de insulina en respuesta a glucosa por las células β (figura 2). Hace un par de décadas se observó que su presencia era necesaria para la inducción de muerte celular programada, por lo que actualmente se sitúa a la mitocondria como el punto donde convergen diferentes vías de señalización apoptótica. En este organelo los cambios en la permeabilidad de sus membranas, controlan la liberación de diversas proteínas que activan diferentes rutas de señalización necesarias para la inducción de la muerte programada de la célula (Sakai y col., 2003).

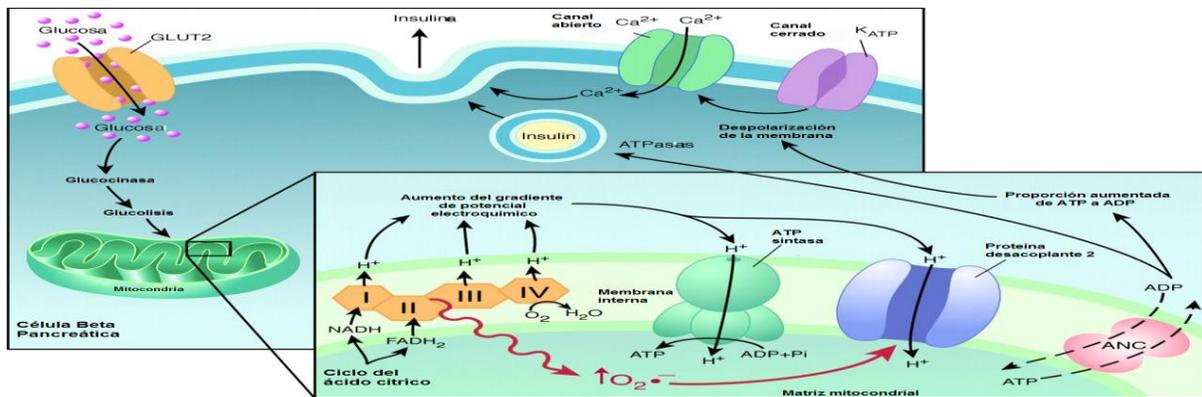


Figura 2. Características y funciones de las mitocondrias. Las mitocondrias están formadas por una doble membrana (externa e interna) que limita un espacio intermembranoso y una matriz mitocondrial. La membrana externa es lisa pero la interna forma unos pliegues o crestas, que aumentan su superficie y permiten que se distribuyan en ellas muchas proteínas enzimáticas y de transporte, entre ellas, las que forman los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria destinados a la producción de energía. El metabolismo aeróbico de las mitocondrias permite la oxidación de la glucosa y ácidos grasos para la generación de ATP y otros intermediarios que se utilizan en el citosol para varios procesos biosintéticos y de secreción. En las células β pancreáticas los carbonos de la glucosa son canalizados a la mitocondria donde se generan las señales para el inicio y potenciación de la secreción de insulina. La resistencia a la insulina en los pacientes con DT2 se asocia con una disfunción mitocondrial (Wiederkehr y Wollheim, 2006).

2.3 Regulación de la apoptosis, las vías extrínseca e intrínseca

La apoptosis constituye un mecanismo esencial para la eliminación selectiva de las células y participa de manera integral en diversos eventos biológicos (DeLong, 1998). El proceso de apoptosis incluye la activación de caspasas, una familia de proteasas con una cisteína en su sitio activo y que son clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica en respuesta a diversos estímulos. Estas existen como zimógenos (proenzimas) en el citoplasma, retículo endoplásmico, mitocondria y matriz nuclear de la mayoría de las células (Nicholson y Thornberry, 1997). Hay dos vías básicas por las que se puede iniciar la apoptosis: la extrínseca y la intrínseca, ambas incluyen la activación de caspasas (figura 3).

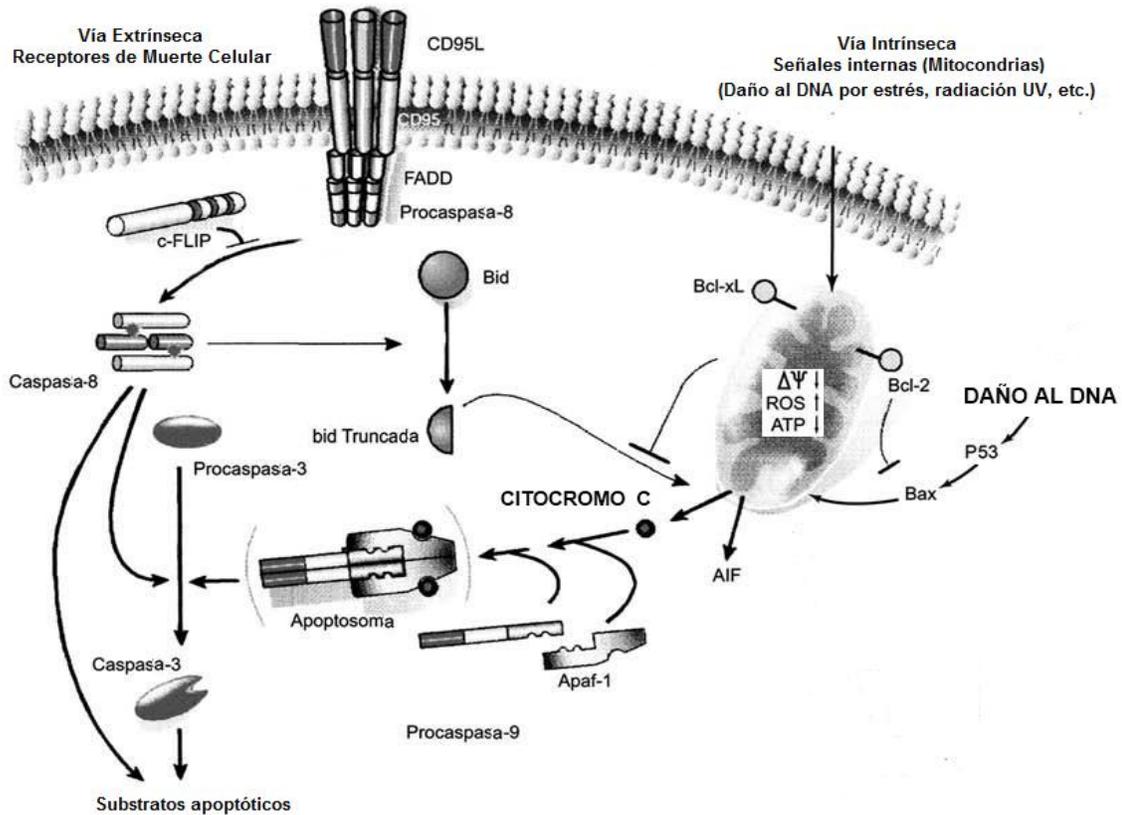


Figura 3. Vías de la apoptosis. Existen dos principales rutas de señalización mediante las cuales una célula se vuelve apoptótica: La vía extrínseca inicia por la unión de ligandos específicos a receptores de muerte en la superficie celular. Ésta interacción lleva a la activación de caspasa 8 quien comienza una cascada de activación de otras moléculas llevando a la muerte celular. La otra vía corresponde a la intrínseca, que inicia a nivel mitocondrial y que lleva a la conformación del apoptosoma, un complejo de proteínas que conduce a la activación de la caspasa 9, quien inicia la cascada que llevará a la muerte por apoptosis (Schulze-Bergkamen y Kramer, 2004).

2.3.1 Vía extrínseca de la apoptosis

En este caso, la apoptosis es inducida por receptores de muerte que pertenecen a la superfamilia génica de receptores del TNF (factor de necrosis tumoral). Los mejor caracterizados son el receptor Fas, también conocido como CD95 (cytotoxicity-dependent protein 95) o APO-1 (apoptosis-1 protein), y el receptor del TNF (TNFR). Tienen en común una secuencia homóloga denominada dominio de muerte (death domain o DD), capaz de iniciar la cascada de eventos que llevan a la apoptosis. Los ligandos para estos receptores pertenecen a la familia del TNF, y son el ligando Fas y el TNF. Estos ligandos, que normalmente existen en forma trimérica, se unen a sus receptores induciendo también su trimerización y así activándolos. El receptor Fas activado recluta moléculas adaptadoras como el FADD/MORT-1 (Fas-associated death domain / mediator of receptor-induced toxicity-1), que contiene también un dominio de muerte (DD) que se une al análogo del receptor Fas y un dominio efector de muerte (DED) que se une a un dominio análogo de la procaspasa 8. Esta enzima, también conocida como FLICE (FADD like IL-1 β -converting enzyme), experimenta activación autocatalítica al unirse a FADD convirtiéndose en caspasa 8 activa (Peter y Krammer, 1998). El complejo que forman Fas, FADD y FLICE se denomina DISC (death-inducing signaling complex). La caspasa 8 rompe y activa otras caspasas efectoras como la 3, 6 y 7, que finalmente liberan una variedad de otras proteínas celulares involucradas en la proteólisis y degradación del DNA. En el caso de los receptores del TNF (TNFR-I y el TNFR-II), la molécula adaptadora que reclutan es TRADD (TNFR-associated death domain), que a su vez sirve de plataforma para el reclutamiento de otros adaptadores como FADD, TRAF-2 (TNFR associated factor-2) y el RIP (receptor interactive protein). El complejo formado activa las caspasas reguladoras y efectoras, igual que lo hacía el receptor Fas (Sakahira y col., 1998).

2.3.2 Vía intrínseca de la apoptosis

La segunda vía inicia con señales internas y se enfoca en las mitocondrias (ver figura 4). Existen zonas de contacto entre las membranas mitocondriales, las denominadas ‘zonas densas’, cuyos componentes proteicos son capaces de interactuar y dar lugar a la formación

de un canal, el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), del que también forman parte proteínas del citoplasma y de la matriz mitocondrial (Johnson y col., 1999).

El PTP es un complejo multiproteico que se forma en las zonas de unión entre las membranas interna y externa de la mitocondria. En él participan proteínas de localización citoplasmática (hexocinasa), de membrana externa (VDAC), de membrana interna (ANT) y de matriz mitocondrial (ciclofilina D) (Johnson y col., 1999). En condiciones fisiológicas, los diferentes componentes del PTP se encuentran disgregados (Crompton, 2000). De esta forma, el VDAC contribuye a la permeabilización de la membrana externa, el ANT controla el paso de manera específica de las distintas formas fosforiladas y no fosforiladas de nucleótidos de adenina a través de la membrana interna, y la ciclofilina D presenta una actividad peptidil-propil isomerasa, la cual resulta crucial para el plegamiento de proteínas (Andreeva y col., 1999). Cuando un estímulo apoptótico alcanza la mitocondria, los diferentes componentes proteicos pueden ensamblarse formando un poro de un radio de 1,0 a 1,3 nm que permite el paso de moléculas de un tamaño inferior a 1.5 kDa de forma no selectiva. Su apertura produce la permeabilización de las membranas mitocondriales, contribuyendo, por lo tanto, a:

- La disipación del gradiente proteico entre citoplasma y matriz, que se encuentra decantado en condiciones fisiológicas hacia esta última.
- La desregulación de la mitocondria y la pérdida del potencial transmembranal ($\Delta\psi_m$), debido a un aumento de la osmolaridad de la matriz
- El hinchamiento de la mitocondria, debido a la entrada de agua, que producirá la rotura de la membrana externa, liberando moléculas del espacio intermembranal al citoplasma.

Se han caracterizado un total de 79 componentes de naturaleza peptídica que se liberan durante la apertura del PTP. Entre estos componentes se incluyen enzimas catabólicas, endocepina y multitud de iones y moléculas con conocida actividad proapoptótica, como citocromo c, Smac/DIABLO, apaf-1, factor inductor de apoptosis (AIF, del inglés apoptosis-

inducing factor) y algunos miembros de la familia de las caspasas, como caspasa-2 y caspasa-9 (Marchenko y col., 2000; Lemaster y col., 2002). Una vez liberados al citoplasma, estos agentes pueden activar diferentes rutas de ejecución apoptóticas. El AIF desencadena procesos de condensación de la cromatina y fragmentación del DNA, de una forma independiente a la activación de caspasas (Susin y col., 1999). Se ha observado que las proteínas proapoptóticas Bax y Bak aceleran la apertura de los canales VDAC y permiten la salida de citocromo c, mientras que las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL cierran estos canales por unión directa con Bax y Bak (Tsujimoto y Shimizu, 2000). El citocromo c liberado hacia el citosol favorece la activación del factor activador 1 de la proteasa apoptótica (Apaf-1). Apaf-1 se puede oligomerizar en presencia de citocromo c y dATP, los oligómeros reclutan a la procaspasa 9 usando el dominio de reclutamiento de Apaf-1 formando de esta manera el apoptosoma. La caspasa 9 madura es liberada desde el complejo y activa otras caspasas, como la caspasa 3, que conduce al inicio de la cascada proteolítica esencial para la apoptosis (Marchenko y col., 2000; Chandra y col., 2001; Garrido y col., 2006).

Se ha observado que los oxidantes y los aumentos patológicos de Ca^{2+} citosólico pueden también inducir la ruptura de la membrana externa de la mitocondria, causando la liberación de citocromo c. El estrés oxidante ha sido citado como otro mediador crítico de la muerte celular que puede desencadenar o modular la apoptosis. Se ha visto que el papel proapoptótico de las ERO es a través de alteraciones de la función mitocondrial, causando la liberación de citocromo c (Hampton y Orrenius, 1997; Garrido y col., 2006).

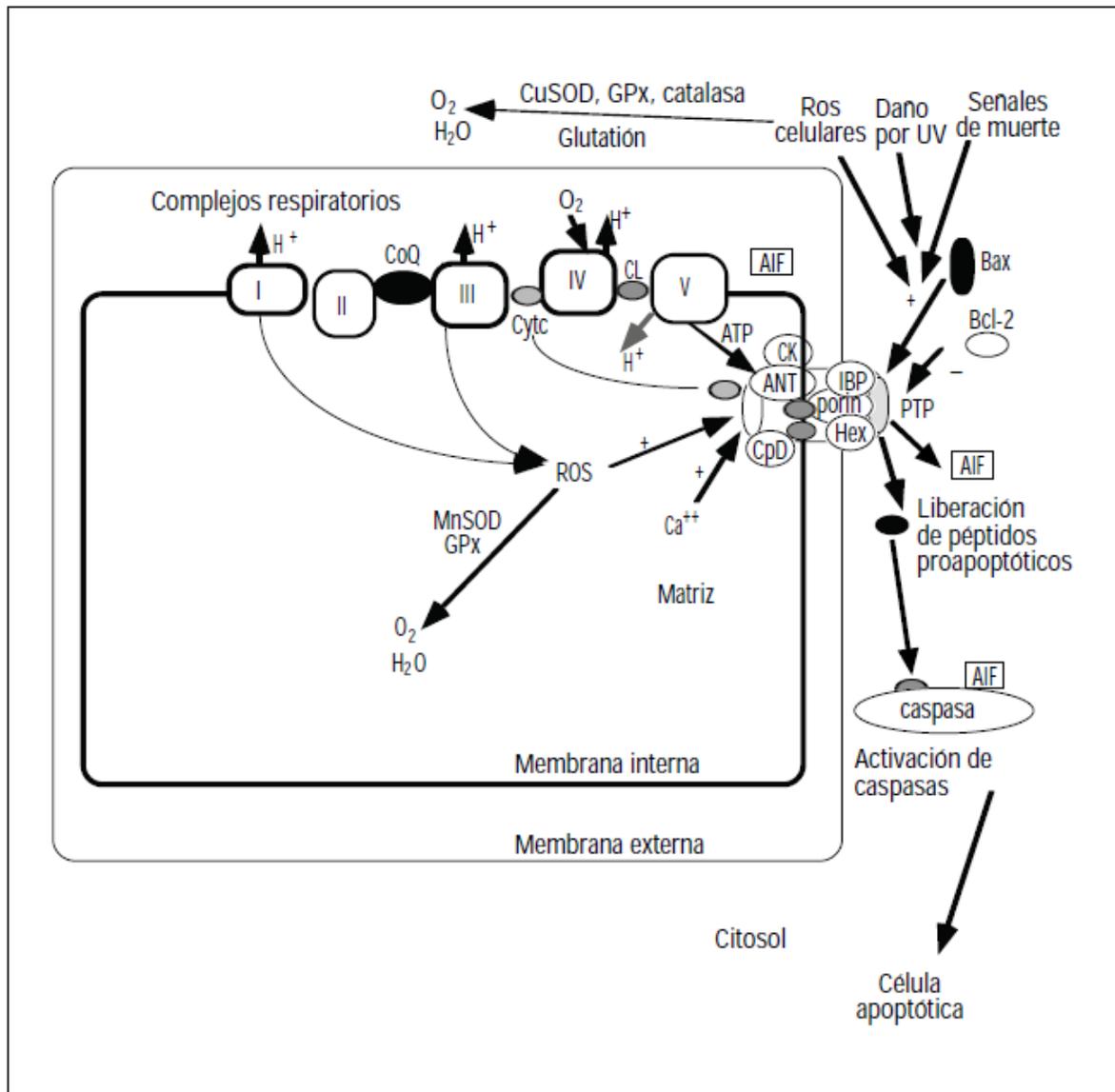


Figura 4. Vía mitocondrial de la apoptosis. Las señales celulares por ERO, o daño del DNA inducido por UV, y una variedad de señales de muerte, desencadenan la vía apoptótica a través de la modulación de la unión de proteínas proapoptóticas (como Bax) al poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), provocando su apertura. Como se observa, los valores elevados de calcio mitocondrial, así como la producción excesiva de ERO (generados en los complejos respiratorios I y III) también promueven la apertura del PTP. Este fenómeno se continúa con la liberación de citocromo c y del factor inductor de apoptosis (AIF) desde la mitocondria al citosol, con la consiguiente activación de caspasas que inician la autodigestión celular y la fragmentación del DNA nuclear, provocando la apoptosis celular. La asociación de Bax a la mitocondria se previene por la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl-2. La neutralización de ERO ocurre en los 2 lugares intramitocondriales por las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) y glutatión peroxidasa (GPx), y en citosol por la CuSOD, GPx y catalasa. También se representan las principales proteínas de que consta el PTP, en los lugares de unión de las membranas mitocondriales interna y externa, como la hexocinasa (Hex), la translocasa de los nucleótidos de adenina (ANT), la creatincinasa (CK), la ciclofilina D (CpD), la porina (VDAC) y el receptor de benzodiazepinas (IBP), así como el fosfolípido de la membrana interna cardiolipina (CL) (Marín-García y Goldenthal, 2002).

Durante el inicio del proceso de apoptosis se observa la translocación de proteínas de señalización y moléculas efectoras entre el núcleo, el citoplasma y las mitocondrias. De particular interés resulta la movilización de proteínas proapoptóticas hasta la mitocondria promoviendo la disfunción de este organelo, en este grupo se encuentra la proteína p53 (Moll y Zaika, 2001; Ito y col., 2004).

2.4 Características generales de p53

La proteína p53 se conoce como el “guardián del genoma” y los resultados biológicos de su activación incluyen la regulación del ciclo celular, inducción de apoptosis, desarrollo, diferenciación, recombinación del DNA, segregación cromosómica y envejecimiento celular. En la rata, p53 es una proteína de 391 aminoácidos y está codificada por un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 10, en la banda 24 (10q24), tiene una longitud de 12 kb y está compuesto de 10 exones y 9 intrones (Hulla y Schneider, 1993). En el humano p53 es una proteína nuclear con un peso molecular de 53 kDa, codificada por un gen de 20 kb (figura 5) que contiene 11 exones y 10 intrones y que está localizado en el brazo corto del cromosoma 17, banda 13 (17p13). Este gen pertenece a una familia de genes altamente conservada que incluye a los genes p63 y p73 (Bai y Zhu, 2006).

La proteína p53 en el humano contiene 393 aminoácidos y se compone de tres dominios funcionales (figura 5): un dominio amino-terminal (N-), implicado en la activación transcripcional (residuos 1-70), donde se localiza una sub-región rica en prolina que contiene 5 copias de la secuencia PXXP (residuos 20-97); un dominio central que contiene la zona de unión al DNA específica de secuencia y que es la región más conservada de la proteína (residuos 100-300); y un dominio carboxilo-terminal (C-) donde hay una región flexible (residuos 301-325), una zona de tetramerización (residuos 326-356) y un extremo básico (363-393). La proteína p53 se une al DNA en forma de tetrámero, donde la formación de esta estructura cuaternaria depende de la correcta activación de p53 y de las modificaciones postraduccionales de la región de tetramerización, y es en la formación del tetrámero donde juega un papel esencial la región C-terminal (Ahn y Prives, 2001).

El dominio N-terminal se requiere para la actividad de transactivación e interactúa con varios factores de transcripción incluyendo a Mdm2, una ligasa E3 de ubiquitina. La región central se compone principalmente por el dominio de unión al DNA requerido por una secuencia específica de DNA. La región C-terminal básica de p53 es considerada como un regulador negativo ya que en el estado de latencia de p53, ésta región se pliega sobre el dominio central evitando de esta forma su unión al DNA. Esta interacción se rompe por modificaciones postraduccionales como fosforilación y acetilación, y provoca que el dominio central quede activo y aumente la actividad transcripcional por p53 (Ahn y Prives, 2001; Bai y Zhu, 2006).

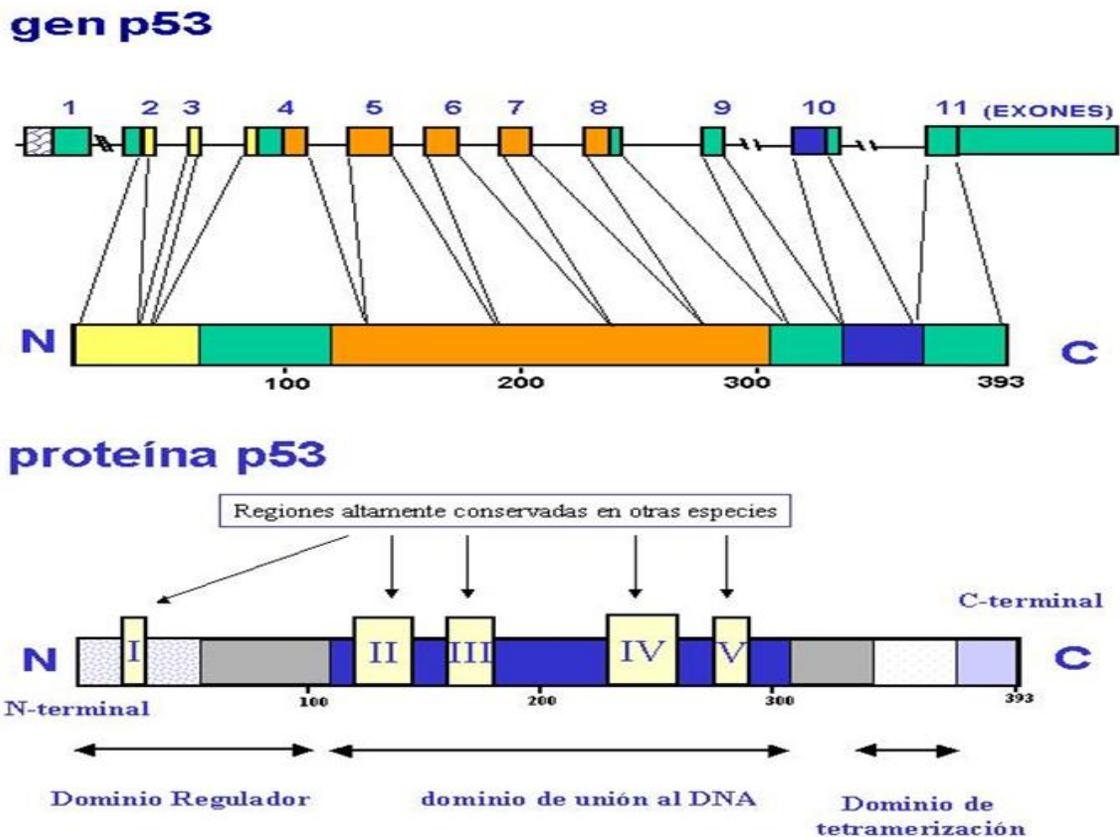


Figura 5. Estructura del gen p53 y dominios funcionales de la proteína p53. El gen que codifica la proteína p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y está constituido por 10 intrones y 11 exones, de los cuales el exón 1 contiene una secuencia no codificante; en el exón 2 existen dos sitios de inicio de la transcripción y el exón 11 contiene el codón de terminación y una gran secuencia no codificante. La proteína p53 presenta 5 regiones evolutivamente conservadas y esenciales para su función normal. La proteína incluye varios dominios, tales como la región ácida N-terminal para la transactivación, el dominio central que contiene una secuencia de unión al DNA y el dominio C-terminal que tiene propiedades reguladoras.

2.5 Funciones y genes regulados por p53

La activación de p53 involucra un incremento a nivel transcripcional, así como cambios cualitativos a través de una amplia modificación postraducciona, que resulta en la activación de genes blanco. Los genes activados por p53 tienen diversas funciones y constituyen efectores corriente abajo de vías de señalización mencionadas anteriormente (Olsson y col., 2007).

En respuesta a distintos estímulos extracelulares e intracelulares, como el daño al DNA, p53 se activa y desencadena diversas respuestas biológicas. Tras el daño celular se produce un rápido incremento en los niveles de p53 en la célula; este aumento se debe principalmente a cambios en la vida media de la proteína a través de una amplia modificación postraducciona, y al aumento en la traducción de su RNAm, que resulta en la activación de sus genes blanco. Muchas de las funciones de p53, incluyendo su papel primario en la supresión de tumores, pueden atribuirse a su capacidad para regular la expresión de genes que modulan diversos procesos celulares, aunque las interacciones proteína-proteína pueden también jugar un papel importante en la regulación de p53. En respuesta a varios tipos de estrés, p53 se acumula en el núcleo y se une a sitios específicos en la región reguladora de genes involucrados en la detención del ciclo celular, reparación del DNA y apoptosis (Bai y Zhu, 2006).

2.5.1 Arresto del ciclo celular y reparación del DNA

Los genes activados por p53 provocan diferentes respuestas como puntos de control (checkpoints) del ciclo celular, supervivencia, apoptosis y envejecimiento (Bai y Zhu, 2006). En este grupo de genes se incluyen genes involucrados en la detención del ciclo celular como p21^{WAF1/Cip1} un inhibidor de cinasas dependientes de ciclina (CDK) (Zhang y col., 1994). A través de su efecto negativo sobre varias CDKs, p21 inhibe las transiciones de G1-S y de G2-mitosis. Otros de los genes implicados en la detención del ciclo en G2 son reprimos (Ohki y col., 2000) y *14-3-3σ*, miembros de una familia de proteínas estructurales, que secuestran el complejo ciclina B1-CDK1 fuera del núcleo lo que permite el mantenimiento del bloqueo en

G2 (Laronga y col., 2000). Además de detener el ciclo celular, p53 interviene en procesos de reparación del daño al DNA a través de la regulación de Gadd45, proteína que se une a PCNA (antígeno de proliferación nuclear), subunidad de la DNA polimerasa δ , inhibiendo así la síntesis de DNA (Gottlieb y Oren, 1996). La proteína p53 también regula la transcripción de la unidad R2 de la ribonucleótido reductasa (Tanaka y col., 2000), genes directamente relacionados con la reparación de DNA.

2.5.2 Apoptosis y genes regulados por p53

Una de las funciones de p53 es la de monitorear el estrés celular e inducir apoptosis si es necesario. En tejidos donde los estresores generan daño severo e irrevocable, p53 puede iniciar apoptosis, y eliminar las células dañadas. Existen dos grupos de genes que regulan la apoptosis, los antiapoptóticos como *bcl-2* y los proapoptóticos como *bax* (Yang y col., 1997), ambos pertenecientes a la familia Bcl-2. Los integrantes de esta familia poseen uno o más de los cuatro residuos conservados conocidos como dominios de homología de Bcl-2 (BH1 a BH4). El Bcl-2 y el Bcl-XL, que actúan como inhibidores de la apoptosis poseen BH1, BH2, BH3 y BH4, y los promotores de la apoptosis como Bax, Bak y Bok contienen solamente BH1, BH2 y BH3 (Bai y Zhu, 2006).

Utilizando metodologías de análisis del genoma como arreglos o SAGE (Serial Analysis of Gene Expresión), se han identificado nuevos genes regulados directamente por p53 e implicados en apoptosis. Es el caso de una colección de genes denominados genéricamente como “p53 Induced Genes” (PIGs) algunos de los cuales participan en los procesos de oxidantes. Una idea reciente e interesante sugiere que la apoptosis por p53 es dependiente de la liberación de ERO a través de genes PIGs. Otros genes regulados por p53 son *noxa* y *puma* cuyas proteínas forman parte de una subfamilia denominada “BH3-only” (que contienen solamente dominios BH3), que son importantes inductoras de apoptosis (Wu y Deng, 2002).

Entre los genes que pueden ser reprimidos por p53 se incluyen *bcl-2*, *bcl-XL*, *ciclina B1*, *map4* y *survivina*, algunos de los cuales son reguladores negativos de apoptosis (Bai y Zhu, 2006).

Por otro lado, p53 también regula genes implicados en rutas de apoptosis vinculadas con receptores de muerte celular. El receptor de muerte CD95 (Fas/APO-1) que media la apoptosis por su interacción con el ligando FasL. La vía de apoptosis a través del receptor Fas está relacionada con la transformación tumoral y es regulada por p53, detectándose elementos de respuesta a p53 en la región promotora del gen *fas* (Müller y col., 1998).

2.5.3 Regulación de la apoptosis por p53 independiente de la transcripción

Una función alternativa de p53 es la regulación de la apoptosis a través de mecanismos independientes de la transcripción (Caelles y col., 1994). Se ha demostrado que en respuesta a múltiples estímulos de muerte, una fracción de p53 se transloca a la mitocondria (Sansome y col., 2001), donde puede interactuar físicamente e inhibir a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL y a su vez contribuir a la activación de Bax y Bak que permeabilizan la membrana mitocondrial externa actuando sobre VDAC, permitiendo la liberación de activadores apoptóticos hacia el citoplasma (Marchenko y col., 2000; Schuler y col., 2000). Como parte de los estudios de p53 se sugirió que pudiera participar como regulador de las funciones de los organelos celulares, la cual se confirmó al observar la movilización de p53 hacia la membrana externa mitocondrial durante la apoptosis en respuesta a estrés por radiaciones γ (Donahue y col., 2001; Mihara y col., 2003; Ito y col., 2004).

Estudios realizados con ratones irradiados, demostraron que p53 se acumula en órganos radiosensibles. En estos órganos existe una translocación rápida de p53 a la mitocondria donde conduce a la activación de la caspasa 3 que regula el proceso de apoptosis. Este proceso parece ser enteramente dependiente de p53; ya que no se observa cuando este factor se encuentra ausente (Erster y col., 2004). Asimismo se ha observado la translocación mitocondrial de p53 en cultivos primarios de células epiteliales sujetas a anoxia química con antimicina A (Kelly y col., 2003). Se ha demostrado que la administración intraperitoneal de pifitrina- α , un potente inhibidor sintético de p53 altamente selectivo, previene la apoptosis de las células tubulares de la medula externa y protege la función renal del ratón (Komarov y col., 1999). El efecto de pifitrina- α es debido a su habilidad para prevenir la translocación de p53 a

la mitocondria (además de la inhibición de la regulación de p53 sobre las proteínas p21 y Bax). Resultados idénticos se han observado después de cultivar células tubulares con antimicina A, donde pifitrina- α bloquea la translocación mitocondrial de p53 y la apoptosis (Kelly y col., 2003).

La localización de p53 en la membrana mitocondrial y los cambios observados durante la inducción de apoptosis por p53 son precedidos por la activación transcripcional de varias oxido-reductasas, producción de ERO y un incremento transitorio del potencial de membrana mitocondrial seguido de una disminución (Li y col., 1999; Macip y col., 2003). Estos trabajos avalan la hipótesis de que p53 participa de manera importante en la señalización mitocondrial y la producción de ERO, por lo que constituye un punto estratégico en la cascada de muerte en algunos tipos celulares (timocitos, células de la glia y células leucémicas) (Macip y col., 2003; Ito y col., 2004; Bonini y col., 2004).

2.6 Regulación de p53 por ubiquitinación

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos evolutivamente conservada. El proceso de ubiquitinación comienza con la activación de ubiquitina por la enzima activadora de ubiquitina E1. En una reacción de trans-esterificación la ubiquitina es transferida de la enzima de activación a la enzima de conjugación E2, quien a su vez transfiere la molécula de ubiquitina hacia una enzima ligasa de ubiquitina E3 (Pickart, 2001; Gao y Karin, 2005). De acuerdo a su estructura, se han definido dos clases principales de ligasas E3: las ligasas con dominio HECT (“homologous to E6-AP C-terminus”) y las E3 que poseen un dominio de tipo “RING-finger”. Las primeras se caracterizan por su capacidad de formar intermedios tiol-éster con la ubiquitina (Hatakeyama y Nakayama, 2003). Por el contrario, las segundas requieren una E2 para transferir las moléculas de ubiquitina hacia el sustrato (Joazeiro y Weissman, 2000).

La principal vía de degradación de p53 es por poliubiquitinación que la conduce al complejo proteosoma 26S (Figura 6) para su degradación proteolítica (Maki y col., 1996). Mdm2 es el regulador negativo predominante de p53 y normalmente mantiene a p53 a bajas concentraciones dentro de las células. Mdm2 actúa como una ligasa de ubiquitina E3

específica de tipo “RING-finger”, y se encarga de agregar cadenas de ubiquitina a p53 en su extremo amino terminal, y de esta manera dirige la translocación de p53 desde el núcleo hacia el citoplasma donde se degradará (Li y col., 2002). Los detalles de los eventos que ocurren después de esta reacción incluyen el reconocimiento de la cadena de poliubiquitina unida a p53 y su degradación posterior por el proteosoma 26S (Li y col., 2003). La proteína p53 es capaz de unirse y regular de forma positiva la transcripción del gen *mdm2*, por lo que al aumentar los niveles de p53 también se incrementa de Mdm2 (Honda y col., 1997).

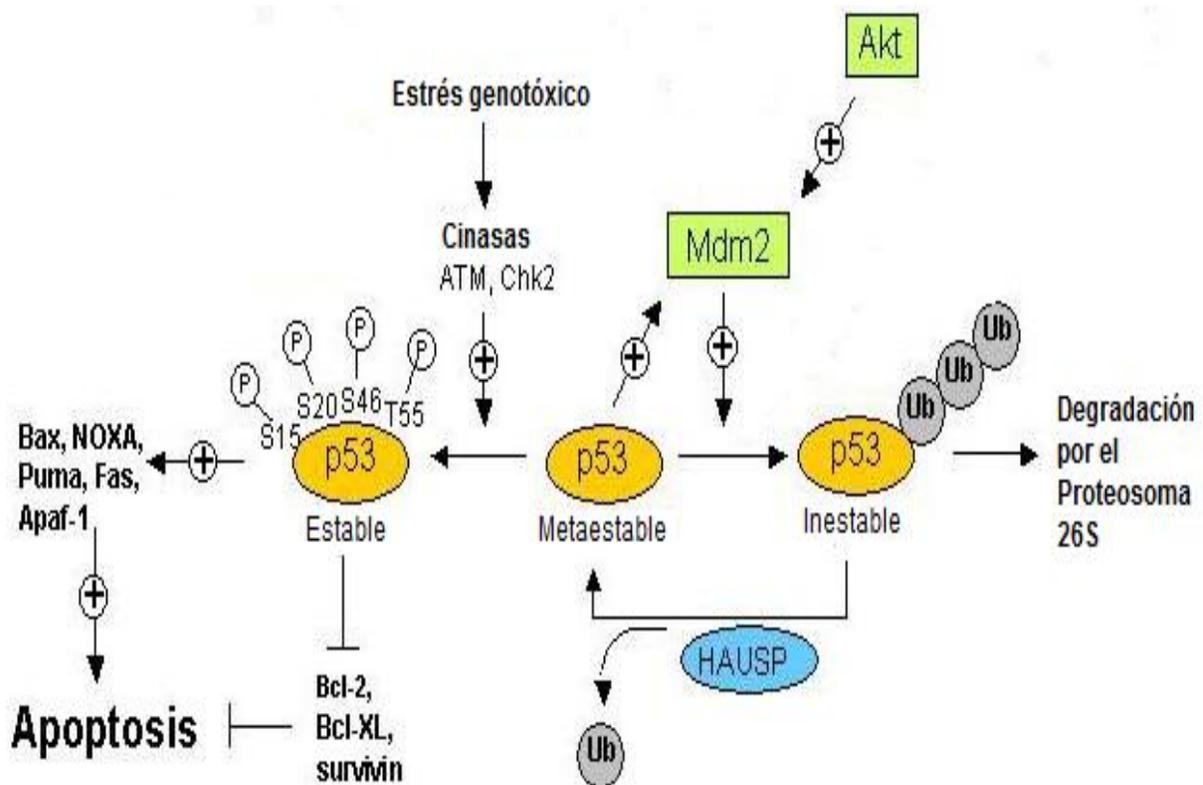


Figura 6. Regulación y degradación de p53. En una célula de crecimiento normal, la proteína p53 se encuentra en un estado metaestable, es decir que p53 es susceptible a la ubiquitinación específica y a la subsecuente degradación proteasomal. Mdm2 interacciona directamente con p53 y cataliza la ubiquitinación de p53. La ubiquitinación de p53 puede ser revertida por la enzima HAUSP, que rescata de la degradación a p53. p53 se estabiliza en respuesta a estrés genotóxico tal como daño en el DNA que lleva a la fosforilación de p53 en varios sitios específicos de Ser y Tre como se comenta más adelante. p53 estabilizada y activada puede translocarse al núcleo donde activa la transcripción de genes pro-apoptóticos y suprime la transcripción de genes antiapoptóticos lo que bajo ciertas condiciones puede dar lugar a la inducción de apoptosis. La actividad de Mdm2 está regulada positivamente por la cinasa Akt: cuando se fosforila Mdm2 por Akt, Mdm2 es capaz de trasladarse desde el citosol al núcleo, donde se desarrolla su efecto inhibitorio sobre p53 (Moll y Petrenko, 2003).

En determinadas situaciones, la transcripción de *mdm2* es posterior a otros genes diana de p53, permitiéndole a esta proteína ejercer su actividad antes de su degradación (Wu y Levine, 1997). Datos recientes sugieren que la ubiquitinación mediada por Mdm2 no es el único factor importante para la regulación de p53, además de Mdm2 otras ligasas E3 también promueven la degradación de p53 vía proteosoma. Pirh2, una proteína que contiene un dominio “RING-H2” que interacciona con p53 y promueve su ubiquitinación y su degradación independiente de Mdm2 (Leng y col., 2003).

Otra ligasa E3, COP1, también marca a p53 para su degradación y al igual que *mdm2*, también *cop1* es un gen inducible por p53 (Dornan y col., 2004). ARF-Bp1 también puede interactuar directamente con la proteína p53 y ubiquitarla para su degradación (Zhong y col., 2005). Tanto Mdm2, COP1, Pirh2, y ARF-BP1 representan un arreglo de ligasas E3 que la célula puede utilizar para regular y mantener los niveles de p53.

Es probable que los mecanismos dependientes e independientes de Mdm2 sean usados cooperativamente por la célula para una estricta regulación de p53, aunque no está claro como estas proteínas son específicamente reguladas y bajo qué situaciones pueden ser activadas (Brooks y Gu, 2006).

2.7 Modificaciones postraduccionales de p53

En condiciones fisiológicas la proteína p53 se encuentra en estado latente llegando, en algunos tipos celulares, a niveles de expresión indetectables por técnicas inmunocitoquímicas o por “Western Blot”. Los estudios realizados en un modelo murino, donde el gen p53 estaba mutado, demostraron inicialmente que no era necesario para una embriogénesis normal. Sin embargo, estudios posteriores han puesto de manifiesto que una pequeña fracción de los embriones deficientes en p53 presentó anomalías en el desarrollo, entre los que destacan defectos en el cierre del tubo neural. La proteína p53 posee una vida media corta cercana a los 15 minutos en algunos tipos celulares y en su conformación inactiva presenta una localización difusa en la célula, en muchos casos citoplasmática (Nikolaev y col., 2003).

La proteína p53 esta presente en bajas concentraciones en células no estresadas, pero ésta es rápidamente estabilizada y activada en respuesta a una variedad de estímulos. Los estímulos que conducen a la activación de p53 están asociados a situaciones de estrés celular, tal como el daño directo al DNA por radiaciones UV o ionizante, por cambios redox, por hipoxia o por choque térmico (Giaccia y Kastan, 1998). Estos estímulos provocan un incremento en los niveles de la proteína p53 en la célula, tanto por el aumento en la estabilidad de la proteína, como por su activación bioquímica a través de modificaciones postraduccionales y esto se correlaciona con una disminución en la poliubiquitinación por Mdm2.

Las funciones de p53 están reguladas por al menos 10 tipos diferentes de modificaciones postraduccionales. Las modificaciones postraduccionales más frecuentes incluyen fosforilación, ubiquitinación acetilación, sumoilación, metilación, ribosilación, y glucosilación (Harris y Levine, 2005). Se ha mostrado también la adición de un residuo de N-acetilglucosamina en la Ser 149 de p53 (Yang y col., 2006). Estas modificaciones son catalizadas por diversas enzimas y contribuyen a la activación de p53 a través de una gran variedad de mecanismos. Muchas modificaciones están relacionadas con un incremento en su capacidad para detener el ciclo celular o inducir apoptosis (Lakin y Jackson, 1999; Lavin y Gueven, 2006) (Figura 7).

2.7.1 Fosforilación

La fosforilación de residuos en las regiones amino y carboxilo-terminal tiene un papel decisivo en la función final de la proteína p53, estas fosforilaciones las realizan proteínas cinasas como ATM (del gen Mutado en Ataxia Telangiectasia); ATR (ATM and Rad3-Related); las cinasas de los puntos de control del ciclo celular Chk1 y Chk2; la cinasa Jun NH₂-terminal (JNK), la proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK) entre otras (Lavin y Gueven, 2006). La fosforilación más frecuentemente descrita ocurre en la Ser 15 de p53 por ATM en respuesta a diferentes señales de estrés, como el rompimiento de la doble cadena del DNA (Khanna y col., 1998). ATM también regula la fosforilación de p53 en respuesta a radiaciones ionizantes en los residuos de Ser 6, 9, 15, 20, 46 y Tre 18 (Saito y col.,

2002). Adicionalmente, la fosforilación en Tre 81 posterior al tratamiento con radiación UV o H₂O₂ es consecuencia de la activación de JNK, este evento estabiliza y activa transcripcionalmente a la molécula (Buschmann y col., 2001). Algunos sitios en p53 como Ser p376 y Ser p378, están constitutivamente fosforilados y experimentan desfosforilación en respuesta a daño por radiación. La pérdida de fosforilación de la Ser p376 crea un sitio de unión consenso para proteínas 14-3-3 que a su vez incrementan la afinidad de p53 por el DNA (Waterman y col., 1998; Laronga y col., 2000).

El aumento en la apoptosis ocurre como resultado de que la p53 activa induce la transcripción de genes pro-apoptóticos (Taira y col., 2007). Por ejemplo, la fosforilación de p53 en Ser 46 es necesaria para la transcripción del gen pro-apoptótico p53aip1 (Oda y col., 2000). Se ha visto que la prolil isomerasa Pin1 se une a p53 después de su fosforilación en Ser 46 y promueve la disociación del inhibidor de la apoptosis iASPP de p53, además se ha demostrado que Pin1 estimula la unión de la acetiltransferasa p300 con p53 facilitando de esta manera su acetilación (Mantovani y col., 2007).

En la terapia génica se ha probado la sustitución de p53 mutado mediada por adenovirus (Ad-p53), en la cual el tipo silvestre se introduce por vectores adenovirales directamente en células tumorales que presentan mutaciones de p53 (Kastan, 2007), sin embargo, aunque los ensayos clínicos demuestran que la utilización de Ad-p53 es segura, no es totalmente eficiente debido a que la expresión de p53 exógeno se limita a solo unos milímetros del sitio de aplicación (Lang y col., 2003). Además de sus implicaciones terapéuticas, las investigaciones sobre Ad-p53 proporcionan un modelo para entender la habilidad de p53 para detener el ciclo celular en lugar de inducir apoptosis, particularmente porque las células que expresan p53 silvestre son resistentes a la apoptosis inducida por Ad-p53. Nakamizo y colaboradores utilizaron Ad-p53 (Ad-p53-18D20D) y comprobaron que la fosforilación simultánea de p53 en Tre 18 y Ser 20 está asociada con la inducción de apoptosis (Nakamizo y col., 2008). De la misma forma se demostró que la fosforilación en Ser 15 y/o Ser 20 de p53 está relacionada con la apoptosis y en ambos casos el tratamiento con Ad-p53 no fosforilado resulta en la detención del ciclo celular por el incremento en la expresión de p21^{WAF1/Cip1} (Amano y col., 2009).

2.7.2 Poli-ADP-ribosilación

Cuando hay presencia de daño al DNA se activa la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) una proteína nuclear de 116 kDa con dos motivos dedo de zinc, que se fija al DNA y detecta específicamente mellas o rupturas del DNA producidas por diferentes agentes genotóxicos (Martin y col., 2006). PARP cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa procedentes NAD^+ , un cofactor esencial en la síntesis de ATP y el balance del potencial redox, sobre los residuos carboxílicos de Glu y Asp de varias proteínas nucleares (Schraufstatter y col., 1986; D'Amours y col., 1999). Esta modificación postraducciona es importante para la activación de una serie de procesos celulares que incluyen la reparación y la replicación del DNA, la transcripción génica, la respuesta inflamatoria, inducción de muerte celular y se da principalmente en respuesta a daños en el DNA generados por agentes genotóxicos, así como estímulos diferentes al daño en el DNA como infección y estrés. Se ha visto que la supresión genética de PARP atenúa la lesión del tejido después de isquemia cerebral transitoria (Eliasson y col., 1997), en diabetes inducida por estreptozotocina (Masutani y col., 1999), y mejora los efectos clínicos adversos en diferentes patologías asociadas con inflamación (Szabo and Dawson, 1998). Está reportado en estudios *in vivo* por inmunoprecipitación de PARP y p53 que ambas proteínas interactúan y la interacción PARP-p53 puede afectar la función de la proteína p53 al ser ADP-ribosilado por PARP en respuesta al daño en el DNA o durante el envejecimiento celular (Oliver y col., 1999). Se ha establecido que la enzima PARP funciona como un regulador positivo de p53 en respuesta al daño en el DNA por radiación ionizante (Pillai y col., 2005). La concentración intracelular de NAD^+ es de vital importancia ya que determina el tamaño del polímero de ADP-ribosa por lo que cuando se induce sobreactivación de PARP, se observa una importante disminución de las concentraciones de NAD^+ , las cuales tienen un efecto directo en el aporte energético a la célula, siendo motivo suficiente para iniciar el proceso de muerte (Le y col., 1998). Se ha reportado que la disminución de las reservas de NAD^+ en la célula al ser convertidas en nicotinamida (NAM) durante el proceso de poli-ADP-ribosilación atenúa la actividad de la desacetilasa Sir2, lo que conlleva a una hiperacetilación de p53 que conduce finalmente a un incremento en la apoptosis (Pillai y col., 2005).

2.7.3 Glucosaminilación y glicación

La activación de la vía de las hexosaminas por hiperglucemia puede resultar en cambios tanto en el ámbito de expresión como función de diversas proteínas que pueden contribuir a la patogénesis de las complicaciones en diabetes (Vrablic y col., 2001). La glucosaminilación intracelular por la adición de N-acetilglucosamina en Ser y Tre es catalizada por la enzima O-N-acetilglucosamina transferasa (OGT). Se sabe también que ciertas proteínas citoplasmáticas involucradas en la señalización de la insulina pueden ser modificadas por glucosaminilación, al igual que factores transcripcionales y proteínas de poro nuclear, lo que sugiere que esta modificación participa en la señalización de los receptores de superficie celular (Liu y col., 2000). Estas modificaciones pueden ser especialmente importantes en la célula β , debido a que la enzima OGT se encuentra en mayor proporción en este tipo celular que en cualquier otro (Hawkins y col., 1997).

En el paciente diabético, también se ha observado que el continuo contacto entre las proteínas y las concentraciones elevadas de glucosa favorece la reacción entre ambas, denominada glicación. Este tipo de reacción no enzimática, se lleva a cabo entre el grupo amino terminal o epsilon de los residuos de Lis de las proteínas, a una velocidad determinada por la concentración de glucosa (Min y col., 1999). La O-GlcNAc ha sido implicada en diabetes tipo 2 y enfermedad de Alzheimer, además de que se ha estudiado el RNAm de OGT y se ha visto que se encuentra abundantemente expresado en páncreas y cerebro (Issad y col., 2010). Se ha demostrado que la O-GlcNAc constituye una modificación postraduccional importante que estabiliza a p53 y evita su degradación (Yang y col., 2006).

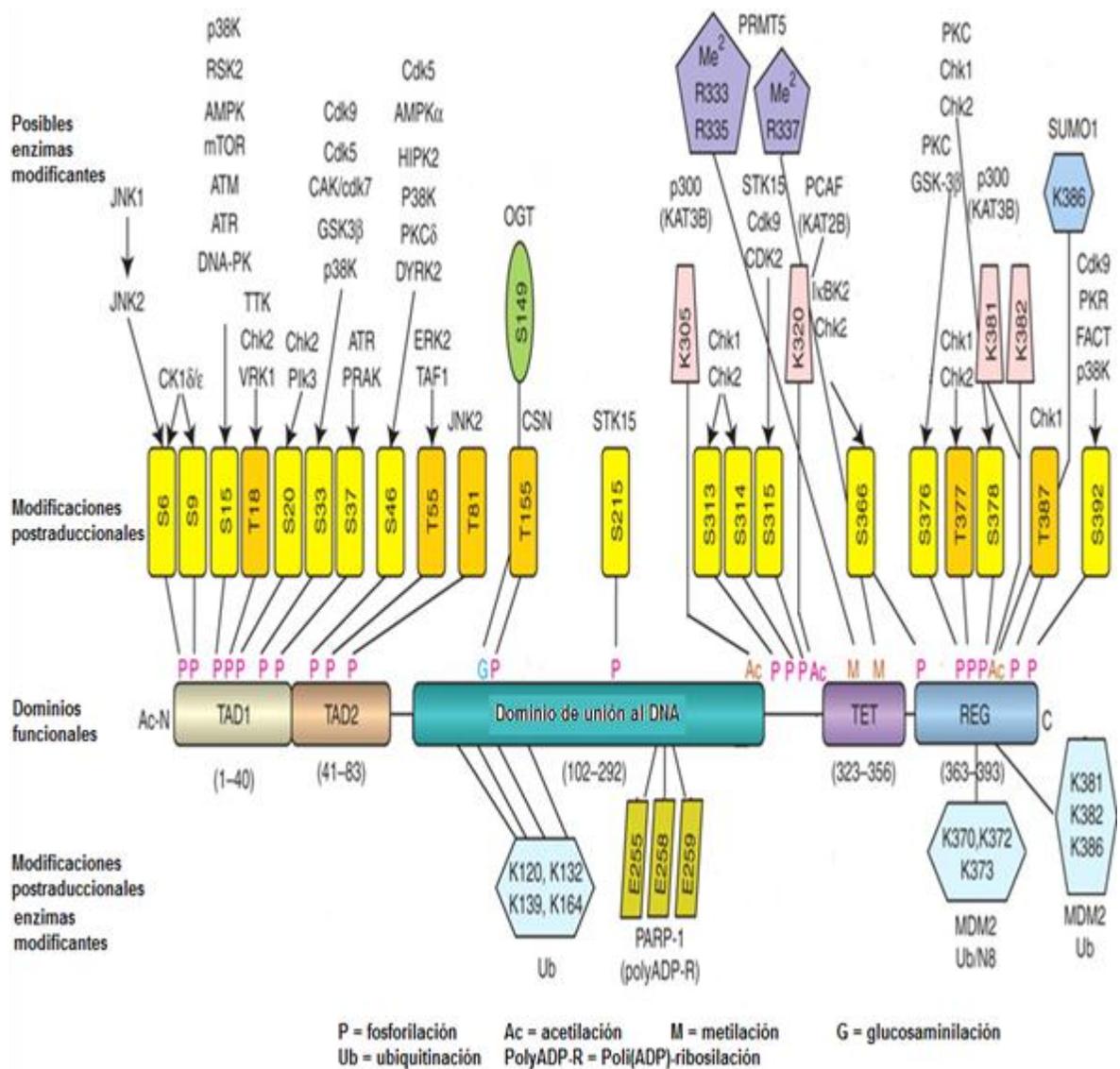


Figura 7. Modificación postraduccionales de p53. En la parte superior se indican las proteínas que fosforilan, acetilan, metilan o glucosaminilan la molécula. La ubiquitinación y poli(ADP)-ribosilación también se produce en los lugares que se muestran bajo el esquema de p53. También se exponen los dominios de transactivación (TAD), de unión al DNA, de tetramerización (TET) y de regulación (REG) en p53 (Lavin y col., 2006).

2.8 Regulación de la apoptosis de células β en DT2 por p53

La producción exacerbada de ERO y el estado de estrés oxidante constituyen dos características que se observan con frecuencia en el paciente diabético descompensado (West, 2000; Evans et al., 2002; Brownlee, 2005). Se ha propuesto que el aumento en la producción de ERO constituye un evento temprano de la intolerancia a la glucosa y probablemente sea la causa de disfunción de las células β en DT2 (Sakai y col., 2003; Brownlee, 2005).

En condiciones fisiológicas, las células β poseen un sistema sensor, que les permite adaptar la cantidad de insulina secretada a los niveles circulantes de glucosa (Kennedy y col., 2002); debido a ello existe un balance entre la masa celular pancreática y los requerimientos de acción de la insulina. En la fase prediabética, la resistencia a la insulina periférica es compensada por un incremento en la masa celular, causado principalmente por el estado de hiperglucemia. Sin embargo, durante la hiperglucemia, el aumento de la masa celular no es suficiente para compensar la resistencia a la insulina; ya que el exceso de glucosa circulante afecta sus rutas de transducción y por lo tanto su patrón de expresión génica (Weir y col., 2001). Estos eventos convergen a largo plazo en defectos en la secreción de insulina y en la eliminación del tejido endocrino pancreático mediado por mecanismos apoptóticos (Roche, 2003). En estas circunstancias, en las que aparecen conjuntamente la resistencia a la insulina en los tejidos diana y el fallo en el funcionamiento de las células β pancreáticas, es que la DT2 se hace evidente. Así se ha podido demostrar en estudios *post mortem*, una reducción de hasta el 60% de la masa de células β en pacientes con DT2 (Weir y col., 2001).

Estudios recientes sugieren que el efecto de la hiperglucemia en la función de las células β depende del tiempo de exposición y del fondo genético de estas células. Aunque aún existe controversia sobre los efectos de la hiperglucemia en la proliferación y la apoptosis de las células β pancreáticas, hay suficientes evidencias en las que se ha observado que los estados de hiperglucemia crónica alteran la función de la célula β y conducen a la muerte (Roche,

2003). Sin embargo, falta mucho por conocer sobre los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos debidos a glucotoxicidad.

La masa de células β está regulada por varios factores que incluyen el tamaño, la tasa de replicación y/o diferenciación y la tasa de apoptosis. La disminución de las células β pancreáticas durante los estados crónicos de hiperglucemia ocurre a través del mecanismo de apoptosis (Mandrup-Poulsen, 2001). El incremento en la tasa de apoptosis se ha demostrado en humano y en modelos experimentales de diabetes y se le considera responsable de la reducción en la masa de células β en pacientes con DT2, tanto obesos como delgados (Butler y col., 2003). La disminución en la masa de células β pancreáticas también se ha observado en personas con alteraciones de la glucosa en ayuno, lo que sugiere que la apoptosis de la célula β puede ser un evento temprano en el desarrollo de DT2 (Giorgino y col., 2005). Sin embargo, el mecanismo preciso mediante el cual la hiperglucemia induce la muerte de las células β hasta ahora se desconoce. Las publicaciones sobre este tema, se han centrado alrededor del metabolismo mitocondrial debido a que representa la fuente principal de ERO que tienen una participación importante en el mecanismo de apoptosis (Gottlieb, 2000; Moll y Zaika, 2001).

Un signo temprano de la muerte por apoptosis es que las células preservan la integridad de su membrana plasmática y muestran translocación o inversión de fosfatidilserina hacia la cara externa; este fosfolípido normalmente se encuentra confinado a la membrana interna. Se ha observado que la incubación de las células RINm5F en un medio alto en glucosa (30 mM), durante 16 y 24 horas, no induce ningún cambio bioquímico ni morfológico asociado con apoptosis. Sólo hasta las 48 horas de incubación se pudieron detectar cambios significativos característicos de apoptosis, como fueron la externalización de la fosfatidilserina evidenciado por la fluorescencia de anexina V-FITC y la fragmentación oligonucleosomal del DNA. Estas observaciones permitieron proponer a la apoptosis como el mecanismo principal en la muerte de las células RINm5F cultivadas en concentraciones altas de glucosa. Previo a este tiempo no se observaron células apoptóticas en el cultivo con 30 mM de glucosa (Ortega-Camarillo y col., 2006).

Durante el proceso de apoptosis la mitocondria tiene un papel central en la fase de ejecución, debido a que almacena en su espacio intermembranal activadores y efectores de la muerte celular, como citocromo c, entre otros. La permeabilización de la membrana externa está asociada con disfunción mitocondrial, colapso del potencial membranar ($\Delta\psi_m$) y liberación de los factores pro apoptóticos (citocromo c, AIF, Smac/diablo). Además se observa la translocación de proteínas de señalización y moléculas efectoras entre el núcleo, el citoplasma y las mitocondrias, entre ellas Bax (Zong y col., 2001). De particular interés resulta la movilización de proteínas proapoptóticas hasta la mitocondria donde inducen disfunción de este organelo y en este grupo se encuentra p53 (Moll y Zaika 2001).

Se ha detectado por inmunofluorescencia *in situ* la localización de p53 en la mitocondria en las células RINm5F a las 24 y 48 horas en condiciones de alta glucosa. El análisis por microscopía confocal mostró una clara localización de p53 en la mitocondria a partir de las 24 horas, misma que se incrementó de forma importante a las 48 horas. La presencia de p53 en la mitocondria de las células RINm5F cultivadas con concentraciones altas de glucosa durante 24 horas constituye un evento temprano, que antecede a la translocación de fosfatidilserina, uno de los primeros cambios en la membrana citoplasmática de las células que mueren por apoptosis. El aumento de p53 en la mitocondria a las 48 horas, coincide con un incremento en el porcentaje de células apoptóticas, así como las manifestaciones clásicas de este tipo de muerte: presencia de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana (positivas a anexina-V-FITC), cambios en el $\Delta\psi_m$, liberación de citocromo c y fragmentación oligonucleosomal del DNA. Todos estos eventos no se observaron en las células control (Ortega-Camarillo y col., 2006). Estudios previos, realizados por Mihara y col. (2003) han demostrado que la liberación de citocromo c es un efecto directo de la translocación de p53 hasta la membrana externa de la mitocondria. En esos estudios, se utilizaron mitocondrias aisladas de hígado de rata, incubadas en presencia de p53 silvestre de ratón y se observó que el 90% del citocromo c se libera dentro de los primeros 30 minutos (Mihara y col., 2003). Resultados recientes han demostrado que durante el estado de estrés oxidante provocado por la hiperglucemia se induce la muerte de las células β pancreáticas por el mecanismo de apoptosis, a través de la

movilización de la proteína p53 hasta la membrana mitocondrial y con disminución en el $\Delta\psi_m$ (Ortega-Camarillo y col., 2006).

Por todo lo anterior, es posible que la hiperglucemia, como un mecanismo de estrés celular, pudiera producir alteraciones postraduccionales en p53, las cuales permitirían la estabilización y activación de esta proteína, lo que explicaría su participación en el proceso de apoptosis en las células β -pancreáticas.

3 Planteamiento del problema

En un ambiente fisiológico, la síntesis y degradación de la proteína p53 se encuentra bajo un estricto control, no así en las células sometidas a situaciones de estrés, que pudieran comprometer la integridad del DNA. Por lo que la respuesta de dichas células será el incrementar, la síntesis de ésta proteína, la cual detendrá el ciclo celular para permitir, de ser posible, la reparación del daño o de lo contrario inducir la muerte.

Además de las funciones transcripcionales de p53, también se cuenta con evidencias como disparador de alteraciones mitocondriales previas a la apoptosis. Se ha visto que las células RINm5F en condiciones de alta glucosa, la proteína p53 se moviliza hasta la mitocondria, ocasionando cambios en el potencial de membrana, liberación de citocromo c y apoptosis. En estados crónicos de hiperglucemia se observan cambios moleculares profusos, los cuales derivan de un metabolismo alterado, activación de vías metabólicas y de señalización con la capacidad de alterar las características fisicoquímicas de estructuras básicas, que a su vez están relacionadas con la aparición de las complicaciones tardías en DT2. Esta serie de eventos están directamente relacionados con el estado de estrés oxidativo que se observa en estas condiciones.

Con este conocimiento, las funciones no transcripcionales atribuidas a p53 probablemente dependan de prolongar su vida media, debido posiblemente, a modificaciones postraduccionales inducidas por concentraciones elevadas de glucosa. Por lo que este trabajo ayudará a describir los posibles cambios transcripcionales que presenta la expresión del gen *p53*, así como los cambios postraduccionales que ocurren en la proteína p53 que contribuyen a su estabilización y particular activación en respuesta a un estado de estrés hiperglucémico, que culmina en el desarrollo de apoptosis. Finalmente, este estudio pretende contribuir a esclarecer los mecanismos moleculares que regulan la disfunción y muerte de las células β pancreáticas por efecto de hiperglucemia, característica principal de DT2, lo que permitirá encontrar nuevas opciones terapéuticas para su prevención y tratamiento.

4 Hipótesis

Las concentraciones altas de glucosa como un proceso de estrés, provocan modificaciones postraduccionales en la proteína p53 que afectan su vida media y regulan su actividad biológica.

5 Objetivo General

Analizar el estado de fosforilación, poli-ADP-ribosilación y N-acetilglucosaminilación de p53, así como su asociación con la apoptosis de células RINm5F expuestas a altas concentraciones de glucosa.

5.1 Objetivos particulares

- Demostrar que las concentraciones altas de glucosa inducen daño al DNA y apoptosis en las células de RINm5F.
- Analizar los cambios en la expresión del RNAm de p53 en células RINm5F expuestos a elevadas concentraciones de glucosa.
- Determinar las modificaciones postraduccionales de p53 inducidas en las células RINm5F por la exposición a elevadas concentraciones de glucosa.
- Analizar la translocación de p53 a la mitocondria y sus efectos en la apoptosis de las células RINm5F

6 Materiales y Métodos

6.1 Reactivos

El RPMI 1640, solución balanceada de Hank, tripsina, EDTA, suero fetal bovino, L-glutamina fueron de GIBCO (Carlsbad, California); Trizol (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.), First Impromp-II Reverse Transcriptase system (Promega), GoTaq DNA Polymerase; Anexin-V Fluos de Roche Applied Science (México, D.F.); Nonidet P-40 (NP-40) (Sigma, St. Louis, MO) . Los anticuerpos anti-p53 pAb 240, anti-p-p53 Ser 15, anti-p-p53 Ser 392; anti-ATM, anti-pATM, anti-p38 MAPK, anti-p-p38 MAPK, anti-ERK 1/2, anti-p-ERK 1/2, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-citocromo c (H-104), anti-PARP 1/2, anti-ubiquitina fueron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California), anti-poly(ADP-ribose) (10H) (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) y Anti-O-linked-N-Acetylglucosamine (Affinity BioReagents, Golden, CO, USA); Protein G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology); SB203580 procedente de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). Otros reactivos de grado analítico se obtuvieron de E. Merck (Darm Stadt. Germany).

6.2 Cultivo de células RINm5F

-Mantenimiento de la línea celular RINm5F

Las línea celular de insulinoma de rata RINm5F se cultivó en monocapa en una atmósfera húmeda a 37 °C y 5 % de CO₂ con medio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, Gaithersurg, MS, EE.UU.) con glucosa (11 mM), 2 mM L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio; 20 µg de gentamicina y 23.8 mM de bicarbonato de sodio y 10% (v/v) de suero fetal bovino. El cultivo se mantuvo hasta que las células alcanzaron 75% de confluencia. En este momento, se sembraron después de despegarlas con 2 mL de tripsina al 0.025% (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) en tampón fosfato salino pH 7.2 con EDTA 2 mM y se recuperaron por centrifugación (5 minutos a 2500 x g a 4 °C). El botón celular se resuspendió con RPMI 1640 suplementado y se tomó una alícuota para cuantificar el número de células y verificar su viabilidad, mediante la prueba de exclusión de azul de tripano. Se colocaron 2x10⁶ células en

botellas de 75 cm², con 10 mL de RPMI 1640 suplementado, al día siguiente se les cambió el medio y al segundo día se adicionaron los tratamientos.

-Inducción in vitro de la hiperglucemia en células RINm5F

Las células RINm5F se cultivaron en las condiciones antes mencionadas, con excepción de la concentración de glucosa. Se emplearon dos concentraciones de glucosa, 11 mM (control) y 30 mM (alta glucosa). Los tiempos de exposición fueron de 2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas. Como un control de osmolaridad se adicionó manitol a una concentración de 25 mM.

6.3 Expresión de p53

-Diseño de iniciadores para p53

Para el diseño de los iniciadores se utilizó el programa OligoPerfect™ Designer de Invitrogen, USA, y la secuencia del RNAm de p53. Las secuencias de los iniciadores fueron para 5'-GGACGACAGGCAGACTTTTC-3' (Tm 59.85) y 3'-TTTTATGGCGGGACGTAGAC 5' (Tm 59.96), el tamaño del amplicón fue de 527 pb. Además, se utilizaron iniciadores específicos para GAPDH como control interno 5'-GAATGGGAAGCTGGTCATCA-3' (Tm 61.02) y 3'-TCTGAGTGGCAGTGATGGTG-5' (Tm 60.91), que producen un amplicón de 368 pb.

-Extracción del RNA por el método de trizol

A una muestra de 10⁷ células depositada en tubo Eppendorf de 1.5 mL se le agregó 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Ca). La muestra se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir la disociación completa de las nucleoproteínas. Luego se agregaron 0.2 mL de cloroformo. Se tapó el tubo firmemente y se agitó vigorosamente por 15 segundos, después se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugó a 12000 x g por 15 minutos a 8 °C. Al término de la centrifugación, se separó la muestra en una fase inferior roja de fenol-

cloroformo, una interfase y una fase acuosa transparente. La fase inferior contiene membranas extracelulares, polisacáridos, proteínas y DNA de alto peso molecular mientras que el RNA permanece exclusivamente en el sobrenadante.

Para obtener el RNA se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se precipitó el RNA agregando 0.5 mL de alcohol isopropílico. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos a 8 °C. Se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado una vez con 1 mL de etanol al 75%. Se mezcló en vortex y se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos a 8 °C. Se retiró el sobrenadante y se secó el precipitado por evaporación por 10 minutos evitando que se secase completamente dado que esto disminuye su solubilización. Se disolvió el RNA en 100 µL de agua libre de RNAsas. La concentración y pureza del RNA total se midieron por absorbancia a A₂₆₀ y A₂₈₀ nm (espectrofotómetro UV-VIS, Beckman DU 640). La integridad se verificó en agarosa al 1.2 % con bromuro de etidio 0.5 µg/mL.

-Retro-Transcripción (RT)

La retro-transcripción (RT), para sintetizar el DNA complementario (cDNA) a partir de RNA, se realizó mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa del kit ImProm II Reverse Transcriptase system (Promega, Madison, WI, EE.UU.) de la siguiente forma:

a) Reacción de desnaturalización (preparada en hielo):

-RNA (2 µg/reacción)	µL
-Oligo(dT)15 (0.5 µg/ reacción)	1 µL
-Agua libre de nucleasas (completar a 5 µL)	µL
Volumen total	5 µL

Cada tubo quedo con un volumen final de 5 µL y se colocaron en un termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 por 5 minutos a 70°C. Se retiraron los tubos del termociclador, y se introdujeron en hielo por 5 minutos.

b) Reacción de RT:	
-Agua libre de nucleasas	4.5 μ L
-Buffer de reacción ImProm-II™ 5X	4 μ L
-MgCl ₂ (3.5 mM)	4 μ L
-Mezcla de dNTPs (0.5 mM por dNTP)	1 μ L
-Inhibidor de ribonucleasas RNasin Recombinat (40 u/ μ L)	0.5 μ L
-Transcriptasa Reversa Im Prom -II	1 μ L
Volumen total	15 μ L

Los 15 μ L de la mezcla de reacción de RT se añadieron a la primera mezcla, alcanzando un volumen final de 20 μ L. Se colocó la reacción en el termociclador (PCR System 2700, Applied Biosystems, USA) bajo las siguientes condiciones:

- Alineamiento: 25 °C/ 5 min.
- Extensión: 42 °C/ 1 hora.
- Inactivación de la transcriptasa reversa: 70 °C/ 15 minutos.
- Enfriamiento: 4 °C por 5 minutos
- Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

-PCR en tiempo real

El cDNA se amplificó mediante la enzima DNA polimerasa del kit de “DNA master plus SYBR Green 1” para p53 y como gen de normalización se empleó la proteína GAPDH. El proceso se llevó a cabo empleando la tecnología SYBR Green con el equipo LightCycler 2.0 (Roche Molecular Biochemicals Mannheim Germany), que mide continuamente la amplificación de productos de PCR en cada ciclo, usando iniciadores normales de PCR y el fluorocromo SYBR Green que se intercala en el surco menor de las hebras de doble cadena de DNA, emitiendo fluorescencia.

La mezcla de reacción con un volumen final de 10 μ L se preparó con 0.5 mM de los iniciadores descritos previamente y la mezcla de reacción 1X que contiene la enzima Fast

Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y MgCl₂ 3.5 mM. Las muestras se amplificaron en el LightCycler 2.0 de Roche utilizando capilares de borosilicato de 20 µL. Se siguió un programa de amplificación para SYBR Green con un primer segmento de 10 minutos a 95° C para la preincubación de la enzima, un segundo segmento de amplificación constituido por 35 ó 40 ciclos y cada ciclo constituido por una desnaturalización de 95° C por 0 segundos a una rampa térmica de 20° C por segundo; un alineamiento a 61° C por 7 segundos a una rampa térmica de 20° C por segundo; una amplificación a 72° C por 10 segundos a una rampa térmica de 20° C por segundo.

Se realizó un programa por el análisis de temperatura de fusión (melting) para verificar la amplificación específica, que consiste en el seguimiento de la desnaturalización lenta del producto final de amplificación, donde se obtiene el punto en el que la pérdida de la fluorescencia refleja la T_m del producto específico de amplificación. El programa consistió de una desnaturalización a 95° C con una rampa térmica de 20° C por segundo, un realineamiento a 65° C durante 15 segundos, a una rampa térmica de 20° C por segundo; y por último, una desnaturalización lenta hasta 95° C a una rampa térmica de 0.1° C por segundo y se cuantificó la fluorescencia de manera continua.

Se realizaron las curvas estándar de cada gen (p53 y GAPDH) con muestras sin tratamiento, a diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000. Para las muestras problema se utilizó una dilución 1:10. Se estandarizaron las reacciones para cada uno de los iniciadores y se utilizó el método de $\Delta\Delta C_t$ para cuantificar la expresión de p53. Se verificó la amplificación específica de cada uno de los transcritos por medio del análisis de las curvas de fusión respectivas. La integridad de PCR se determinó por el análisis de los productos de amplificación en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio.

6.4 Determinación de la viabilidad y apoptosis celular

-Determinación de la viabilidad celular por exclusión de azul tripano

La viabilidad celular se evaluó con el método de exclusión del azul de tripano. El azul de tripano es una amina orgánica, con una carga negativa neta que no penetra al interior de las células con membranas intactas, mientras que las células dañadas rápidamente lo incorporan al citoplasma (Freshney, 1987). Se añadieron 100 μL de la suspensión celular recogida previamente en tubos Eppendorf y 100 μL de azul de tripano; se mezclaron bien y se incubaron 3 minutos. Se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer y se añadieron 10 μL de la mezcla de células y azul de tripano (relación 1:1). Se contaron las células que hay en los recuadros divididos en 16 cuadrículas. La media aritmética de los 4 recuentos efectuados, multiplicada por el factor de la cámara (10000) y por el factor de dilución (2) representó la concentración de células en la muestra (N° células/mL).

-Cuantificación de apoptosis con anexina V-FITC.

Las células RINm5F se cultivaron con 11 o 30 mM de glucosa hasta por 72 horas. Después de este tiempo se cosecharon en PBS-EDTA 2 mM pH 7.4, BSA 0.1% y se lavaron con PBS por centrifugación (250 x g a 4 °C, 5 minutos), se resuspendieron con 100 μL de solución de marcaje [10 μL de anexina V-Fluos (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 10 μL de ioduro de propidio (IP) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en 1 mL de HEPES (HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl_2 5 mM)]. Se incubaron 15 minutos en ausencia de luz. Posteriormente se adicionaron 400 μL de HEPES y se procedió al análisis (20 000 células) en un citómetro de flujo (BD FaCSAria; Becton Dickinson System & Co., San Jose, CA, USA). La emisión de fluorescencia se midió a 515 y 610 nm para FITC e IP, respectivamente con una excitación de 488 nm. Los datos se analizaron con el software para citometría de flujo FACSDIVA.

-Análisis de la integridad del DNA

Después de los tratamientos las células se cosecharon con PBS- EDTA. Se lavaron dos veces por centrifugación con PBS. El botón celular se resuspendió con 10 μ L de solución de lisis (EDTA 20 mM, Tris-HCl, igeal 1% pH 7.5) por cada millón de células (por lo menos 5 millones) se agitó 10 segundos e inmediatamente se centrifugó por 5 minutos a 3500 x g a 4 °C. A continuación se repitió la extracción con el tampón de lisis en el botón y se juntaron los sobrenadantes.

Posteriormente al sobrenadante se adicionó SDS al 1% y se incubó 2 horas con RNasa a una concentración final de 5 μ g/ μ L a una temperatura de 56 °C, seguido por la digestión con proteinasa K a una concentración final de 2.5 μ g/ μ L durante 2 horas a 37 °C. Después se adicionó 1/2 volumen de acetato de amonio 10 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, para precipitar el DNA, se almaceno toda la noche a -20 °C.

La concentración de DNA en cada muestra se calculó mediante la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro. Posteriormente se colocaron las muestras (20 μ g de DNA) en un gel de agarosa al 1.2% en amortiguador de TBE 1X (Tris 1 M, ácido bórico 1 M, EDTA 20 mM pH 8.3), y se corrieron durante 70 minutos a 60 volts, al finalizar con ayuda de un analizador de imágenes con luz ultravioleta, se analizó la integridad del DNA (Herrmann, 1994).

6.5 Detección de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Después del tratamiento con glucosa, las células RINm5F se lavaron con PBS y se incubaron por 30 minutos en oscuridad con 5 μ M de 2'7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCDHF-DA) en solución de Hank. La DCDHF-DA ingresa a la célula donde esterasas intracelulares, eliminan sus grupos acetato y queda expuesta a la oxidación por peróxido de hidrógeno y/o de otros radicales libres y generando la 2'7'-diclorofluoresceína (DCF). Se procedió al análisis (20 000 células) en un citómetro de flujo (BD FaCSAria; Becton

Dickinson System & Co., San Jose, CA, USA). La emisión de la fluorescencia se midió a 530 nm con una excitación de 488 nm. Los datos se analizaron con el software para citometría de flujo FACSDIVA.

6.6 Obtención de las fracciones subcelulares

Las fracciones citosólica, mitocondrial y nuclear se obtuvieron con el siguiente protocolo. En cada fracción se cuantificó la concentración de proteínas (Lowry y col., 1951) y la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa (marcador mitocondrial) (Bernt y col., 1965), el resto de los lisados se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Tampón A: 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA.

Tampón C: 20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA.

Las células RINm5F (20×10^6) se resuspendieron en 400 μL de tampón A y se mantuvieron en hielo por 15 minutos. Se añadieron 25 μL 10% Nonidet NP-40. Se agitó vigorosamente durante 20 segundos y se centrifugó a 13000 x g por 30 segundos (antes de centrifugar se apartó una pequeña fracción que se etiquetó como proteínas totales), el sobrenadante contiene las fracciones citosólica y mitocondrial, y la pastilla resultante la fracción nuclear, esta última se resuspendió en 60 μL de tampón C y se agitó fuertemente por 20 minutos a 4°C . Se centrifugó por 10 minutos a 13000 x g a 4°C .

El sobrenadante resultante contiene las proteínas nucleares. Al sobrenadante que contiene las fracciones citosólica y mitocondrial se le agregó 50 μL de sacarosa 1.25 M y 200 μL de manitol 1 M, posteriormente se centrifugó a 13000 x g por 20 minutos, el sobrenadante se etiquetó como fracción citosólica y el sedimento (fracción mitocondrial) se resuspendió en 40 μL de tampón A.

6.7 Determinación de los cambios postraduccionales de p53

-Electroforesis y “western blot”

Las fracciones (100 µg proteína), se mezclaron con 1 volumen igual del amortiguador de carga (Tris 125 mM, SDS 2 %, glicerol 10 %, mercaptoetanol 1 mM, azul de bromofenol 0.002 %, pH 6.9) se calentaron por 5 minutos a 95 °C y resolvieron en PAGE-SDS al 10 %, 1 horas a 100 volts, posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (0.8 mA/cm², 2 horas), en amortiguador Tris 25 mM, glicina 192 mM y 20 % de metanol. La membrana se lavó dos veces con TBS-T (NaCl 140 mM, Tris 50 mM pH 7.2; Tween 20 0.1 %), antes de bloquear los sitios de unión inespecíficos con TBS-T-BSA 5 % durante 1 horas a 20 °C. Se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente: anti-p53 pAb 240, anti-p-p53 Ser 15, anti-p-p53 Ser 392; anti-ATM, anti-pATM, anti-p38 MAPK, anti-p-p38 MAPK, anti-ERK 1/2, anti-p-ERK 1/2, anti-CREB, anti-p-CREB, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-citocromo c, anti-caspasa 3 y anti-PARP 1/2 (Santa Cruz Biotechnology), en TBS-T-BSA 1 %. Para la detección se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano y un estuche comercial de quimioluminiscencia (Perking Elmer Life Science, Boston USA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

-Inmunoprecipitación

Se transfirieron 200 µg de proteína celular total a un tubo de centrifuga de 1.5 mL. Se añadió a cada tubo 5 µL de anticuerpo primario anti-p53 pAb 240 (Santa Cruz Biotechnology) y se incubaron durante una hora a 4 °C en agitación orbital. Se añadieron 20 µL de suspensión de Protein G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) y se incubaron en agitación orbital durante toda la noche. Posteriormente se colectaron las inmunoprecipitados por centrifugación a 1000 x g por 5 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Las pastillas se lavaron 4 veces por centrifugación con PBS. Después del lavado final, se aspiró y descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 20 µL de amortiguador de carga (Tris 125 mM, SDS 2 %, glicerol 10 %, mercaptoetanol 1 mM, azul de bromofenol 0.002 %, pH 6.9) se calentaron por 2-3

minutos a 95 °C y se centrifugaron 1 minuto a 1000 x g, se recuperó el sobrenadante y se pasó a un tubo limpio. Finalmente las muestras se cargaron directamente en un PAGE-SDS al 10 %, 1 hora a 100 volts y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se lavó dos veces con TBS-T, antes de bloquear los sitios de unión inespecíficos con TBS-T- BSA 5 %, durante 1 hora a 20 °C. Se adicionó el anticuerpo primario correspondiente: anti-Bcl-2, anti-ubiquitina, anti-PARP (Santa Cruz Biotechnology), anti-poly(ADP-ribose) (10H) (Alexis Biochemicals) para detectar residuos de poli-ADP-ribosa y anti-O-linked-N-Acetylglucosamine (Affinity BioReagents) para detectar residuos de N-acetilglucosamina en TBS-T-BSA 1 %, y se incubó toda la noche a 4 °C. Para la detección se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano y un estuche comercial de quimioluminiscencia (Perking Elmer Life Science, Boston USA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

-Análisis por inmunofluorescencia

Las células RINm5F se cultivaron en una micro cámara de 8 pozos estéril (Lab-Teck brand products, Nalge Nunc International, Naperville IL USA), en presencia de 11 ó 30 mM de glucosa durante 72 horas. Al final del tratamiento se marcaron las mitocondrias durante 30 min a 37° C con MitoFluor Green (Molecular Probes, USA), 200 nM en RPMI 1640-10% SFB. Después de lavar las células con PBS-T20, se fijaron con formaldehído 4% en RPMI 1640-10% SFB durante 30 minutos a 37° C y permeabilizaron con PBS-tritón X-100 al 0.3%. Se adicionó bloqueador universal (Bioenex, USA) y se lavaron con PBS-T20. Se adicionó el anticuerpo primario correspondiente (anti-P-p53Ser 392 ó anti-P-p38 MAPK) y se dejaron toda la noche a 4° C en cámara húmeda con agitación suave. Al día siguiente y posterior a los lavados, se incubó el anticuerpo secundario (alexa 594, Molecular Probes, USA) durante 4 horas. Después de los lavados, los núcleos se contrastaron con DRA-Q7 (Biostatus, UK). Se empleo VECTASHIEL (Vector, USA) como medio de montaje. El análisis se realizó con un microscopio CONFOCAL (Carl Zeiss, Axiovert) con el programa de captura y análisis de la intensidad, ZEON 2009 (Carl Zeiss, Goettingen, Germany). Para la captura de imagen se utilizaron el láser de 488 nm y 543 nm, así como filtros de pase corto (BP 505-530) para

MitoFluor Green, filtro de pase corto (BP 565-585) para P-p53Ser392 ó P-p38 MAPK y filtro de pase largo (LP 650) para DRA-Q7. Se capturaron imágenes a 40X.

6.8 Inhibición de la fosforilación de p53 por p38 MAPK

Para inhibir la fosforilación de p53 se utilizó el inhibidor específico de p38 MAPK, SB203580 procedente de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). Las células RINm5F se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10 % (v/v), L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, NaHCO₃ 23.8 mM, gentamicina 20 µg y 10 µM de SB203580 en una atmósfera húmeda a 37 °C y 5 % de CO₂. Bajo concentraciones diferentes de glucosa 11 mM (control) y 30 mM (alta glucosa) a tiempos de 24, 48 y 72 horas.

6.9 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con el programa NCSS versión 07.1.17 (Kaysville, Utah), www.NCSS.com. Los resultados se expresan como promedios ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Se utilizó una prueba paramétrica de comparaciones múltiples (ANOVA) y la comparación entre grupos se realizó con Tukey-Kramer, considerando el valor de significancia de $p < 0.05$. En las imágenes de confocal los valores de intensidad se estimaron por colocación mediante un histograma de dispersión, se determinó el grado de significancia por t Student para muestras independientes, con $p < 0.5$.

7 Resultados

7.1 La alta glucosa disminuye la viabilidad, aumenta el daño al DNA, la apoptosis y la producción de ERO en células RINm5F.

Estudios previos han demostrado que la alta glucosa (30 mM) en células RINm5F aumenta el índice apoptótico a las 48 horas de cultivo (Ortega-Camarillo y col., 2006), es por ello que en el presente estudio el cultivo con alta glucosa se mantuvo hasta 72 horas. Los resultados indican que existe una disminución significativa en el porcentaje de viabilidad celular a partir de las 48 horas ($p < 0.05$), con respecto al control (figura 8A). Estos datos están en concordancia con el incremento en el porcentaje de células apoptóticas (44 %, $p < 0.001$) a las 72 horas con respecto al control (figura 8B). Los experimentos realizados para demostrar la fragmentación de DNA, muestran que existe fragmentación a partir de las 48 horas de cultivo con alta glucosa y estos datos coinciden con la disminución en la viabilidad celular, lo cual es un indicativo de muerte por apoptosis (figura 8C). Los resultados también muestran un incremento en el porcentaje de células positivas a DCF, indicador de ROS a partir de 24 hasta 72 horas (13.8 y 37.6 %, respectivamente) (figura 8D).

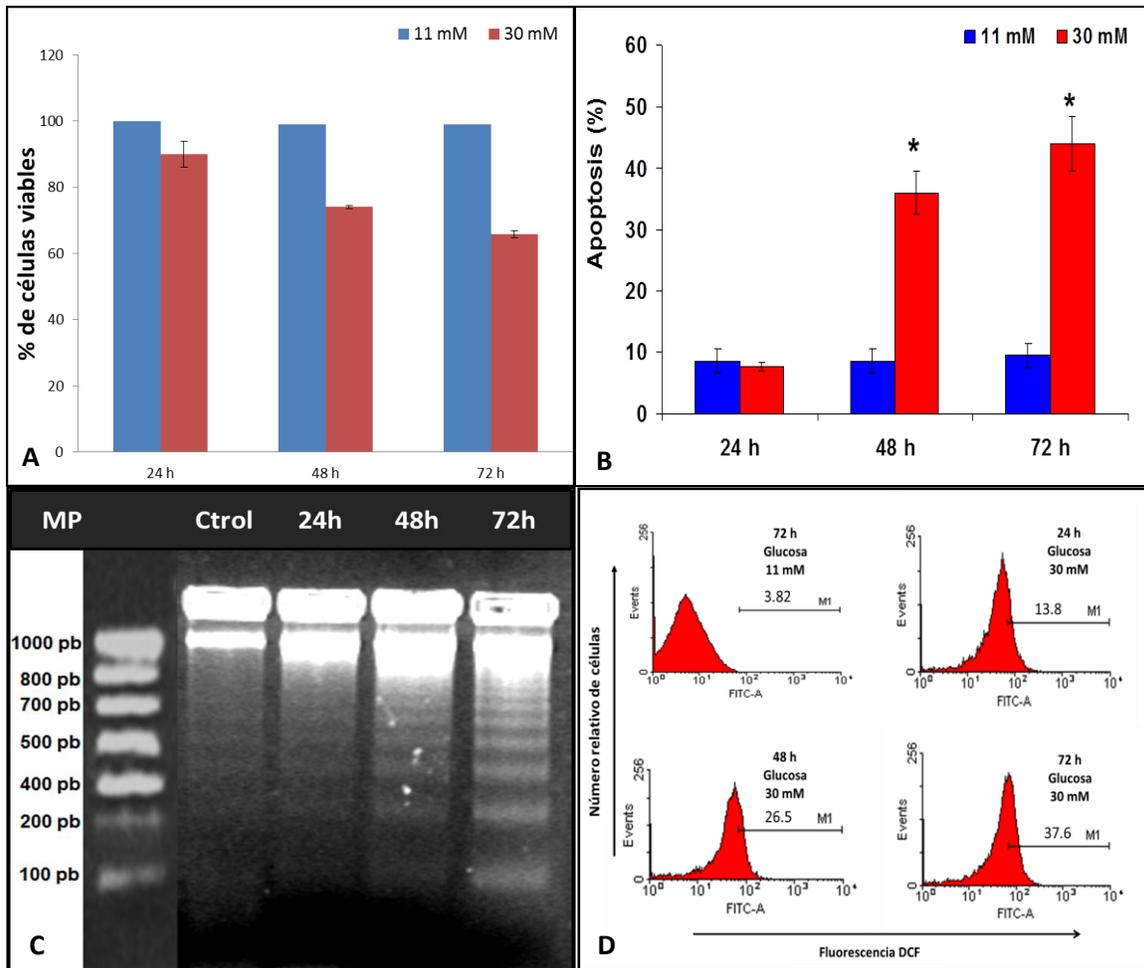


Figura 8. Producción de ERO, marcadores de apoptosis y viabilidad celular. Las células RINm5F se cultivaron con glucosa 30 mM por 24, 48 y 72 horas. (A) Disminución de la viabilidad celular a partir de las 48 horas, * $p < 0.05$ vs control. (B) Porcentaje de apoptosis, * $p < 0.001$ vs control. (C) Fragmentación del DNA por efecto de la alta glucosa. (D) Imagen representativa de la producción de ERO por alta glucosa medida por la fluorescencia de DCF. Las gráficas muestran el promedio y desviación estándar de 5 experimentos independientes.

7.2 Efecto de la concentración alta de glucosa sobre la relación Bcl-2/Bax, liberación del citocromo c y activación de caspasa 3.

La figura 9A muestra que en condiciones de alta glucosa aumenta significativamente la presencia de Bax (proteína pro-apoptótica) y disminuye la de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) en la mitocondria, lo que conduce a una disminución en la relación Bcl2/Bax dependiente del tiempo de tratamiento con glucosa 30 mM. El incremento de Bax favorece cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, como se demuestra por la liberación de citocromo c al citosol a partir de las 24 horas de cultivo con alta glucosa (figura 9B). El cultivo con alta glucosa también promovió la activación de la caspasa 3, una caspasa efectora implicada en la regulación y ejecución de la apoptosis (figura 9C).

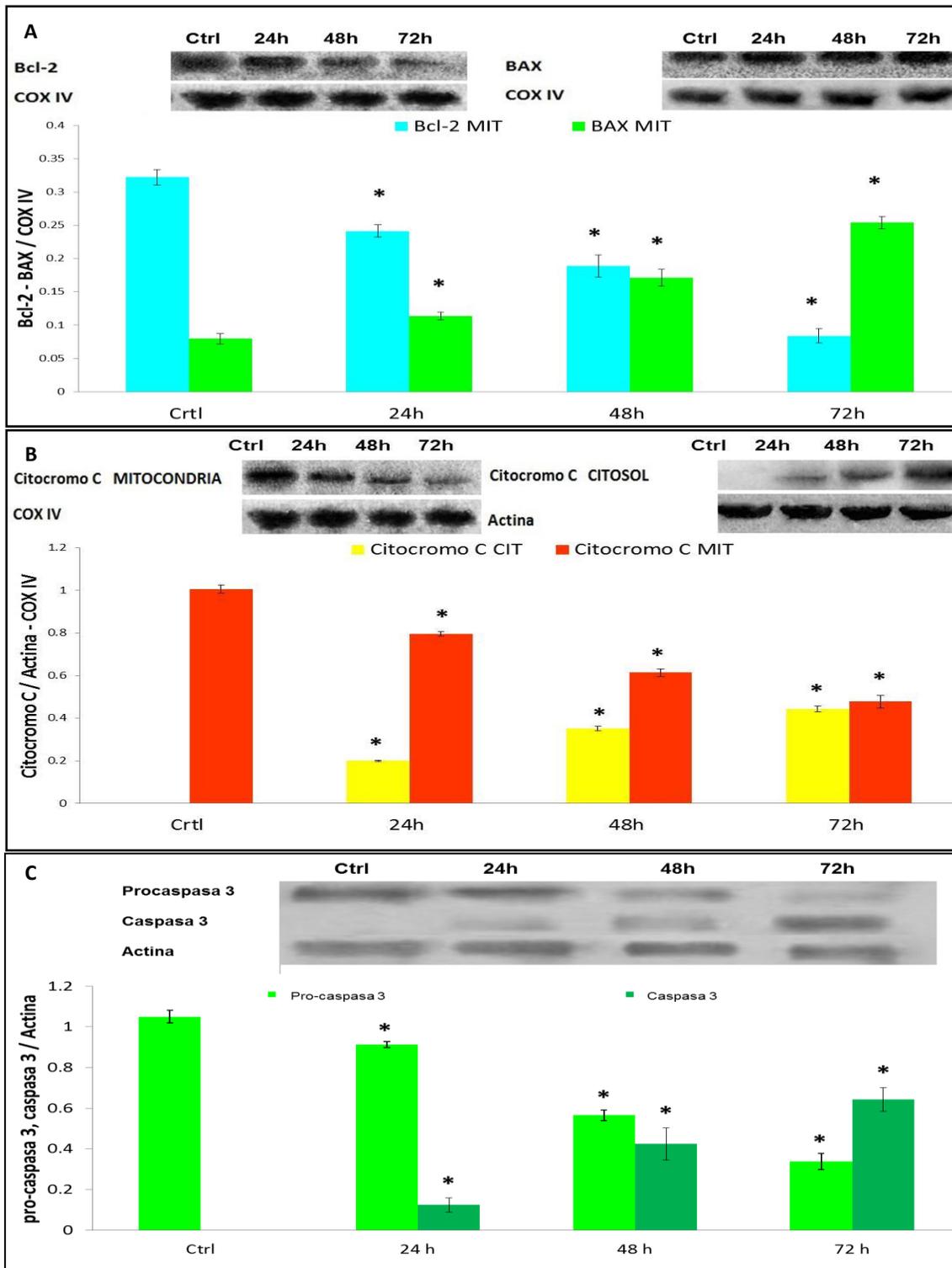


Figura 9. Efecto de la alta glucosa sobre las proteínas Bcl-2, Bax, citocromo c y caspasa 3. (A) Relación Bcl-2/Bax en mitocondria, $*p < 0.05$ vs control; (B) Liberación de citocromo c al citosol, $*p < 0.01$ vs control y (C) Activación de la caspasa 3 por efecto de la alta glucosa $*p \leq 0.005$ vs control. Se muestra el $X \pm DE$ de 3 experimentos independientes.

7.3 Disminución de la fosforilación de ERK y CREB por efecto de la alta glucosa.

El cultivo de las células RINm5F con alta glucosa afectó la fosforilación de ERK, una cinasa involucrada en la inducción de proliferación celular, se observó una disminución significativa en la activación de ERK a las 72 horas de cultivo con glucosa 30 mM(figura 10A). De la misma forma se encontró un decremento en la fosforilación y activación de la proteína CREB, un importante factor de transcripción para la homeostasis y la supervivencia de la célula β (figura 10B).

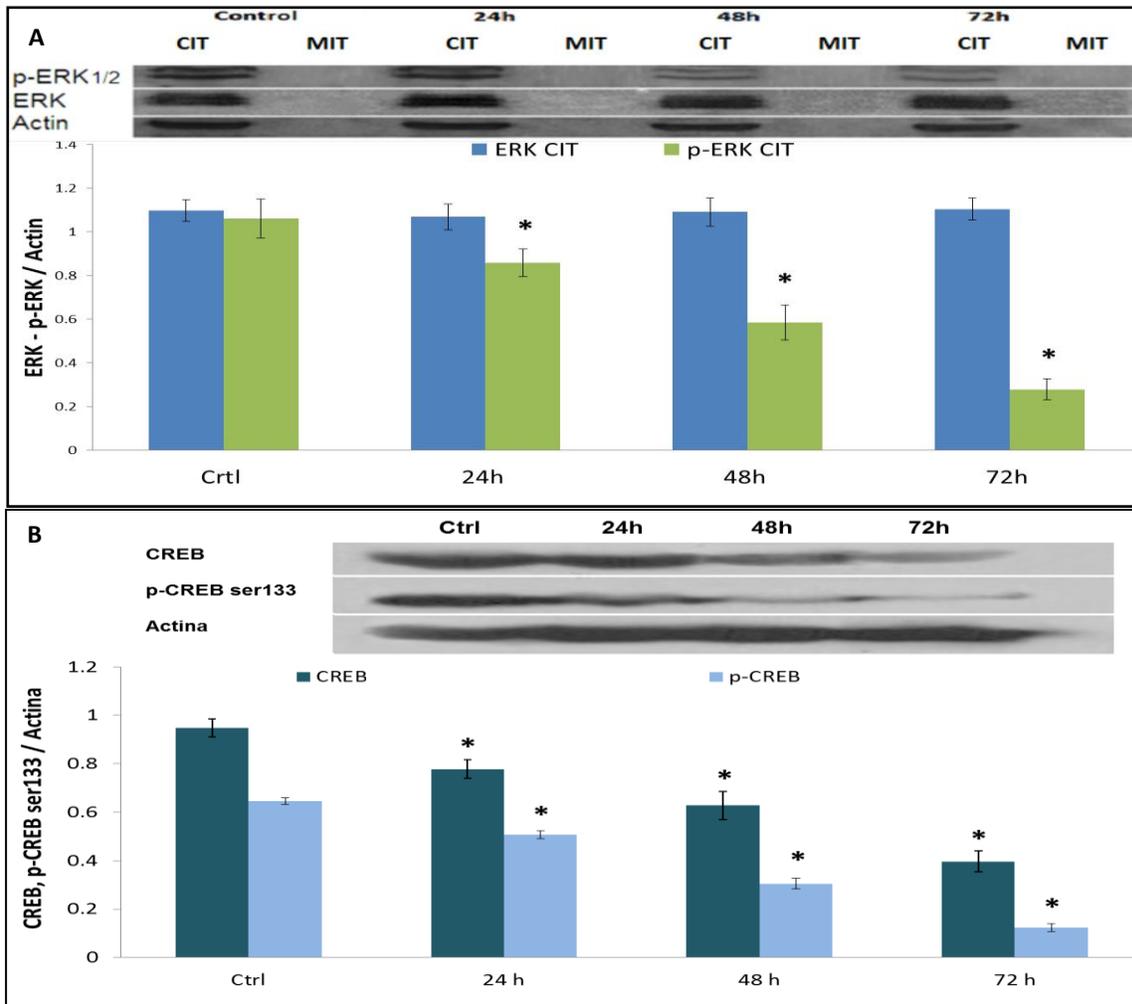


Figura 10. Efecto de la alta glucosa sobre las proteínas ERK y CREB. Disminución en la fosforilación de ERK * $p < 0.05$ vs control (A) y CREB * $p < 0.005$ vs control (B) por efecto de las concentraciones elevadas de glucosa. Se muestra el $X \pm DE$ de 3 experimentos independientes.

7.4 Expresión y distribución de p53 en células RINm5F cultivadas con alta glucosa.

La glucosa 30 mM no modificó la expresión de p53 en células RINm5F en ninguno de los tiempos estudiados (figura 11A). Por el contrario favoreció la redistribución celular de p53. En células con baja glucosa (11 mM), p53 se localizó principalmente en citosol y núcleo (72 y 28 %, respectivamente). A partir de 24 horas de cultivo en presencia de alta glucosa, se estimuló la movilización de una fracción (25 %) de p53 a la mitocondria, proveniente del citosol y núcleo (14 y 11 %, respectivamente). Un comportamiento similar se observó a las 48 horas, siendo exacerbada la presencia de p53 en la mitocondria a las 72 horas, con mayor aportación del citosol (75 %) (Figura 11B).

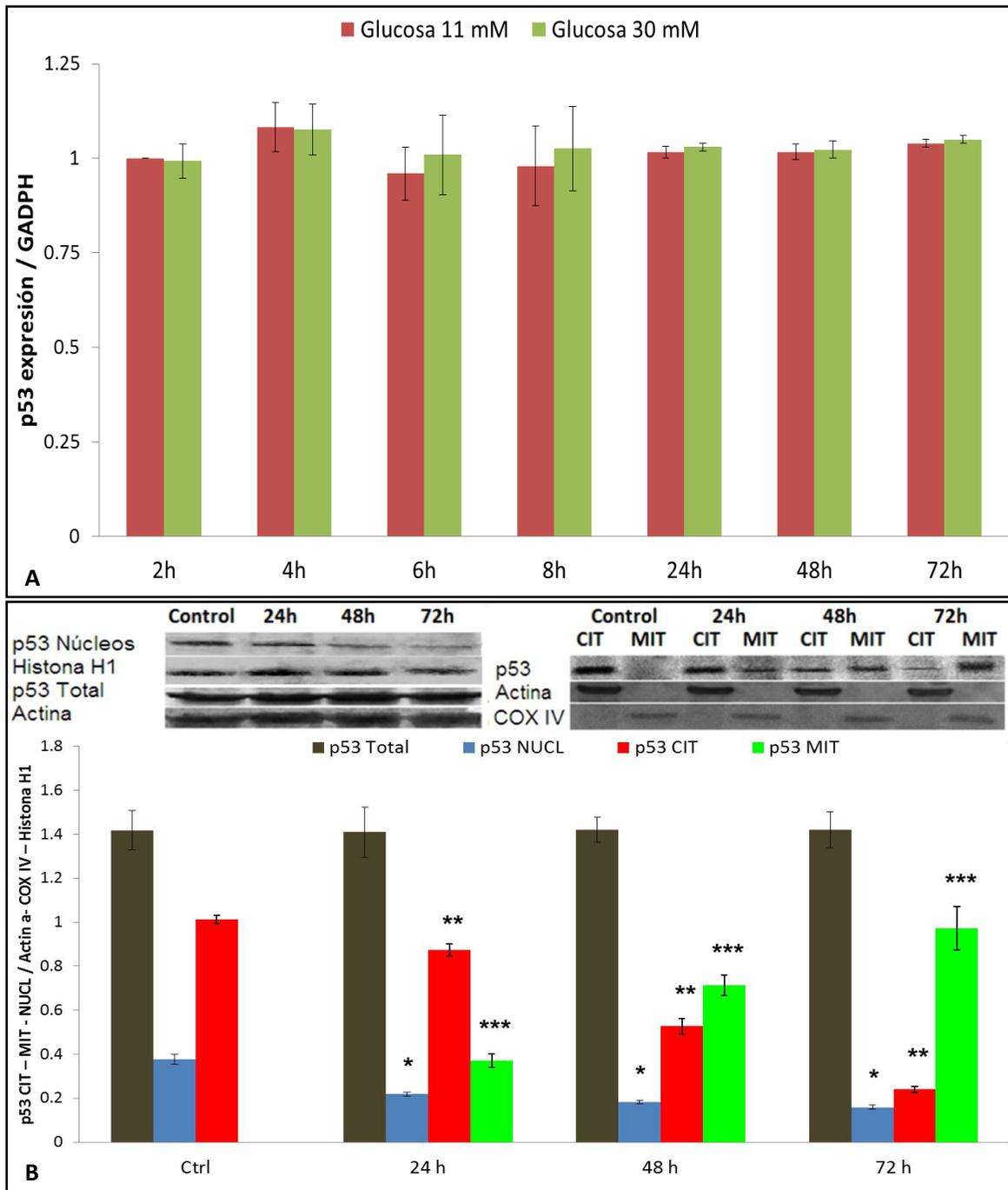


Figura 11. Expresión y distribución intracelular de p53. Células RINm5F cultivadas con glucosa (11 ó 30 mM) de 2-72 h. (A) Expresión del RNAm de p53 por PCR en tiempo real. (B): “Western blot” y análisis densitométrico de la distribución intracelular de p53. CIT: citosol; MIT: mitocondria, NUCL: núcleo, Ctrl: 11 mM glucosa, 24, 48 y 72 h: 30 mM glucosa. Citosol ** y mitocondria *** $p < 0.001$. Núcleo * $p < 0.005$. Las gráficas muestran el promedio y desviación estándar de 5 experimentos independientes.

7.5 Fosforilación de p53 y ATM en núcleo

La fosforilación en Ser 15 de p53 localizada en el núcleo de las células RINm5F cultivadas con alta glucosa fue detectada a las 24 horas (figura 12A), a partir de 48 horas y hasta 72 horas tanto la proteína total como la fosforilada disminuyen con alta glucosa, probablemente debido a la movilización de p53 hacia la mitocondria. La activación de ATM en respuesta a la alta glucosa se presentó tanto en la fracción citosólica como en la nuclear partir de 24 h y aumenta conforme al tiempo de incubación con alta glucosa (figura 12B).

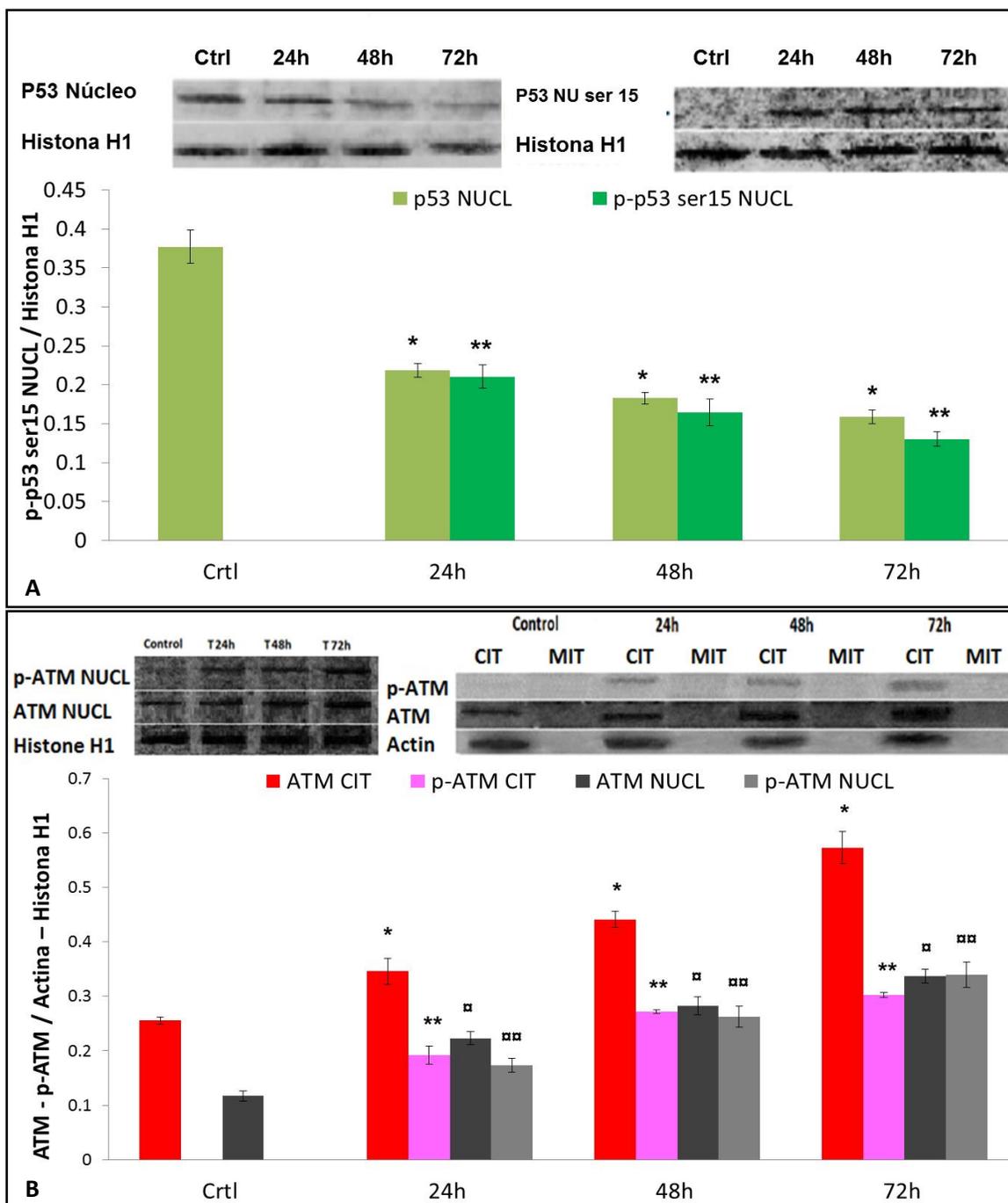


Figura 12. Análisis por “western blot” de la fosforilación de p53 y ATM en núcleo y citosol. Células RINm5F cultivadas con glucosa 11 (control) y 30 mM a diferentes tiempos. CIT: citosol, NUCL: núcleo. (A): Fosforilación de p53 ser 15 en la fracción nuclear, $p < 0.005$; (B): Fosforilación de ATM en citosol y núcleo, $p < 0.05$ vs el control. Las gráficas muestran el promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

7.6 Fosforilación de p53 y p38 MAPK en células RINm5F cultivadas con alta glucosa.

En las células RINm5F cultivadas con glucosa 11 mM, la proteína p53 no se fosforila (citósol y mitocondria). Por el contrario en las células cultivadas con alta glucosa, p53 presenta fosforilación en Ser 392 en la fracción mitocondrial a partir de las 24 horas y se mantuvo hasta las 72 horas, en estas condiciones también se observó fosforilación de p53 en Ser 15, pero esta fue 4 veces menor que en Ser 392 (figura 13A). Debido a que p38 MAPK se activa en respuesta a estrés oxidativo y puede fosforilar a p53, se estudió su estado de activación en la fracción citosólica y mitocondrial. Los resultados muestran que en células RINm5F con glucosa 11 mM, p38 MAPK se localiza en citósol. En presencia de alta glucosa, p38 MAPK se observó tanto en citósol como en mitocondria pero su activación se limitó a la fracción mitocondrial (figura 13B).

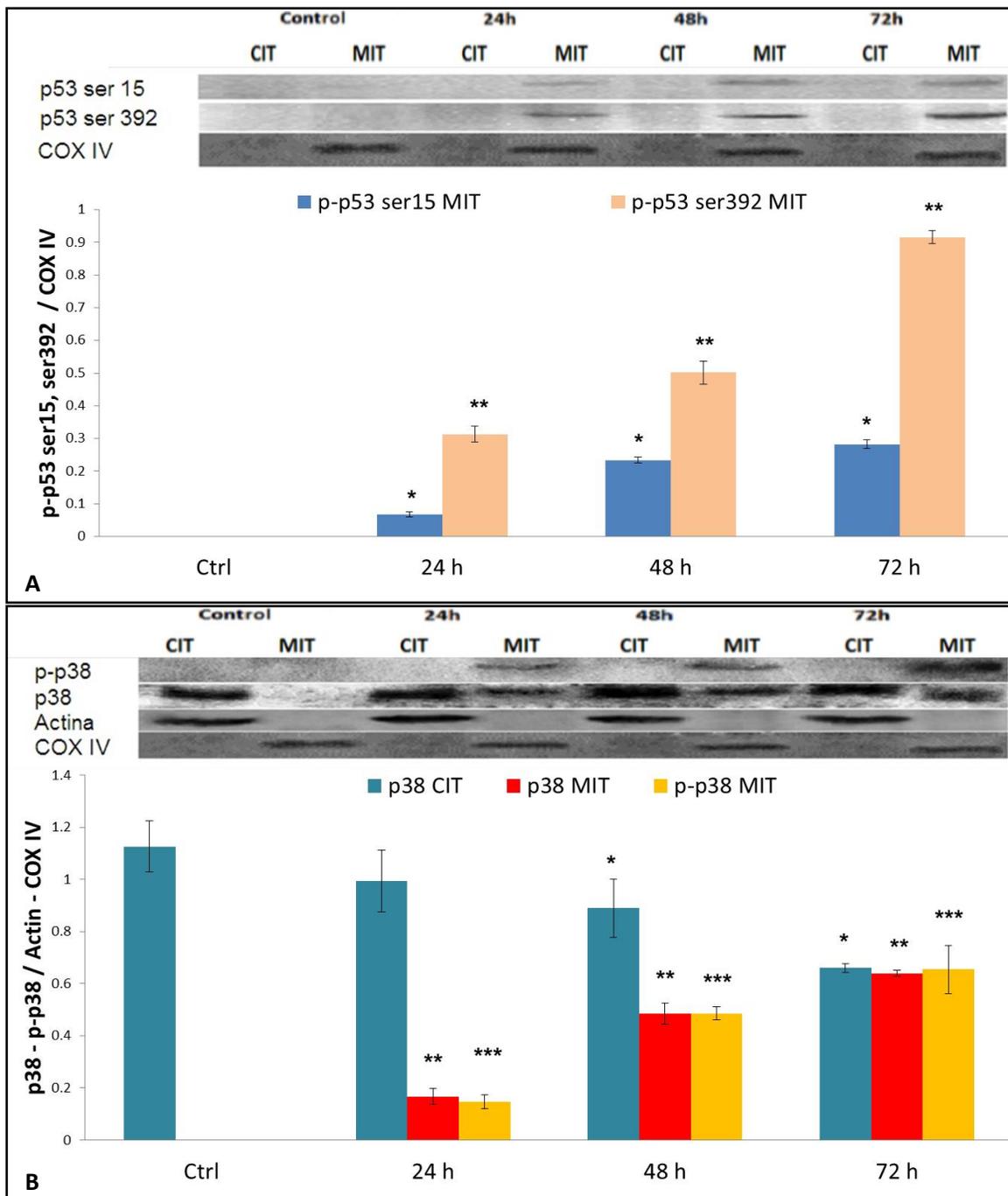


Figura 13. Análisis por “western blot” de la fosforilación de p53 y p38 MAPK en mitocondria. Células RINm5F cultivadas con glucosa 11 (control) y 30 mM a diferentes tiempos. CIT: citosol, MIT: mitocondria. (A): Fosforilación de p53 ser 15 y ser 392, respectivamente $p < 0.001$; (B): p38 MAPK Citosol $*p < 0.05$, p38 MAPK Mitocondria $**p < 0.001$ y su fosforilación $***p < 0.005$ vs control. Las gráficas muestran el promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

7.7 El SB203580 inhibe la fosforilación de p53 en Ser 392 y Ser 15, así como la liberación de citocromo c por alta glucosa.

Con el propósito de determinar la participación de p38 MAPK en la fosforilación de p53 en las células RINm5F cultivadas con alta glucosa, evaluamos la fosforilación de p53 en Ser 392 y Ser 15 después de inhibir la actividad de p38 MAPK por la adición de SB203580 (piridinil imidazol) 10 μ M, así como la liberación de citocromo c como marcador de apoptosis. Los resultados muestran que la inhibición de p38 MAPK no solo bloqueó completamente la fosforilación de p53 en Ser 392 y Ser 15 (figura 14A), sino que también disminuyó la liberación del citocromo c y la apoptosis de las células RINm5F cultivadas con alta glucosa (figura 14B). La inhibición de la actividad de p38 MAPK también afectó la distribución intracelular de p53, en esta condición p53 se localizó principalmente en citosol. Además se aprecia un decremento de p53 en el citosol, lo cual indicaría una posible degradación de esta proteína conforme se incrementa el tiempo de cultivo (figura 14C). La inhibición de p38 MAPK protege a las células RINm5F de la muerte inducida por alta glucosa (Fig. 14D). Lo cual nos sugiere que existe una disminución de la apoptosis al haber una inhibición de la fosforilación de p53.

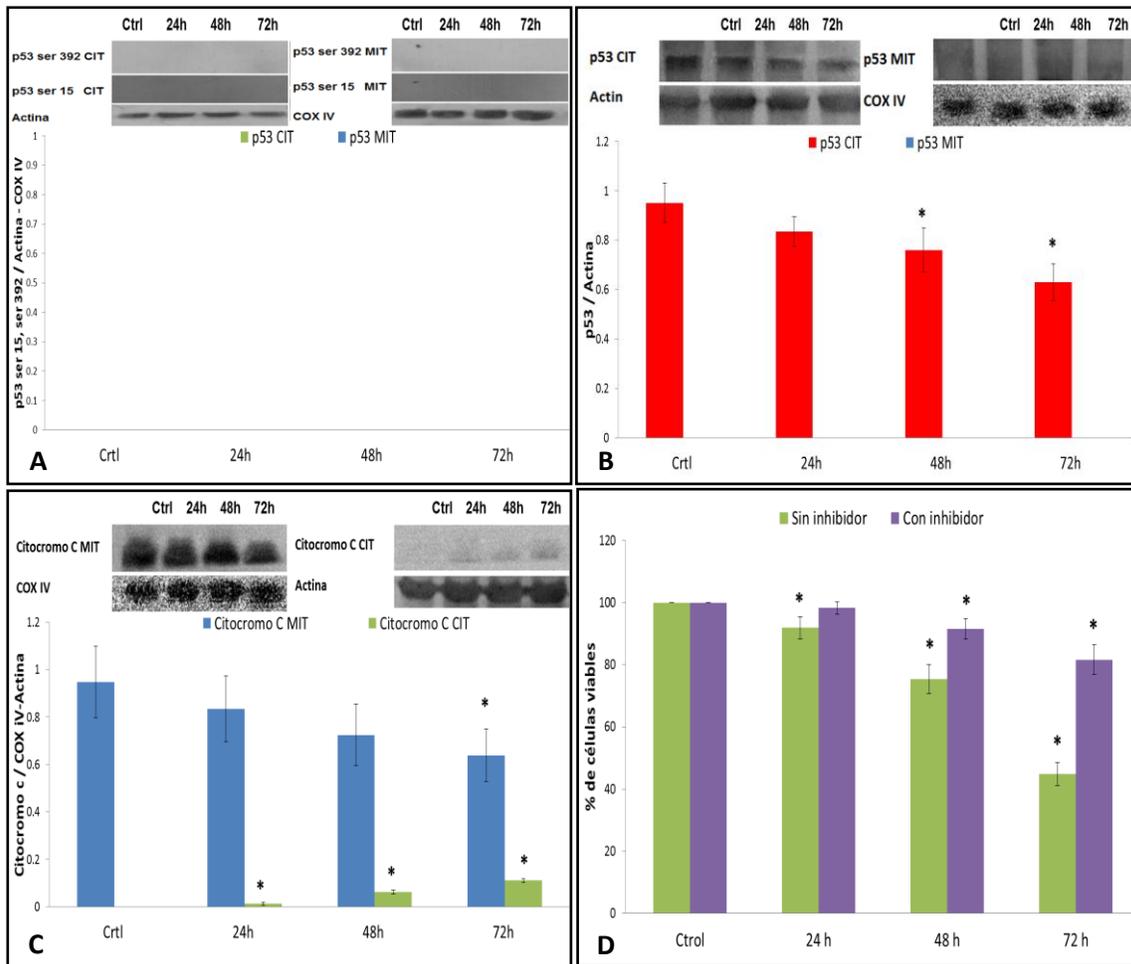


Figura 14. Inhibición de p38 MAPK y de la fosforilación de p53 y su efecto sobre la apoptosis. (A) “Western blot” de la fosforilación de p53 en Ser 392 y Ser 15 en las mitocondria de células RINm5F cultivadas con 11 (control) y 30 mM de glucosa en presencia del inhibidor de p38 MAPK SB203580 a diferentes tiempos, * $p < 0.005$. CIT: citosol; MIT: mitocondria. Se utilizo COX IV y actina como control de corrimiento. (B) Disminución de p53 en citosol y mitocondria. (C) “Western blot” y análisis densitométrico de citocromo c hacia el citosol. (D) Porcentaje de viabilidad por azul tripano Las gráficas muestran el promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes, $p < 0.05$.

7.8 Análisis de la interacción de p53 con la proteína Bcl-2 por efecto de la alta glucosa en células RINm5F

Para determinar si existía una interacción de p53 con la proteína antiapoptótica Bcl-2 se realizó un ensayo por inmunoprecipitación utilizando anti-p53, posteriormente se realizó la transferencia a membranas de PVDF y se revelaron con el anticuerpo contra Bcl-2. La figura 15A muestra la interacción entre p53 y Bcl-2 en la fracción mitocondrial de las células tratadas con 30 mM de glucosa a partir de 24 horas. Este mismo ensayo se realizó utilizando muestras en las que se utilizó el inhibidor de p38 MAPK SB203580 10 μ M. La inhibición de la fosforilación de p53 en Ser 392 y Ser 15 afectó su asociación con la proteína Bcl-2 (figura 15B). Estos resultados marcan una clara evidencia de que esta fosforilación es muy importante para fomentar la asociación de p53-Bcl-2 y para que p53 pueda permanecer presente en la mitocondria.

7.9 Colocalización mitocondrial de fosfo p53Ser392 y fosfo p38 MAPK por microscopía confocal

Con el propósito de corroborar la distribución intracelular de p53 fosforilado en Ser 392 y de la cinasa que se encarga de su fosforilación p38 MAPK, se realizaron análisis con microscopia confocal de p53 Ser 392 y p38 MAPK después de marcar las mitocondrias con una sonda fluorescente en forma independiente al potencial de membrana (“MitoFluor Green”), lo que facilita su identificación independientemente de la viabilidad celular (figura 16). Las células RINm5F se cultivaron con 11 ó 30 mM de glucosa y se analizaron a las 24, 48 y 72 horas. La presencia de p53 fosforilado en Ser 392 y de p38 MAPK en las mitocondrias es muy clara en las 72 horas de cultivo con alta glucosa.

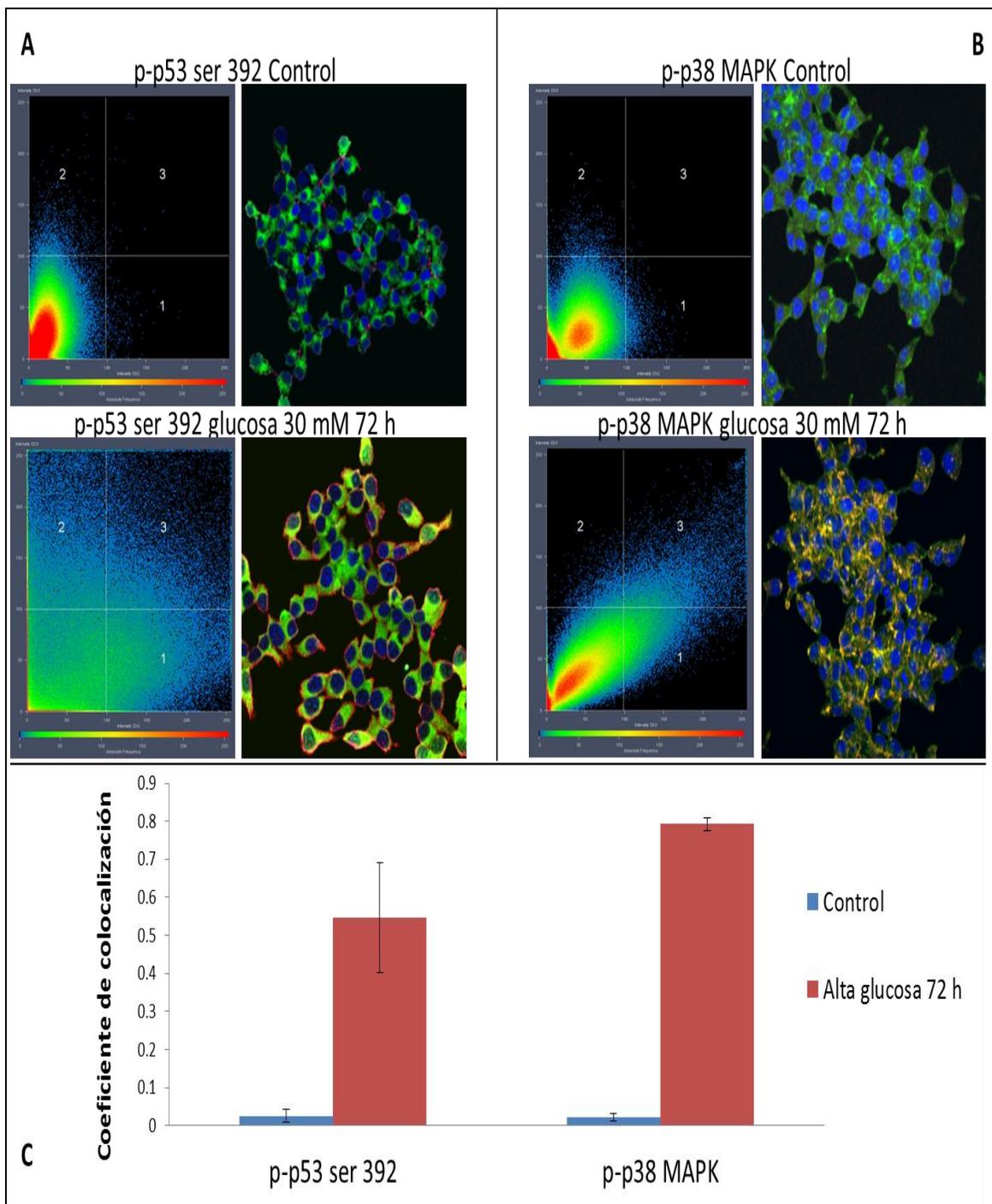


Figura 16. Coeficiente de colocalización mitocondrial. Se muestra el coeficiente de colocalización mitocondrial de p53 Ser 392 (A) y p38 MAPK (B) fosforiladas en células RINm5F cultivadas con alta glucosa por 72 horas. Las mitocondrias se marcaron con “MitoFluor Green” (verde). La fosforilación de p53 Ser 392 y p38 MAPK (rojo). La colocalización con la mitocondria (amarillo) se muestra en la gráfica de puntos. (C) coeficiente de colocalización de p53 Ser 392 y p38 MAPK fosforiladas. Se muestra una imagen representativa, promedio y desviación estándar de 5-6 experimentos independientes. (* $p < 0.0001$ vs. Control)

7.10 Análisis de poli-ADP-ribosilación de p53 y de PARP durante la apoptosis por alta glucosa

La proteína PARP presenta en la región amino terminal una secuencia diana de las caspasas-3 y 7, por lo que cuando estas caspasas se activan rompen a PARP en dos fragmentos de 89 y 24 kDa. Esta ruptura proteolítica se considera actualmente como marcador de apoptosis dependiente de caspasas. Los fragmentos generados por la acción de las caspasas-3 y 7 contribuyen a la inactivación de la enzima intacta (Chaitanya y col., 2010). El tratamiento con alta glucosa a tiempos cortos (2 a 16 horas) induce un incremento de la proteína PARP. Los ensayos por inmunoprecipitación muestran que en condiciones de alta glucosa se forma el complejo PARP-p53 (Figura 17C), esta asociación induce la adición de residuos de ADP-ribosa a p53 (poli-ADP-ribosilación) en la fracción nuclear hasta las 16 horas (figura 17A). A partir de las 24 horas se observa una disminución en la poli ADP-ribosilación de p53, lo que coincide con la fragmentación e inactivación de PARP (figura 17B).

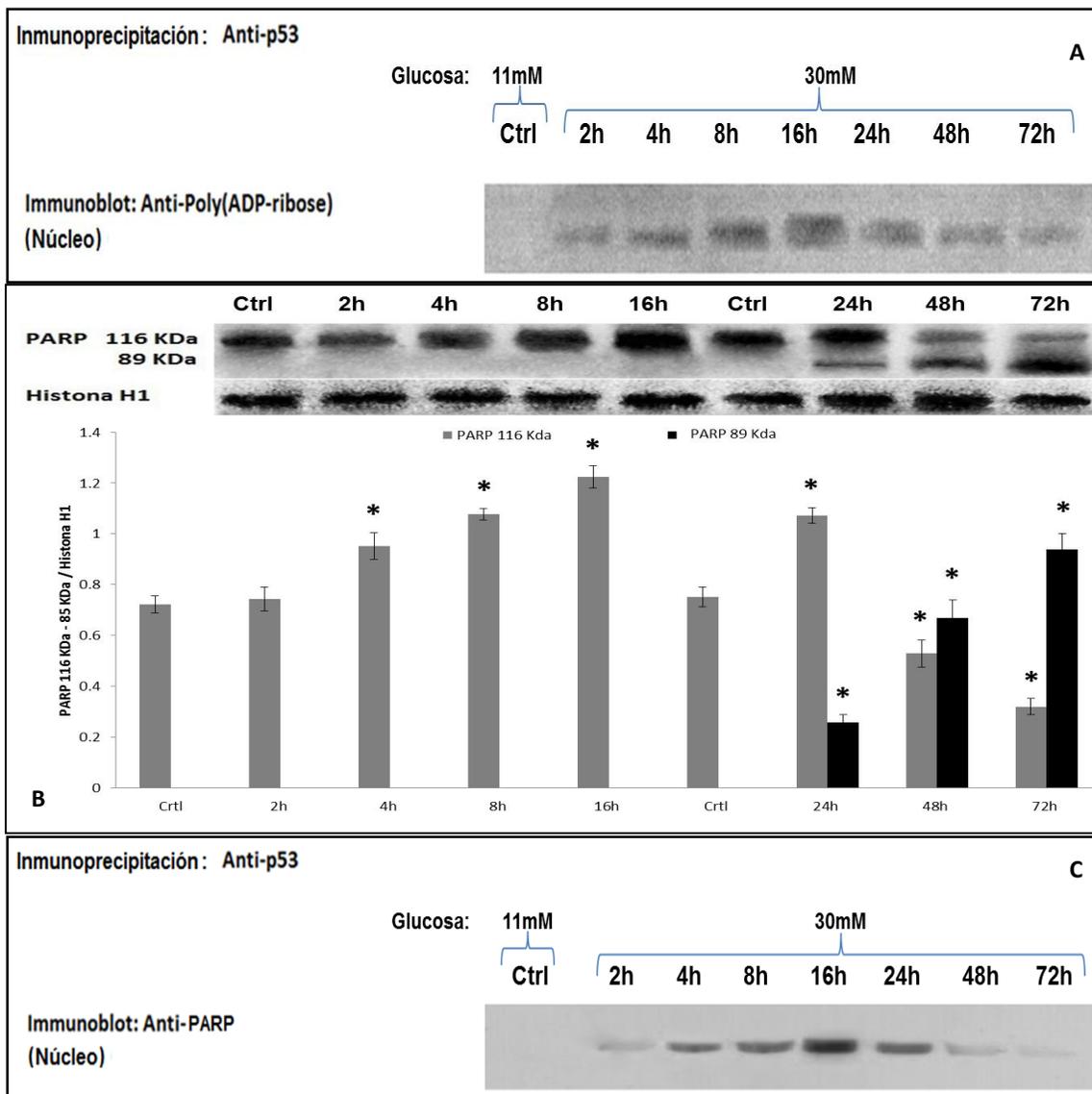


Figura 17. Efecto de la alta glucosa sobre la proteína nuclear PARP. (A) Inmunoprecipitación de p53 y “western blot” con anticuerpo contra residuos de poli-ADP-ribose en fracción nuclear, (B) “Western blot” y análisis densitométrico de PARP en células RINm5F tratadas con 11 (control) y 30 mM de glucosa a diferentes tiempos, se aprecia que PARP se fragmenta (residuo de 85 KDa) a partir de 24 horas. La gráfica muestra el promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes, $p < 0.05$. (C) Inmunoprecipitación de p53 y western blot con anticuerpo contra PARP en fracción nuclear.

7.11 Análisis de N-acetilglucosaminilación de p53 por efecto de la alta glucosa en células RINm5F

La figura 18 muestra los resultados del “western blot” para O-GlcNAc de p53, se observó que p53 esta O-GlcNAc a bajas concentraciones incluso en la fracción control y que se incrementa a partir de las 8 horas de tratamiento en la fracción citosólica posiblemente como un mecanismo protector para p53. En mitocondria observamos la presencia de p53 O-GlcNAc a partir de las 24 horas con tendencia a incrementarse y coincidiendo con su movilización hacia este organelo.

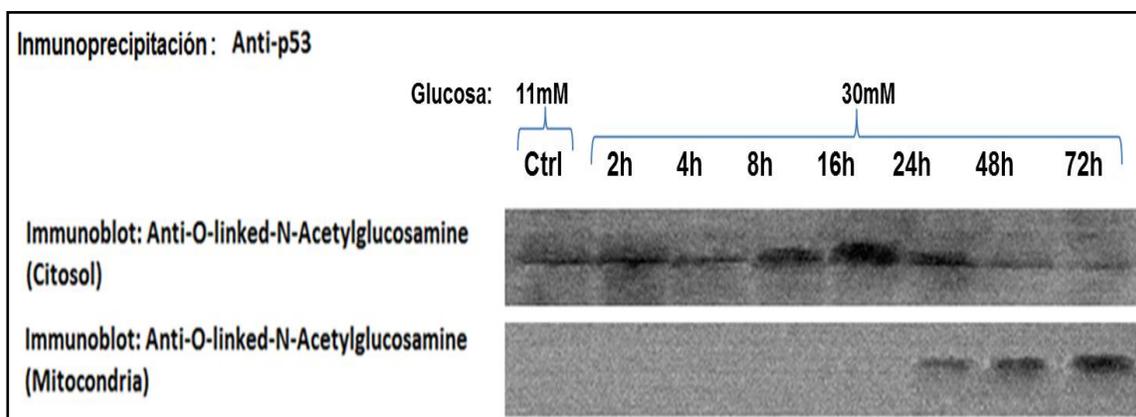


Figura 18. Efecto de la alta glucosa sobre la N-acetilglucosaminilación de p53. Immunoprecipitación de p53 y revelado con anticuerpo Anti-O-linked-N-Acetylglucosamine en fracciones citosólica y mitocondrial. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

8 Discusión

La proteína p53 tiene una vida media muy corta. Un elemento clave en su regulación es Mdm2 que se une a p53 en su dominio de transactivación, bloquea su actividad transcripcional y la marca para su degradación (Freedman y Levine, 1999). La interferencia con la interacción entre p53 y Mdm2 permite la acumulación y subsecuente iniciación de los procesos dependientes de p53 como son la transactivación, arresto del ciclo celular y apoptosis (Chen y col., 1996).

Se han realizado análisis de la apoptosis y de la proteína p53 en ratones diabéticos inducidos por estreptozocina y en cultivos *in vitro* en condiciones de hiperglucemia crónica, estos estudios sugieren que la diabetes provoca un aumento de la respuesta apoptótica a través de un mecanismo mediado por p53 y el bloqueo de p53 con RNA de interferencia resultó en una importante protección contra la apoptosis de fibroblastos inducida por isquemia (Jazayeri y col., 2008). En este estudio cultivamos células RINm5F de origen pancreático con dos concentraciones de glucosa (11 y 30 mM) a diferentes tiempos (2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas), para determinar cambios en expresión, distribución celular y en las modificaciones postraduccionales de p53 como fosforilación, poli (ADP-ribosilación) y N-acetilglucosaminilación (O-GlcNAc), así como su asociación con la muerte celular en condiciones de estrés oxidativo por alta glucosa.

El aumento del índice de apoptosis por alta glucosa se observó a las 48 y 72 horas, sin encontrar diferencias significativas entre ellos (figura 8B). La similitud de respuesta entre 48 y 72 horas, probablemente este relacionada con diferencias en la sensibilidad a la glucosa. Se ha sugerido la existencia de subpoblaciones de células β que evitan o revierten la activación del programa apoptótico (Pipeleers, 1992). Además del efecto protector atribuido a la glucosa en la supervivencia de las células β , mediante la inducción de la síntesis de proteínas que suprimen la apoptosis, el efecto es dependiente de concentración y tiempo de exposición (Martens y Pipeleers, 2005). El equilibrio entre las proteínas pro (Bax) y anti apoptóticas (Bcl-2), entre otras, determina la permeabilidad mitocondrial y liberación de otras proteínas pro

apoptóticas (Adams y Cory, 1998) y la sobrevivencia celular. En este estudio la relación Bcl-2/Bax en la mitocondria disminuyó significativamente a partir de 24 horas de cultivo en alta glucosa (figura 9A), señalando la citotoxicidad de la alta glucosa sobre las células β . Nuestros resultados están acorde con reportes previos que demuestran que la hiperglucemia induce apoptosis en células β , al disminuir expresión de Bcl-2 e incrementar la de Bax (Huang y col., 2007), ello asociado con liberación del citocromo c y la activación de la caspasa 3 (Nakagami y col., 2001).

La hiperglucemia incrementa la producción de ERO mitocondriales (Brownlee, 2005; Sakai y col., 2003), que aunado a la escasa defensa antioxidante de las células β (Grankvist y col., 1981), favorecen la activación de mecanismos apoptóticos en este tipo celular. En la figura 8D se observa un incremento significativo del porcentaje celular que produce ERO, coincidiendo con la localización de Bax en mitocondria (figura 9A). Por otra parte, se observa que la alta glucosa disminuye la fosforilación de ERK 1/2 (figura 10A). Todo ello relacionado con aumento de la apoptosis y el decremento en la tasa de proliferación celular. La fosforilación de ERK 1/2 modula genes relacionados con proliferación, diferenciación, migración y muerte dependiendo de la duración, magnitud y localización celular (Murphy y Blenis, 2006). En varios tipos celulares incluyendo células ductuales pancreáticas de humano (Nakagami y col., 2001; Rescan y col., 2005) la fosforilación de ERK 1/2 incrementa la sobrevivencia celular, principalmente al promover la actividad de Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, IAP e inhibir por fosforilación a BAD y BIM evitando su movilización mitocondrial (Balmanno y Cook, 2009). En células β la activación de ERK 1/2 favorece la síntesis y secreción de insulina en respuesta a glucosa e inhibe la apoptosis (Lawrence y col., 2008), por lo que su inactivación afecta las funciones y la masa de células β . Algunos estudios han demostrado que p53 induce la expresión de fosfatasas (PAC1 y DUSP5) que inactivan ERK 1/2 por UV y estrés oxidante (Yin y col., 2003; Wu, 2004). La sobre expresión de PAC1 incrementa la susceptibilidad a la apoptosis en presencia de ERO. Debido a que PAC1 y DUSP5 desfosforilan a ERK 1/2 y p53 induce su expresión en respuesta a estrés oxidante, es probable que la apoptosis mediada por p53 en esta condición sea a través de la inactivación de ERK 1/2 por dichas fosfatasas (Wu, 2004; Ued y col., 2003).

Al igual que ERK 1/2 en las células RINm5F tratadas con glucosa 30 mM, la proteína CREB sufre el mismo desenlace al disminuir su fosforilación y su actividad. CREB es una proteína que actúa como factor de transcripción. Se une a ciertas secuencias de DNA llamadas elementos de respuesta a AMPc, mediante los cuales incrementa o reduce la transcripción corriente abajo regulada por estos genes. En ratones que sufren una deficiencia en la actividad de CREB, causada por la expresión del transgen negativo dominante A-CREB en células β , desarrollan diabetes por apoptosis de las células β (Jhala y col., 2003). La glucosa y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) activan CREB por fosforilación en el residuo Ser 133 a través de vías de calcio y AMPc para regular la expresión de genes en la célula β , tales como el gen antiapoptótico *bcl-2* y el gen *irs-2* (substrato del receptor de la insulina-2) (Jhala y col., 2003; Jambal y col., 2003). La sobreexpresión de CREB en células MIN6 conduce a la protección contra la apoptosis inducida por citosinas (Jambal y col., 2003), mientras que formas mutantes dominante-negativas de CREB inducen apoptosis y disminuyen la acción antiapoptótica de los factores de crecimiento en los islotes humanos (Sarkar y col., 2007). También se ha reportado que la cascada de señalización de ERK 1/2 controla la fosforilación y el nivel de proteína de CREB y que esta red de señalización juega un papel clave en la supervivencia de la célula β (Costes y col., 2006). Estudios más recientes han demostrado que la exposición de las células β a concentraciones altas de glucosa disminuye la expresión de la proteína CREB debido a un incremento en su degradación por la vía de la ubiquitina-proteosoma, esta disminución de CREB contribuye a la disfunción de las células β y a su muerte por apoptosis (Costes y col., 2009).

En algunos tejidos, el daño al DNA, la expresión de oncogenes y ERO favorecen la movilización de p53 a la mitocondria (Marchenko y col., 2000; Erster y col., 2004) independientemente de sus efectos transcripcionales (Marchenko y col., 2000; Mihara y col., 2003). En este estudio la localización mitocondrial de p53 concuerda con el aumento de apoptosis en las células RINm5F cultivadas con alta glucosa (Figura 11B), sin inducir cambios en su expresión (figura 11A). Ello sugiere que la movilización de p53 es un factor determinante para modificar la permeabilidad mitocondrial e iniciar la apoptosis.

Se ha mencionado que los niveles de p53 dependen del balance entre su síntesis y su degradación y es claro que cualquier efecto sobre estos eventos tendrá distintas consecuencias en la célula. Dado que en nuestros resultados las concentraciones altas de glucosa no modificaron la transcripción de p53, su movilización e incremento en la mitocondria muy probablemente sean el resultado de la estabilización de la proteína, lo cual depende de modificaciones postraduccionales como fosforilación (Huang y col., 1999). La fosforilación de p53 en el extremo NH- terminal en citosol, se ha relacionado con un incremento en la transcripción de Bax (Ito y col., 2004), también se ha asociado con la interacción de p53 con coactivadores p300/CBP y P/CAF que promueven la acetilación, evitan la ubiquitinación por Mdm2 y la degradación de p53 (Lavin y Gueven, 2006). En el C-terminal la fosforilación de Ser 389 (Ser 392 en humanos) esta relacionada con la formación del tetrámero de p53, la unión al DNA, la inducción de la apoptosis y la supresión de tumores (Hoogervorst y col., 2005). Sin embargo, la importancia biológica de la fosforilación de p53 durante la hiperglucemia se desconoce. Por lo que un dato nuevo, que emerge del presente estudio es la fosforilación de p53 Ser 15 y Ser 392 en la mitocondria inducido por alta glucosa (figura 13A).

La fosforilación de p53 Ser 15 y Ser 392 en mitocondria por hiperglucemia es probable que sea requisito para que p53 interactúe con proteínas pro y/o anti apoptóticas, contribuyendo principalmente la fosforilación en Ser 392. Se ha reportado que en células RBK-2H3 (mastocitos) con eugenol (antialérgico) la fosforilación de p53 Ser 15 en la mitocondria permite la interacción de p53 con Bcl-2 y Bcl-xL e induce cambios en $\Delta\psi_m$ y liberación de citocromo c (Park y col., 2005). Contrario a esto, se ha evidenciado que la fosforilación de Ser 15 en la mitocondria por Cdk1, estimula la producción de ATP y el $\Delta\psi_m$, proponiendo a p53 como una señal de supervivencia (Nantajit y col., 2010). Si bien, la fosforilación de p53 Ser 392 en la mitocondria inducida por hiperglucemia no se ha reportado, existen por lo menos dos estudios donde la fosforilación de esta serina por p38 MAPK, se relacionó con activación de Bax y apoptosis en miocitos cultivados con alta glucosa (Fiordaliso y col., 2001; Malhotra y col., 2009). No obstante que estos estudios se realizaron en extracto total, por lo que es probable que la activación de Bax se deba a movilización de p53 a la mitocondria y no

descarta la posible interacción de p53 con Bcl-2 y/o Bcl-xL o bien Bak y su participación en los cambios de permeabilidad mitocondrial. Nuestros resultados mostraron un incremento de 3 veces en la fosforilación de p53 en la Ser 392 con respecto a la Ser 15, lo cual acentúa la importancia de la fosforilación en la Ser 392 para la inducción de la apoptosis vía mitocondria por hiperglucemia. Es posible que la fosforilación proporcione estabilidad y facilite la interacción de p53 con proteínas anti y pro apoptóticas para inducir apoptosis. Hemos demostrado también que hay una movilización de p53 a la mitocondria a partir de 24 horas de cultivo con alta glucosa (30 mM), donde observamos que interactúa con la proteína anti-apoptótica Bcl-2 impidiendo la función de esta última (figura 15). Estos datos concuerdan con cambios observados previamente en $\Delta\psi_m$ y liberación de citocromo c (Ortega-Camarillo y col., 2006).

Dado que p53 posee múltiples sitios de fosforilación también existen múltiples cinasas que regulan este proceso, incluyendo aquellas activadas por estrés oxidante como p38 MAPK (Evans y col., 2002; Chen y col., 2003). Aquí se demuestra que en condiciones de alta glucosa se estimula la redistribución subcelular de p38 MAPK (de citosol a mitocondria), pero su activación solo se observó en la fracción mitocondrial. La localización y fosforilación de p53 coincidió con la fosforilación de p38 MAPK en la mitocondria durante el tratamiento con alta glucosa. Estos datos fueron confirmados por estudios de colocalización de las proteínas fosforiladas por microscopia confocal, donde se observó un coeficiente de colocalización alto tanto para p53 como para p38 MAPK en la mitocondria. Para comprobar la participación de p38 MAPK en la fosforilación de p53, se adicionó el inhibidor específico de p38 MAPK (SB203580), al cultivo de las células RINm5F con alta glucosa. El inhibidor evito la fosforilación de p53 en Ser 392 y Ser 15, en todos los tiempos, así mismo disminuyo la liberación de citocromo c y la apoptosis. Lo que demuestra que en estas condiciones la activación de p38 MAPK es responsable de fosforilar a p53 en Ser 392 y Ser 15 en la mitocondria. Estudios previos en otros tipos celulares demostraron que en situaciones de hiperglucemia, estrés oxidante y radiaciones UV, p38 MAPK regula la apoptosis al fosforilar a p53 en Ser 392 (Huang y col., 1999; Fiordaliso y col., 2001; Thornton y Rincon, 2009) y Ser 15 (She y col., 2000). La inhibición de p38 MAPK también afecto la movilización de p53 a la

mitocondria. Es probable que la fosforilación tenga un efecto protector sobre p53, lo cual evite su reconocimiento e interacción con Mdm2 y su degradación, ello permitiría su movilización a la mitocondria y la activación de la apoptosis, así como su asociación con proteínas anti-apoptóticas.

También reportamos la fosforilación de p53 en Ser 15 en la fracción nuclear. Se ha reportado con anterioridad que la fosforilación de p53 en Ser 15 por radiaciones UV o peróxido de hidrogeno se debe a la activación de ATM, la fosforilación de este residuo en el núcleo ayuda a la estabilización y a la activación de las funciones transcripcionales de p53, relacionadas a la regulación de la muerte por apoptosis (Chen y col., 2003). Los resultados de este estudio mostraron un incremento en la fosforilación de ATM en citosol y núcleo por alta glucosa, probablemente como consecuencia del estrés oxidativo que prevalece en estas condiciones (Fu y col., 2008; Ortega-Camarillo y col., 2006; Brownlee, 2005). Los ratones deficientes de ATM presentan estrés oxidativo y daño en DNA, proteínas y lípidos por ERO (Barzilai y col., 2002) y la administración de antioxidantes como N-acetil cisteína (NAC) disminuyen el daño oxidativo, revierten el déficit neurológico y el envejecimiento prematuro de estos animales (Reliene y col., 2004). ATM fosforila un número substancial de sustratos necesarios para la reparación del DNA, la regulación del ciclo celular y la apoptosis, como la proteína p53. En este estudio la fosforilación de p53 en Ser 15 en la fracción nuclear parece estar relacionada con la activación de ATM. Aunque es probable que la activación de ATM también este asociada a la fosforilación de otras proteínas y ejerza una regulación indirecta sobre p53. ATM puede fosforilar a p53 a través de la activación de Chk2 (Borges y col., 2008) o bien fosforilar a Mdm2 en Ser 395 y evitar de esta manera la ubiquitinación de p53 y su degradación, por lo que podría ser un mecanismo adyacente para su estabilización (Lavin y Gueven, 2006; Xu, 2003). Adicionalmente, se ha señalado la relevancia de la activación de ATM en el metabolismo de la glucosa, aunque los mecanismos precisos aun no se han determinado, sí se sabe que la inhibición de ATM afecta la incorporación de glucosa en músculo y tejido adiposo mediante la movilización de GLUT4, por lo que se le ha relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina y DT2 (Halaby y col., 2008).

Además de la fosforilación, el cultivo con alta glucosa conduce a la activación de mecanismos adyacentes que regulan la vida media y la actividad biológica de p53, como la poli ADP-ribosilación. Nuestros resultados muestran que la enzima PARP, encargada de añadir los polímeros de ADP-ribosa a p53 está activa en etapas previas al inicio de apoptosis en las células RINm5F y posteriormente su función cesa cuando es cortada por la caspasa 3 (Simbulan-Rosenthal y col., 1999), este evento normalmente es utilizado como marcador de apoptosis (Kumari y col., 1998; Mignotte and Vayssiere, 1998). Por lo tanto la poli ADP-ribosilación de p53 comprende una modificación postraduccional temprana. Algunos estudios han sugerido un papel para PARP en la respuesta de p53 ante el daño al DNA, aunque la naturaleza y la consecuencia de esta interacción no son del todo comprendidas (Oliver y col., 1999). Se sabe que la enzima PARP funciona como un regulador positivo de la función de transactivación de p53 relacionada a la reparación del DNA en etapas tempranas del daño celular (Wieler y col., 2003). Cuando es inminente la muerte celular la poli ADP-ribosilación podría proporcionar estabilidad a la proteína protegiéndola de su degradación proteolítica (Simbulan-Rosenthal y col., 2001) para las subsecuentes modificaciones postraduccionales que p53 requiera y le permitan regular el proceso apoptótico.

Por otra parte se ha visto que a altas concentraciones de glucosa la O-N-acetilglucosaminilación (O-GlcNAc) de p53 es un evento muy temprano y muy importante; ya que le concede estabilidad a la proteína evitando su degradación, lo cual permite modificaciones posteriores como fosforilación que activan la función apoptótica de p53 (Fiordaliso y col., 2001). El mecanismo por el cual la O-GlcNAc aumenta la estabilidad de p53 ha sido establecido por la identificación del residuo N-acetilglucosamina en p53 usando espectrometría de masas. La activación de p53 por estrés involucra su O-GlcNAc en Ser-149, y la modificación de este sitio interfiere con la fosforilación en Tre-155. La reducción de la fosforilación en Tre-155 debilita la interacción de p53 con Mdm2, disminuye su ubiquitinación y por consiguiente su proteólisis, lo que resulta en una mayor estabilidad en p53 (Yang y col., 2006). Nuestros resultados indican que p53 presenta O-GlcNAc en etapas previas a la apoptosis y que comienza a aumentar conforme aparecen los signos de apoptosis, también se observó que la proteína p53 con O-GlcNAc se moviliza hasta la mitocondria donde

participa en la liberación de elementos proapoptóticos. Por ello, puede suponerse que esta modificación le brinda estabilidad a p53 evitando su degradación y permitiéndole viajar hasta la mitocondria.

Con base en estos resultados podemos proponer que la hiperglucemia vía ERO induce la apoptosis de células RINm5F a través de la movilización de p53 hacia la mitocondria y su fosforilación en Ser 392 vía p38 MAPK. Ello probablemente permite su interacción con proteínas anti y/o pro apoptóticas y su participación en la regulación de la permeabilidad mitocondrial. Estos resultados también muestran la importancia de la poli ADP-ribosilación y la O-N-acetilglucosaminilación como factores que contribuyen a la estabilización y activación de p53 en células expuestas a altas concentraciones de glucosa (figura 19).

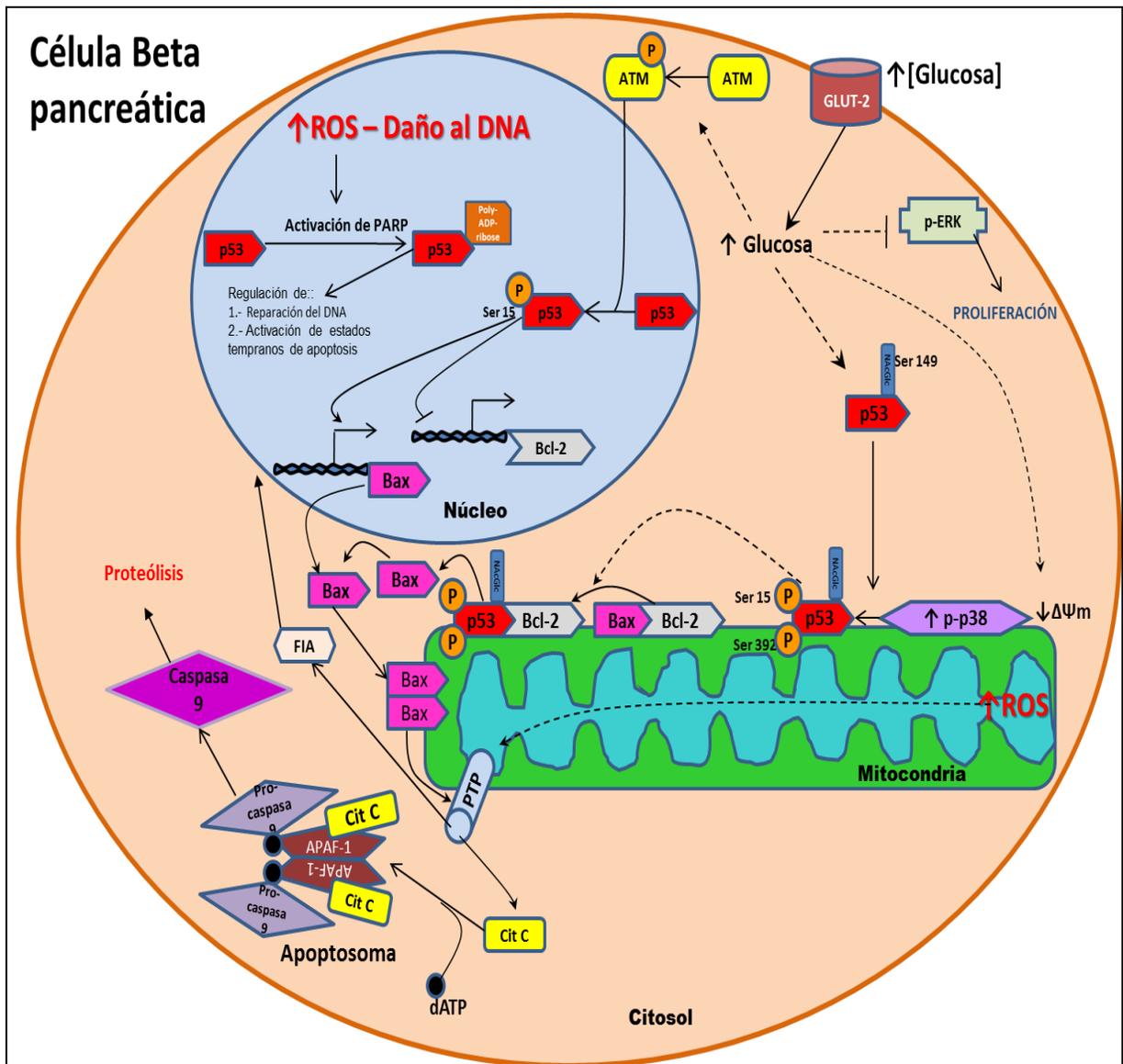


Figura 19. Modificaciones postraduccionales de p53. La poli-ADP-ribosilación aparece en etapas muy tempranas del cultivo de las células RINm5F con alta glucosa permitiéndole a p53 regular funciones como la reparación del daño al DNA y las etapas tempranas de la apoptosis. La O-GlcNAc de p53 se incrementa en el citosol y le brinda a p53 estabilidad lo que permite que migre hasta la mitocondria donde se fosforila por p38 MAPK, lo que probablemente promueva su interacción con elementos anti-apoptóticos y la liberación de elementos proapoptóticos como citocromo c y como consecuencia a la activación de caspasas.

9 Conclusiones

- No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la expresión del RNAm de p53 por efecto del tratamiento con alta glucosa, por lo que la regulación de la apoptosis de p53 sobre las células tratadas con alta glucosa probablemente se deba a la estabilización de la proteína pre existente más que a síntesis de *nov*o.
- La alta glucosa induce un incremento en la formación de ERO que generan daño al DNA y muerte por apoptosis en las células RINm5F.
- Existe una movilización de p53 hacia las mitocondrias por efecto de la alta glucosa donde posteriormente se induce la fosforilación de p53 en la Ser 392 y Ser 15. Este evento permite un control de la apoptosis dependiente de la concentración de glucosa.
- La poli (ADP-ribosilación) y O-GlcNAc son modificaciones postraduccionales importantes que contribuyen a la estabilización y activación de p53 en células expuestas a altas concentraciones de glucosa.
- Nuestros resultados apoyan de manera importante al entendimiento de los eventos bioquímicos que provocan la muerte de las células β por efecto de la alta glucosa durante la DT2, y proporcionan un punto de referencia para futuros estudios concernientes a posibles blancos terapéuticos sobre las modificaciones postraduccionales de p53.

10 Bibliografía

1. **Adams JM, Cory S.** 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 281: 1322-6.
2. **Ahn J, Prives C.** 2001. The C-terminal of p53: the more you learn the less you know. *Nat Struct Biol*. 8:730-732.
3. **Alberti KG, Zimmet P, Shaw J.** 2007. International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention. *Diabet. Med.* 5:451-63.
4. **Amano T, Nakamizo A, Mishra SK, Gumin J, Shinojima N, Sawaya R, Lang FF.** 2009. Simultaneous phosphorylation of p53 at serine 15 and 20 induces apoptosis in human glioma cells by increasing expression of pro-apoptotic genes. *J Neurooncol.* 3: 357-71.
5. **American Diabetes Association.** 2004. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1:S5-S10.
6. **Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al.** 1981. Sequence and organization of human mitochondrial genome. *Nature*. 290: 457-65.
7. **Andreeva L, Heads R, Green CJ.** 1999. Cyclophilins and their possible role in the stress response. *Int J Exp Pathol.* 80: 30515.
8. **Bai L, Zhu WG.** 2006. p53: structure, function and therapeutic applications. *J Cancer Mol.* 2: 141-153.
9. **Balmano K, Cook SJ.** 2009. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ.* 16: 368-77.
10. **Barzilai A, Rotman G and Shiloh Y.** 2002. ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 1: 3-25.
11. **Bereiter-Hahn J.** 1990. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol.* 122: 163.
12. **Bern E, Bergmeyer HU.** 1963. Determination of glutamate dehydrogenase enzymatic activity. In: Bergmeyer HU. (ed), *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York, pp.384-388.
13. **Bonini P, Cicconi S, Cardinales A, Vitale C, Serafino AL, Ciotti MT, Marlier N.J-L, L.** 2004. Oxidative stress induced p53-mediated apoptosis in glia: p53 transcription-independent way to die. *J. Neurosc. Res.* 75:83-95.
14. **Borges HL, Linden R and Wang JY.** 2008. DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system. *Cell Res.* 18: 17-26.
15. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
16. **Brooks CL, Gu W.** 2006. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell.* 3: 307-15.
17. **Brownlee M.** 2005. The pathology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes.* 54:1615-1625.
18. **Brownlee, M.** 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414,

813-819.

19. **Buschmann T, Potapova O, Bar-Shira A, Ivanov VN, Fuchs SY, Henderson S, Fried VA, Minamoto T, Alarcon-Vargas D, Pincus MR, Gaarde WA, Holbrook NJ, Shiloh Y, Ronai Z.** 2001. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Tre-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol.* 21:2743-2754.
20. **Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Bulter PC.** 2003. β -Cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* 52:102–110.
21. **Caelles C, Helmbert A, Karin M.** 1994. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature.* 370:220-223.
22. **Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP.** 2010. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal.* 22: 8-31.
23. **Chandra J, Zhivotovsky B, Zaitsev S, Juntti-Berggren L, Berggren P, Orrenius S.** 2001. Role of apoptosis in pancreatic beta-cell death in diabetes. *Diabetes.* 50: S44-S47.
24. **Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W.** 2005. ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell.* 121:1071-1083.
25. **Chen J, Wu X, Lin J, Levine AJ.** 1996. mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol.* 16: 2445-52.
26. **Chen K, Albano A, Ho A, Keaney JF.** 2003. Activation of p53 by oxidative stress involves platelet-derived growth factor-b receptor-mediated ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase activation, *J Biol Chem.* 278: 39527-39533.
27. **Costes S, Broca C, Bertrand G, Lajoix AD, Bataille D, Bockaert J, Dalle S.** 2006. ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes.* 55(8): 2220-30.
28. **Costes S, Vandewalle B, Turrel-Cuzin C, Broca C, Linck N, Bertrand G, Kerr-Conte J, Portha B, Pattou F, Bockaert J, Dalle S.** 2009. Degradation of cAMP-responsive element-binding protein by the ubiquitin-proteasome pathway contributes to glucotoxicity in beta-cells and human pancreatic islets. *Diabetes.* 58(5): 1105-15.
29. **Crompton M.** 2000. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol.* 529: 1121.
30. **D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG.** 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J.* 1;342 (Pt 2):249-68.
31. **DeLong MJ.** 1998. Apoptosis: a modulator of cellular homeostasis and disease states. *Ann N Y Acad Sci.* 842:82-90.
32. **Diabetes Atlas,** 3^a edición, Federación Internacional de Diabetes, 2006.
33. **Donahue JR, Razmara M, Hoek BJ, Knudsen BT.** 2001. Direct influence of the p53 tumor suppressor on mitochondrial biogenesis and function. *Faseb J.* 15:635-644.

34. **Donath YM, Gross JD, Cerasi, Kaiser N.** 1999. Hyperglycemia-induced β -cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 48, 738-744.
35. **Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, O'Rourke K, Koeppen H, Dixit VM.** 2004. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature*. 429:86-92.
36. **Du X-L, Edelstein D, Rossetti L, Fantus GI, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M.** 2000. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosilation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 12222-12226.
37. **Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, Dawson VL.** 1997. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med.* 10: 1089-95.
38. **Erster S, Mihara M, Kim RH, Petrenko O, Moll UM.** 2004. *In vivo* mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol.* 24:6728-6741.
39. **Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM.** 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 23: 599-622.
40. **Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** 2003. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1:S5-20.
41. **Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B, Anversa P, Kajstura J.** 2001. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes.* 50: 2363-75.
42. **Freedman DA, Wu L, Levine AJ.** 1999. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci.* 55: 96-107.
43. **Freshney, R. I.** 1987. Culture of animal cells: A manual of basic technique. Alan R. Liss, Inc., New York. 117
44. **Fu X, Wan S, Lyu YL, Liu LF, Qi H.** 2008. Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation. *PLoS One.* 3: e2009.
45. **Gao M, Karin M,** 2005. Regulating the regulators: control of protein ubiquitination and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli. *Mol Cell.* 19:581-593.
46. **Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G.** 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 9:1423-1433.
47. **Gazdar AF, Chick WL, Oie HK, Sims HL, King DL, Weir GC, Lauris V.** 1980. Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 6:3519-3523.
48. **Giaccia AJ, Kastan MB.** 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 19: 2973-83.

49. **Giogino F, Laviola L, Leonardi A.** 2005. Pathophysiology of type 2 diabetes: Rationale for different oral antidiabetic treatment strategies. *Diabetes Res Clin Pract* 68S1: S22-S29.
50. **Golstein P, Aubry L, Levraud J.** 2003. Cell-death alternative model organisms: why and which?. *Natur Rev Mol Cell Biol.* 4: 798-807.
51. **Gordon DM, Dancis A, Pain D.** 2000. Mechanisms of mitochondrial protein import. *Essays Biochem.* 36:61-73.
52. **Gottlieb AR.** 2000. Mitochondria: execution central. *FEBS letters* 482, 6-12.
53. **Gottlieb TM, Oren M.** 1996. p53 in growth control and neoplasia. *Biochem Biophys Acta.* 1287:77-102.
54. **Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB.** 1981. CuZn-superoxide dismutasa, Mn-superoxide dismutasa, catalasa and glutathione peroxidasa in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J.* 199, 393-398.
55. **Gray MW, Burger G, Lang BF.** 1999. Mitochondrial evolution. *Science.* 283: 147681.
56. **Green DR, Reed JC.** 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281: 130912.
57. **Grill V, Björklund A.** 2001. A Overstimulation and beta-cell function. *Diabetes.* 1, 122-4.
58. **Halaby MJ, Hibma JC, He J and Da-Qing.** 2008. ATM protein kinase mediates full activation of Akt and regulates glucose transporter 4 translocation by insulin in muscle cells. *Cell Signal.* 20: 1555-1563.
59. **Hamman R, Wing R, Edelstein S, Lachin J, Bray G, Delahanty L et al.** 2006. Effect of weight loss with lifestyle intervention on risk of diabetes. *Diabetes Care.* 29: 2102-2107.
60. **Hampton MB, Orrenius S.** 1997. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 414:552-556.
61. **Harris SL, Levine AJ.** 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene.* 24: 2899-2908.
62. **Hatakeyama S, Nakayama KI.** 2003. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem Biophys Res Commun.* 302:635-645.
63. **Hawkins M, Barzilai N, Liu R, Hu M, Chen W, Rossetti L.** 1997. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insuline resistance. *J Clin Invest.* 99:2173-2182.
64. **Herrmann M, Lorenz HM, Voll R, Grunke M, Woith W, Kalden JR.**1994. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments nucleic acids research. *Nucleic Acids Res.* 22: 5506-5507.
65. **Honda R, Tanaka H, Yasuda H.** 1997. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 1: 25-7.
66. **Hoogervorst EM, Bruins W, Zwart E, van Oostrom CT, van den Aardweg GJ, Beems RB, van den Berg J, Jacks T, van Steeg H, de Vries A.** 2005. Lack of p53 Ser389 phosphorylation predisposes mice to develop 2-acetylaminofluorene-induced bladder tumors but not ionizing radiation-induced lymphomas. *Cancer Res.* 65: 3610-6.

67. **Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y, Dong Z.** 1999. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem.* 274: 12229-35.
68. **Huang Q, Bu S, Yu Y, Guo Z, Ghatnekar G, Bu M, Yang L, Lu B, Feng Z, Liu S, Wang F.** 2007. Diazoxide prevents diabetes through inhibiting pancreatic beta-cells from apoptosis via Bcl-2/Bax rate and p38-beta mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology.* 148: 81-91.
69. **Hulla JE, Schneider RP.** 1993. Structure of the rat p53 tumor suppressor gene. *Nucleic Acids Res.* 3:713-717.
70. **International Diabetes Federation.** IDF Diabetes Atlas, 5th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2011.
71. **Issad T, Masson E, Pagesy P.** 2010. O-GlcNAc modification, insulin signaling and diabetic complications. *Diabetes Metab.* 36: 423-35.
72. **Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Segawa K, Ikeda Y, Kizaki M.** 2004. Induction of apoptosis in Leukemia cells by homovanillic acid derivate, capsaicin, through oxidative stress: implication of Phosphorilation of p53 al ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res.* 64:1071-1078.
73. **Jambal P, Masterson S, Nesterova A, Bouchard R, Bergman B, Hutton JC, Boxer LM, Reusch JE, Pugazhenti S.** 2003. Cytokine-mediated down-regulation of the transcription factor cAMP-response element-binding protein in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 278(25): 23055-65.
74. **Jazayeri L, Callaghan MJ, Grogan RH, Hamou CD, Thanik V, Ingraham CR, Capell BC, Pelo CR, Gurtner GC.** 2008. Diabetes increases p53-mediated apoptosis following ischemia. *Plast Reconstr Surg.* 121: 1135-43.
75. **Jhala US, Canettieri G, Screatton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White M, Montminy M.** 2003. cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev.* 13: 1575-80.
76. **Joazeiro CA, Weissman AM.** 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell.* 102:549-552.
77. **Johnson N, Khan A, Virji S, Ward JM, Crompton M.** 1999. Import and processing of heart mitochondrial cyclophilin D. *Eur J Biochem.* 263: 3539.
78. **Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M.** 1999. Benefical effects of antioxidants in diabetes. Possible protection of pancreatic B-cells against glucose toxicity. *Diabetes.* 48, 2398-2406.
79. **Kastan MB.** 2007. Wild-type p53: tumors can't stand it. *Cell.* 128: 837-840.
80. **Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC.** 2003. P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: Protective role of a p53 inhibitor. *J Am Soc Nephrol.* 14:128-138.
81. **Kennedy TR, Kauri ML, Dahlgren MG, Jung S-K.** 2002. Metabolic oscillations in β -cells. *Diabetes.*

- 51(suppl. 1):S152-S161.
82. **Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF.** 1998. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat. Genet.* 20:398-400.
 83. **Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV.** 1999. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science.* 285:1733-1737.
 84. **Kroemer G, Reed JC.** 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 6: 5139.
 85. **Kumari SR, Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R.** 1998. Functional interactions of p53 with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) during apoptosis following DNA damage: covalent poly(ADP-ribosylation) of p53 by exogenous PARP and noncovalent binding of p53 to the M(r) 85,000 proteolytic fragment. *Cancer Res.* 58: 5075-8.
 86. **Lakin ND, Jackson SP.** 1999. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene.* 18: 7644-7655.
 87. **Lang FF, Bruner JM, Fuller GN, Aldape K, Prados MD, Chang S, Berger MS, McDermott MW, Kunwar SM, Junck LR, Chandler W, Zwiebel JA, Kaplan RS, Yung WK.** 2003. Phase I trials of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results. *J Clin Oncol.* 21: 2508-2518.
 88. **Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH.** 2000. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J Biol Chem.* 275:23106-23112.
 89. **Lavin MF and Gueven N.** 2006. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.* 13: 941-950.
 90. **Lawrence M, Shao C, Duan L, McGlynn K, Cobb MH.** 2008. The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic beta cells. *Acta Physiol (Oxf).* 192: 11-7.
 91. **Le Rhun Y, Kirkland JB, Shah GM.** 1998. Cellular responses to DNA damage in the absence of Poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1:1-10.
 92. **Lebovitz HE.** (1999). Type 2 diabetes: An Overview. *Clin Chem.* 45:1339-1345.
 93. **Lemaster JJ, Qian T, He L, Kim S-J, Elmore PS, Cascio EW, Brenner AD.** 2002. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis and autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 5:769-782.
 94. **Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, Parant JM, Lozano G, Hakem R, Benchimol S.** 2003. Pirh2, a p53-induced ubiquitin – protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell.* 112:779-791.
 95. **Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W.** 2003. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science.* 302:1972-1975.

96. **Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W.** 2002. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem.* 277: 50607-50611.
97. **Li PF, Dietz R, Harsdorf VR.** 1999. P53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *EMBO J.* 18:6027-6036.
98. **Liu K, Paterson JA, Chin E, Kudlow JE.** 2000. Glucose protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic β cells: Linkage of O-linked GlcNAc to β cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:2820-2825.
99. **Macip S, Igarashi M, Berggren P, Yu J, Lee WS, Aaronson AS.** 2003. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol.* 23:8576-8585.
100. **Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM.** 1996. *In vivo* ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res.* 56: 2649-54.
101. **Malhotra A, Vashistha H, Yadav VS, Dube MG, Kalra SP, Abdellatif M, Meggs LG.** 2009. Inhibition of p66ShcA redox activity in cardiac muscle cells attenuates hyperglycemia-induced oxidative stress and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 296: H380-8.
102. **Mandrup-Poulsen T.** 2001. β -cell apoptosis. *Diabetes* 50 (suppl. 1), S58-S63.
103. **Mantovani F, Tocco F, Girardini J, Smith P, Gasco M, Lu X, Crook T, Del Sal G.** 2007. The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor I κ B. *Nat Struct Mol Biol.* 14: 912-20.
104. **Marchenko ND, Zaika A, Moll UM.** 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 275: 16202-12.
105. **Marín-García J, Goldenthal MJ.** 2002. The mitochondrial organelle and the heart. *Rev Esp Cardiol.* 53:1293-1310
106. **Marshak S, Leibowitz G, Bertuzzi F, Kaiser N, Gross JD, Cerasi E, Melloul D.** 1999. Impaired β -cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes.* 48, 1230-1236.
107. **Martens GA, Pipeleers D.** 2009. Glucose, regulator of survival and phenotype of pancreatic beta cells. *Vitam Horm.* 80: 507-39.
108. **Martin OD, Muñoz-Gómez JA, Aguilar QR, Ruiz AM, Oliver FJ.** 2006. Poli (ADP-ribose) Polimerasa-1: una proteína nuclear implicada en procesos inflamatorios, muerte celular y cáncer. *Médicas UIS.* 2:95-103.
109. **Masutani M, Suzuki H, Kamada N, Watanabe M, Ueda O, Nozaki T, Jishage K, Watanabe T, Sugimoto T, Nakagama H, Ochiya T, Sugimura T.** 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 2301-4.
110. **Meetoo D, McGovern P, Safadi R.** 2007. An epidemiological overview of diabetes across the world. *Br J Nurs.* 16:1002-1007.

111. **Mignotte B, Vayssiere JL.** 1998. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem.* 252: 1-15.
112. **Mihara M, Erster S, Zaika A, Oleski P, Chittenden T, Pancoska P, Moil MU.** 2003. P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 11:577-590.
113. **Moll MU, Petrenko O.** 2003. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res.* 14:1001-8.
114. **Moll MU, Zaika A.** 2001. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Let.* 493:65-69.
115. **Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ.** 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 69:1237-1245.
116. **Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH.** 1998. p53 activates the CD95 (Apo-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med.* 188:2033-2045.
117. **Murphy LO, Blenis J.** 2006. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci.* 31: 268-75.
118. **Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Yoshimura SI, Taniyama Y, Aoki M, Matsubara H, Kim S, Kaneda Y, Ogihara T.** 2001. Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death induced by high D-glucose in human endothelial cells. *Diabetes.* 50: 1472-81.
119. **Nakamizo A, Amano T, Zhang W, Zhang XQ, Ramdas L, Liu TJ, Bekele BN, Shono T, Sasaki T, Benedict WF, Sawaya R, Lang FF.** 2008. Phosphorylation of Thr18 and Ser20 of p53 in Ad-p53-induced apoptosis. *Neuro Oncol.* 3: 275-91.
120. **Nantajit D, Fan M, Duru N, Wen Y, Reed JC, Li JJ.** 2010. Cyclin B1/Cdk1 phosphorylation of mitochondrial p53 induces anti-apoptotic response. *PLoS One.* 23: e12341.
121. **Neupert W.** 1997. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 66: 863917.
122. **Nicholson DW, Thornberry NA.** 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22:299-306.
123. **Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y.** 2000. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell.* 6: 849-62.
124. **Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N, Taniguchi T.** 2000. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem.* 275:22627-22630.
125. **Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J.** 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
126. **Olaiz-Fernández G, Rojas R, Aguilar-Salinas CA, Rauda J, Villalpando S.** 2007. Diabetes mellitus in Mexican adults: results from the 2000 National Health Survey. *Salud Pública Méx.* 3:S331-S337.
127. **Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, de Murcia G.** 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease. *Am J Hum Genet.* 64: 1282-8.

128. **Olsson A, Manzl C, Strasser A, Villunger A.** 2007. How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? *Cell Death Differ.* 9: 1561-75.
129. **Ortega-Camarillo C, Guzman-Grenfell AM, García-Macedo R, Rosales-Torres AM, Ávalos-Rodríguez A, Durán-Reyes G, Medina-Navarro R, Cruz M, Díaz-Flores M, Kumate J.** 2006. Hyperglycemia induces apoptosis and p53 mobilization to mitochondria in RINm5F cells. *Mol Cell Biochem.* 281:163-170.
130. **Park BS, Song YS, Yee SB, Lee BG, Seo SY, Park YC, Kim JM, Kim HM, Yoo YH.** 2005 Phosphoserine 15-p53 translocates into mitochondria and interacts with Bcl-2 and Bcl-xL in eugenol-induced apoptosis. *Apoptosis.* 10: 193-200.
131. **Peter ME, Krammer PH.** 1998. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10:545-551.
132. **Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, Polonsky KS.** 1998. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes.* 3:358-64.
133. **Pickart CM.** 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 70:503-533.
134. **Pillai JB, Isbatan A, Imai S, Gupta MP.** 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD⁺ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. *J Biol Chem.* 52:43121-43130.
135. **Pipeleers DG.** 1992. Heterogeneity in pancreatic beta-cell population. *Diabetes.* 41: 777-81.
136. **Reliene R, Fischer E and Schiestl RH.** 2004. Effect of N-acetyl cysteine on oxidative DNA damage and the frequency of DNA deletions in atm-deficient mice. *Can Res* 64: 5148-5153, 2004.
137. **Rescan C, Le Bras S, Lefebvre VH, Frandsen U, Klein T, Foschi M, Pipeleers DG, Scharfmann R, Madsen OD, Heimberg H.** 2005. EGF-induced proliferation of adult human pancreatic duct cells is mediated by the MEK/ERK cascade. *Lab Invest.* 85: 65-74.
138. **Roche E.** 2003. Diabetes tipo 2: gluco-lipo-toxicidad y disfunción de la célula β pancreática. *Ars Pharmaceutica.* 44:313-332.
139. **Rodríguez MS, Desterro JM, Lain S, Midgley CA, Lane DP, Hay RT.** 1999. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO. J.* 18:6455-6461.
140. **Saito S, Goodarzi AA, Higashimoto Y, Noda Y, Lees-Miller SP, Appella E, Anderson CW.** 2002. ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser (46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem.* 277:12491-12494.
141. **Sakahira H, Enari M, Nagata S.** 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 391:96-99.

142. **Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Shirotani T, Brownlee M, Araki E.** 2003. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 300:216-222.
143. **Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, Moll UM.** 2001. Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett.* 488:110-115.
144. **Saraste M.** 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science.* 283: 148893.
145. **Sarkar SA, Gunter J, Bouchard R, Reusch JE, Wiseman A, Gill RG, Hutton JC, Pugazhenti S.** 2007. Dominant negative mutant forms of the cAMP response element binding protein induce apoptosis and decrease the anti-apoptotic action of growth factors in human islets. *Diabetologia.* 50(8): 1649-59.
146. **Schatz G, Dobberstein B.** 1996. Common principles of protein translocation across membranes. *Science.* 271: 151926.
147. **Schraufstatter IU, Hyslop PA, Hinshaw DB, Spragg RG, Sklar LA, Cochrane CG.** 1986. Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4908-12.
148. **Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein CJ, Fitzgerald P, Green RD.** 2000. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome *c* release. *J Biol Chem.* 275:7337-7342.
149. **Schulze-Bergkamen H, Krammer P.** 2004. Apoptosis in Cancer - Implications for therapy. *Seminar Oncol.* 31: 90-119.
150. **She QB, Chen N, Dong Z.** 2000. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem.* 275: 20444-9.
151. **Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo R, Smulson ME.** 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 during apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* 59: 2190-4.
152. **Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo RB, Samara R, Jung M, Dritschilo A, Spoonde A, Smulson ME.** 2001. Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 in vitro and *in vivo* modulates binding to its DNA consensus sequence. *Neoplasia.* 3: 179-88.
153. **Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al.** 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosisinducing factor. *Nature.* 397: 4416.
154. **Szabó C, Dawson VL.** 1998. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci.* 7: 287-98.
155. **Taira N, Nihira K, Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K.** 2007. DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell.* 5: 725-38.
156. **Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y.** 2000. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature.* 404:42-49.

157. **Thornton TM, Rincon M.** 2009. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci.* 5: 44-51.
158. **Tsujimoto Y, Shimizu S.** 2000. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.* 12:1174-1181
159. **Ueda K, Arakawa H, Nakamura Y.** 2003. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. *Oncogene.* 22: 5586-91.
160. **Vrablic SA, Albrigh DC, Craciunescu NC, Salganik IR, Zeisel HS.** 2001. Altered mitochondrial function and overgeneration of reactive oxygen species precede the induction of apoptosis by 1-O-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine in p53-defective hepatocytes. *Faseb J.* 15:1739-1744.
161. **Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD.** 1998. ATMdependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet.* 19:175-178.
162. **Weir CG, Laybutt RD, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A.** 2001. β -cell adaptation and compensation during the progression of diabetes. *Diabetes.* 50(suppl. 1):S154-S159.
163. **West IC.** 2000. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med.* 17:171-180.
164. **Wiederkehr A, Wollheim CB.** 2006. Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology.* 147: 2643-9.
165. **Wieler S, Gagné JP, Vaziri H, Poirier GG, Benchimol S.** 2003. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a positive regulator of the p53-mediated G1 arrest response following ionizing radiation. *J Biol Chem.* 278: 18914-21.
166. **Wu GS.** 2004. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 3: 156-61.
167. **Wu L, Levine AJ.** 1997. Differential regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 genes after high-dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene. *Mol Med.* 7: 441-51.
168. **Wu X, Deng Y.** 2002. Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. *Front Biosci.* 7:151-156.
169. **Xu Y.** 2003. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ.* 10: 400-403.
170. **Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X.** 1997. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Sci.* 275:1129-1132.
171. **Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS, Cho JW.** 2006. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol.* 8: 1074-1083.
172. **Yin Y, Liu YX, Jin YJ, Hall EJ, Barrett JC.** 2003. PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression. *Nature.* 422: 527-31.
173. **Zhang H, Hannon G J, Beach D.** 1994. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.* 8:1750-1758.

174. **Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X.** 2005. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell*. 7: 1085-95.
175. **Zimmet P.** 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 414:782-787.
176. **Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB.** 2001. BH3-only proteins that bind pro survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Gen Dev*. 15:1481-1486.

11 Premios y distinciones

XXIII Premio Nacional de Investigación 2012

Fundación GlaxoSmithKline – Fundación Mexicana para la Salud A.C.

Segundo lugar en la categoría básica con el trabajo: Poli (ADP-ribosilación) y N-acetilglucosaminilación de p53. Dos modificaciones postraduccionales inducidas por hiperglucemia en células RINm5F. Efectuado el 6 de septiembre de 2012.

Recipient of a Travel Award for 19th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM)

Winner of the Society's annual Travel Award 2012 for attended and presented a poster presentation, "Phosphorylation, O-N-Acetylglucosaminylation and Poly-ADP-Ribosylation of p53 in RINm5F cells cultured in high glucose", held november 14-18, 2012.

Winner for free meeting registration for the 2013 SFRBM Annual Meeting in San Antonio, TX or 2014 SFRBM Annual Meeting in Seattle, WA.

12 Difusión de resultados

07/05/13 Fwd: Decision on your manuscript #MOLE-5467R2 - luisbiolepx@gmail.com - Gmail
<https://mail.google.com/mail/ca/u/0/#inbox/13e5669d26e9faae> 1/1
From: Molecular Biology Reports (MOLE) <manikandan.jayaraman@springer.com>
Date: 2013/4/27
Subject: Decision on your manuscript #MOLE-5467R2
To: Clara Ortega-Camarillo <clara.ortegacamarillo@gmail.com>

Dear Dr Clara Ortega-Camarillo:

I am pleased to inform you that your manuscript, "High glucose induces mitochondrial p53 phosphorylation by p38 MAPK in pancreatic RINm5F cells" has been accepted for publication in Molecular Biology Reports.

Please remember to always include your manuscript number, #MOLE-5467R2, whenever inquiring about your manuscript. Thank you.

Sincerely yours,

Andre van Wijnen
Editor-in-Chief
Molecular Biology Reports

Molecular Biology Reports

High glucose induces mitochondrial p53 phosphorylation by p38 MAPK in pancreatic RINm5F cells

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MOLE-5467R1
Full Title:	High glucose induces mitochondrial p53 phosphorylation by p38 MAPK in pancreatic RINm5F cells
Article Type:	Manuscript
Keywords:	Apoptosis, High glucose; B-cell; Mitochondria; oxidative stress; p53-ser392.
Corresponding Author:	Clara Ortega-Camarillo Instituto Mexicano del Seguro Social MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Instituto Mexicano del Seguro Social
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	LUIS ANTONIO FLORES-LÓPEZ, Ms
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	LUIS ANTONIO FLORES-LÓPEZ, Ms
	MARGARITA DÍAZ-FLORES, DR.
	REBECA GARCÍA-MACEDO, DR.
	ALEJANDRO ÁVALOS-RODRÍGUEZ, DR.
	MARCELA VERGARA-ONOFRE, DR.
	MIGUEL CRUZ, DR.
	ALEJANDRA CONTRERAS-RAMOS, DR.
	MINA KONIGSBERG, DR.
	Clara Ortega-Camarillo
Order of Authors Secondary Information:	

High glucose induces mitochondrial p53 phosphorylation by p38 MAPK in pancreatic RINm5F cells

Luis A Flores-López, Margarita Díaz-Flores, Rebeca García-Macedo, Alejandro Ávalos-Rodríguez, Marcela Vergara-Onofre, Miguel Cruz, Alejandra Contreras-Ramos, Mina Konigsberg, and Clara Ortega-Camarillo.

M Díaz-Flores, R García-Macedo, M Cruz, C Ortega-Camarillo
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, HE, Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. Av. Cuauhtémoc 330, Col Doctores, Del. Cuauhtémoc. CP 06720, D.F., México

LA Flores-López
Posgrado en Biología Experimental, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana – Izt. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Del. Iztapalapa, CP 09340, D.F., México.

A Ávalos-Rodríguez, M Vergara-Onofre
Bioquímica de la Reproducción, Depto. Prod. Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana – Xoch., Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud. Del. Coyoacan, CP 04960, D.F., México.

A Contreras-Ramos
Lab. Biología del Desarrollo y T. Exp. Hospital Infantil de México Federico Gómez. Dr. Márquez 162, Col Doctores, Del. Cuauhtémoc. CP 06720, D.F., México

M Konigsberg
Depto. de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana – Izt. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Del. Iztapalapa, CP 09340, D.F., México.

Corresponding author: Clara Ortega-Camarillo. Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, HE, Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. Av. Cuauhtémoc 330, Col Doctores, Del Cuauhtémoc, CP. 06720, México, D.F., México. Tel. and Fax +55 56 27 69 14. email: clara.ortegacamarillo@gmail.com

Abstract

Pancreatic β -cell death in type 2 diabetes has been related to p53 subcellular localisation and phosphorylation. However, the mechanisms by which p53 is phosphorylated and its activation in response to oxidative stress remain poorly understood. Therefore, the aim of this study was to investigate mitochondrial p53 phosphorylation, its subcellular localisation and its relationship with apoptotic induction in RINm5F cells cultured under high glucose conditions. Our results show that p53 phosphorylation in the mitochondrial fraction was greater at ser392 than at ser15. This increased phosphorylation correlated with an increase in reactive oxygen species (ROS), a decrease in the Bcl-2/Bax ratio, a release of cytochrome c and an increase in the rate of apoptosis. We also observed a decline in ERK 1/2 phosphorylation over time, which is an indicator of cell proliferation. To identify the kinase responsible for phosphorylating p53, p38 MAPK activation was analysed. We found that high glucose induced an increase in p38 MAPK phosphorylation in the mitochondria after 24 to 72 h. Moreover, the phosphorylation of p53 (ser392) by p38 MAPK in mitochondria was confirmed by colocalisation studies with confocal microscopy. The addition of a specific p38 MAPK inhibitor (SB203580) to the culture medium during high glucose treatment blocked p53 mobilisation to the mitochondria and phosphorylation; thus, the release of cytochrome c and the apoptosis rate in RINm5F cells decreased. These results suggest that mitochondrial p53 phosphorylation by p38 MAPK plays an important role in RINm5F cell death under high glucose conditions.

Keywords: Apoptosis, β -cell, High glucose, Mitochondria, Oxidative stress, p53-p-ser392.

INTRODUCTION

Dysfunctional and decreasing numbers of pancreatic β -cells are determining factors in the development of type 2 diabetes. A 60% reduction in β -cell mass has been reported to occur prior to any clinical manifestations of the disease [1]. β -cell death is likely a consequence of intracellular changes caused by chronic hyperglycaemia, specifically the increase in mitochondrial oxidative stress [2, 3] and the decreased expression of reactive oxygen species (ROS)-scavenging enzymes [4]. Apoptotic cell death has also been reported in human pancreatic islets and insulin-producing cell lines cultured in the presence of high glucose (30 mM) and mitochondrial respiration inhibitors [5, 6].

Oxidative stress generated as a consequence of chronic hyperglycaemia activates multiple signalling pathways, which in turn initiate phosphorylation cascades involving kinases such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) family [extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK) and p38] [3, 7, 8]. These pathways regulate the ROS response and determine cell fate: proliferation, differentiation, stress adaptation or apoptosis [9]. Recent studies have demonstrated that the expression and phosphorylation of ERK, JNK and p38 MAPK exacerbate endothelial dysfunction in advanced stage of diabetes [10]. Additionally, the activation of MAPKs is critical for cardiovascular dysfunction in diabetes [3, 11] as well as in high glucose-induced cellular hypertrophy [12]. In particular, p38 MAPK activation is a fundamental mechanism for β -cell apoptosis induced by free fatty acids [13]. Other high glucose-activated kinases include DNA-dependent protein kinase and ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein kinase [14, 15]. An important protein that is susceptible to phosphorylation by any of these kinases is p53, which plays an important role in β -cell apoptosis [16].

Protein p53 is a major regulator of cell proliferation and apoptosis. Under physiological conditions, p53 is maintained under strict control through binding to Mdm2 (murine double minute 2), a ubiquitin ligase that facilitates the proteosomal degradation of p53. Under stress conditions such as chronic hyperglycaemia, p53 is rapidly stabilised and activated through post-transcriptional modifications [17-20], which appear to influence its participation in β -cell apoptosis [13, 16]. In particular, phosphorylation of the amino and carboxyl terminal regions plays a key role in defining p53 function. Another important feature of p53 functional regulation is its subcellular localisation. The p53 protein has been shown to mobilise to the mitochondria in response to stress [21]. Previous results from our group revealed an increase ROS, p53 mobilisation to the mitochondria, altered membrane potential, cytochrome c release, and apoptosis when the pancreatic cell line RINm5F was cultured in 30 mM glucose [16].

Despite existing studies related to the mechanisms of p53 phosphorylation and its activation in response to oxidative stress, these phenomena remain poorly understood in hyperglycaemia-induced β -cell apoptosis. In this work, we propose that the mitochondrial localisation of p53 is a consequence of its activation and stabilisation via p38 MAPK. The aim of this study was to investigate mitochondrial p53 and p38 MAPK phosphorylation, the subcellular localisation of p53 and its association with the apoptotic index in RINm5F cells cultured under high concentrations of glucose.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

RPMI-1640 medium, Hank's balanced salt solution, trypsin, EDTA, glucose, HEPES, KCl, EGTA, DTT, PMSF, NaF, NaVO₄, sucrose and mannitol were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Foetal bovine serum (FBS), TRIzol, gentamicin and L-glutamine were purchased from Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, USA). Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), anti-mouse IgG-Alexa 594, anti-rabbit IgG-Alexa 594 and MitoTracker Green were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Annexin-V FITC and propidium iodide were purchased from Roche Applied Science (México). Anti-p53 pAb 240, anti-phosphoser15, anti-phospho-p53-ser392, anti-p38 MAPK, anti-phospho-p38 MAPK, anti-ERK 1/2, anti-phospho-ERK 1/2, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-cox IV, anti-actin and anti-histone H1 antibodies were obtained from Santa Cruz

Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). An ECL kit was obtained from GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA). Sequiblot-PVDF membranes, Precision Plus protein standards and DC protein assay kit were purchase from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). A First Strand cDNA Synthesis Kit was obtained from Fermentas (MD, USA). A Light Cycler Fast Start DNA Master PLUS SYBR Green I kit was purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). All other analytical grade chemicals were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Cell culture

Rat RINm5F (insulin-producing; A.T.C.C) cells were cultured in RPMI-1640 medium with 11 mM glucose (low glucose, LG) supplemented with 10 % foetal bovine serum (FBS) (v/v), 1 mM sodium pyruvate, 23.8 mM NaHCO₃, 2 mM glutamine and 20 µg/ml gentamicin at 37 °C in a 5 % CO₂ environment. The cells were harvested and subcultured for 24, 48 and 72 h in RPMI-1640 with 30 mM glucose (HG). Passage 8 was used until 75 % confluency was achieved [16].

RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR (RT-PCR) analysis

Total RNA was purified from RINm5F cells (10⁷ cells) using TRIzol following the manufacturer's instructions. cDNA was synthesised from 5 µg of RNA using a First Strand cDNA Synthesis Kit; the material obtained was used for RT-PCR. The following p53 specific primers were used: 5'-GGACGACAGGCAGACTTTTC-3' (T_m = 59.85) and 3'-TTTTATGGCGGGACGTAGAC-5' (T_m = 59.96). RT-PCR was performed in a Light Cycler 2.0 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim Germany) in conjunction with a Light Cycler Fast Start DNA Master PLUS SYBR Green I Kit. The data were normalised to GAPDH. After amplification, melting curves for each PCR product were obtained and used to determine their specificity.

Apoptosis analysis

Flow cytometry

Cells were harvested in 2 mM PBS-EDTA, washed in 0.1 % BSA-PBS (w/v) and centrifuged at 200 g for 5 min. Next, 100 µl of staining solution [20 µl Annexin V-FITC (10 µg/ml) and 20 µl propidium iodide (PI, 50 µg/ml) in 1 ml HEPES buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)] was added to the pellet followed by incubation in the dark for 15 min. The samples were analysed by flow cytometry (BD FACSAria; Becton Dickinson System & Co., San Jose, CA, USA) at an excitation wavelength of 488 nm. The emitted light was split and collected at 530 nm for FITC and 585 nm for PI. For each run, 20,000 cells were required. The data were analysed using FACSDIVA™ software (Becton Dickinson).

DNA fragmentation

After treatment, the cells were harvested with PBS-EDTA and washed twice with PBS. The cell pellet was lysed in 10 µl of buffer (20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 % Igepal v/v) per 10⁶, stirred for 10 s and immediately centrifuged for 5 min at 9,200 g and 4 °C. The supernatant was recovered, the pellet was resuspended with lysis buffer and centrifuged, and the supernatants were unified. Subsequently, 1 % SDS was added to the supernatant, followed by incubation for 2 h with RNase (final concentration: 5 µg/µl) at 56 °C, followed by digestion with proteinase K (final concentration: 2 µg/µl) for 2 h at 37 °C. DNA was precipitated with 0.5 volumes of 10 M ammonium acetate and 2.5 volumes of absolute ethanol at -20 °C overnight. The DNA was visualised on 1.3 % agarose gels stained with ethidium bromide [22]

Measurement of reactive oxygen species (ROS)

Following high glucose exposure, RINm5F cells were incubated in the presence of 10 µM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) for 30 min at 37 °C. After incubation, the RINm5F cells were washed with HBSS, trypsinised and resuspended in 1 % FBS-PBS (pH 7.4). The DCF (dichlorofluorescein) fluorescence

intensity was measured with a flow cytometer at excitation/emission wavelengths of 488/530 nm, analysing 20,000 cells in each run.

Subcellular fractionation

After treatment, the cells were harvested in PBS (2 mM EDTA, pH 7.4), centrifuged at 250 g for 5 min at 4 °C and washed with PBS. Five hundred microlitres of cold buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 50 mM NaF, 100 mM NaVO₄) was added; after 5 min at 4 °C, 20 µl of 10 % Igepal v/v was added and samples were centrifuged at 16,500 g for 1 min. Both the pellet and the supernatant were recovered. The nuclear integrity and purity were verified by staining with 0.1 % toluidine blue. The nuclear fraction was obtained following a previously described method [23]. *Mitochondrial and cytosolic fractions*: Two hundred microlitres of 1 M mannitol and 50 µl of 1.25 M sucrose were added to the supernatants obtained in the previous centrifugation, and the samples were centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4 °C. Forty microlitres of buffer A was added to the resulting pellet (mitochondrial fraction), and the supernatant (cytosolic fraction) was centrifuged at 15,000 g for 10 min at 4 °C; the resulting supernatant was the cytosolic fraction. Cytosolic fractions were analysed for glutamate dehydrogenase (GDH, mitochondrial marker) activity [24] as a purity control. The protein concentration was determined using DC protein assay kit, and the remaining lysates were stored at -70 °C until use.

Western blot analysis

Forty-microgram samples of total protein from different subcellular fractions were subjected to 10 % SDS-PAGE and electroblotted onto PVDF membranes overnight (40 V, 4 °C). The samples were incubated for 2.5 h with the appropriate primary antibody (1:500 dilution; anti-p53 pAb 240, anti-phospho-p53-ser15, anti-phospho-p53-ser392, anti-p38 MAPK, anti phospho-p38 MAPK-Tyr182, anti-ERK 1/2, anti-phospho-ERK 1/2, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-cytochrome c, anti-Cox IV (cytochrome oxidase), anti-actin or anti-histone H1). Next, the samples were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (1:2000), and an enhanced chemiluminescence kit (ECL) was used to develop the luminescent signal. Immunoreactive bands were quantified by densitometric scanning, and the density of the individual bands was calculated using a Kodak 1500 Imaging System and Kodak molecular imaging software.

Immunoprecipitation

The appropriate antibodies (anti-p53 or anti-Bax in a 5 µl volume) were added to 200 µg of total protein and incubated for 1 hour at 4 °C under orbital agitation. Thereafter, 20 µl of Protein G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) was added, followed by overnight incubation under orbital agitation. The immunoprecipitates were collected by centrifugation, boiled in Laemmli sample buffer, subjected to 10 % SDS-PAGE and electroblotted onto PVDF membranes. After blocking, the p38 MAPK antibody or anti-phosphoserine antibody (1:500) in 1 % BSA-TBS was added, followed by overnight incubation at 4 °C. Detection was performed as previously described.

Colocalisation of phospho-p53-ser392 and phospho-p38 MAPK

RINm5F cells were cultured in 8-well Lab-Tek Chamber Slides with covers (Nalgene Nunc International) in RPMI 1640-10 % FBS (v/v) with 11 or 30 mM glucose. After 72 h, the cells were incubated in culture medium with 200 nM MitoTracker Green for 30 min; the dye was then removed, and the cells were washed and fixed in 4 % formaldehyde in culture medium for 30 min at 37 °C. After rinsing with PBS-Tween 20[®], the cells were permeabilised with 0.3 % Triton[™] X-100 in PBS- for 15 min at room temperature. After blocking, anti-phospho-p53-ser392 or anti-phospho-p38 MAPK antibody (1:10 dilution) was added, and the samples were incubated at 4 °C overnight. The next day, anti-mouse IgG-Alexa 594 or anti-rabbit IgG-Alexa 594 (1:50 dilution) was added,

followed by incubation for 4 h. The cells were then washed, the nuclei were stained with DRA-Q7 (Biostatus), and the samples were mounted with VECTASHIELD®. Microscopic analysis was performed with a confocal microscope (Carl Zeiss, Axiovert), and capture and intensity analysis was performed with the program Zen 2009 (Carl Zeiss, Goettingen, Germany). For imaging, 488-nm and 543-nm laser and short-pass filters (BP 505-530) were used for MitoFluor Green, a short-pass filter (BP 565-585) was used for phospho-p53-ser392 and phospho-p38 MAPK, and a long-pass filter (LP 650) was used for DRA-Q7. All images were captured at 40X.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm SD of at least three independent experiments. The data were subjected to variance analysis followed by Tukey's test for multiple comparisons. Differences with p values ≤ 0.05 were considered to be significant. The overlap coefficient in confocal micrographs was determined by the degree of colocalisation between channel 1 and channel 2 shown in quadrant 3. Each fluorescent contains 256 intensity levels (8 bits) and is represented by a two-dimensional graph or a dot plot of 256 x 256 levels of intensity with the criterion of 50 x 50 background intensity levels, as indicated by the program. Statistical analysis was performed using Pearson's colocalisation coefficient in quadrant 3 with Zen software (Carl Zeiss).

RESULTS

ROS levels, changes in the Bcl-2/BAX ratio and ERK 1/2 phosphorylation induced by high glucose treatment increase the apoptosis rate in RINm5F cells

Previously, we demonstrated that high glucose concentrations (30 mM) in RINm5F cells increase the apoptotic index after 48 h of culture [16]. Therefore, in the present study, we sought to determine the effect of high glucose on cell viability after a longer time period (72 h). Figure 1a illustrates the mitochondrial Bcl-2/Bax ratio, which was quantified as an indicator of the cellular tendency to undergo apoptotic cell death. Our results indicate that as time passes, the ratio tends to favour the pro-apoptotic protein as opposed to the anti-apoptotic protein. This result correlates with the observed ROS increase after a longer period of exposure to high glucose, as measured by flow cytometry using DCF (Fig. 1b). The percentage of apoptotic cells was also determined using annexin V FITC, and the results indicate that although the previous three parameters suggested a propensity to undergo apoptosis at 24 h, actual cell death was only observed at 48 and 72 h (37 % and 44 %, respectively, $P < 0.01$) (Fig. 1c). Finally, because a reduction in β -cell mass has been reported to occur as a very early event in diabetic pathology, ERK 1/2 activation was determined as an indicator of cell proliferation and β -cell mass. Figure 1d shows that high glucose decreased ERK 1/2 activation by approximately 20 % after 24 h, by 40 % at 48 and by 47 % at 72 h.

High glucose concentrations modify the subcellular distribution of p53

To ensure the enrichment of the mitochondrial fraction, GDH activity was measured in the mitochondrial and cytosolic fractions of cells with low and high glucose. GDH activity was lower in the cytosolic fraction (0.83 ± 0.25 and 0.96 ± 0.28 U/mg protein) for HG and LG, respectively) compared with the mitochondrial fraction (17.81 ± 1.95 and 18.3 ± 0.103 U/mg protein, respectively). Furthermore, the purity of the nuclei was verified by staining with toluidine blue before lysis of the nuclear fraction. High glucose did not alter p53 mRNA expression in RINm5F cells at any of the studied times (Fig. 2a); rather, it favoured a p53 subcellular redistribution. As shown in Figure 2b, p53 is primarily located in the cytosol and nucleus in control cells; however, after 24 h of incubation in the presence of 30 mM glucose, a fraction of p53 (0.37 ± 0.03) was mobilised from the cytosol and nucleus into the mitochondria. A similar behaviour was observed after 48 h and 72 h, where the majority of p53 was found in the mitochondria (0.97 ± 0.097) (Fig. 2b).

High glucose induces p53 and p38 MAPK phosphorylation in mitochondria

In RINm5F cells cultured in low glucose (11 mM, LG) for up to 72 h, p53 was unphosphorylated (in both the cytosol and mitochondria). High glucose induced p53-ser392 phosphorylation in the mitochondria starting at 24 h, and this effect was maintained at 72 h. Under these conditions, p53-ser15 phosphorylation was also observed, but it was markedly lower (approximately 4-fold) than ser392 phosphorylation. Because p38 MAPK is known to be activated in response to oxidative stress [25], the activation of this kinase was examined in the mitochondrial and cytosolic fractions. The results showed that the protein kinase p38 MAPK was found only in the cytosol in its inactive form in RINm5F cells cultured in low glucose, but in cells cultured in high glucose, p38 MAPK was found both in the cytosol and in the mitochondria. However, the phosphorylated form was exclusively found in the mitochondrial fraction (Fig. 3a).

p38 MAPK co-precipitates with p53 under high glucose conditions

To investigate the interaction between p38 MAPK and p53, RINm5F cells were cultured with high glucose and at the end of the treatment, immunoprecipitation was performed with an antibody against p53, and western blotting was performed using an antibody against p38 MAPK. The results showed the formation of a complex between p38 MAPK and p53 in cells treated with high glucose. When the pyridinyl imidazole SB203580 (10 μ M), a potent inhibitor of p38 MAPK, was added to the culture, the interaction between p53 and p38 MAPK was abrogated (Fig. 3b).

SB203580 inhibits p53-ser392 phosphorylation and regulates the intracellular localisation of p53

To further investigate whether the apoptosis and p53-ser392 phosphorylation observed in RINm5F cells cultured in high glucose were due to p38 MAPK activation, we cultured cells in 30 mM glucose with the p38 MAPK inhibitor SB203580 and examined p53 phosphorylation. The inhibition of p38 MAPK completely abolished p53-ser392 phosphorylation in the mitochondria (Fig. 3c). These results indicate that p53-ser392 phosphorylation regulates the subcellular distribution of p53 as well as its degradation because the addition of SB203580 decreased p53 levels in a time-dependent manner after treatment (Fig. 3d). Thus, it is likely that preventing the phosphorylation of p53 promotes its recognition by molecules that lead to its degradation.

A p38 MAPK inhibitor (SB203580) inhibits Bax phosphorylation

Previous studies have shown that p38 MAPK regulates both Bax translocation to mitochondria and the release of cytochrome c [26, 27]. Likewise, Bax has been shown to be phosphorylated by p38 MAPK [28]. As expected in RINm5F cells, Bax phosphorylation increased in a time-dependent manner, and when the SB203580 inhibitor was added, Bax phosphorylation decreased significantly, as was observed in the immunoprecipitation experiments (Fig 3e).

Phosphorylated p53-ser392 and p38 MAPK colocalise with mitochondria in RINm5F cells cultured in high glucose

The phosphorylation of p53 and that of p38 MAPK were separately analysed by confocal microscopy after staining the mitochondria with MitoFluor Green. The results are shown in Figure 4. Phosphorylated p53-ser392 in cells harvested after 72 h of treatment with high glucose colocalised with the mitochondrial fraction (Fig. 4a). The same behaviour was observed for phosphorylated p38 MAPK (Fig. 4b). The average coefficients of colocalisation (overlap coefficients) were 0.79 ± 0.042 and 0.82 ± 0.013 for phospho-p53-ser392 and phospho-p38 MAPK with HG, respectively. For the cells treated with LG, the coefficients of colocalisation were 0.48 ± 0.02 for phospho-p53-ser392 and 0.52 ± 0.03 for phospho-p38 MAPK, show statistically significant differences ($P < 0.001$) compared with cells exposed to high glucose (Fig. 4c).

SB203580 inhibits RINm5F cell apoptosis induced by high glucose

When RINm5F cells were cultured in high glucose with SB203580, a significant decrease in two important indicators of apoptosis, caspase 3 activation (Fig. 5a) and oligonucleosomal DNA fragmentation (Fig. 5b), was

observed. These results agree with previous studies showing that high glucose concentrations alter mitochondrial permeability and induce the release of cytochrome c and the incidence of apoptosis in RINm5F cells [16]. In this study, we also observed that these two effects are diminished by the addition of SB203580 to RINm5F cells cultured in high glucose (Fig. 5c and 5d).

DISCUSSION

In this study, we cultured pancreatic RINm5F cells using two different glucose concentrations, LG (11 mM) or HG (30 mM), for 24, 48, and 72 h to examine changes in p53 expression, cellular distribution and phosphorylation, changes that are normally associated with cell death under oxidative stress caused by hyperglycaemia. Our results showed that high glucose increased ROS levels and the percentage of cells undergoing apoptosis in a time-dependent manner without changing p53 mRNA expression. HG conditions also increased p53 localisation to the mitochondria and its phosphorylation therein, highlighting the importance of p53 phosphorylation by activated p38 MAPK as a contributing factor in the elimination of β -cells under hyperglycaemic conditions through mitochondrial control.

An increased rate of apoptosis under high glucose conditions was observed after 48 h and was maintained at 72 h. This response between 48 and 72 h is likely related to differences in cell sensitivity to glucose. Nevertheless, this study was performed using a cell line; in this case, the cells were not synchronised, and therefore, each cell could have been in a different stage of the cell cycle. This condition can influence the cellular response to different stressors. It has been suggested that β -cell subpopulations prevent or reverse apoptotic program activation [29]; this outcome occurs in addition to the protective effect attributed to glucose for β -cell survival, in which the synthesis of proteins that suppress apoptosis is stimulated in a time- and glucose concentration-dependent manner [30]. Mitochondrial permeability and proapoptotic protein release [31] both depend on Bcl-2 and Bax concentrations, and thus, the Bcl-2/Bax ratio is critical for cell survival. In the present study, the Bcl-2/Bax ratio in mitochondria decreased significantly. Our results are consistent with previous reports demonstrating that high glucose induces apoptosis in β -cells by decreasing Bcl-2 expression and increasing Bax expression [32]; the latter is associated with cytochrome c release and caspase 3 activation [33].

Hyperglycaemia induces mitochondrial ROS production [2, 5], which, in conjunction with a lack of antioxidant defense in β -cells [4], favours the activation of apoptotic pathways in this cell type. In accordance with previous reports [34], we observed a significant increase in the percentage of cells producing ROS, coinciding with Bax localisation in the mitochondria. Furthermore, high glucose levels reduced ERK 1/2 phosphorylation, which could affect β -cell mass and function. It is known that ERK 1/2 phosphorylation modulates genes associated with cell proliferation, differentiation, migration and death; the effects vary depending on the duration, magnitude and cellular localisation of ERK 1/2 phosphorylation [35]. Thus, for example, it has been demonstrated in human ductal pancreatic cells that ERK 1/2 phosphorylation increases cell survival by promoting the activity of anti-apoptotic proteins [36]. Additionally, in β -cells, ERK 1/2 activation promotes insulin synthesis and secretion in response to glucose and inhibits apoptosis [37].

We previously reported that the localisation of p53 in the mitochondria correlates with increased apoptosis in RINm5F cells cultured in high glucose for 48 h [16]. The present study shows that p53 levels in mitochondria with HG were higher at 72 h. Interestingly, hyperglycaemia treatment in RINm5F cells did not modify p53 mRNA expression, suggesting that p53 mobilisation is critical to altering mitochondrial permeability and initiating apoptosis, as has been shown in other cell types [21]. In some tissues, DNA damage, oncogene expression and ROS trigger p53 mobilisation to the mitochondria as an event prior to or independent of p53-mRNA transcription [21]. Furthermore, p53 levels depend on a balance between its synthesis and its degradation, and it is clear that any increase in p53 levels may have various consequences for the cell. Because high glucose did not alter p53 transcription, its mobility and increased levels in the mitochondria result from the stabilisation of this protein, which depends on post-translational modifications, such as phosphorylation, that not only prevent p53 degradation but also regulate its activation [20].

To examine the importance of p53 phosphorylation in its mobilisation to the mitochondria and its involvement in the induction of apoptosis during high glucose treatment, we studied two major phosphorylation sites (ser15 and ser392) that are known to regulate the p53 activation status and are therefore involved in cell fate. Our results showed an increase in ser392 phosphorylation with respect to ser15, emphasising the importance of

ser392 in the glucose-mediated induction of apoptosis via the mitochondrial pathway. N-terminal p53 phosphorylation in the cytosol has been linked to Bax transcription [38], [39], and ser389 phosphorylation at the C-terminus has been related to tetramer formation, DNA binding, apoptosis and tumour suppression [40]. However, the biological importance of p53 phosphorylation under high glucose conditions is still unknown. Thus, the important contribution that emerges from this study is that high glucose levels result in increased p53 phosphorylation at ser392, mainly in the mitochondria, and are related to apoptosis induction.

Although the purpose of p53 phosphorylation at ser15 and ser392 in the mitochondria in high glucose is uncertain, this mechanism is likely a requirement for the interaction of p53 with pro- and/or anti-apoptotic proteins, for which p53-ser392 phosphorylation is apparently decisive. We did not focus on the interaction of p53 with other proteins in this study; however, the increase in cytochrome c release in RINm5F cells grown in high glucose demonstrates that the presence of p53 in the mitochondria alters the mitochondrial permeability and triggers apoptosis. In RBK-2H3 cells (mastocytes) treated with eugenol (an antiallergen), p53 phosphorylation on ser15 in the mitochondria permits its interaction with Bcl-2 and Bcl-xL and induces changes in the $\Delta\psi_m$ (mitochondrial membrane potential) and cytochrome c release [41]. In contrast, there is evidence suggesting that ser15 phosphorylation in the mitochondria stimulates ATP production and $\Delta\psi_m$, which act as pro-survival signals [42]. To date, phosphorylation of p53 at ser392 in mitochondria after high glucose treatment has not been reported in β -cells; however, at least two prior studies reported that the phosphorylation of this serine residue by p38 MAPK was associated with Bax activation and apoptosis in myocytes cultured in HG [43, 44]. Although these studies were conducted with total cell extracts, the observed Bax activation was likely due to p53 mobilisation to the mitochondria and does not rule out the possible interaction of p53 with Bcl-2, Bcl-XL or Bak, or its participation in modifications related to mitochondrial permeability.

Because p53 has multiple phosphorylation sites and because multiple kinases, including those activated by oxidative stress such as p38 MAPK [3, 14], regulate this process, we analysed p38 MAPK activation and its interaction with p53 in RINm5F cells cultured in high glucose. Our results show that the expression levels of the phosphorylated form of p38 MAPK were markedly increased in the mitochondrial fraction of RINm5F cells with HG; this increase coincided with p53-p38 MAPK interaction, p53 phosphorylation and an increased apoptosis rate. The fact that p38 MAPK phosphorylation was found exclusively in the mitochondria in high glucose was likely due to the increase in ROS observed under these conditions. p38 MAPK phosphorylation due to the oxidative stress effect has previously been demonstrated [45]. The mitochondrial localisation of p53 in RINm5F cells cultured in high glucose was previously demonstrated by our group [16]; therefore, in this study, we sought to identify phosphorylated p53-ser392 and p38 MAPK in the mitochondria using *in situ* immunofluorescence in whole cells after 72 h of high glucose treatment. The results of the confocal analysis showed the positive colocalisation of phosphorylated p53 and p38 MAPK within the mitochondria.

Furthermore, experiments utilising the inhibitor SB203580 further demonstrated that p38 MAPK activation plays an important role in the mitochondrial localisation of p53 and its phosphorylation induced by high glucose. In addition, p38 MAPK inactivation by SB203580 was verified by measuring Bax phosphorylation, a target of p38 MAPK [27, 28]. Our results showed that Bax phosphorylation was also inhibited.

The apoptosis index was also measured in RINm5F cells cultured in high glucose and with the p38 MAPK inhibitor. Interestingly, SB253080 not only inhibited the Bax phosphorylation but also reduced caspase 3 activation, DNA fragmentation and the release of cytochrome c. These results suggest that p53 phosphorylation at ser392 is related to mitochondrial membrane permeability and HG-induced apoptosis. It also suggests that p53 phosphorylation at ser392 may prevent the targeting of p53 for degradation and may instead act as a signal for its translocation to the mitochondria to initiate the apoptotic cascade. In other cells experiencing hyperglycaemia or oxidative or UV stress, p38 MAPK regulates apoptosis by phosphorylating p53 at ser392 [20, 44, 46] and ser15 [47]. In addition, p38 MAPK has been shown to participate in Bax activation, $\Delta\psi_m$ collapse and apoptosis [27]. Previously, it has been reported that p38 MAPK contributes significantly to insulin secretion and survival of β -cells [48, 49]. Furthermore, it has been demonstrated that the p38 MAPK/p53 signalling pathway is activated in H_2O_2 -induced tumour cell apoptosis [50]. Our results permit us to propose that β -cell apoptosis induced by high glucose requires p38 MAPK activation, which leads to the mobilisation of p53 to the mitochondria and its phosphorylation.

In conclusion, we propose that high glucose induces apoptosis in RINm5F cells via an oxidative stress response involving p53 mobilisation to the mitochondria and phosphorylation at ser392 by activated p38 MAPK. This activation likely allows p53 to interact with anti- and/or pro-apoptotic proteins and is involved in the

regulation of mitochondrial membrane permeability. In addition, we cannot rule out a certain degree of p53 transcriptional activation.

Acknowledgments This work was partially funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México [Grant 54878/FIS/IMSS/PROT/144], and the Fondo de Investigación en Salud, IMSS [Grant FIS/IMSS/PROT/145]. We thank the Fundación IMSS A.C. and the Fundación Río Arronte I.A.P. for their support in purchasing laboratory equipment. We would also like to thank the Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa (postgraduate section), the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and the Coordinación de Investigación en Salud, IMSS (LA Flores-López, scholarship).

References

1. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003) β -Cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110
2. Brownlee M (2005) The pathology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54:1615-1625
3. Evans JL, Goldfine DI, Maddux AB, Grodsky MG (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Rev* 23:599-622
4. Grankvist K, Marklund SL, Täljedal I-B (1981) CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* 199:393-398
5. Sakai K, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M, Araki E (2003) Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic β -cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300:216-222
6. Robertson RP, Harmon JS (2007) Pancreatic islet β -cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase. *FEBS Lett* 581:3743-3748
7. Hou N, Torii S, Saito N, Hosaka M, Takeuchi T (2008) Reactive oxygen species-mediated pancreatic beta-cell death is regulated by interactions between stress-activated protein kinases, p38 and c-Jun N-terminal kinase, and mitogen-activated protein kinase phosphatases. *Endocrinol* 149 (4):1654-1665
8. Kim WH, Lee JW, Gao B, Jung MH (2005) Synergistic activation of JNK/SAPK induced by TNF- α and IFN- γ : apoptosis of pancreatic β -cells via the p53 and ROS pathway. *Cell Signal* 17:1516-1532
9. Macip S, Igarashi M, Berggren P, Yu J, Lee SW, Aaronson SA (2003) Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol* 23 (23):8576-8585
10. Huang A, Yang YM, Yan C, Kaley G, Hintze TH, Sun D (2012) Altered MAPK signaling in progressive deterioration of endothelial function in diabetic mice. *Diabetes* 61 (12):3181-3188
11. Liu Z, Cao W (2009) p38 mitogen-activated protein kinase: a critical node linking insulin resistance and cardiovascular diseases type 2 diabetes mellitus. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 9 (1):38-46
12. Fujita H, Omori S, Ishikura K, Hida M, Awazu M (2004) ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF-beta expression in renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286 (1):F120-F126
13. Yuan H, Zhang X, Huang X, Lu Y, Tang W, Man Y, Wang S, Xi J, Li J (2010) NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species mediate FFAs-induced dysfunction and apoptosis of β -cells via JNK, p38 MAPK and p53. *PLoS One* 5 (12):e15726-e15726
14. Chen K, Albano A, Ho A, Keane JF (2003) Activation of p53 by oxidative stress involves platelet-derived growth factor-b receptor-mediated ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase activation. *J Biol Chem* 278:39527-39533
15. Bonini P, Cicconi S, Cardinales A, Vitale C, Serafino AL, Ciotti MT, Marlier NJ-L (2004) Oxidative stress induced p53-mediated apoptosis in glia: p53 transcription-independent way to die. *J Neurosci Res* 75:83-95
16. Ortega-Camarillo C, Guzmán-Grenfell AM, García-Macedo R, Rosales-Torres AM, Ávalos-Rodríguez A, Duran-Reyes G, Medina-Navarro R, Cruz M, Díaz-Flores M, Kumate J (2006) Hyperglycemia

- induces apoptosis and p53 mobilization to mitochondria in RINm5F cells. *Mol Cell Biochem* 281:163-170
17. Yap DBS, Hsieh J-K, Zhong S, Heath V, Gusterson B, Crook T, Lu X (2004) Ser³⁹² phosphorylation regulates the oncogenic function of mutant p53. *Cancer Res* 64:4749-4754
 18. Thompson T, Tovar C, Yang H, Carvajal D, Vu BT, Xu Q, Wahl GM, Heimbrook DC, Vassilev LT (2004) Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem* 279:53015-53022
 19. Shieh S-Y, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C (2000) The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14:289-300
 20. Huang C, Ma W-Y, Maxiner A, Sun Y, Dong Z (1999) p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem* 274:12229-12235
 21. Marchenko DN, Zaika A, Moll MU (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. *J Biol Chem* 275:16202-16212
 22. Herrmann M, Lorenz HM, Voll R, Grünke M, Woith W, JR JRK (1994) A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acid Res* 22 (24):5506-5507
 23. Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts", prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17:6419
 24. Bergmeyer HU: (1963) *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press New York.
 25. Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S, Weir GC (2002) Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J Biol Chem* 277 (33):30010-30018
 26. Shou Y, Li L, Prabhakaran K, Borowitz JL, Isom GE (2003) p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Regulates Bax Translocation in Cyanide-Induced Apoptosis. *Toxicol Sc* 75:99-107
 27. Gomez-Lazaro M, Galindo MF, Mera RMM-Fd, Fernandez-Gómez FJ, Concannon CG, Segura MF, Comella JX, Prehn JHM, Jordan J (2007) Reactive Oxygen Species and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activate Bax to Induce Mitochondrial Cytochrome c Release and Apoptosis in Response to Malonate. *Mol Pharmacol* 71 (3):736-743
 28. Yuan Z-q, Feldman RI, Sussman GE, Coppola D, Nicosia SV, Cheng JQ (2003) AKT2 Inhibition of Cisplatin-induced JNK/p38 and Bax Activation by Phosphorylation of ASK1. *J Biol Chem* 278 (26):23432-23440
 29. Pipeleers DG (1992) Heterogeneity in pancreatic beta-cell population. *Diabetes* 41:777-781
 30. Martens GA, Pipeleers DG (2009) Glucose, regulator of survival and phenotype of pancreatic beta cells. *Vitam. Horm.* 80:507-539
 31. Adams JM, Cory S (1998) The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1325
 32. Huang Q, Bu S, Yu Y, Guo Z, Ghatnekar G, Bu M, Yang L, Lu B, Feng Z, Liu S, Wang F (2007) Diazoxide prevents diabetes through inhibiting pancreatic β -cells from apoptosis via Bcl-2/Bax rate and p38-b mitogen-activated protein kinase. *Endocrinol* 148 (1):81-91
 33. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Yoshimura SI, Taniyama Y, Aoki M, Matsubara H, Kim S, Kaneda Y, Ogihara T (2001) Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death induced by high D-glucose in human endothelial cells. *Diabetes* 50 (6):1472-1481
 34. Nishikawa T, Edelstein D, Du JX, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek AM, Beebe D, Oates JP, Hemmes PH, Giardino I, Brownlee M (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404:787-790
 35. Murphy LO, Blenis J (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends. Biochem. Sci.* 31:268-275
 36. Balmanno K, Cook SJ (2009) Tumor cell survival signalling by the ERK 1/2 pathway. *Cell Death Differ* 16:368-377
 37. Lawrence M, Shao C, Duan L, McGlynn K, Cobb MH (2008) The protein kinases ERK 1/2 and their roles in pancreatic beta cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192:11-17
 38. Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Segawa K, Ikeda Y, Kizaki M (2004) Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress. *Cancer Res* 64:1071-1078

39. Lavin MF, Gueven N (2006) The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 13:941-950
40. Hoogervorst EM, Bruins W, Zwart E, Oostrom CTMv, Aardweg GJvd, Beems RB, Berg Jvd, Jacks T, Steeg Hv, Vries Ad (2005) Lack of p53 Ser389 phosphorylation predisposes mice to develop 2-acetylaminofluorene-induced bladder tumors but not ionizing radiation-induced lymphomas. *Cancer Res* 65:3610-3616
41. Park BS, Song YS, Yee SB, Lee BG, Seo SY, Park YC, Kim JM, Kim HM, Yoo YH (2005) Phosphoserine 15-p53 translocates into mitochondria and interacts with Bcl-2 and Bcl-xL in eugenol-induced apoptosis. *Apoptosis* 10 (1):193-200
42. Nantajit D, Fan M, Duru N, Wen Y, Reed JC, Li JJ (2010) Cyclin B1/Cdk1 phosphorylation of mitochondrial p53 induces anti-apoptotic response. *PLoS One* 5 (8):e12341-12354
43. Malhotra A, Vashistha H, Yadav VS, Dube MG, Kalra SP, Abdellatif M, Meggs LG (2009) Inhibition of p66ShA redox activity in cardiac muscle cells attenuates hyperglycemia-induced oxidative stress and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296 (2):H380-H388
44. Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B, Anversa P, Kajstura J (2001) Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes* 50:2363-2375
45. Kulisz A, Chen N, Chandel NS, Shao Z, Schumacker PT (2002) Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L1324-L1329
46. Thornton TM, Rincon M (2009) Non-classical p38 MAP kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* 5 (1):44-52
47. She QB, Chen N, Dong Z (2000) ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at Serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem* 275 (27):20444-20449
48. Sumara G, Formentini I, Collins S, Sumara I, Windak R, Bodenmiller B, Ramracheya R, Caille D, Jiang H, Platt KA, Meda P, Aebersold R, Rorsman P, Ricci R (2009) Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell* 136:235-248
49. Lu X, Liu J, Hou F, Liu Z, Cao X, Seo H, Gao B (2011) Cholesterol induces pancreatic β cell apoptosis through oxidative stress pathway. *Cell Stress and Chaperones* 16:539-548
50. Filimeni G, Piccirillo S, Rotilio G, Ciriolo MR (2012) p38(MAPK) and ERK1/2 dictate cell death/survival response to different pro-oxidant stimuli via p53 and Nrf2 in neuroblastoma cells SH-SY5Y. *Biochem Pharmacol* 83 (10):1349-1357

Figure captions

Fig. 1 ROS production, apoptosis, and proliferation markers induced by high glucose. **(a)** Representative western blot and densitometric analysis of mitochondrial Bcl-2 and Bax and the ratio of Bcl-2/Bax. Protein expression levels were normalised to the Cox IV expression level; results are shown in the lower panel (*, ** and ***, $P < 0.001$). **(b)** Intracellular ROS production was measured by flow cytometry with DCF staining. The histogram is representative of three independent experiments. **(c)** Percentages of apoptotic cells were measured with Annexin V-FITC and propidium iodide (* $P < 0.001$ vs. low glucose). **(d)** Western and densitometric analyses of basal and phospho-activated levels of ERK 1/2 in the cytosol. Expression levels were normalised to actin; results are shown in the lower panel (* and **, $P < 0.05$). HG: high glucose, 30 mM; LG: low glucose, 11 mM for 72 h. The values are reported as the mean \pm SD of five independent experiments

Fig. 2 p53 mRNA expression and intracellular distribution. **(a)** p53 mRNA levels was determined by RT-PCR, and GADH was used to normalise expression levels. **(b)** Representative western blot and densitometric analyses. p53 protein expression levels were normalised to actin (cytosol), H1 (nucleus) or Cox IV (mitochondria) expression levels; results are shown in the lower panel. Cytosol *, **, $P < 0.001$. Nucleus *, **, §, †, $P < 0.05$. Mitochondria *, **, §, †, $P < 0.001$. C: cytosol; M: mitochondria; N: nucleus; H1: histone 1; Cox IV: cytochrome

oxidase; HG: high glucose, 30 mM; LG: low glucose, 11 mM for 72 h. The values are reported as the mean \pm SD of five independent experiments

Fig. 3 p53 and p38 MAPK phosphorylation in the absence or presence of the MAPK inhibitor SB203580. **(a)** Western and densitometric analyses of basal and mitochondrial p53 phosphorylation at ser15 and ser392, p38 MAPK and P-p38 MAPK. **(b)** Immunoprecipitation with anti-p53 and immunoblotting with anti-p38 MAPK in RINm5F cells cultured in high glucose with SB203580. **(c)** Western and densitometric analyses of mitochondrial phospho-p53-ser392 with SB203580. **(d)** Western blot and densitometric analyses of basal p53 in RINm5F cells cultured in high glucose with SB203580. **(e)** Immunoprecipitation with anti-Bax and immunoblotting with anti-phosphoserines. Cox IV and actin were used as loading controls to normalise protein expression levels. C: cytosol; M: mitochondria; HG: high glucose, 30 mM; LG: low glucose 11 mM for 72 h. The values are reported as the mean \pm SD of five independent experiments (*, **, $P < 0.05$)

Fig. 4 The colocalisation coefficients of P-p53ser392 and P-p38 MAPK in RINm5F cells cultured in high glucose (30 mM, 72 h). Mitochondria were labelled with MitoFluor Green (green). **(a)** Phosphorylation of p53 ser392 (red, quadrant 1). **(b)** Phosphorylation of p38 MAPK (red, quadrant 2). Colocalisation with the mitochondria is shown in yellow (quadrant 3). The dot plot shows a representative image of the overlap coefficient, and the white lines delimit the quadrants based on a background value of 50 x 50 intensity levels. **(c)** The colocalisation of phosphorylated p53-ser392 and p38 MAPK with mitochondria was analysed by Pearson's colocalisation coefficient and is shown in the lower histogram. The image is representative of 5-6 independent experiments, and the values are reported as the mean \pm S.D. (* $P < 0.0001$ vs. 72 h LG)

Fig. 5 SB203580 reduces apoptosis of RINm5F cells induced by high glucose. **(a)** Analysis of oligonucleosomal DNA fragmentation. **(b)** Western and densitometric analyses of caspase 3. Western and densitometric analyses of cytochrome c release into the cytosol without **(c)** and with **(d)** the p38 MAPK inhibitor. The densitometric analyses of three independent western blots are shown in the lower panels, and the protein expression levels were normalised to actin or Cox IV expression levels (*, **, §, $P < 0.001$ without SB203580 and $P < 0.05$ with SB203580)

Figure: 1

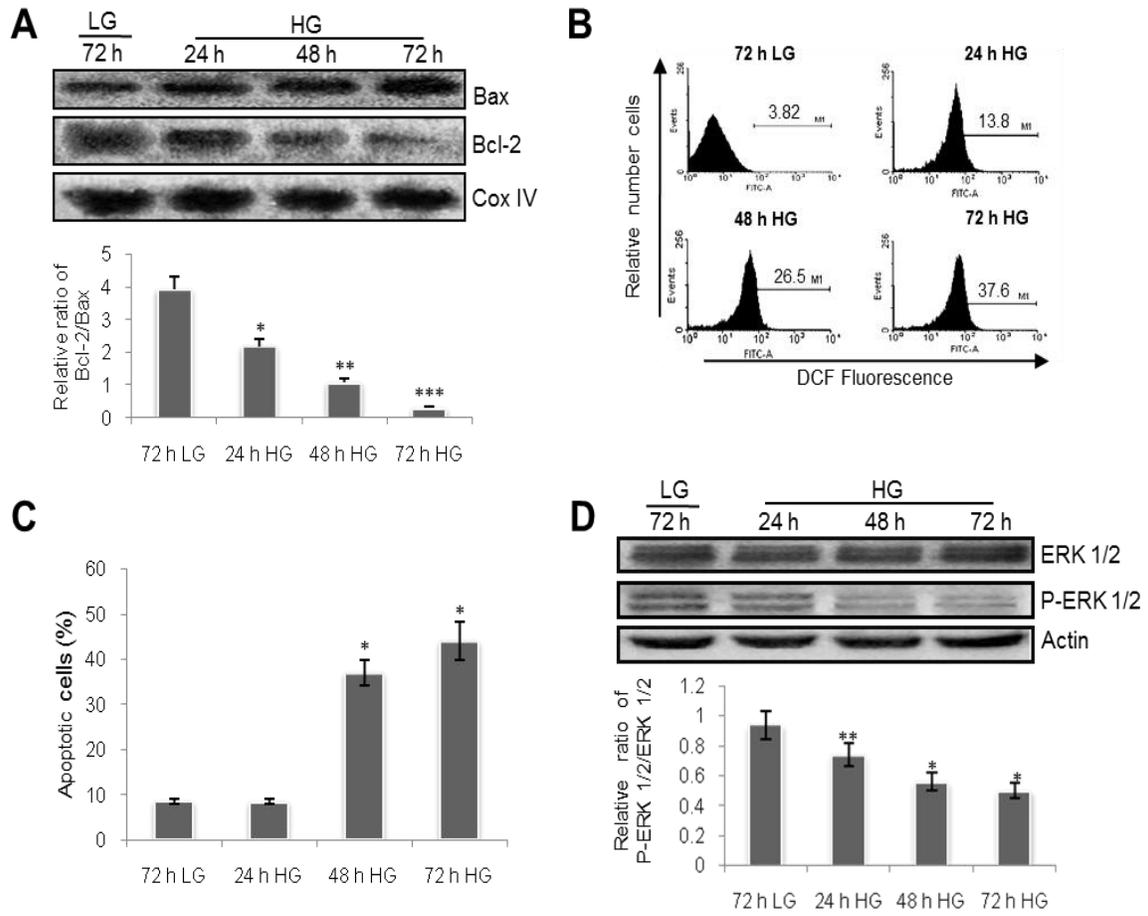


Figure: 2

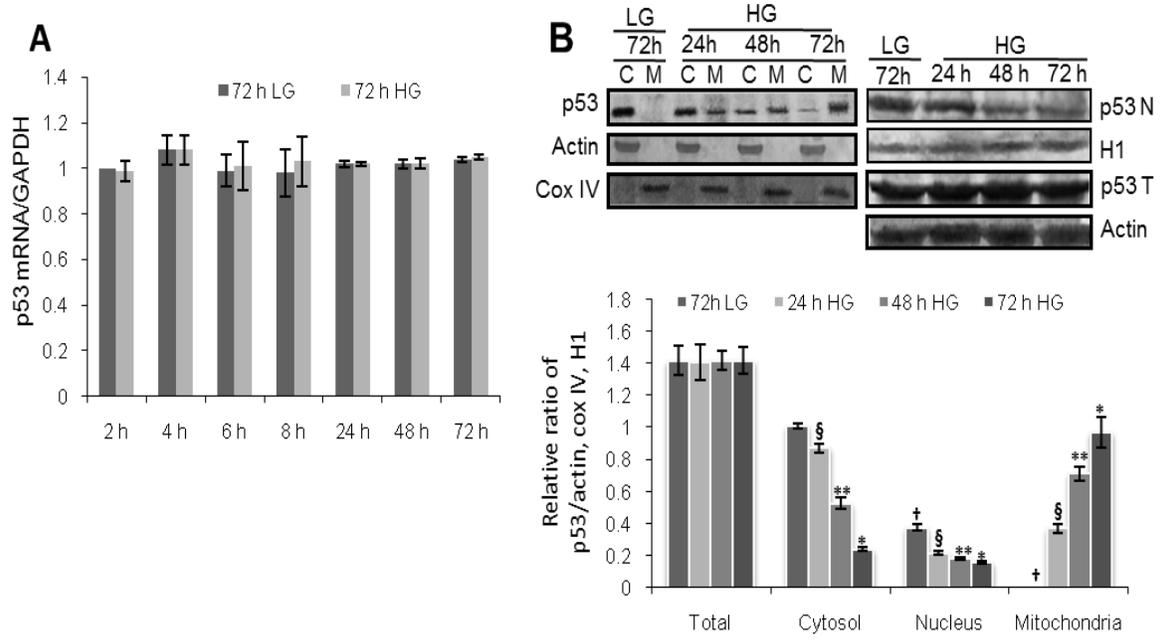


Figure: 3

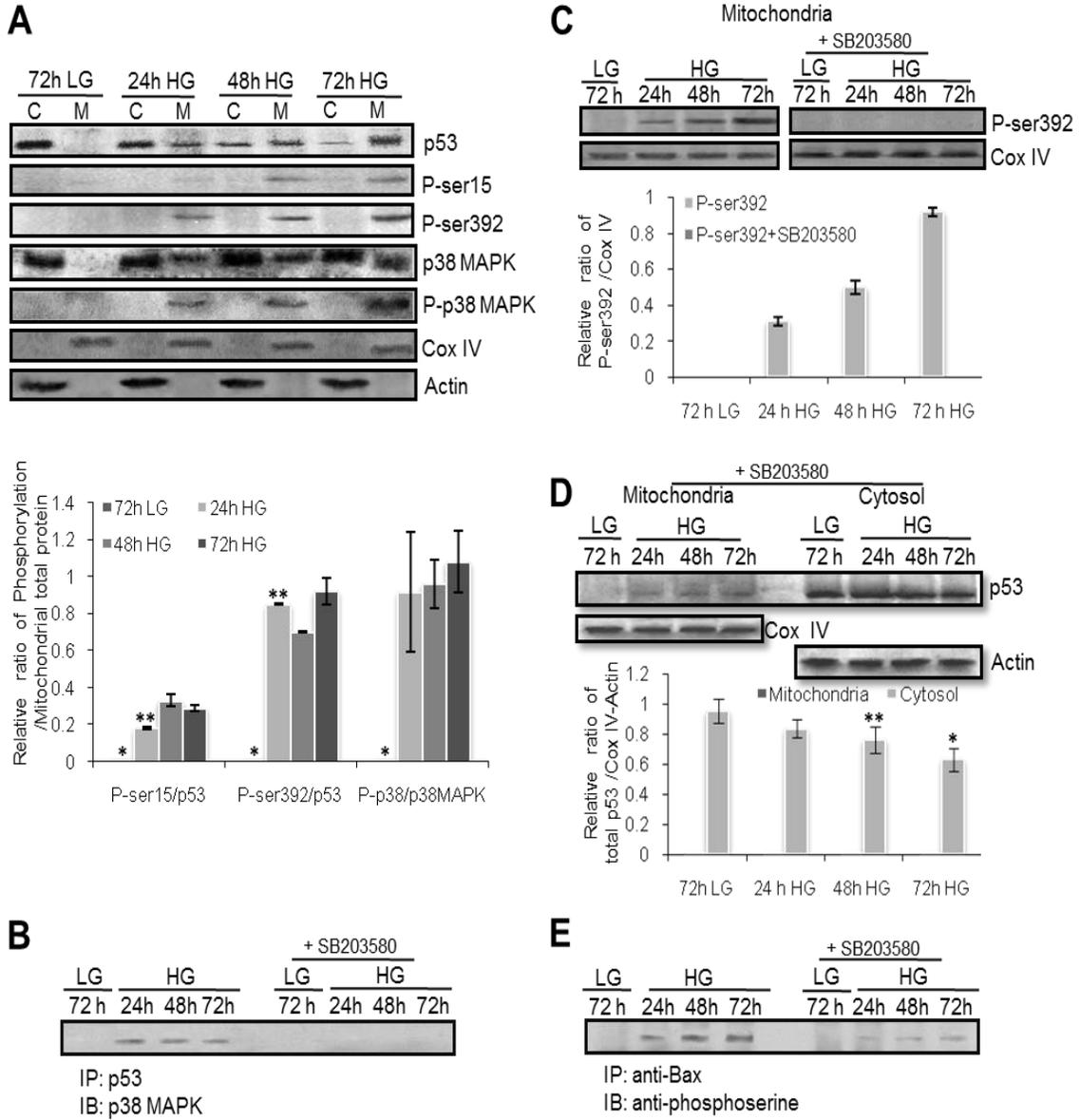


Figure: 4

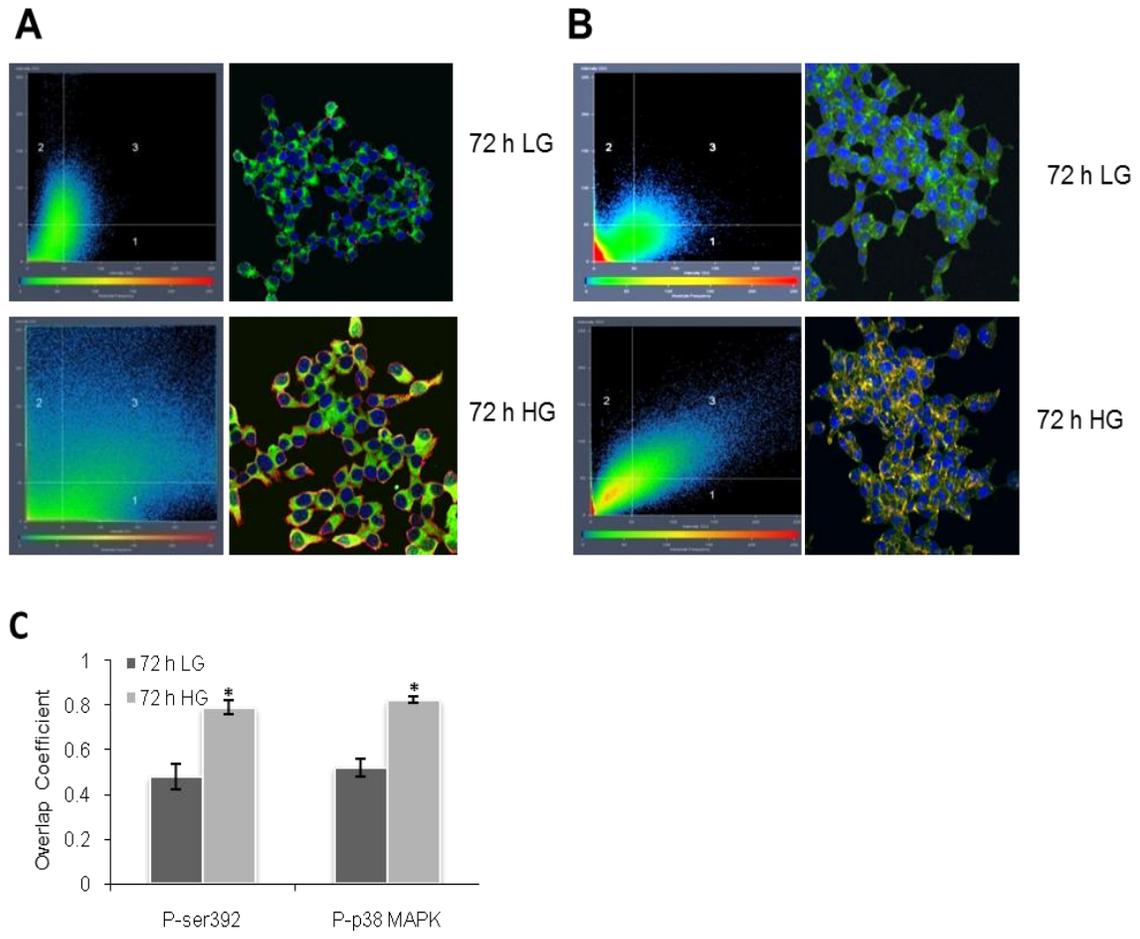


Figure: 5

