

ISBN: 970-27-0770-6

## **IDENTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DEL mRNA DEL GFAP (PROTEÍNA FIBRILAR GLIAL ÁCIDICA) EN DISTINTAS REGIONES DEL SISTEMA NERVIOSO DE LA RATA ADULTA.**

**Carrillo-González Nidia Jannette, Ortuño-Sahagún Daniel y  
Gudiño-Cabrera Graciela.**

*Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural, Dpto. de Biología Celular y  
Molecular. CUCBA. U de G.*

### **Introducción**

El citoesqueleto es una compleja red de filamentos proteicos que se extienden por el citoplasma de las células eucariontes, y que resulta esencial para diversas funciones celulares como el soporte y estructura celular, el transporte interno de organelos, el movimiento y la migración, etc<sup>1</sup>. Consta de tres componentes filamentosos, que se distinguen por sus propiedades bioquímicas, morfológicas y funcionales: los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios (FI).<sup>2</sup>

Los FI se caracterizan por ser los más rígidos y resistentes de los tres componentes del citoesqueleto, forman una red en el citoplasma que rodea el núcleo y se extiende hasta la periferia celular,<sup>1</sup> su ensamblaje es regulado por fosforilación y desfosforilación del filamento y no requiere de la hidrólisis de ATP o GTP.<sup>3</sup> Los FI se encargan principalmente de proporcionar resistencia mecánica a la célula, su estructura proteica consiste en un dominio central  $\alpha$ -hélice altamente conservado, mientras que sus dos extremos, amino y carboxilo terminales, presentan una alta diversidad en secuencias de aminoácidos.<sup>4</sup>

Los FI se clasifican, con base en la similitud de sus secuencias de aminoácidos, en seis tipos:

Tipo I: keratinas ácidas (células epiteliales).

Tipo II: keratinas neutro-básicas (células epiteliales).

Tipo III: Vimentina, Desmina, Proteína Fibrilar Glial Acídica (GFAP) (células de mesénquima, de músculo y células gliales respectivamente).

Tipo IV: Neurofilamentos (neuronas maduras).

Tipo V: No estandar: Filensina y Facinina (células fibrosas del cristalino).

Tipo VI: Lamina nuclear (envoltura nuclear).

El gen de cada uno de los FI se transcribe en diversas isoformas, lo que sugiere una amplia diversidad celular y funcional. La expresión de cada FI es característica de cada tejido o tipo celular evidenciando cierta especificidad,<sup>3</sup> por lo que los FI son ampliamente usados como marcadores para identificar diversos tipos celulares, así como diferentes etapas o estadios de diferenciación celular. Sin embargo, debido a su diversidad proteica, se ha propuesto que la función de los FI puede variar en los distintos tipos celulares.<sup>5</sup>

## Antecedentes

La mayoría de las células expresan *in situ* un solo tipo de FI, sin embargo, las excepciones incluyen a las células gliales, tales como: astrocitos inmaduros, y diversos tipos de aldainoglia<sup>6</sup> como: la glía envolvente (GE) del bulbo olfatorio (BO), la glía de Bergman, la glía de Müller, los tanicitos, la glía perivascular, etc, que co-expresan más de un tipo de FI. En el caso de los astrocitos inmaduros, co-expresan nestina y vimentina en abundancia.<sup>7</sup> Otras células gliales, co-expresan vimentina y GFAP.<sup>4</sup>

La GFAP constituye el principal FI de las células gliales, y su expresión se considera característica de astrocitos.<sup>8</sup> Sin embargo, recientemente se ha descrito la expresión de GFAP en células precursoras neurales multipotenciales (PNM) de organismos adultos.<sup>9</sup> Durante el desarrollo, los PNM del SNC que se diferencian a células gliales, usualmente expresan vimentina como principal FI. La vimentina se expresa en la mayoría de las células neuroepiteliales del tubo neural, y su expresión se correlaciona con un estado poco diferenciado de las células gliales,<sup>4</sup> además de expresarse en diversos linajes celulares.

Los niveles de expresión del GFAP son regulados durante el desarrollo del SNC por condiciones y factores específicos.<sup>10</sup> En esta regulación participan entre otros, la hormona tiroidea, los glucocorticoides, así como diversos factores, como los factores de crecimiento; el FGF (*Fibroblast Growth Factor*), CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*), TGF beta (*Transforming Growth Factor beta*), TGF-alpha (*Transforming Growth Factor alpha*), así como otros factores como el LIF (*Leukemia Factor Inhibitor*), la citocina IL-6 (*Interleucina-6*) y algunos miembros de la familia de las BMP (*Bone Morphogenic Proteins*). Particularmente, se ha descrito que el TGF-alpha, influye durante el desarrollo posnatal en la diferenciación de astrocitos, incrementando los niveles de expresión de GFAP y disminuyendo la expresión de nestina (proteína de FI utilizada como marcador de células precursoras del SNC)<sup>11</sup>. El desarrollo astrogliar también es promovido por el CNTF, IL-6, LIF y BMP2.<sup>12</sup> Por ejemplo, se ha descrito que la citocina LIF, junto con la proteína gp130, componen un receptor transductor de señalización, que actúa sinérgicamente junto con la proteína BMP2, para inducir la diferenciación de células con fenotipo astrogliar por la vía STAT3-Smad1, a partir de células neuroepiteliales de ratón.

Se ha demostrado que la expresión de GFAP depende de la vía de activación mediada por STAT3. Sin embargo, se sabe que durante el desarrollo de las neuronas, no se expresa GFAP en respuesta a la activación de la vía STAT3, lo que sugiere que existen otros mecanismos a través de los cuales se reprime su expresión, tales como la metilación en sitios promotores de la expresión del GFAP en neuronas.<sup>13</sup> Hasta el momento es prácticamente inexistente la información a cerca del patrón de expresión en diferentes tejidos de las diferentes isoformas del GFAP, así como de los mecanismos que regulan su expresión.

## Isoformas del GFAP

La GFAP en humano es un polipéptido de 432 aminoácidos, y de 55 kDa, codificado por 9 exones, del cual se han identificado hasta el momento 5 isoformas<sup>6</sup> identificadas por la secuencia de sus mRNAs como:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ .

GFAP  $\alpha$ : Es la isoforma más conocida y se presenta en el SNC. Su mRNA es de 2.9 kb.

GFAP  $\beta$ : Descrito en células de Schwann del SNP. Presenta un inicio de transcripción 169 pb antes que el GFAP  $\alpha$ .

GFAP  $\gamma$ : Es expresado en tejidos no neurales. Su mRNA es de 2.4 kb, y carece del exón 1, pero incluye 126 pb del intrón 1.

GFAP  $\delta$ : Expresado en tejidos neurales. Su mRNA es de 4.2 kb, el cual además de presentar los 9 exones de las isoformas anteriores, incluye 1255 pb del intrón 7 en la secuencia del exón 7.

GFAP  $\epsilon$ : Se ha identificado en el SNC, en una región asociada a la unión entre elementos del citoesqueleto y presenilinas, y se considera importante en enfermedades con procesos degenerativos. Es resultado de un empalme alternativo del exón 8 y 9 del GFAP  $\alpha$ , que corresponde al dominio C-terminal, y que genera una proteína de 431 amino ácidos.

La existencia de al menos 5 isoformas de GFAP localizadas en distintas regiones, nos indica una amplia diversidad funcional. Por lo anterior, y teniendo en cuenta que el GFAP se expresa tanto en astrocitos, como en PNM y en la aldainoglia, resulta importante identificar cual es la isoforma, o isoformas, de GFAP involucradas en los procesos de diferenciación de la GE, y cómo se organiza su expresión durante la diferenciación a partir de PNM hacia fenotipo aldainoglia.

## Material y métodos

### *Obtención de tejido*

El tejido se obtuvo de ratas adultas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar, criadas y mantenidas en el bioterio del Departamento de Biología Celular y Molecular del CUCBA, con acceso libre a agua y alimento, temperatura controlada de 22-25°C, y con periodos de luz-obscuridad de 12-12 h.

El sacrificio de animales se realizó en una cámara de CO<sub>2</sub>, con posterior dislocación de cervicales, e inmediatamente se procedió a la obtención del tejido, que se realizó en condiciones estériles, disecando las siguientes estructuras: a) BO e hipotálamo, como estructuras que albergan poblaciones celulares de aldainoglia, b) corteza cerebral, en donde se esperan poblaciones predominantemente de astrocitos, y c) el nervio ciático, como

población celular de glía del SNP (células de Schwann). El tejido obtenido se mantuvo en refrigeración a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta la extracción del mRNA.

### ***Obtención de mRNA***

La extracción del mRNA se realizó en condiciones estériles, libres de RNAasas, como se describe en el kit: QuickPrep® Micro mRNA Purification KIT (Pharmacia Biotech). Se emplearon aproximadamente 100 mg de tejido de cada estructura para la extracción del mRNA.

### ***Síntesis de cDNA a partir de mRNA***

El mRNA se precipitó por centrifugación en una microfuga a 13,000 rpm durante 20 min, después se eliminó el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta pasteur sin tocar el pellet del mRNA, el cual se resuspendió en 5 l de agua DEPC, para poder utilizarse en la síntesis del cDNA. La síntesis del cDNA se realizó como se describe en el kit FIRST-Strand® cDNA síntesis KIT, a partir de 1 l del mRNA obtenido previamente. Finalmente, el cDNA se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior amplificación.

### ***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).***

El cDNA fue amplificado con la enzima Taq Polimerasa (1U por reacción), la mezcla de reacción para la PCR incluye; tampón para PCR pH 8.5, dNTP 0.5 a 1 M, 1.5 M  $\text{MgCl}_2$  y 0.5 M de mezcla de oligonucleótidos, en concentraciones finales, añadiendo 1 l del cDNA.

La mezcla de reacción se realizó en un tubo de microcentrífuga de 0.5 ml y fue mantenida en hielo, para posteriormente someterse al programa del termociclador que incluye; un primer lapso de 5 min a  $94^{\circ}\text{C}$ , seguido de 35 ciclos ( $94^{\circ}\text{C}$  1 min,  $65^{\circ}\text{C}$  1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  2 min), finalmente a  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 min para asegurar que se terminan de extender todos los fragmentos, y posteriormente se reduce la temperatura a  $4^{\circ}\text{C}$  en 5 min para almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El producto de PCR se visualizó en geles de agarosa al 1.5 % preparados con TBE, y utilizando bromuro de etidio 0.5 g/ml.

### ***Oligonucleótidos para identificar las isoformas de GFAP***

Para identificar las isoformas mejor descritas en tejido neural del GFAP  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ , se seleccionaron 8 oligonucleótidos que se describen en la Tabla 1, y su posición relativa se ilustra en la figura 1. La isoforma  $\alpha$  es característica del SNC, la isoforma  $\beta$  es característica del SNP, y presenta diferencias en la porción amino terminal, y la isoforma  $\delta$  está presente en el tejido neural en general, y presenta diferencias en la porción carboxilo terminal de la proteína. Con éstos oligonucleótidos se forman parejas que amplifican diferentes fragmentos que se indican en la Tabla 2.

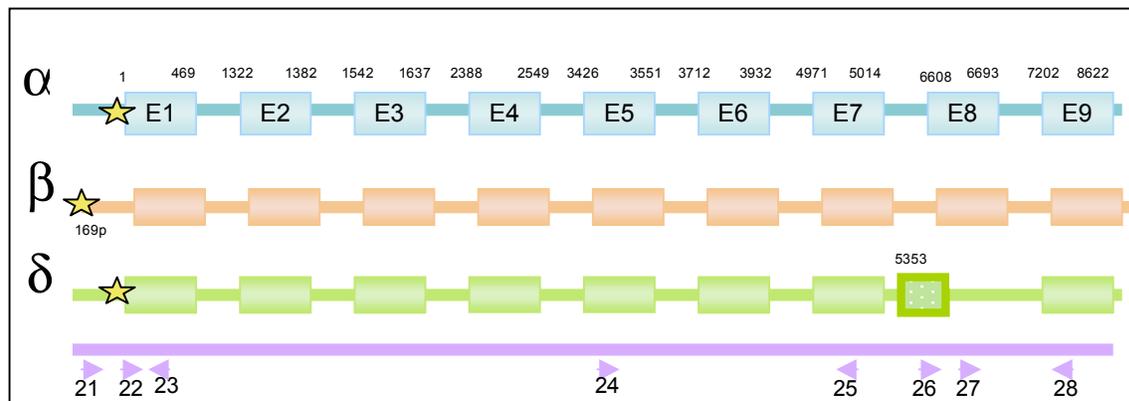
Oligonucleótidos	Secuencia 5' - 3'	Posición en mRNA	Tm
21	GAC ATC CCA GGA GCC AGC A	-18/+1	62
22	GAG ACG TAT CAC CTC TGC AC	23/42	62

23	GCT GTT CCA GGA AGC GGA CCT	285/265	68
24	ACC TCA CAG ACG TTG CTT CC	3433/3452	62
25	TCT GTA CAG GAA TGG TGA TG	4990/4971	58
26	GCC AGC ACT CCG TTA GAC AC	5464/5485	64
27	GGC CAC CTC AAG AGG AAC ATC	6640/6660	66
28	CAT CAC ATC CTT GTG CTC CT	7240/7221	60

**Tabla 1.** Las secuencias de oligonucleótidos se obtuvieron a partir de la secuencia del mensajero de GFAP reportada en el Gen-Bank,<sup>14</sup> con número de acceso: AF028784. La temperatura de alineamiento se calculó de acuerdo a la fórmula:  $4(G+C)+2(A+T)=^{\circ}C$ . La numeración de los oligonucleótidos se realizó de forma arbitraria (únicamente con fines de identificar la secuencia). Los oligonucleótidos se sintetizaron en *Invitrogen*.

Oligonucleótidos	pares de bases	Isoforma
21-23	303	$\beta$
22-23	262	$\alpha$
24-25	360	todas las isoformas
26-28	1262	$\delta$
27-28	93	$\alpha, \beta, \text{no } \delta$

**Tabla 2.** Tamaños esperados de acuerdo a la amplificación de cada pareja de oligonucleótidos, y la isoforma identificada con base en las diferentes combinaciones.



**Figura 1.** Secuencia de intrones y exones del gen de GFAP. Se indican las diferencias entre las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  del GFAP. Las cajas señaladas como E1, E2...E9, representan los exones, separadas por líneas que representan los intrones. En la parte inferior se señala la posición relativa de los diferentes oligonucleótidos empleados para las amplificaciones por PCR.

## Resultados

Se realizaron pruebas de PCR para verificar la integridad del cDNA extraído con una pareja de oligonucleótidos para un gen constitutivo, la  $\beta$ -actina. Después de verificar la integridad del cDNA, se realizaron algunas modificaciones en la metodología para amplificar los diferentes fragmentos del GFAP (Tabla 3).

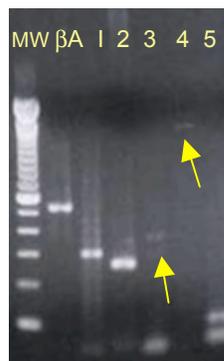
21-23 (303)	$\beta$	TM = 68°C
22-23 (262)	$\alpha$	Condiciones establecidas.
24-25 (360)	todas	Condiciones establecidas.
26-28 (1262)	$\delta$	Tampón a pH 9.5 con tritón X-100, y 2 l de cDNA.
27-28 (93)	no $\delta$	Condiciones establecidas.

**Tabla 3** Modificaciones realizadas al procedimiento de amplificación en cada pareja de oligonucleótidos.

Con base en las modificaciones mencionadas, ha sido posible amplificar los fragmentos de GFAP en diferentes tejidos del SNC, y los resultados se resumen en la tabla 4.

Carril	Isoforma	BO	ciático	hipotálamo	corteza
1	21-23 (303) $\beta$	*	*	*	*
2	22-23 (262) $\alpha$	*	n.d.	*	*
3	24-25 (360) todas	*	n.d.	*	*
4	26-28 (1262) $\delta$	*	*	*	*
5	27-28 (93) no $\delta$	*	*	*	*

**Tabla 4** Isoformas amplificadas en diferentes regiones del SNC y en nervio periférico (ciático). \* Amplificación positiva, n.d.; no detectado.



**Figura 2.** Amplificación en el BO de las diferentes parejas de oligonucleótidos, incluida la  $\beta$ -Actina (530 pb). La secuencia de los carriles 1 a 5 y los tamaños de los fragmentos esperados con cada pareja de oligonucleótidos se presentan en la tabla 2. El marcador de peso molecular (MW) utilizado fue 100 pb DNA ladder (GIBCO BRL cat: 15628-019).

En las condiciones de PCR ensayadas, demostramos la presencia de la isoforma  $\beta$  del GFAP en algunas regiones del SNC, inicialmente descrita sólo en el SNP. Este resultado es muy posiblemente debido a la presencia de células de aldainoglia.

En el bulbo olfatorio se evidencia la presencia de las tres isoformas del GFAP estudiadas;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  (como se muestra en la figura 2), mismas que se presentan, además, en el hipotálamo y la corteza. Por otra parte, en el nervio ciático no se consiguió amplificar la isoforma  $\alpha$  y sí la isoforma  $\beta$ , característica del SNP.

La aldainoglia es un tipo celular de gran importancia para el estudio del desarrollo y regeneración del SNC por sus propiedades promotoras del crecimiento axonal. Los diferentes fenotipos gliales que la conforman, comparten entre sí propiedades funcionales y estructurales, y presentan características fenotípicas tanto de astrocitos como de células de Schwann, lo que la convierte en un excelente candidato celular para realizar transplantes buscando la reparación funcional del SNC.<sup>15</sup>

A partir de estos resultados, el siguiente paso es analizar las isoformas presentes en cultivos purificados de aldainoglia, para poder establecer si son éstas células las que

expresan las 3 isoformas, y posteriormente, analizar el perfil de expresión de las diferentes isoformas durante la diferenciación de esta glía a partir de PNM.

### **Agradecimientos**

El presente trabajo de investigación es apoyado por la U. de G. mediante el proyecto 33540 del CA-414 en Neurobiología durante el año 2005, y es parte de un proyecto apoyado por CONACyT bajo el acuerdo J33999N para GGC, además de la beca Doctoral 185241 para NJCG.

---

### **Referencias**

- <sup>1</sup> Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P. 1999. Introducción a la Biología Celular. Ed Omega. Barcelona.
- <sup>2</sup> Kidd GJ y Trapo B.D. 1995. Cytoskeletal organization of myelinating Schwann cells. In Kettenmann. H. and Ransom. B.R. (Eds) Neuroglia. Oxford University Press. New York.
- <sup>3</sup> Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D y Darnell J. 2002. Biología Celular y Molecular. 4ta ed., Ed. Médica Panamericana. Madrid.
- <sup>4</sup> Eng LF y Lee YL. 1995. Intermediate filaments in astrocytes. In Kettenmann. H. and Ransom. B.R. (Eds) Neuroglia. Oxford University Press. New York.
- <sup>5</sup> Kalnins VI, Subrahmanyam L and Opas M. 1986. The cytoskeleton. Astrocytes. Vol.3. Academic Press, Inc.
- <sup>6</sup> Gudino-Cabrera, G. y Nieto-Sampedro M. 2000. Schwann-like macroglia in adult rat brain. *Glia*. 30(1):49-63.
- <sup>7</sup> Nielsen A, Holm IE, Johansen M, Boven B, Jorgensen P and Jorgensen AL. 2002. A New Splice variant of glial fibrillary acidic protein, GFAPe, Interacts with the presenilin protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(33):29983-91.
- <sup>8</sup> Bignami A and Dahl D. 1974. Astrocyte-specific protein and Neuroglial differentiation. An Immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *J.Comp. neur.* 153:27-38.
- <sup>9</sup> Doetsh F. 2003. A niche for adult neural stem cells. *Current opinion in Genetics and development*. 13:543-50
- <sup>10</sup> Gomes FC, Paulin D. and Moura-Neto V. 1999. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res*. 32(5):619-31.

- 
- <sup>11</sup> Zhou R, Wu X and Skalli O. 2001. TGF-alpha induce a stationary, radial-glia like phenotype in cultured astrocytes. *Brain Res.* 56(1):37-42.
- <sup>12</sup> Zhou R, Quao. 2003. Glial cell development in the vertebrate central nervous system. Electronic Thesis: Doctor of Philosophy in Biology, Pasadena, CA. En: <http://etd.caltech.edu/etd/available/etd-04092003-155305/>
- <sup>13</sup> Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M and Taga T. 2001. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell.* 1:749-58.
- <sup>14</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=4103876>
- <sup>15</sup> Nieto-Sampedro M, Collazos-Castro JE, Taylor JS, Gudiño-Cabrera G, Verdú-Navarro E, Pascual-Piédrola JI, Insausti-Serrano R. 2002. Trauma en el Sistema Nervioso Central y su reparación. *Rev Neurol* 35:534-52.