ISBN 970-27-1045-6

IDENTIFICACIÓN POR HIBRIDACIÓN SUSTRACTIVA DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE ENTRE CÉLULAS PRECURSORAS NEURALES MULTIPOTENCIALES Y GLÍA ENVOLVENTE DEL BULBO OLFATORIO

Rojas Mayorquín Argelia Esperanza, Torres Ruiz Nadia Magali, Palomera Ávalos Verónica, Gudiño Cabrera Graciela, Ortuño Sahagún Daniel (dortuno@cucba.udg.mx)

Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural.
Instituto de Neurobiología.
Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA.
Universidad de Guadalajara

Introducción y antecedentes

Para la identificación y clonaje de los genes que se expresan diferencialmente entre dos poblaciones celulares, la genoteca por sustracción es una poderosa y muy útil herramienta. El mRNA de una población celular es convertido a cDNA, el cual se hace hibridar con el mRNA de la otra población celular y viceversa. Las secuencias que hibridan son removidas y los fragmentos de cDNA que no hibriden representan los genes que son expresados diferencialmente en cada uno de los tipos celulares.

Nuestro laboratorio está interesado en caracterizar el linaje de la aldainoglía, un fenotipo de glía asociado a la regeneración, [1, 2, 3] cuyo prototipo es la glía envolvente (GE) del bulbo olfatorio, así como su linaje y mecanismos de diferenciación a partir de células precursoras neurales multipotenciales (PNM), para lo cual resulta importante identificar moléculas marcadoras específicas de PNM y GE, por lo que el presente abordaje pretende detectar algunas de las proteínas que son expresadas diferencialmente y por lo tanto características de los dos diferentes tipos celulares estudiados.

Con el fin de identificar genes característicos de cada tipo celular, se obtuvieron cultivos purificados de GE y PNM, a partir de los cuales se construyó una genoteca y se realizó una hibridación sustractiva bidireccional entre ambas poblaciones celulares. De esta manera se logró clonar e identificar por secuenciación de DNA, genes que se expresan específicamente en la GE.

Metodología

Cultivos celulares de PNM y de GE purificada

A partir de cultivos de PNM obtenidos del cuerpo estriado de embriones de rata (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar) de 14 días de desarrollo embrionario (E-14),[4] así como de cultivos de GE a partir de la capa externa del BO de ratas macho adultos, [5] se obtienen dos

poblaciones celulares suficientemente homogéneas *in vitro*, como ya se ha descrito previamente

Extracción de mRNA y construcción de la genoteca

Una vez obtenidos los cultivos de GE purificada y de PNM, se procedió a la extracción de su mRNA poli-A+ con el *QuickPrep Micro mRNA Purification Kit* de Amersham Pharmacia Biotech. Para la construcción de la genoteca utilizamos el *PCR-Select cDNA Subtraction Kit* de CLONTECH, como ya se describió previamente.[6] Los fragmentos de cDNA expresados diferencialmente entre ambas poblaciones celulares fueron amplificados por 2 reacciones secuenciales de PCR.

Clonaje e identificación de los clones positivos

El ligamiento de los insertos obtenidos de la genoteca por sustracción se realizó en el plásmido pCR II TOPO de 4.9 kb del *TOPO TA Cloning kit* de INVITROGEN. Con el vector ligado se transformaron bacterias de la cepa DH-5α, se identificaron las colonias de bacterias transformadas por plásmidos recombinantes, por medio de la expresión del gen lacZ. El DNA clonado se purificó en minipreparaciones por lisis alcalina y se trató con RNAsa y proteinasa K para su secuenciación.

Secuenciación de insertos e identificación de los cDNA diferencialmente expresados

La secuenciación de los insertos obtenidos se realizó por el método automático de Sanger aplicado por Applied Biosystems. Para la lectura de las secuencias se utilizó el secuenciador de tecnología capilar ABI Prism 310. El análisis y comparación para la búsqueda de homólogos de las secuencias se realizó con el programa PSI-BLAST y consultas al GenBank del *National Center for Biotechnology Information*.

Resultados y discusión

A partir de las bacterias transformadas se procedió a la extracción del DNA clonado. Se realizaron digestiones enzimáticas con EcoR I, y se clasificaron por tamaño los distintos fragmentos clonados (figura 1). Una vez identificados los clones se procedió a secuenciarlos. Se obtuvieron ocho clones de la sustracción de GE menos PNM. Los resultados obtenidos están dentro de lo esperado en cuanto al número de clones identificado.

Los genes identificados se ilustran en la tabla 1. Cabe destacar que se obtuvo la secuencia 3' del mRNA de la tenascina C, identificada por su homología con la secuencia del ratón. Al ser una secuencia novedosa, se hizo el reporte correspondiente a la base de datos del GenBank registrándose con el número de acceso DQ916292.[7]

Se identificó el gen que codifica para la proteína 5 de unión a IGF (IGF-BP5),[8] la cual se expresa abundantemente en células de Schwann (CS) en cultivo durante su

diferenciación inducida por IGF-I. Se asocia a la matriz extracelular y favorece la acción de este factor de crecimiento. Al encontrar que esta proteína se expresa de forma diferencial en la GE en el presente trabajo, es posible proponer su papel como factor relacionado a la proliferación de la GE *in vitro*. Además, se ha demostrado que el IGF-I es capaz de inducir la expresión de la IGF-BP5,[9] ya que el IGF-I es producido por la propia GE,[2] y hemos detectado la expresión diferencial de la IGF-BP5 en GE *vs*. PNM,[4] resulta probable que el IGF-1 sea uno de los componentes importantes producidos por la GE en el medio de cultivo que condiciona para su propia diferenciación a través de su interacción con la IGF-BP5.

Otro de los genes identificados es una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.[10] Es una enzima asociada a la membrana plasmática que promueve el ensamblaje y el anclaje de los microtúbulos y que puede regular su distribución intracelular. Se ha descrito su expresión en el BO,[11] en oligodendrocitos,[12] así como durante la diferenciación hacia CS de líneas celulares tumorales.[13] Además, funcionalmente se ha involucrado con el mantenimiento de las interacciones entre las células gliales y los axones de neuronas en el SNC.[12] La presencia de la Cnp1 en GE, encontrada en el presente trabajo, resulta relevante para explicar el papel promotor de la regeneración de esta glía, así como su semejanza, no sólo fenotípica sino funcional, con las CS y otros tipos de glía central.

También identificamos, en dos clones, a la subunidad 1 de la citocromo C oxidasa. Se trata de una enzima marcadora de la actividad mitocondrial, es crítica en el control de la respiración celular y la apoptosis.[14] Su actividad es fundamental para el metabolismo energético de la célula y resulta relevante, sobre todo durante el desarrollo del SN, en la regulación del proceso de proliferación.[15] Por otra parte, en un experimento de sustracción diferencial se identificó como uno de los 10 genes que incrementan su expresión inducida por EGF en células de páncreas en cultivo.[16] Dado que se ha demostrado la expresión de EGF y de su receptor en el epitelio olfatorio,[17] la elevación de esta enzima puede ser de importancia en los procesos de proliferación celular de la GE *in vitro*.

Finalmente, se obtuvieron cuatro clones de la Tenascina C (TN-C), que es una glicoproteína de matriz extracelular considerada un factor importante para favorecer la plasticidad morfológica en el SNC.[18] Se expresa en precursores de oligodendrocitos y es necesaria para regular su maduración hacia el fenotipo mielinizante, así como para modular su respuesta a factores de crecimiento, como el PDGF.[19] Por otra parte, la TN-C se ha identificado en dos experimentos de sustracción de cDNA, similares al nuestro, en precursores gliales *vs*. células neuro-epiteliales y en precursores O2A. En el primer caso, su expresión es específica de células gliales en etapas intermedias de diferenciación, considerándola una molécula marcadora de linaje y estado de diferenciación, se propone que juega un importante papel en la diferenciación y la migración de precursores gliales de destino restringido;[20] mientras que en el segundo experimento se propone la participación de la TN-C en la regulación de la movilidad de los precursores O2A, a través del bloqueo de la señalización por Wnt.[21] Además, recientemente se ha propuesto que la TN-C promueve la proliferación celular y la migración a través de la vía del receptor beta-1 de integrina de una forma autocrina en astrocitos.[22] Es relevante el que la TN-C se exprese de manera importante en la ZSV, donde contribuye a la generación de un ambiente propicio para modular la acción de factores de crecimiento que aceleran el desarrollo y la

diferenciación de las PNM. Finalmente, se ha descrito también la expresión de TN-C en CS.[23] Todo lo anterior indica que esta proteína de matriz extracelular es importante para mediar las funciones características descritas para la aldainoglía, lo cual coincide con su presencia en GE.

Conclusiones

En conjunto, estos cuatro genes identificados mediante la sustracción diferencial de aquellos expresados por la GE en cultivo, a diferencia de las PNM, permiten ampliar el estudio dirigido a nivel molecular de los factores característicos de la GE (células gliales de fenotipo aldainoglía). El siguiente paso será corroborar por PCR la expresión diferencial de los genes identificados en GE, así como durante la diferenciación de aldainoglía a partir de PNM.

Colaboración

La secuenciación se realizó en el Instituto de Botánica del CUCBA a cargo del Dr. Aarón Rodríguez.

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación es apoyado por la Universidad de Guadalajara mediante el proyecto PIFI del CA-414 en Neurobiología, y es parte de un proyecto apoyado por CONACyT bajo los acuerdos J33999N para GGC y U48002-M para GGC y DOS, además de las becas Doctorales 170295 para AERM y 170325 para NMTR. Los resultados aquí presentados son parte del trabajo de tesis doctoral de AERM.[1]

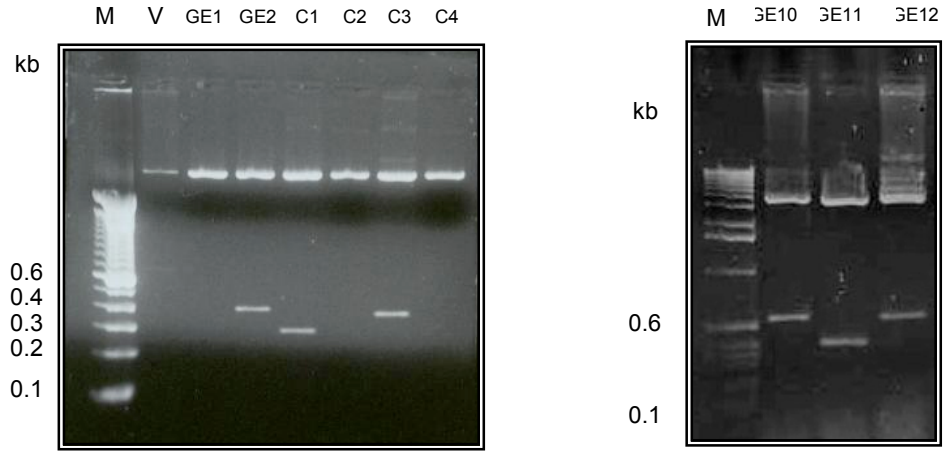

Figura 1. Insertos de cDNA liberados. Geles de agarosa al 1.5%.
M- Marcador de tamaño, V- Vector linearizado, GE – Glía envolvente, C – Control.

Clon ID	Tamaño aprox. (kb)	Tamaño por secuencia (pb)	Número de acceso de base de datos		Identificación
			Gen	Proteína	
GE 7	0.3	218	NM_012817	NP_036949	IGF-BP5
GE 8	0.2	180	BC098066	AAH98066	Fosfodiesterasa (Cnp1)
GE 2	0.4	400	S79304	AAB21298	Citocromo C oxidasa (subunidad I)
GE 11	0.5	414			
GE 3	0.5	597			
GE 4	0.7	597	NM_011607	NP_035737	Tenascina C
GE 10	0.6	578	(Mus musculus)	(Mus musculus)	
GE 12	0.6	578			

Tabla 1. Insertos clonados y liberados de la genoteca por sustracción.

Referencias

[1] Gudiño-Cabrera G y Nieto-Sampedro M. (1999) Estrogen receptor immuno-reactivity in Schwann-like brain macroglia. J Neurobiol 40(4):458-470.

[2] Gudiño-Cabrera G y Nieto-Sampedro M. (2000) Schwann-Like Macroglia in Adult Rat Brain. Glia 30(1):49-63.

[3] Panicker M y Rao M. (2001) Stem cells and neurogenesis In: Stem Cell Biology. Marshak DR, Gardner DK and Gottlieb D. eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). 399-438.

[4] Rojas-Mayorquín AE. (2006) Diferenciación in vitro de aldainoglía a partir de precursoras neurales multipotenciales. Análisis de la expresión génica diferencial. Tesis Doctoral. Universidad de Guadalajara, 31 de octubre de 2006.

[5] Gudiño-Cabrera G y Nieto-Sampedro M. (1996) Ensheathing cells: Large scale purification from adult olfactory bulb, freeze-preservation and migration of trasplanted cells in adult brain. Restor Neurol Neurosci;10:25-34.

[6] Rojas-Mayorquín AE, Torres-Ruiz NM, Gudiño-Cabrera G, Ortuño-Sahagún D. (2005) Construcción de genotecas por sustracción diferencial de los genes expresados en precursores neurales multi-potenciales y glía envolvente. En: 2005-Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. Carbajal S. (Ed) ISBN 970-27-0770-6 pp 505-67.

[7] Ortuño-Sahagún D y Rojas-Mayorquín AE. (2006) Rattus norvegicus tenascin C mRNA, partial cds. Sequence reported to Gen Bank DQ916292 Submitted 24 aug 2006; on line 7 oct 2006.

[8] Cheng HL, Shy M y Feldman EL. (1999) Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-5 expression during Schwann cell differentiation. Endocrinol 140(10):4478-85.

[9] Duan C, Liimatta MB y Bottum OL. (1999) Insulin-like growth factor (IGF)-I regulates IGF-binding protein-5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B/Akt, and p70 S6 kinase signaling pathway. J Biol Chem 274(52):37147-53.

[10] Bifulco M, Laezza C, Stingo S y Wolff J. (2002) 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a membrane-bound, microtubule-associated protein and membrane anchor for tubulin. Proc Natl Acad Sci (USA) 99(4):1807-12.

[11] Gomes SS, Carvalho SL, Santiago MF, Lopez LB, Barradas PC y Cavalcante LA. (2003) Expression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in the developing olfactory bulb and subventricular zone rostral extension. J Neurosci Res 73(4):471-80.

[12] Rasband MN, Tayler J, Kaga Y, Yang Y, Lappe-Siefke C, Nave KA y Bansal R. (2005) CNP is required for maintenance of axon-glia interactions at nodes of Ranvier in the CNS. Glia 50(1):86-90.

[13] Sugimoto T, Kato T, Sawada T, Horii Y, Kemshead JT, Hino T, et al. (1988) Schwannian cell differentiation of human neuroblastoma cell lines in vitro induced by bromodeoxyuridine. Cancer Res 48(9):2531-7.

[14] Nakajima T, Nakajima E, Fukiage C, Azuma M y Shearer TR. (2002) Differential gene expression in the lens epithelial cells from selenite injected rats. Exp Eye Res 74(2):231-6.

[15] Paraoanu LE, Weiß B, Robitzki AA y Layer PG. (2005) Cytochrome-c oxidase is one of several genes elevated in marginal retina of the chick embryo. Neuroscience 132:665-72.

[16] Jeon SY, Baek KH, Kim YS, Park CG, Kwon HS, Ko SH, et al. (2004) Differentially up-regulated genes in proliferating porcine neonatal pancreas cells caused by epidermal growth factor. J Cell Biochem 91(2):354-64.

[17] Salehi-Ashtiani K y Farbman AI. (1996) Expression of neu and Neu differentiation factor in the olfactory mucosa of rat. Int J Dev Neurosci 14(7-8):801-11.

[18] Theodosis DT, Piet R, Poulain DA y Oliet SH. (2004) Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. Neurochem Int 45(4):491-501.

[19] Garwood J, Garcion E, Dobbertin A, Heck N, Calco V, ffrench-Constant C y Faissner A. (2004) The extracellular matrix glycoprotein Tenascin-C is expressed by oligodendrocyte precursor cells and required for the regulation of maturation rate, survival and responsiveness to platelet-derived growth factor. Eur J Neurosci 20(10):2524-40.

[20] Cai J, Xue H, Zhan M y Rao MS. (2004) Characterization of progenitor-cell-specific genes identified by subtractive suppression hybridization. Dev Neurosci 26(2-4):131-47.

[21] Kakinuma Y, Saito F, Osawa S y Miura M. (2004) A mechanism of impaired mobility of oligodendrocyte progenitor cells by tenascin C through modification of wnt signaling. FEBS Lett 568(1-3):60-4.

[22] Nishio T, Kawaguchi S, Yamamoto M, Iseda T, Kawasaki T y Hase T. (2005) Tenascin-C regulates proliferation and migration of cultured astrocytes in a scratch wound assay. Neuroscience 132(1):87-102.

[23] Hakim SG, Lauer I, Nadrowitz R, Berndt A, Kosmehl H y Sieg P. (2004) Re-distribution of tenascin-C in the parotid acinar cells. An early marker of radiation-induced damage of salivary glands? Anticancer Res. 24(5A):2841-6.