

ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROCESO PARA DETECCIÓN DEL FACTOR DE SILENCIAMIENTO RESTRICTIVO NEURONAL NRSF/REST EN CÉLULAS NORMALES Y CÉLULAS SINCRONIZADAS.

Meléndez Encinas G. E.⁽¹⁾; Tapia Ramírez J.⁽²⁾; A.⁽²⁾; Santana Román H.⁽²⁾

⁽¹⁾ Facultad de Química/ Universidad Autónoma de Querétaro

⁽²⁾ Departamento de Genética y Biología Molecular/ Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

RESUMEN

El factor REST se encuentra presente en todas las células de mamíferos, pero al ser un factor de transcripción sus cantidades basales son muy pequeñas, es por ello que al determinar la cantidad presente en las células se tiene muy poca muestra con que trabajar, teniendo entonces problemas para la detección adecuada de REST. Es por ello que se intenta lograr una estandarización del método de detección, utilizando diferentes muestras como el extracto proteínico de células normales, el extracto de células que se encuentran sincronizadas y el extracto de células que tienen sobre-expresado REST, teniendo entonces que a los tres extractos se les realizan pruebas de cuantificación y después son sometidos a pruebas de Western Blot para determinar la presencia de REST en el extracto. Como resultados tenemos que la detección de REST que se encuentra presente en todas las muestras, cada uno en niveles distinto, debido a esto se puede decir que la detección depende de varios factores y no tan solo del tipo de extracto utilizado. Es por ello que hay que tener un proceso adecuado en la toma de muestra y el manejo de la misma, además de que se deben de tener en cuenta todas las posibles interferencias en el estudio, además de procurar utilizar anticuerpos específicos y funcionales para el tipo de muestras utilizadas, que identifique específicamente la proteína que nos interesa ya que aunque suele ser el mismo anticuerpo pero varía la especificidad entre las marcas utilizadas y el tipo de muestra.

ANTECEDENTES

La regulación de expresión de genes es fundamental en los sistemas biológicos y la mayoría de esta regulación existe a niveles de transcripción (Holstege 1999), estos datos siguen las interacciones de los elementos cis en los genes con factores tejido-específicos y que estos juegan roles importantes en la expresión de los genes en tejidos específicos. Reciente evidencia sugiere que el complejo de regulación de genes durante el desarrollo y en el adulto es controlado principalmente por la combinación de acción de tres clases de componentes transcripcionales: proteínas de unión a secuencias específicas de ADN (activadores y represores), co-reguladores (co-activadores y co-represores) y componentes de la maquinaria basal, incluyendo factores generales de transcripción y RNA polimerasas (Goodrich y col. 1996).

REST/NRSF también es conocido como un represor transcripcional, es un silenciador de genes neuronales en los progenitores no diferenciados neuronales y células no neuronales en tejidos de mamíferos (Chong y col. 1995), funciona con la unión del elemento RE-1/NRSE que se encuentra presente en los genes diana, estos genes codifican para un gran rango de proteínas involucradas en el desarrollo y funcional neuronal, incluyendo receptores de neurotransmisores (receptor acoplado a la proteína GPR, subunidad γ -2 del receptor GABA, receptor tipo 1 NMDA, subunidad GluR2 del receptor AMPA, subunidad β -2 del receptor nicotina-acetilcolina y receptor M4 muscarina-acetilcolina), neurotransmisores sintetasa (dopamina β -hidrolasa y acetilcolintransferasa), factores neurotróficos (factor neurotrófico derivado de cerebro- BDNF), moléculas de adhesión celular neuronal (L1, Ng-CAM), canales iónicos (canal de sodio tipo II),

citoesqueleto neuronal [β -tubulina tipo III] (Otto y col. 2007), proteínas neuronales asociadas al crecimiento (SCG-10), proteínas de vesículas sinápticas (sinapsina I) y proteínas de reciclaje de vesículas sinápticas y endocitosis (dinamina I). Muchas de estas proteínas tienen roles importantes en la plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria del sistema nervioso central mamífero (SNC), y REST/NRSF ayuda a restringir esto a los sistemas neuronales bloqueando la expresión en células no neuronales, es entonces que REST en presencia de CoREST interfiere con la diferenciación programada inducida por el factor de crecimiento. También se ha demostrado que la función de REST/NRSF es de activador de algunos genes (27, 30, 31, 32, 33, 34 y 35) en células neuronales y en otros tejidos (Palm y col. 1998).

Además de lo descrito también se sabe que REST/NRSF y/o RE-1/NRSE puede actuar no solo como silenciador, sino también como enhancer transcripcional, se ha mostrado que REST/NRSF puede mediar la represión con asociación en la unión de su dominio terminal NH₂- con mSin3/histona desacetilasa 1, 2 [HDAC 1,2] (Westbrook y col. 2008) o con los factores generales de transcripción TBP y TFIIB (Shimojo y col. 2006). Esto es importante tomando en cuenta que se puede encontrar REST en todas las células de los tejidos mamíferos, por lo tanto se tiene conocimiento que no solo actúa en neuronas sino en todas las células, pero su función principal en tejidos no neuronales sigue siendo el de silenciador, esto como un factor de transcripción negativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el cultivo de células animales se utilizó la línea celular HeLa, se cultivaron en cajas P-100 con 10 ml de DMEM (Medio Esencial Mínimo, 10% SFB, 1% estreptomicina/ampicilina, 1% glutamina) con una confluencia de 30% y se incubó a 37° C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ en aire durante 7 días con repique en monocapa cada dos días utilizando PBS y Tripsina según protocolo. Para las células sincronizadas se utilizó el protocolo de sincronización de células humanas de Kristian Helin (BRIC, Uni. Copenhagen, Denmark), utilizando células HeLa en 30% de confluencia y DMEM con 2mM de timidina, siendo arrestadas en el inicio de la fase S o el final de la G₁, se comprueba el arresto del ciclo celular (Darzynkiewicz, 1997) por medio del protocolo del análisis del ciclo celular por contenido de ADN (Propidium Iodide) utilizando el citómetro de flujo.

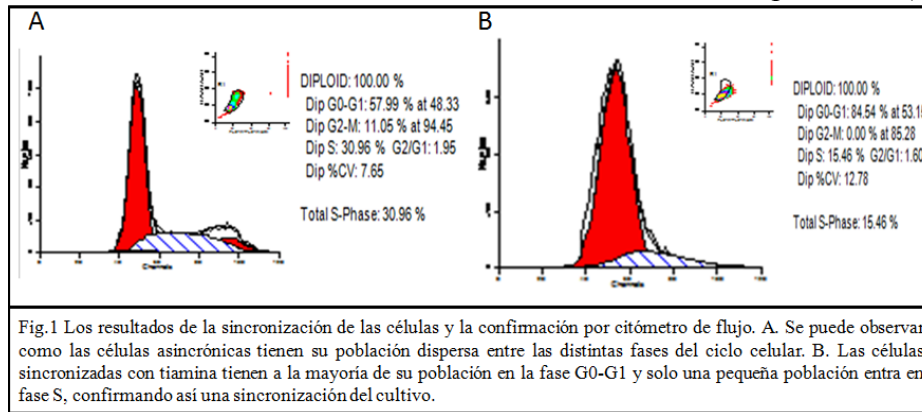
Para la sobre-expresión de REST se realiza la construcción de un plásmido a partir de pQBI25/50-fC2, se le agrega el fragmento que contiene a REST y es clonado en el plásmido, obteniendo así M4-GFP-REST o pQBI25-REST y por medio de lípidos catiónicos se introduce en bacterias (*E. Coli*) y se cultivan en medio diferencial, se toma una UFC que contenga al plásmido y se crece en 10 ml de medio LB con 75 μ l de ampicilina (10 mg/ml) en agitación a 37° C por 12 horas. Transcurrido el tiempo se someten al protocolo de Miniprep para plásmidos (STET) seguido de una extracción y precipitación de ADN por método de fenol-cloroformo, para confirmar la presencia del plásmido se somete la muestra obtenida a un ensayo de restricción con XhoI, BamHI, HindIII esperando encontrar un fragmento de aproximadamente 3 kb. Ya confirmado que se tiene un extracto del plásmido se utilizan células HeLa competentes para hacer la transformación con el plásmido M4-GFP-REST y se crecen las células con el protocolo mencionado anteriormente.

Se realiza un extracto celular de cada una de las líneas celulares mencionadas anteriormente, se toma una muestra de este extracto para realizar cuantificación de proteínas por el método de Bradford, luego de esto se procede a hacer una Inmoprecipitación a cada una de las muestras por medio de un kit estandarizado, la muestra obtenida se somete a electroforesis en SDS-PAGE,

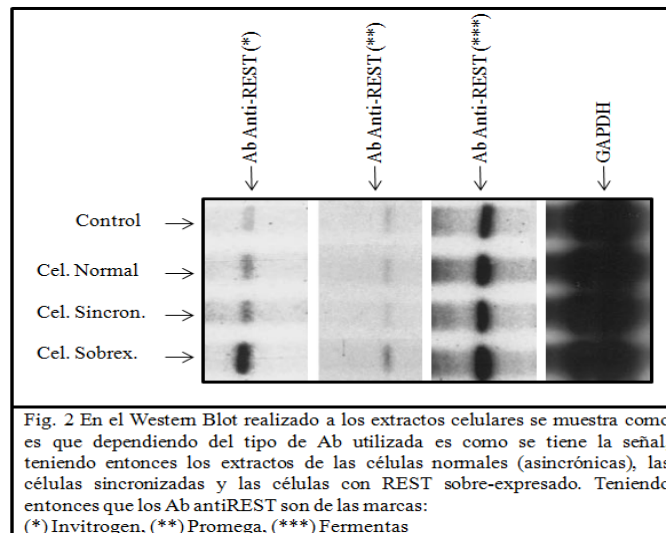
y después de esto se transfiere a una membrana de nitrocelulosa, después de esto se hace una tinción con rojo de Ponceau para observar eficiencia de transferencia, luego se procede a continuar con el Wester Blot con el Ab anti-REST y con el Ab secundario, seguido del revelado y el análisis.

RESULTADOS

Después del cultivo de células HeLa se obtuvo un extracto de células asincrónicas que fueron analizadas en el citómetro junto con las células que fueron sometidas al protocolo de sincronización, teniendo entonces que las primeras se encontraban dispersas en distintas fases del ciclo celular en comparación con las células sincronizadas en donde la mayor parte de la población se encuentran arrestadas en la fase G0-G1, tal como marca el protocolo (Figura 1).



La construcción del plásmido se da de manera eficiente, por medio de enzimas de restricción, y siguiendo el protocolo, obteniendo así células competentes, transformadas que tienen sobre-expresada la síntesis de REST y con esto se puede utilizar el extracto como un control positivo, la comprobación de la existencia del plásmido en el extracto se verifico por medio de un ensayo de restricción en donde se logro observar la banda en la distancia esperada (figura no mostrada). Se realizo una cuantificación por Bradford y con esto se hicieron los cálculos para la cantidad de muestra en los carriles del SDS-PAGE, después se continuó con el Wester Blot obteniendo distintos grados de intensidad de la señal dependiendo el tipo de anticuerpo utilizado, se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo de las marcas Invitrogen, Promega y Fermentas. (Fig. 2)



CONCLUSIÓN

En la detección del factor de transcripción de REST se utilizan procedimientos comunes con otras detecciones de diferentes proteínas, que además se encuentran ya estandarizados, la diferencia es el tipo de proteína que se está buscando, en este caso en particular la utilización de anticuerpos específicos para REST es lo que marca la diferencia principal en la estandarización de la prueba con respecto a los distintos tipos de extractos utilizados, es por ello que se tiene que tener un control negativo, en donde se sabe que no se va a detectar REST y un control positivo en donde la cantidad sea tan grande que se detecte con un anticuerpo que no cuenta con una especificidad muy alta, es por esto último que la utilización de extracto celular de un cultivo transformado, en donde existe una sobre-expresión de REST es lo que nos lleva a concluir que los anticuerpos utilizados si detectan la proteína, el problema es que no son tan específicos para las cantidades en las que este factor se encuentra normalmente, esto ejemplificado con las células asincrónicas utilizadas, en donde la señal es muy baja, pero que aunque se encuentra, los resultados mostrados es el obtenido después de varios intentos en donde no se detectaba señal de esta extracto.

La utilización de células sincronizadas es debido a que REST muestra una expresión diferencial en el ciclo celular, encontrándose en la fase G0-G1 en los niveles basales elevados, teniendo entonces que aunque no está sobre-expresado REST si contiene cantidades más altas que en las muestras de células asincrónicas, teniendo entonces que se pueden utilizar cultivos sincronizados para la detección de REST cuando esto no afecte con los resultados que se deseen obtener. Pero hay que tener en cuenta que no solo depende de la cantidad de muestra obtenida, sino también del manejo que se le proporcione, así como de la pérdida que va teniendo a través de los distintos procesos que se llevan a cabo. Otro factor importante que se debe de tomar en cuenta es el tipo de anticuerpo utilizado, ya que aunque en teoría todos son del mismo tipo, siempre hay diferencias dependiendo de la marca y del lote del que se trata, teniendo como resultado el que la estandarización solo funciona en un experimento en particular y que la detección en otra muestra puede no ser la misma, debido a lo discutido anteriormente, es por ello que cada vez que se desee utilizar anticuerpos policlonales específicos para una proteína hay que realizar las pruebas correspondientes con las distintas marcas para poder regular la detección y con ello estandarizar la prueba para obtener los mejores resultados.

REFERENCIAS

- . Chong J. A., Tapia-Ramírez J., Kim S., Zheng Y., Boutros M. C., Altshuler Y. M., Kraner S. D., Mandel G., “REST: A Mammalian Silencer Protein That Restrict Sodium Channel Gene Expression to Neurons”, *Cell* 80:949-957, 1995.
- . Goodrich J.A., Cutler G., Tjian R., “Contacts in Context: Promoter Specificity and Macromolecular Interactions in Transcription”, *Cell* 84: 825-830, 1996
- . Holstege F. C., Young R. A., “Transcriptional Regulation: Contending with Complexity”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2-4, 1999.
- . Otto S. J., McCorkle S. R., Hover J., Conaco C., Han J., Impey S., Yuchum G., Dunn J., Goodman R. H., Mandel G., “A New Binding Motif for the Transcriptional Repressor REST Uncover Large Gene Networks Devoted to Neuronal Functions”, *Journal of Neuroscience* 27: 6729-6739, 2007.
- . Palm K., Belluardo N., Metsis M., Timmusk T., “Neuronal Expression of Zinc Finger Transcription factor REST/NRSF/XBR Gene”, *Journal of Neurosciencie* 18(4): 1280-1296, 1998
- . Shimajo M., Hersh L. B., “Characterization of the REST/NRSF-interacting LIM domain protein (RILP): localization and interaction with REST/NRSF”, *Journal of Neurochemistry* 96: 1130-1138, 2006
- . Westbrook T. F., Hu G., Ang X. L., Mulligan P., Pavlova N. N. Liang A., Leng Y., Maehr R., Shi Y., Harper J. W., Elledge S. J., “SCF^{β-TRCP} controls oncogenic transformation and neural differentiation through REST degradation”, *Nature* 452: 371-375, 2008.