

ISBN: 970-27-0770-6

CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS POR SUSTRACCIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES EXPRESADOS EN PRECURSORES NEURALES MULTIPOTENCIALES Y GLÍA ENVOLVENTE.

Argelia E. Rojas Mayorquín, Nadia M. Torres Ruíz, Graciela Gudiño Cabrera y Daniel Ortuño Sahagún.

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

Introducción

La formación de neuronas y células gliales del sistema nervioso (SN) se da principalmente durante el desarrollo embrionario. La producción de nuevas células, neuronas o glía, a partir de precursores neurales multipotenciales (PNM), se da en respuesta a una exigencia fisiológica como puede ser una lesión; esto es posible gracias al proceso de diferenciación celular, por medio del cual una célula precursora origina una célula diferenciada, tal como ocurre en el desarrollo embrionario. En nuestro laboratorio, estamos interesados en dilucidar los mecanismos de la diferenciación *in vitro* a partir de PNM de un tipo especial de células gliales; la aldainoglia.¹

A pesar de que los PNM se identificaron hace más de una década, tanto a partir de tejido embrionario² como a partir de tejido adulto,³ el mecanismo que regula su diferenciación, tanto *in vitro* como *in vivo*, recién se ha empezado a dilucidar, por lo que aún hacen falta estudios más detallados acerca de los mecanismos que regulan su diferenciación hacia neurona o glía, así como de sus propiedades proliferativas y de migración, para entender su naturaleza tanto durante el desarrollo como en el individuo adulto.

La identificación y el conocimiento de los genes que codifican para las proteínas involucradas en la diferenciación de neuronas y células gliales, proveerá la información necesaria para guiar la neurogénesis y la gliogénesis, en el cerebro y la medula espinal, en el organismo adulto,⁴ así como para el tratamiento de padecimientos neurodegenerativos, como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson o la esclerosis múltiple, e incluso el tratamiento de tumores.⁵⁻⁶

Antecedentes

Las células gliales constituyen una importante fuente de factores neurotróficos en el cerebro,⁷⁻⁹ y juegan un papel crucial en los procesos de degeneración y regeneración del SN, implicándose directamente en la etiopatogenia y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, así como, en la reparación o regeneración luego de lesiones.¹⁰⁻¹¹⁻¹² Por

la capacidad que tiene para promover el crecimiento de las neuritas, la glía envolvente (GE) del bulbo olfatorio (BO) en particular, representa una promisorio vía de estudio en el abordaje de los problemas de degeneración y regeneración del SNC.^{13·14·15} Sin embargo, el linaje celular de la GE a partir de PNM no ha sido aún esclarecido, por lo que resulta de interés el conocer e identificar las señales implicadas en la diferenciación de la GE a partir de los PNM.

A lo largo del desarrollo embrionario, la proliferación y diversificación de los PNM, así como la definición de su destino celular a lo largo del linaje neuroectodérmico, recae en dos tipos de factores. Por un lado, en factores intrínsecos al tipo celular, mediante la activación de vías de señalización intracelular que culminan en el núcleo modulando la transcripción génica.¹⁶ Por otro lado, en señales extracelulares que dependen de la localización espacio-temporal¹⁷ y que incluyen; factores de crecimiento, moléculas de señalización y proteínas de matriz extracelular,^{18·19 ·20} que controlan en conjunto la proliferación y diferenciación de los PNM. Por lo que, debido a la gran variedad de factores que intervienen durante la diferenciación, resulta fundamental el abordar en forma integral, a nivel del genoma, el proceso de la diferenciación, iniciando por establecer las semejanzas y diferencias, a nivel de su expresión génica, entre células PNM y la aldainoglia.

Por lo anterior, en el presente trabajo nos propusimos construir dos genotecas de cDNA (conjunto de genes expresados por una célula o grupo de células), a partir de células PNM y de GE del BO purificada, ambas cultivadas *in vitro*, con el fin de realizar una hibridación sustractiva bidireccional entre ambas poblaciones celulares, con el objetivo de poder identificar, en una segunda etapa, aquellos genes que se están expresando diferencialmente entre ambas poblaciones celulares. Una vez aislados, se procederá finalmente a su identificación por secuenciación. La metodología, de hibridación sustractiva, permite el análisis simultáneo de todos los genes expresados por un tipo celular en relación a otro, es decir, expresados diferencialmente, en un momento determinado. Con ello se genera una gran cantidad de información de forma rápida y precisa.

La hibridación sustractiva es una eficaz técnica molecular, que permite comparar dos poblaciones de mRNA obtenido ya sea a partir de dos poblaciones de células, o bien de una misma población sometida a dos condiciones experimentales diferentes, y obtener clones de genes que estén expresados en una de las poblaciones y no en la otra. Aunque existen diferentes métodos, el principio que siguen es el mismo. Inicialmente se obtiene el mRNA de las poblaciones celulares o tejidos en estudio, posteriormente se realiza la síntesis del cDNA, uno de los cuales se empleará como referencia, y el otro como prueba de sustracción. El DNA de ambos tipos o condiciones celulares, es hibridado entre sí, y todas aquellas secuencias que hibriden, es decir que estén presentes en ambas poblaciones de moléculas, serán retiradas, quedando únicamente aquellas moléculas que no hayan hibridado, y que por lo tanto sean las expresadas diferencialmente, ya que están presentes en la prueba pero no en la referencia, o viceversa, para su posterior clonaje e identificación.

De los métodos disponibles, el que nosotros empleamos se basa en la amplificación génica selectiva, por PCR, de las moléculas diferencialmente expresadas mediante el empleo de adaptadores.^{21·22} Este método presenta importantes ventajas pues requiere de poca cantidad de mensajero (de 0.5 a 2 gr de RNA poly A⁺), el procedimiento completo

dura 4 días, sin incluir el clonaje e identificación posteriores, y no requiere la separación física de las moléculas de DNA de cadena sencilla y doble, por lo que se realiza todo el procedimiento prácticamente en el mismo tubo.²³ Lo que permite un alto rendimiento y fidelidad, con un muy bajo margen de error en la identificación de genes diferencialmente expresados²⁴.

Metodología

Cultivos celulares.

En el presente trabajo partimos de la obtención y cultivo de PNM a partir de región del cuerpo estriado de embriones de rata (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar) de 14 días de desarrollo embrionario (E-14). Se consigue la formación de neuroesferas (que son conglomerados de PNM) in vitro, que se mantienen proliferando e indiferenciadas utilizando medio definido DMEM/F12/B27 suplementado con EGF (10 ng/ml) y FGF (10 ng/ml) (Fig 1). Por otra parte, realizamos cultivos de GE a partir de la capa externa del BO de ratas macho adultos, en medio DMEM/F12 suplementado con 5 % y 0.5 % de SFB (suero fetal bovino) (Fig 2).

Purificación de mRNA.

Una vez obtenidas las células de la GE purificada y las células PNM, se procedió a la extracción del RNAm, utilizando el *QuickPrep Micro mRNA Purification Kit* de Amersham Pharmacia Biotech. El proceso utiliza tiocinato de guanidina y celulosa oligo(dT) en columnas.

Construcción de la genoteca por sustracción diferencial.

Para la construcción de la genoteca utilizamos el *Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit*²⁵. En una primera etapa, a partir de RNAm de PNM y de GE, sintetizamos cDNA de primera cadena. Posteriormente, sintetizamos cDNA de segunda cadena. En una segunda etapa, se realiza una digestión del cDNA de doble cadena con la enzima Rsa I. Lo anterior, nos permite obtener fragmentos de cDNA más cortos y con extremos “romos”, una condición indispensable para ligar, posteriormente, los adaptadores correspondientes de secuencia conocida.

Después de separar en dos grupos los cDNA así digeridos, se procedió a ligar los adaptadores, uno distinto para cada grupo (adaptador 1 y adaptador 2R); para ello se utilizó la enzima T4DNA ligasa, generando dos poblaciones de cada muestra, una con cada adaptador. Una vez ligados los adaptadores se realiza un análisis de la eficiencia de la ligación; que consiste en realizar una PCR con oligonucleótidos específicos para los adaptadores y para algún gen control conocido, el cual en este caso fue el de la glucosa-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), lo cual nos permite amplificar un fragmento del gen control para verificar la adecuada ligación de los adaptadores. (Fig 3). Posteriormente, una vez corroborado el correcto ligamiento de los adaptadores, se procede a realizar dos hibridaciones sucesivas entre el material de sustracción y el material a ser sustraído, lo cual lleva a un enriquecimiento de los fragmentos, o las secuencias diferencialmente expresadas.

En la primera hibridación se agrega una gran cantidad de cDNA sin adaptadores de una población celular, y se enfrenta al cDNA de la otra población celular con uno y otro adaptador. Los fragmentos que hibriden serán descartados, ya que no se amplificarán. En la segunda hibridación se enfrentan todos los fragmentos de cDNA que llevan ambos adaptadores, del mismo tipo celular con una nueva cantidad de cDNA sin adaptadores; para hacer parejas. Finalmente, los fragmentos así obtenidos, que contengan ambos adaptadores se amplifican después de 2 reacciones secuenciales de PCR (Fig 4A y 4B), con oligonucleótidos para los adaptadores, las cuales enriquecerán sustancialmente los insertos que resulten de la sustracción diferencial, es decir, se amplificarán exponencialmente aquellos cDNA de doble cadena con diferente adaptador. Con lo que el producto final son dos genotecas obtenidas por sustracción diferencial. (Fig 5)

Resultados

Hemos generado y mantenido *in vitro* poblaciones homogéneas de células precursoras neurales multipotenciales (PNM) y de glía envolvente (GE), evidenciado por inmunocitoquímicas de marcadores específicos.²⁶ Los PNM E-14, forman neuroesferas a partir del segundo día de cultivo. A los 14 días *in vitro* la GE es confluyente y se procede a su inmunopurificación. Al realizar la inmunocitoquímica se corroboró la co-expresión del receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75 y la proteína de citoesqueleto GFAP²⁶

A partir de ambas poblaciones celulares, se realizó la extracción de mRNA y su posterior cuantificación por D.O. (260/280 nm), así mismo se corroboró la integridad del RNAm aislado, mediante la visualización en gel de agarosa al 1%. Se ha obtenido RNAm en cantidad de 4 a 6 g por cada extracción.

Se obtuvo cDNA de cadena sencilla y doble de ambos tipos celulares para la ligación de adaptadores como se describió en la metodología. Se comprobó la eficiencia de ligación al amplificar, por PCR y con oligonucleótidos específicos para los adaptadores, una secuencia abundante y conocida del genoma de rata, de la glucosa-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (fig 3).

Se realizaron dos hibridaciones y se corroboró la sustracción de insertos (cDNA) por medio de la amplificación por PCR de los mismos (fig 4). Con lo que el producto final son dos genotecas obtenidas por sustracción diferencial, de cada tipo celular.

Para posteriormente poder comprobar *in vitro* la participación de los genes seleccionados por clonaje e identificados por secuenciación, contamos con un esquema de diferenciación *in vitro* de PNM, empleando medios condicionados, en el cual podremos comprobar la acción de los genes identificados.

Conclusiones

1) La construcción de genotecas por sustracción diferencial es un procedimiento rápido y eficaz para la obtención de fragmentos de genes expresados diferencialmente entre dos poblaciones celulares.

2) La obtención de fragmentos de genes expresados diferencialmente es una herramienta adecuada para los estudios de diferenciación celular, ya que permite conocer secuencias únicas de un tipo celular que no están expresadas en otro, permitiendo un abordaje integral.

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 las becas Doctorales 170295 para AERM y 170325 para NMTR.

Figuras

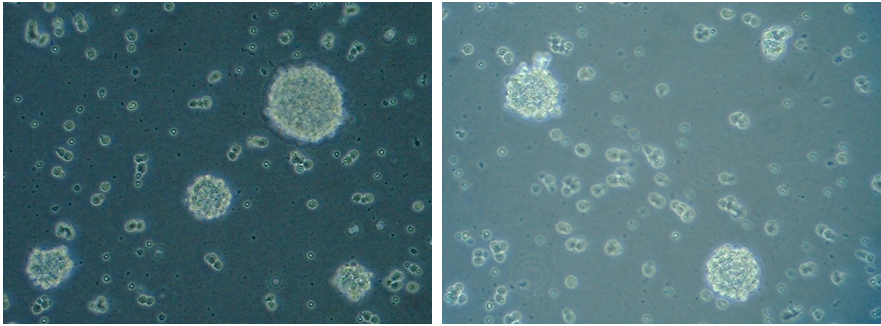


Fig 1. PNM (8DIV) utilizadas para la extracción de mRNA para genoteca

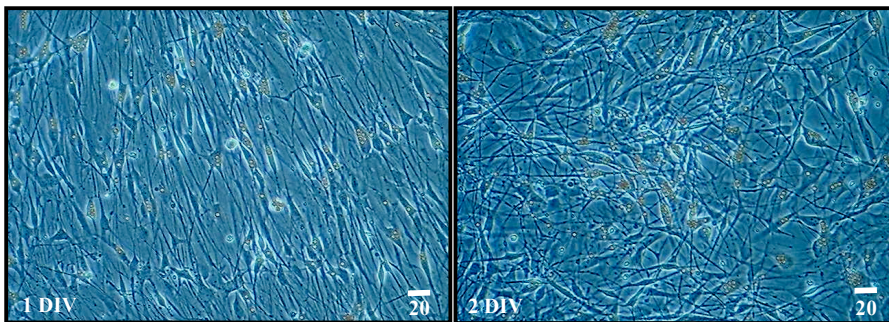


Fig 2. GE purificada utilizada para la extracción de mRNA para genoteca

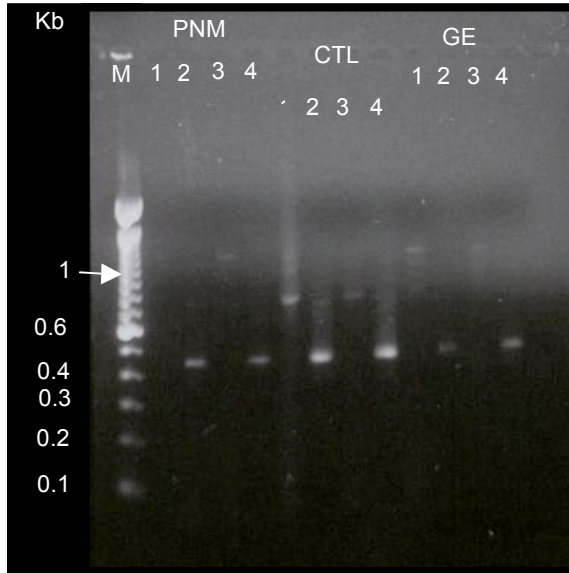


Fig 3. Análisis de eficiencia de ligación. Se observa amplificación del fragmento control, glucosa-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (gel agarosa al 1.5%).

PNM - muestra (cDNA) de precursores neurales multipotenciales

CTL - muestra (cDNA) control de músculo esquelético (kit)

GE - muestra (cDNA) de glía envolvente

M - marcador de tamaño molecular

1 y 3 – G3PDH leído sobre template con primer G3PDH 3'

2 y 4 – G3PDH leído sobre template con primer G3PDH 3' y 5'

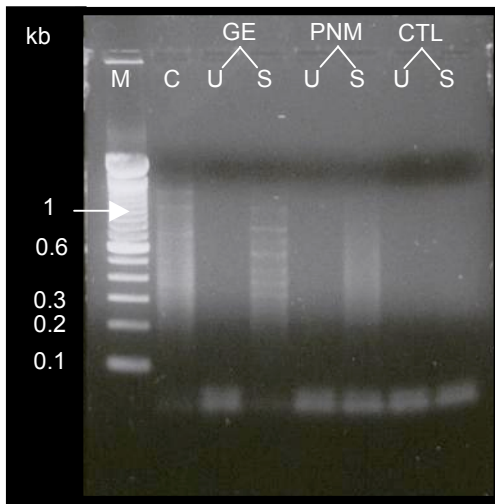


Fig 4A PCR 1

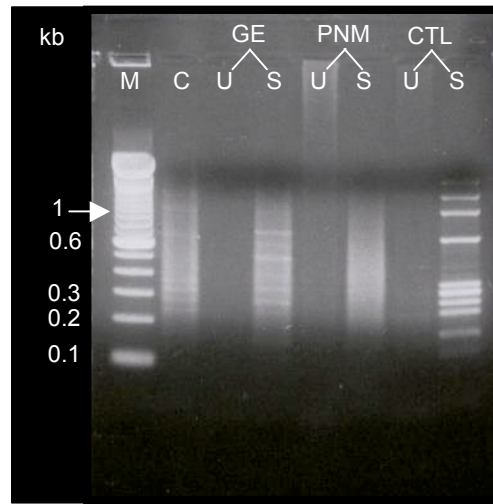


Fig 4B PCR 2

Fig. 4. Genoteca. Amplificación por PCR de los fragmentos ligados a los adaptadores de las dos poblaciones celulares luego de la sustracción diferencial.

M – marcador de tamaño molecular

C – fragmentos de cDNA substraído (control kit)

GE- fragmentos cDNA amplificados de glía envolvente

PNM- fragmentos cDNA amplificados de precursores neurales multipotenciales

CTL- fragmentos cDNA amplificados de control de músculo esquelético (kit)

U – cDNA no substraído

S- cDNA substraído (por lo tanto no expresado en la muestra contraria)

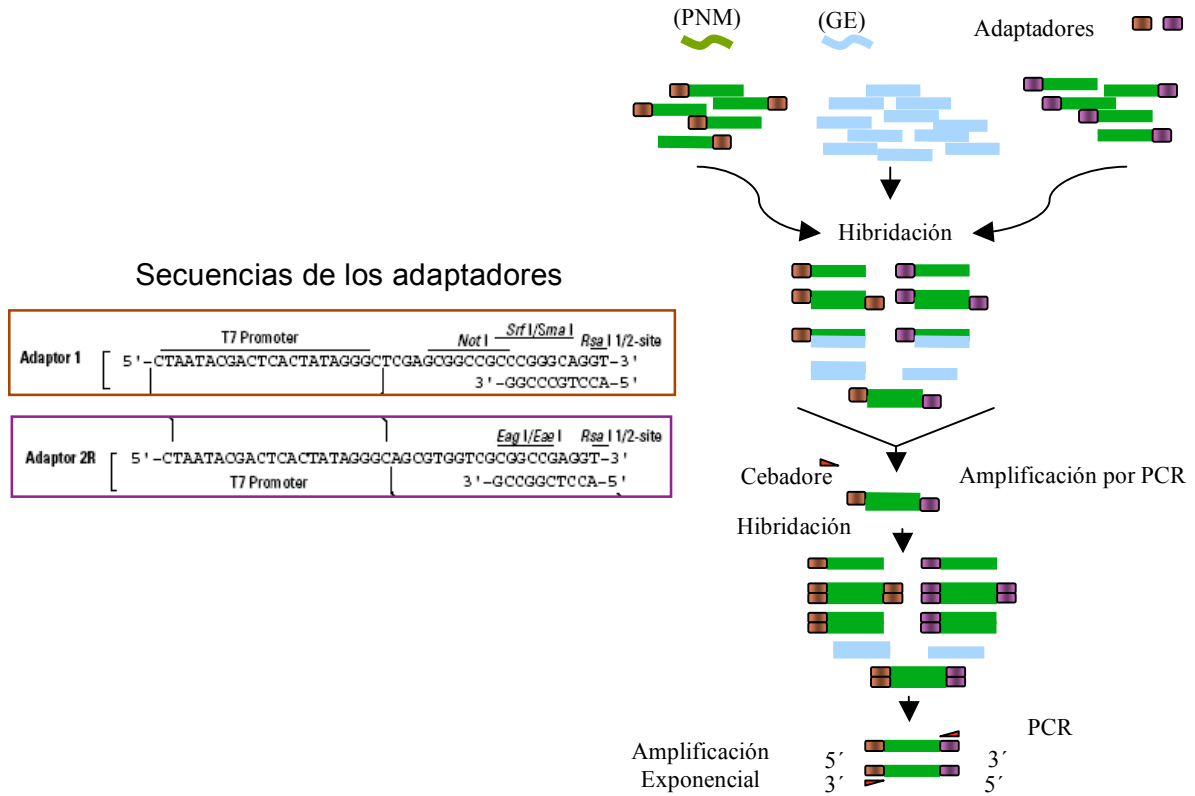


Fig. 5. Diagrama que muestra el procedimiento de hibridaciones y amplificaciones para la construcción de la genoteca. (Tomado de ref. 25)

Referencias

- ¹ Gudiño-Cabrera, G. y Nieto-Sampedro, M. (2000) Schwann-like macroglia in adult rat brain. *Glia*. 31(1):49-63.
- ² Stemple, D. L. y Anderson, D. J. (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71, 973-985.
- ³ Lois, C. and Alvarez-Buylla, A. (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 2074-2077.
- ⁴ Goldman, S. (2003) Glia as neural progenitor cells. *Trends in Neurosciences* 26(11):590-596.
- ⁵ McKay RD (2004) Stem cell biology and neurodegenerative disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359(1445):851-6.
- ⁶ Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. (2004) Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med.* 10 Suppl:S42-50.
- ⁷ Martin D.C. (1992) Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 5:81-94.
- ⁸ Labourdette, G. y Sensenbrenner, M. (1995) Growth factors and their receptors in the central nervous system. En: *Neuroglia* Eds. Kettenmann, H. y Ransom B.R. pp. 441-459.
- ⁹ Nedergaard M, Ramsom B, Goldman S.A. (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosci.* 26(10):523-530.
- ¹⁰ Nieto-Sampedro, M., Collazos-Castro, J.E. Taylor, J.S. Gudiño-Cabrera, G. Verdú-Navarro, E. Pascual-Piédrola, J.I. Insausti-Serrano, R.. (2002) Trauma en el Sistema Nervioso Central y su Reparación. *Rev Neurol* 35: 534-52.
- ¹¹ Gotz M. (2003) Glial cells generate neurons--master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. *Neuroscientist.* 9(5):379-97.
- ¹² McKay RD (2004) Stem cell biology and neurodegenerative disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359(1445):851-6.
- ¹³ Pascual JI, Gudiño-Cabrera G, Insausti R, Nieto-Sampedro M. (1997) Loss and restoration of rat urinary bladder function after lumbosacral rhizotomy and ensheathing glia transplantation. *Soc Neurosci Abstr.* 23: 1720.

-
- ¹⁴ Navarro, X., Valero, A., Gudiño-Cabrera G., Forés, J., Rodríguez F.J., Verdú, E., Pascual, R., Cuadras, J. and Nieto-Sampedro, M. (1999) Ensheathing glial transplants promote dorsal root regeneration and spinal reflex restitution after multiple lumbar rhizotomy. *Ann. Neurol.* 45(2):207-215.
- ¹⁵ Kafitz KW, Greer CA. (1999) Olfactory ensheathing cells promote neurite extension from embryonic olfactory receptor cells *in vitro*. *Glia*; 25:99-110.
- ¹⁶ Sauvageot, C.M. y Stiles, C.D. (2002) Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 12:244-249.
- ¹⁷ Jessell, T.M. (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20-29.
- ¹⁸ Cameron, R.S. y Rakic, P. (1991) Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia*; 4: 124-37.
- ¹⁹ Vaccarino, F.M., Yosif, G., Zhang, Y., Zheng, W. (2001) Stem Cells in Neurodevelopment and plasticity. *Neuropsychopharmacology* 25 (6): 806-15.
- ²⁰ Álvarez-Buylla, A y Garcia-Verdugo, J. (2002) Neurogenesis in adult Subventricular Zone. *J Neurosci.* 22 (3) : 629-34.
- ²¹ Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P. D., Khaspekov, G. L., Lukyanov, K. A., Vagner, L. L., Ermolaeva, O. D., Lukyanov, S. A., and Sverdlov, E. D. (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.* 240:90-97.
- ²² Diatchenko, L., Lau, Y.-F. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. & Siebert, P. D. (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6025-6030.
- ²³ Duguid, J. R. & Dinauer, M. C. (1990) Library subtraction of *in vitro* cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res.* 18:2789-2792.
- ²⁴ <http://www.genhunter.com/support/index.html#comparison>
- ²⁵ CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual PT1117-1 (PR22926) (2002) Catalog #: K1804-1
- ²⁶ Rojas Mayorquín A.E., Ortuño Sahagún D. y Gudiño Cabrera G. (2005) Diferenciación celular *in vitro* de precursores neurales embrionarios hacia

células gliales tipo aldainoglia. En: 2004-Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. Ed: Carbajal S. ISBN 970-27-0757-9