

# CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

#### **UNIDAD ZACATENCO**

# DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

"Análisis de la interacción del factor de transcripción REST/NRSF con elementos RE1-like del gen *pdx-1*"

### **TESIS**

Que presenta

# Q.F.B. ROMERO HERNÁNDEZ OCTAVIO

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis:

DR. JOSÉ ISABEL TAPIA RAMÍREZ

Ciudad de México

AGOSTO, 2016

**Dedicatoria:** A mi abuela, mis padres, mis hermanas, amigos y cada una de las personas que creyeron en este logro.

#### Agradecimientos:

Al Dr. José Tapia Ramírez, al M. en C. Humberto Santana, a mi compañero y amigo Josué Ramírez, compañeros y personal del laboratorio no. 2 del área 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular, por el apoyo y las facilidades durante mi estancia en la institución.

A mis asesores la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y el Dr. Efraín Garrido Guerrero, por el apoyo, atenciones y aportaciones a este proyecto.

A mis compañeros de generación y profesores que participaron en mi formación y crecimiento personal y profesional.

Agradecimientos especiales al CINVESTAV por la oportunidad de pertenecer a este programa de posgrado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado con la beca número 392785, gracias a la cual se pudo materializar este proyecto y obtener el grado de Maestro en Ciencias en la especialidad de Genética y Biología Molecular.

#### Resumen

ha descrito anteriormente, el Factor de Silenciamiento Transcripcional RE1 (REST) o Factor de Silenciamiento Neuro-Restrictivo (NRSF), ejerce su actividad represora sobre un robusto conjunto de genes específicos de neuronas en diversos linajes celulares. Recientemente, un número importante de genes específicos de neuronas se han descrito en las células pancreáticas, lo que ha fortalecido la asociación entre los tejidos pancreáticos y neuronales y hace hincapié en que estos tejidos comparten factores de transcripción en común. Se ha demostrado que REST reprime genes de origen pancreático, como en el caso de los genes Islet-brain 1 (IB-1), paired-box 4 (PAX4) y neurogenina 3 (NGN-3). PDX-1 es un factor de transcripción del gen de insulina, expresado principalmente en las células-β pancreáticas. Trabajos recientes han demostrado una relación notable entre el promotor de pdx-1 y dos de los cofactores reguladores reclutados por REST, la histona deacetilasa 1 (HDAC1) y el correpresor mSin3A. Inicialmente realizamos el análisis bioinformático de un fragmento de 6700 pb que incluye la regiones upstream y codificante de pdx-1, encontrando cinco importantes motifs putativos RE1 dentro de esa región (RE1-like 1-5), dos de los cuales RE1-2 y RE1-4 mostraron gran afinidad por REST en ensayos de movilidad electroforética (EMSA), competencia, superretardamiento e inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). En este trabajo hemos examinado si existe una interacción significativa entre REST y la región upstream y codificante del gen pdx-1 en la línea celular inmortalizada HeLa, estos datos nos sugieren que REST es capaz de unirse a sitios RE1 en el gen pdx-1 en células HeLa y podría estar regulando de manera negativa la transcripción de este gen.

#### **Abstract**

As previously described, the RE1 Silencing Transcription Factor (REST) or (neuron-restrictive silencer factor, NRSF) exerts its repressor activity over a robust set of neuron-specific genes in diverse cell lineages. Recently, a relevant number of neuron-specific genes have been described in pancreatic cells, which has strengthened the association between pancreatic and neuronal tissues and emphasizes that these tissues share common transcription factors. REST has been shown to repress genes of pancreatic origin, such as in the case of the genes Islet-brain 1 (IB-1), paired box gene 4 (PAX4) and neurogenin 3 (NGN-3). PDX-1 is a transcription factor of insulin gen, mainly expressed in pancreatic β-cells. Recent work has shown a noteworthy relationship between pdx-1 promoter and two of the regulatory cofactors recruited by REST, histone deacetylase 1 (HDAC1) and the corepressor mSin3A. Firstly we perform a bioinformatic analysis of a fragment of 6700 bp to includes the upstream and coding regions of pdx-1, and found five important putative RE1 motifs within that region (RE1-like 1-5), two of which RE1-2 and RE1-4 showed great affinity for REST in electrophoretic mobility shift assay (EMSA), competency, super-shift and chromatin immunoprecipitation (ChIP). In the recent work we examined if a significant interaction exists between REST and the upstream and coding region of the gen pdx-1 in the immortalized cell line HeLa, these data suggest that REST is able to bind at sites RE1 in the pdx-1 gen in HeLa cells, and could downregulate the transcription of this gen.

CONT	ENIDO	Página			
1.	Dedicatoria y Agradecimientos	1			
2.	Abstract/Resumen	2-3			
3.	Introducción	5-15			
4.	Justificación e Hipótesis	16			
5.	Objetivo General y Particulares	17			
6.	Estrategia Experimental	18-19			
7.	Material y Métodos	20-30			
	a. Cultivo Celular y Extracción de proteína nuclear	20			
	b. Ensayos de retardamiento	20-21			
	c. Ensayos de competencias	21			
	d. Ensayos de super-retardamiento	22			
	e. Diseño, síntesis e hibridación de sondas LUEGO	22-23			
	f. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	23-26			
	g. Inmunoprecipitación magnética	26-27			
	h. Aislamiento del DNA a partir de cromatina (ChIP)	27			
	i. Diseño de primers para ensayos ChIP	28			
	j. Ensayos de amplificación de PCR de cromatina	29-30			
8.	Resultados	31-44			
	a. Análisis Bioinformático con Genomatix MatInspector	31			
	b. Sistema de sondas LUEGO	31-34			
	c. Ensayos de retardamiento (EMSA) y competencias	34-39			
	d. Ensayos de super-retardamiento con ab anti-REST	39-41			
	e. Ensayos de Inmunoprecipitación de la Cromatina	41-44			
9.	45-46				
10. Conclusiones 47					
11	11. Perspectivas 47-48				
12. Anexos A: S1- S3 material adicional 49-					
13. Anexo B: Soluciones y Buffers 53-56					
14	14. Bibliografía 57-63				

# Introducción

# Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad creciente en incidencia y frecuencia, con un aumento progresivo en las tasas de morbi-mortalidad, tanto en sociedades desarrolladas como en vías de desarrollo. El padecimiento constituye un grupo de trastornos metabólicos que tiende hacia la cronicidad y es caracterizado por un elemento común, la hiperglucemia, que contribuye al desarrollo de complicaciones microvasculares, macrovasculares y neuropáticas.

La OMS ha relacionado el aumento progresivo de la prevalencia de la diabetes con el crecimiento y envejecimiento de la población, el incremento de la obesidad, hábitos erróneos de la alimentación y modos de vida sedentarios, así como la DM2 asociada a la obesidad en niños. El problema que representa a nivel individual y de salud pública es de enormes proporciones.

De acuerdo a lo que representa esta enfermedad, se han implementado medidas preventivas, de diagnóstico precoz y tratamiento temprano como vínculos oportunos entre el paciente y el control de la misma. En concordancia con los estatutos clínicos de prevención y tratamiento, se han estado realizando durante la última década, algunos esfuerzos en materia de investigación científica, en aras de encontrar los elementos y características que definan la enfermedad en su forma más integral. Así, se ha estudiado sobre la etiología, fisiopatología y genética de la diabetes mellitus, llegando al descubrimiento de algunos genes candidato que predisponen a la enfermedad, y al estudio de numerosas moléculas implicadas en su patogenia. A la par, se ha planteado incluso sobre el origen y regeneración

del tejido pancreático, abriendo el conocimiento sobre una gamma de interacciones moleculares que están implicadas directamente sobre la fisiología del páncreas y, en concreto, sobre la funcionalidad de las células-β de los islotes de Langerhans. Respecto a esto, se han evaluado los componentes biológicos que integran la vía de señalización de la insulina, el mecanismo de regulación del funcionamiento de las células beta y la homeostasis de la glucosa.

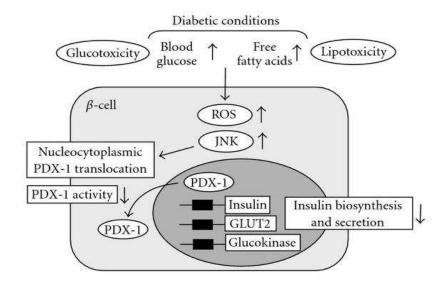
La diabetes tipo 2 (DM2) se caracteriza por la disfunción pancreática de las células- $\beta$  y la resistencia a la insulina. En primer lugar, el comer en exceso y la obesidad conducen al desarrollo de la resistencia a la insulina, y esto provoca que las células- $\beta$  normales secreten una mayor cantidad de insulina para compensar el aumento de resistencia a la insulina. A continuación, los adipocitos secretan más ácidos grasos libres (AGL) y diversas citocinas inflamatorias, lo que deteriora gradualmente la función de las células- $\beta$ , lo que finalmente conduce a la aparición de la diabetes. Este proceso se conoce como "lipotoxicidad de células- $\beta$ " en este estado se induce el estrés oxidativo, lo que conduce a la reducción de la secreción de insulina (1-5). Además, la causa primaria de la diabetes tipo 2 no es necesariamente debido a la agravación de la resistencia a la insulina inducida por comer en exceso o la obesidad. Se ha pensado recientemente que la diabetes tipo 2 es fundamentalmente una enfermedad poligénica que implica una insuficiencia primaria de las células- $\beta$  (6).

Hace poco un nuevo concepto fue propuesto sobre la historia natural de la insuficiencia de las células- $\beta$ ; se plantea que la pérdida de la masa de células- $\beta$  es debido a una desdiferenciación de células- $\beta$ , más no debido a la muerte de células- $\beta$ . De hecho, los experimentos de linaje trazados muestran que  $\beta$ -células indiferenciadas se convierten en células progenitoras y posteriormente adoptan como destino las células- $\alpha$ . Estos resultados

muestran que el proceso de desdiferenciación de células-β juega un papel crucial en la historia natural de la insuficiencia de las células-β (7).

Otro factor importante involucrado en la diabetes es el estrés oxidativo, el cual se le ha encontrado implicado en el deterioro de función de las células-β. Se demostró que cuando derivados de líneas celulares de células-β o aislados de islotes de rata fueron expuestos a estrés oxidativo, se suprime tanto la actividad del promotor del gen de insulina, como la expresión del mRNA. La reducción de actividades de unión al DNA y/o de expresión de PDX-1 y MAFA por la exposición crónica a la alta glucosa puede impedirse mediante un tratamiento antioxidante. Estos resultados sugieren que la hiperglucemia crónica suprime la biosíntesis y secreción de insulina por el estrés oxidativo aumentando, acompañado de una reducción de expresión y/o actividades de unión al DNA de dos importantes factores de transcripción de páncreas PDX-1 y MAFA (8).

En conclusión en DM2 hay una reducción sustancial en la expresión y/o actividad de varios factores de transcripción del gen de insulina. Este proceso se conoce como toxicidad de la glucosa de las células-β, que se observa a menudo en condiciones diabéticas, sin embargo los mecanismos moleculares precisos no han sido bien elucidados (9).



# Los defectos genéticos de la célula-β pancreática

Varias formas de diabetes están asociadas con defectos monogenéticos en función de las células-β. Estas formas de diabetes se caracterizan frecuentemente por la aparición de hiperglucemia en una edad temprana (generalmente antes de la edad 25 años). Estas formas se conocen como diabetes tipo MODY y se caracterizan por la secreción de insulina deteriorada con defectos mínimos en la acción de la insulina. Estas formas se heredan con un patrón autosómico dominante. Anomalías en seis loci genéticos en diferentes cromosomas se han identificado hasta la fecha. La forma más común se asocia con mutaciones en el cromosoma 12 en un factor de transcripción hepático al cual se hace referencia como el factor nuclear de hepatocitos HNF-1α. Una segunda forma se asocia con mutaciones en el gen de la glucocinasa en el cromosoma 7p y resulta en una molécula de glucocinasa defectuosa. La glucocinasa convierte la glucosa en glucosa-6-fosfato, el metabolismo el cual, a su vez, estimula la secreción de insulina por parte la células-β. Por lo tanto, la glucocinasa sirve como el "sensor de glucosa" para las células-β. Debido a defectos en el gen de la glucocinasa, el aumento de los niveles plasmáticos de glucosa es necesario para obtener los niveles normales de secreción de insulina. Las formas menos comunes son el resultado de mutaciones en otros factores de transcripción, incluyendo HNF-4α, HNF-1β, el factor promotor de insulina (PDX-1), y NeuroD1 (10).

# Tejido pancreático y su similitud con el tejido neuronal

El tejido pancreático es un ensamble complejo de células que se ha estudiado ampliamente y muchos de sus factores de transcripción se han caracterizado y se han relacionado con procesos específicos para el desarrollo y mantenimiento del tejido. A menudo, las células pancreáticas, particularmente las células-β, se han contrastado contra las células de origen neural, tanto en el genotipo como en función (11) (12). Con frecuencia se ha

sugerido que hay programas de desarrollo ancestrales en común que pueden regir la diferenciación de las células de los islotes y las neuronas (13).

Varios factores de transcripción que son esenciales para la diferenciación de células-β también están involucrados en el programa de desarrollo neuronal. Por ejemplo, la expresión de Beta2/Neuro D es necesaria para la diferenciación terminal de todos los tipos de células endocrinas similares las requeridas para la diferenciación de las neuronas en el cerebro. También existen similitudes entre los islotes y las células neuronales en el nivel de la fisiología, como en su excitabilidad eléctrica y funciones de vesículas secretoras (14).

Se ha informado que mecanismos de silenciamiento equivalentes controlan un grupo de genes específicos de neuronas que existen tanto en las células-  $\beta$  pancreáticas como en células neuronales (11) . Aunque varios tejidos poseen numerosos factores de transcripción en común durante el desarrollo, el páncreas y el sistema nervioso se someten a múltiples procesos biológicos que implican la acción de factores de transcripción comunes que activan o reprimen genes que definen el tejido, tal es el caso de algunas moléculas como el glutamato que modula una amplia gama de procesos en el cerebro y también actúa como un mensajero intracelular en la regulación de la secreción de insulina de las células- $\beta$  (15), Beta2/NeuroD que es esencial para la diferenciación de las dendritas de células granulares (16) y ha demostrado inducir la diferenciación y la proliferación de las células pancreáticas (17) , y el péptido similar a glucagón-1 (GLP-1) que promueve la supervivencia celular en las células- $\beta$  y las neuronas (18).

## REST/NRSF y la represión transcripcional de genes pancreáticos

REST/NRSF (RE1 Silencing Transcription Factor) es un factor de transcripción bien estudiado, caracterizado como un miembro de la familia Gli-Kruppel de proteínas que poseen dominios dedos de zinc de unión a DNA. Su principal actividad se ha definido como un represor de los genes neuronales en células no neurales con la capacidad de unirse a sus genes blanco a través de un elemento de 21 pb llamado elemento RE1 (19) (20) (21). A su vez REST recluta múltiples cofactores incluyendo HDAC-1, HDAC-2 y mSin3A, así como el cofactor CoREST para reprimir la transcripción de genes blanco (22) (23) (24). Como se describe en numerosos informes, REST silencia un gran número de genes en las células neuronales y no neuronales (19) (25) (21) (26) (27). El elemento RE1 en el DNA al cual se une REST ha sido identificado en muchos genes que son marcadores específicos para células del linaje neuronal y neuroendocrino.

Gene	Species	Sequence	Location
Consensus		TTCAGCACCacGGACAGmgcC	
Pdx1	Human	GGCcT-t	Coding
	Mouse	GGAT <b>C-T</b> c <b>T</b> -t	
	Rat	GGAT <b>C</b> c <b>T</b> -t	
	Hamster	GGAT <b>C</b> c <b>T</b> -t	
Neurogenin3	Human	C <b>G</b> -A- <b>T</b> -g <b>T</b>	Intron
NeuroD/Beta2	Human	-A- <b>G</b> -Ttt	Coding
	Pig	-A- <b>G</b> tt	
	Mouse	-A- <b>G</b> tt	
	Rat	-A- <b>G</b> tt	
	Chicken	-A- <b>G</b> tt	
	Xenopus	-AT <b>G</b> -Ttt	
	Zebrafish	- A- <b>G</b> -T <b>A</b> -tt-T	
Hes I	Human	-CGaGa-gT	5'UTR
	Mouse	-CGaGa-gT	
	Rat	-CGaGa-gT	
	Human	-G <b>T</b> Gca- <b>A</b> T <b>A</b> T	Coding
	Mouse	-G <b>T</b> Gca- <b>A</b> T <b>A</b>	_
	Rat	-G <b>T</b> Gca- <b>A</b> T <b>A</b>	
p48	Mouse	GG <b>C</b> t	Promoter
Pax4	Mouse	a-A	Promote

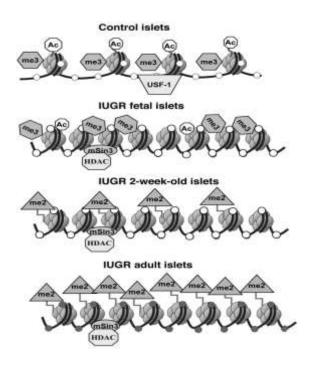
Al realizarse una búsqueda bioinformática dirigida a genes que pudieran tener elementos RE1 se encontró que algunos de estos genes que podrían estar siendo regulados por REST son de origen pancreático y juegan un papel importante en la homeostasis de las células productoras de insulina. (14).

Posteriormente se comprobó efectivamente que algunos genes pancreáticos como los genes IB1 (28), PAX 4 (14) y Connexina 36 (CX36) son regulados negativamente por REST (29).

## Importancia del factor de transcripción del gen de insulina PDX-1

PDX-1 es un factor de transcripción expresado principalmente en las células progenitoras en el páncreas primitivo, así como en células que se acercan a una etapa adulta, en esta etapa PDX-1 disminuye, pero vuelve a aparecer más adelante casi exclusivamente en las células- $\beta$  (30). Este factor juega un papel importante en el desarrollo del páncreas y se considera que es crucial para la función de la célula- $\beta$  madura (31) (32) (33). Muchos estudios han informado de que actúa a nivel de la transcripción en la regulación de genes específicos de células- $\beta$  numerosa como la insulina, la glucocinasa, IAPP y GLUT-2 (34) (35).

La Actividad de PDX1 es fundamental para la regulación de un número de genes glucoreguladores dentro de las células-β, incluyendo la insulina (16), el polipéptido amiloide de los islotes pancreáticos (IAPP) (17)(18),el transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2) (19)], y glucocinasa (20). Las mutaciones en este factor de transcripción crítico predisponen al desarrollo de la diabetes tipo 2, con una rara ocurrencia natural de mutación, el desplazamiento del marco de lectura resulta en agenesia de páncreas (21), y la forma heterocigótica asociada con el desarrollo de la diabetes tipo MODY (22).



Se ha encontrado que el gen *pdx-1* contienen varios sitios de regulación dentro de un área delimitada circunscrita a 4.5 kb upstream del promotor (36), y tres pequeñas secuencias designadas como PH1, PH2 PH3 y que están altamente conservadas en los genes humanos y de roedores que se han mostrado indispensables para conducir a la expresión de PDX-1 (37). Esta región ha demostrado ser suficiente para el desarrollo y la expresión apropiada y específica de los islotes, además de encontrarse conservada filogenéticamente en los mamíferos (36). Esta región contiene además sitios de unión para factores de transcripción específicos de páncreas, como Foxa2, Ptf1a, HNF1α, AFP, HNF6, Pax6, SP1, SP3 y para el mismo PDX-1 (38) (39)(40). USF-1 también se ha descrito como un fuerte activador del promotor de PDX-1 (41).

Un trabajo publicado muestra la implicación de PDX-1 en el desarrollo de páncreas, incluyendo los resultados de la condición fetal de retraso del crecimiento intrauterino del páncreas (42). Bajo esta condición se ha encontrado una asociación significativa del promotor de *pdx-1* con la histona

deacetilasa 1 (HDAC1) y el correpresor mSin3A, es importante señalar que ambos cofactores son reclutados por REST para la represión transcripcional. Esta interacción también mostró la pérdida de USF-1 de unión en el promotor proximal de *pdx-1* (43).

# Región promotora de *pdx-1* y su control transcripcional

Los eventos que regulan la expresión del gen pdx-1 aún se siguen delineando. Un análisis de pdx-1 utilizando construcciones de gen reportero en ratones transgénicos ha indicado que un fragmento de 6.5 kb del gen pdx-1 de rata (23) y un fragmento que cubre la región -4.5 a 8.2 kb (24) del gen pdx-1 de ratón contiene todos los elementos regulatorios necesarios para la transcripción directa. Un análisis de una secuencia potenciadora situada entre -6200 y -5670 pb , que es esencial para la regulación específica de tejido del gen pdx-1 en rata, ha indicado que los factores de transcripción HNF-3 $\beta$  (25) y NeuroD/ $\beta$ 2 (26) inducen la expresión del gen pdx-1 en células de los islotes. Esta región también se ve influida por los glucocorticoides, que reducen la expresión del gen pdx-1 al interferir con la actividad de HNF-3 $\beta$  (27). La expresión del gen pdx-1 de rata también depende de un elemento caja-E proximal al que se une el factor de transcripción ubicuo USF-1.

El objetivo de este estudio es saber si REST se une a sitios específicos ubicados en las regiones regulatoria y codificante de *pdx-1*. Resultados previos de nuestro grupo de investigación muestran la expresión de NRSF/REST y varias de sus isoformas en diversas líneas celulares, incluidas la línea celular de insulinoma de rata RINm5F y la línea celular HeLa de células inmortalizadas de cáncer cervicouterino (Torres C., tesis de maestría 2004).

Debido a que REST es un represor transcripcional de genes neuronales en células no neuronales, elegimos como modelo de estudio la línea celular HeLa para realizar nuestros ensayos, al ser una línea celular no neuronal,

mostrar una gran expresión de este represor en los ensayos de Western Blot y adicionalmente por ser una línea celular no productora de insulina en la cual REST pudiera estar unido a sitios RE1 de *pdx-1* y estar reprimiendo su transcripción.

## MatInspector: Búsqueda de sitios de unión a factores de transcripción

MatInspector de Genomatix es una herramienta de software que utiliza una amplia biblioteca de descripciones de matriz para buscar en secuencias de DNA sitios candidatos de unión a factores de transcripción. Está herramienta asigna una calificación de calidad para sitios candidatos y por lo tanto permite un filtrado y la selección de dichos sitios.

Esta herramienta la emplearemos para buscar sitios RE1-*like* dentro de la región regulatoria (-4.5 kb) y codificante de *pdx-1*, seleccionando para nuestros ensayos sólo aquellas secuencias que tengan un valor de score alto (Matrix sim.) y que conserven la mayoría de las bases importantes para la unión a REST.

Check transcription factor							
Detailed Family Information		Detailed Matrix Information		Matrix sim. 👙			Sequence
2		~		~		~	
AP4	and related proteins	Acti	vator protein 4		0.954	cgco	ccAGCTgetetet
Myo	blast determining factors	Myo (myf	genic regulatory factor MyoD 3)		0.930	agag	gagCAGCtggggcg
	t subfamily of class B bHLH scription factors	subf	xis (TCF15), member of the Twist amily of Class B bHLH factors, s heterodimers with E12		0.870	caga	agAGCAgctgggggggct
Myo	blast determining factors	Tran	scription factor E2a (E12/E47)		0.997	ccga	cccCAGCtgctctc

El análisis con MatInspector nos proporciona además información detallada acerca de la matriz contra la que se compara, la similitud con la matriz, la secuencia señalando las bases importantes para la unión al factor de transcripción, su posición, sentido, etc. En la región de regulación transcripcional del gen que codifica para el receptor a canal de sodio dependiente de voltaje tipo II se encuentra un sitio RE1 (RE1-NavCh), el cual

se ha comprobado es un sitio al cual se une REST y regula de manera negativa su transcripción (44). Dicho sitio lo emplearemos como un control positivo para compararlo en contra de nuestros sitios problemas tanto en los ensayos de retardamiento como en el ensayo de la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

# Justificación

Debido a que la región regulatoria y codificante del gen *pdx-1* puede contener elementos RE1-*like*, es probable que REST regule la transcripción de este gen y de esta manera estar participando indirectamente en la regulación de la expresión de la insulina.

# **Hipótesis**

La región regulatoria y codificante de *pdx-1* posee elementos RE1-*like* a los cuales REST podría unirse y de esta manera regular la transcripción del gen.

# Objetivo general

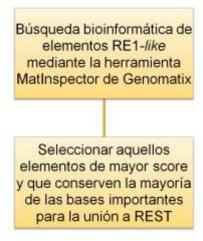
Determinar si REST es capaz de interaccionar con elementos RE1-like del gen pdx-1.

# **Objetivos Particulares**

- 1. Realizar el análisis bioinformático para determinar posibles elementos RE1-*like* dentro de la región regulatoria y codificante del gen *pdx-1*.
- 2. Evaluar la unión específica *in vitro* de REST a los elementos RE1-*like*, dentro de la región regulatoria y codificante del gen *pdx-1*.

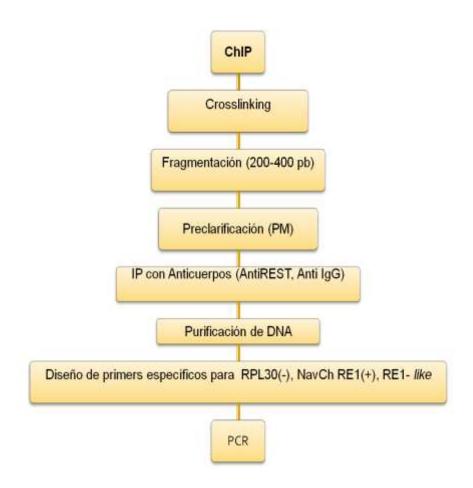
# Estrategia Experimental

# Objetivo particular 1



# Objetivo particular 2





# **MATERIAL Y METODOS**

# Cultivo Celular y Extracción de Proteína Nuclear

Se cultivaron células HeLa entre 12 y 16 horas después de un pasaje celular, hasta que alcanzaron una confluencia del 80% aproximadamente. Se les retiró el medio, se lavaron dos veces con 3 mL de PBS 1X y se descartó el sobrenadante. Posteriormente con un scrapper se procedió a cosechar las células. Se colocaron 1x10<sup>7</sup> células en un tubo eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se lavó la muestra dos veces con PBS 1X y se descartó el sobrenadante. A la pastilla resultante se le adicionaron 400 uL de Buffer A, se resuspendió 15 veces por pipeteo y se incubó la muestra por 10 min en hielo, a continuación se agregaron 25 uL de NP40 10% a la muestra y se mezcló 30 s en vórtex. La muestra se centrifugó a 14 000 rpm por un minuto a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Nota: este sobrenadante puede servir como extracto de proteínas citoplasmáticas, por lo tanto, se puede recuperar, pasar a un tubo eppendorf nuevo y mantener en hielo hasta su uso. Se le agregaron 80 ul de Buffer B a la pastilla y se resuspendió por pipeteo, posteriormente se incubó la muestra por 90 min en el cuarto frío (4°C) en agitación vigorosa con vórtex. Finalmente se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante en tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo.

# Ensayo de retardamiento

Los ensayos de retardamiento se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos en (45) con las siguientes modificaciones para su optimización en extractos de proteína nuclear obtenidos de células HeLa. El Buffer de unión utilizado se describe en el anexo B. Se agregaron 4 uL de buffer de unión a un tubo eppendorf de 1.5 mL por cada sonda de muestra (en total para cada sonda fueron 10 muestras). Se añadieron 2 uL de extracto de proteína nuclear (a diferentes concentraciones) para cada tubo de muestra y se

incubaron las muestras por 15 min a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 2 uL de cada una de las sondas (0.1 uM) tanto el control positivo (NavCh RE1), así como las cinco sondas problema (RE1-1, RE1-2, RE1-3, RE1-4, RE1-5) para cada uno de los tubos de muestra, se resuspendió por pipeteo y se incubaron las muestras por 1 h a temperatura ambiente. Al final de la reacción se añadieron a cada tubo de muestra 2 uL de ficoll 3.5% se resuspendió por pipeteo la mezcla, se cargaron las muestras en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 8% (previamente precorrido 10 min a 100 Volts), y se corrió por 1 h y 20 min a 100 Volts en buffer TBE 0.5x.

## Ensayos de competencias

Se agregaron 4 uL de buffer de unión para ensayos de competencia (ver anexo B) a cada tubo de muestra (en total para cada sonda se utilizaron 4 tubos). Posteriormente se añadieron 2 uL de extracto de proteína nuclear (3 ug/uL) a los tubos de muestra 2, 3, 4 y se incubaron las muestras por 15 min a temperatura ambiente. Se agregaron 2 uL del oligonucléotido heterólogo AP1 (1.5 uM) para el tubo 2 y 2 uL del oligonucléotido específico RE1-NavCh (1.5 uM) para el tubo 3, así como 4 y 2 uL de PBS (1x) al tubo 1 y 2 respectivamente y se dejaron incubando los tubos por 1 h a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 2 uL de cada una de las sondas (0.1 uM) tanto el control positivo (RE1-NavCh), así como las cinco sondas problema (RE1-1, RE1-2, RE1-3, RE1-4, RE1-5) para cada uno de los tubos de muestra y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron a cada tubo de muestra 2 uL de ficoll 3.5% se resuspendieron por pipeteo y se cargaron las muestras en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 8% (previamente pre-corrido 10 minutos a 100 Volts), y se corrió por 1 hora y 30 minutos a 100 Volts en TBE 0.5x.

# Ensayos de super-retardamiento

Se agregaron 2 uL de buffer de unión para super-retardamiento a cada tubo de muestra (en total para cada sonda se utilizaron 3 tubos), posteriormente se añadieron 2 uL de extracto de proteína nuclear (3 ug/uL) para los tubos 2 y 3 y se incubaron las muestras por 15 min a temperatura ambiente. A continuación se adicionaron 12.5 uL del anticuerpo específico NRSF /H-190 (0.2 ug/uL) al tubo 2, 1 uL del anticuerpo inespecífico anti-Hemaglutinina (2.5 ug/uL) al tubo 3, se ajustan los volúmenes de los otros dos tubos a 16.5 uL utilizando PBS (1x) y se dejaron incubar por 2 h a temperatura ambiente. Finalmente se agregan 2 uL de cada una de las sondas (0.1 uM) tanto el control positivo (RE1-NavCh), así como las cinco sondas problema (RE1-1, RE1-2, RE1-3, RE1-4, RE1-5) para cada uno de 3 tubos de muestra por ensayo y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se adicionó a cada tubo de muestra 1 uL de ficoll al 5% se resuspendieron por pipeteo y se cargaron las muestras en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 8% (previamente pre-corrido 10 minutos a 100 Volts), v se corrió por 2 h y 30 minutos a 100 Volts en TBE 0.25x, realizando un cambio de buffer a la hora y 15 minutos de corrida.

# Diseño, síntesis e hibridación sondas fluorescentes LUEGO

Se diseñaron y mandaron sintetizar con (SIGMA ALDRICH, México) las secuencias a emplearse en los ensayos de retardamiento. Un control positivo RE1-NavCh de unión a REST comprobada y los sitios RE1 problema (resaltados en amarillo), los cuales complementan con 6 bases hacia la región 5' y 9 bases a la región 3' pertenecientes a la secuencia original en el oligo sentido. En el oligo antisentido se tiene la secuencia complementaria al oligo sentido, además de la secuencia complementaria a la secuencia LUEGO (resaltada en rojo) para poder hibridar cada par de oligos a su vez con la secuencia luego formando una sonda prueba que contiene los 3 oligos unidos.

LUEGO	5'-GTGCCCTGGTCTGG-3'
F-RE1-1	5'-ACAGGAGCTAGATCCACGGGGAAGTACAACACACGT-3'
R-RE1-1	3'-CACGGGACCAGACCTGTCCTCGATCTAGGTGCCCCTTCATGTTGTGTGCA-5'
F-RE1-2	5'-ATCCATGGAATACCCCGGCGATCCCCTCCTCT-3'
R-RE1-2	3'-CACGGGACCAGACCTAGGGTACCTTATGGGGGGCCGCTAGGGGAGGAGGAGA-5'
F-RE1-3	5'-ACAGAGATTAGGTGCCCGGGCCCCACGGCCTTTCAT -3'
R-RE1-3	3'- CACGGGACCAGACCTGTCTCTAATCCACGGGCCCGGGGTGCCGGAAAGTA-5'
F-RE1-4	5'-ACTTGTTTCTGCACCACCTCCTCCTCGTAGGT-3'
R-RE1-4	3'-CACGGGACCAGACCTGAACAAAGACGTGGTGATGGTGGAGGAGGCATCCA-5'
F-RE1-5	5'-ATCAAGTTCAACATGACAGCCAGCTCCACCCGGCGT-3'
R-RE1-5	3'-CACGGGACCAGACCTAGTTCAAGTTGTACTGTCGGTCGAGGTGGGCCGCA-5'
F-NaV1.2	5'- ATGGTTCTCAGCACCATGGACAGCGTTACTGCAATT-3'
R-NaV1.2	3'-CACGGGACCAGACCTACCAAGAGTCGTGGTACCTGTCGCAATGACGTTAA-5'

La hibridación de los oligonucleótidos se llevó a cabo en el termociclador OneStep (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95	2 min	-
Hibridación	70	-	520
i nortadolori	↓0.1 °C/5 min		
	18	8	-

# Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) modificado del protocolo HIGHCELL CHIP KIT MANUAL de DIAGENODE.

## <u>Fijación</u>

Se cultivaron células HeLa entre 12 y 16 horas después de un pasaje celular, hasta que alcanzaron una confluencia del 80% aproximadamente. Se les retiro el medio, se lavaron dos veces con 3 mL de PBS 1X y se descartó el sobrenadante. A continuación se utilizó un scrapper para cosechar dichas células. Se colocaron 5x10<sup>6</sup> células tubos eppendorf de 1.5 mL (por cada ChIP se colocaron 2 tubos distintos con los cuales se realizará la inmunoprecipitación con un anticuerpo no relacionado, con un anticuerpo

especifico Anti-REST) posteriormente se realizan dos lavados con PBS 1X y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendieron las células en 500 uL de PBS 1X. A continuación para llevar a cabo el crosslinking se adicionaron 13.5 uL de formaldehido (37%) a cada muestra. *La concentración final de formaldehido que utilizo fue del 1%.* Se mezcló suavemente en vórtex y se incubaron las muestras 8 min a temperatura ambiente (TA) en agitación constante. Para finalizar el crosslinking se adicionaron 57 uL de glicina‡ (1.25 M) a la muestra. *La concentración final de glicina que se utilizó fue de 150 mM*. Se mezcló suavemente en vórtex y se incubaron las muestras 5 minutos a TA en agitación constante. Se *trabajó en hielo después de este punto*. Se centrifugaron las células a 300 x g por 5 min a 4 °C y se les retiró el sobrenadante.

## Lisis celular

Se lavaron dos veces las células fijadas con 1 mL de PBS 1X frío y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de Buffer de Lisis L1<sup>‡</sup> frío a las células y se resuspendieron 15 veces por pipeteo. Posteriormente se Incubaron por 10 min a 4 °C en agitación suave. Se centrifugaron a 500 x g por 5 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante manteniendo íntegra la pastilla, a continuación se agregó 1 mL de Buffer de Lisis L2<sup>‡</sup> frío a la muestra y se resuspendió 15 veces por pipeteo. Se incubaron las muestras por 10 min a 4 °C en agitación suave, y se centrifugaron a 500 x g por 5 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante manteniendo íntegra la pastilla. Por otra parte se preparó el Buffer de Fragmentación S1<sup>‡</sup> completo: 1 uL de Inhibidores de Proteasas<sup>‡</sup> (200 x) por cada 200 uL de Buffer de Fragmentación S1<sup>‡</sup> (mantener el buffer a TA hasta su uso), y se agregaron 200 uL de Buffer de Fragmentación S1<sup>‡</sup> completo. S1<sup>‡</sup> completo se incubó por 10 min a 4 °C.

## Fragmentación de la cromatina

Se llevó a cabo la fragmentación de la cromatina en el equipo Bioruptor® con las siguientes condiciones para obtener fragmentos de aproximadamente 400 pb: tres corridas de ocho ciclos cada una, y cada ciclo de 15 s ON /90 s OFF. Se resuspende en vórtex y se centrifugar 8 s a máxima velocidad después de cada corrida. *En este punto se puede analizar la fragmentación de la cromatina*.

Se preparó el buffer ChIP C1<sup>‡</sup> con Inhibidores de Proteasas<sup>‡</sup>: 5 uL de Inhibidores de Proteasas<sup>‡</sup> por cada mL de Buffer ChIP C1<sup>‡</sup>. Se agregaron 800 uL de Buffer ChIP C1<sup>‡</sup> preparado a los 200 uL de cromatina fragmentada y se centrifugó la cromatina a 13 000 rpm por 10 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y mantener a 4 °C.

## Pre-clarificación de la cromatina

Se agregaron 28 uL de Perlas Magnéticas cubiertas de Proteína G‡ a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron 100 uL de Buffer ChIP C1‡ frío y se resuspendió. Se centrifugó a máxima velocidad por 10 s a 4 °C. Se incubaron por un minuto el tubo en el rack magnético‡ previamente enfriado y se retiró el sobrenadante. Se mantuvieron íntegras las perlas. Posteriormente se lavaron dos veces con 100 uL de PBS 1X frío: se resuspendieron las perlas, se centrifugó a máxima velocidad por 10 s a 4 °C, se incubaron por un minuto el tubo en el rack magnético‡ frío y se les retiró el sobrenadante, manteniendo íntegras la perlas. A continuación se resuspendieron las perlas con 100 uL de PBS 1X frío, y transfirieron al tubo que contiene la muestra de cromatina fragmentada y se incubaron 12 h a 4 °C en agitación. A continuación se centrifugó a máxima velocidad por 10 s a 4 °C. Se Incubó por un minuto el tubo en el rack magnético‡ frío y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo, el proceso de pre-clarificación se repitió una vez más.

# <u>Pre-tratamiento (bloqueo) de perlas magnéticas cubiertas con proteína G\*</u> <a href="mailto:para">para ChIP</a>

Se agregaron 28 uL de Perlas Magnéticas cubiertas de Proteína G‡ a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se resuspendieron con 100 uL de Buffer ChIP C1‡ frío. Se centrifugó a máxima velocidad por 10 s a 4 °C. Se Incubó por un minuto el tubo en el rack magnético‡ previamente enfriado y se retiró el sobrenadante. Se mantuvieron íntegras las perlas y se lavaron dos veces con PBS 1X frío: Para los lavados se resuspendieron las perlas, se centrifugó a máxima velocidad por 10 s a 4 °C, se incubaron por un minuto el tubo en el rack magnético‡ frío y se les retiró el sobrenadante, manteniendo las perlas íntegras. Después se resuspendieron las perlas en 100 uL de PBS 1X frío, y se agrego lo siguiente 60 uL de DNA de esperma de salmón sonicado (DNA sss) (10 mg/mL) y 30 uL de BSA libre de IgG (20 mg/mL) (SIGMA ALDRICH México). Se incubaron los tubos 8 h a 4 °C en agitación constante. Posteriormente se agregaron 6.3 ug de anticuerpo no relacionado (control negativo: IgG de ratón‡) o anticuerpo contra REST (anti-REST, de Millipore policlonal anti-conejo) y se incubaron 12 h a 4 °C en agitación constante.

#### <u>Inmunoprecipitación Magnética</u>

Se transfirieron 950 uL de cromatina pre-clarificada al tubo con las perlas magnéticas cubiertas de proteína G pre-tratadas\* y se incubaron 12 h a 4 °C en agitación. Se transfirieron también 9.5 uL de cromatina pre-clarificada a un tubo eppendorf nuevo y se almacenó a -20 °C hasta su uso; este es el *input*, que corresponde a un 1% de la cromatina total. A continuación se centrifugó a máxima velocidad por 10 s a 4 °C. Se incubaron por un minuto el tubo en el rack magnético‡ frío y se les retiró el sobrenadante, manteniendo íntegras las perlas. Se lavó tres veces con 1 mL de Buffer ChIP C1‡ frío. En cada lavado se agregó el Buffer, se resuspendió por pipeteo moderado, se incubó 5 min a 4 °C en agitación, se centrifugó a máxima velocidad por 8 s a 4 °C, se colocó el tubo en el rack magnético‡ frío y se descartó sobrenadante, manteniendo íntegras las perlas. Se lavaron una vez con 1 mL

de Buffer W1<sup>‡</sup> frío. Se agregó el Buffer, se resuspendió por pipeteo moderado, se incubó 5 min a 4 °C en agitación, se centrifugó a máxima velocidad por 8 s a 4 °C, se colocó el tubo en el rack magnético<sup>‡</sup> frío y se descartó sobrenadante. Se mantuvieron íntegras las perlas.

## Aislamiento de DNA a partir de cromatina

Se preparó el Buffer DIB‡ completo: Se agregaron 0.5uL de Proteinasa K‡ por cada 50uL de Buffer DIB‡. Se escala la preparación de este Buffer con relación a que 50 uL de este Buffer son necesarios por cada IP o *input*. A continuación se resuspendieron las perlas y el *input* con 50 uL de Buffer DIB‡ completo, se transfirieron a un tubo nuevo y se incubaron 15 min a 55 °C a 500 rpm. Las muestras se Incubaron por 15 min en ebullición, y se centrifugó a máxima velocidad por 10 s a TA. Se incubó por un minuto el tubo en el rack magnético‡ frío y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Finalmente se cuantificó el DNA obtenido en el equipo Nanodrop, tanto de los tubos con los IPs como del *input*. El símbolo (‡) significa que el reactivo pertenece al kit HIGHCELL CHIP KIT MANUAL de DIAGENODE.

Se realizó la cuantificación de DNA purificado a partir del ensayo ChIP en el equipo Nanodrop, tanto de las inmunoprecipitaciones como del input 1%, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla al final todas las muestras de DNA se ajustaron a 10 ng/uL, para realizar las reacciones de PCR.

Muestra	ng/uL
IP IgG (ctl -)	16.4
IP REST (ctl +)	10.9
Input 1%	115.1

# Diseño de primers para ensayos ChIP

Se diseñaron mediante la herramienta informática Mac Vector y se enviaron sintetizar a SIGMA-ALDRICH, 7 pares de primers para los ensayos de PCR. Dichos pares de primers flanquean las 5 secuencias problema (RE1-like), un control positivo que es una secuencia de unión a REST conocida (RE1-NavCh) y un control negativo que es una secuencia ubicada en la región regulatoria de un gen constitutivo que codifica para una proteína ribosomal (RPL30), que no requiere de factores de transcripción para su expresión (se añadió una F para los primers forward y una R para los reverse). Adicionalmente se muestra en la última columna de la tabla el tamaño de amplicón que genera para cada par de primers. Al diseñar los primers se consideró mantenernos en un rango de entre 150 y 450 pb, que es lo recomendado para hacer más específico nuestro ensayo, aunque para RE1-5 no fue posible respetar ese rango debido a la dificultad de generar primers para ese sitio.

Oligonucleótido	Secuencia	Amplicón
F-NaV1.2	167 pb	
R-NaV1.2	5'-GGATAGGCATTTTTTTTCTCCCAC-3'	
F-RPL30	5'-CTCCCAAAGGCTATTCAGTAATGG-3'	363 pb
R-RPL30	5'-GCTAAAAGGTGCTCGCTTCAGC-3'	
F- RE1-1	5'-GCTAGATCCACGGGGAAGTAC-3'	188 pb
R-RE1-1	5'-CTTTGCTCCCTGGGTCCCTTC-3'	
F- RE1-2	5'-GGAATACCCCGGCGATCCCC-3'	147 pb
R- RE1-2	5'-AAATATTAAATGGAAGCAAATG-3'	
F- RE1-3	5'-ATTAGGTGCCCGGGCCCCACG-3'	448 pb
R- RE1-3	5'-CGTTGTTTAGGAAAGGCGGAG-3'	
F- RE1-4	5'-TTCTGCACCACTACCACCTCC-3'	386 pb
R- RE1-4	5'-TTAAACGAAATAGCAGATAAT- 3'	
F- RE1-5	5'-GGAGCTGGCTGTCATGTTGAA-3'	648 pb
R- RE1-5	5'-TACA GCACTCCACCTTGGGAC-3'	



# Ensayos de amplificación para ensayos de cromatina

La siguiente tabla muestra las cantidades y los componentes empleadas para cada una de las reacciones de PCR (v=25 uL).

Reactivo	Concentración	Concentración	Volumen
	inicial	final	requerido uL
Agua	-	-	7.5
Primer Forward	30uM	0.6uM	0.5
Primer Reverse	30uM	0.6uM	0.5
JumpStart <sup>™</sup> TaqReadyMix <sup>™</sup>	-	-	12.5
Templado	10 ng/uL	50 ng	5 uL

# Amplificación por PCR para los RE1 y RPL30

La siguiente tabla muestra las condiciones a emplearse en el termociclador para la amplificación con cada par de primers.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	2 min	-
Desnaturalización	94	30 s	
Hibridación	T de alineación (TA*)	30 s	35
Elongación	72	1 min	
Elongación final	72	5 min	-



NOTA: TA\* es la temperatura de alineación para cada uno de los pares de primers a evaluar en las reacciones de PCR.

# Temperaturas de alineación (TA)

Primers flanqueantes	TA* (°C)
RE1-NavCh	52.4
RPL30	58.2
RE1-1	52.7
RE1-2	58.2
RE1-3	59.7
RE1-4	57.1
RE1-5	59.2



## **RESULTADOS**

## Análisis bioinformático con Genomatix MatInspector

Una secuencia de 6700 pb del gen de *pdx-1* fue analizada con el software Genomatix MatInspector, obteniendo secuencias candidatas a sitios de unión al factor de transcripción REST/NRSF, los sitios se ubican hacia regiones upstream del promotor e interesantemente también en la región codificante del gen (ver tabla 1). Los motifs muestran fuerte similitud con la secuencia consenso del elemento RE1, a estos elementos los llamamos RE1-*like* (Tabla 1). A partir de este primer análisis de la región regulatoria y codificante del gen *pdx-1* seleccionamos 5 candidatos de secuencias RE1-*like* para continuar nuestros ensayos de la posible unión del factor de transcripción REST. Para ello planteamos en nuestra estrategia experimental ensayos de retardamiento en gel, (electrophoretic mobility shift assay, *EMSA*).

#### Sistema de sondas fluorescentes LUEGO.

Para los ensayos de retardamiento se empleó un sistema denominado LUEGO el cual consta de una secuencia nucleotídica universal (LUEGO) acoplada a un fluoróforo (Cy5) en sus dos extremos 5' y 3'. Al ser una secuencia universal marcada solo se necesita diseñar la secuencia que contiene el sitio de unión a la proteína y un oligo complementario a dicho sitio, pero que al mismo tiempo sea complementario a LUEGO de tal manera que puedan hibridar las 3 secuencias formando así lo que denominaremos sonda. En primer instancia se determinaron las mejores condiciones de alineamiento para generar las sondas LUEGO, y aunque los periodos de incubación y alineamiento incluyen rampas de descenso de temperatura de 0.1 °C cada 5 minutos e incubaciones por 48 horas, se obtuvieron las sondas marcadas de manera específica, cabe mencionar que estas sondas LUEGO,



son bastante estables y podemos trabajar con ellas sin degradación por más de 6 meses, adicionalmente no existe el riesgo de trabajar con radioactividad (BioTechniques, Vol. 51, No. 4, Oct 2011, pp. 267–269). En la figura 1, se muestran las sondas LUEGO generadas para cada uno de los elementos RE1-like.

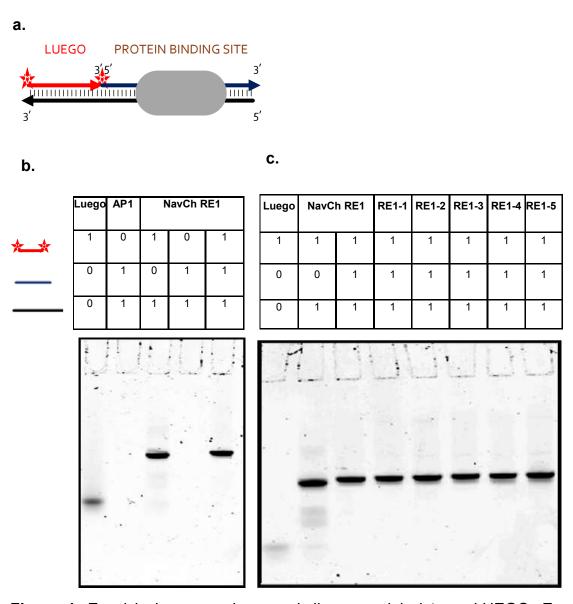
Una vez que generamos nuestras sondas fluorescentes marcada en los extremos 5' y 3' terminal con Cy5, codificando para cada uno de los elementos RE1-*like*, empezamos a determinar la posible unión del factor de transcripción REST.

			Ubicación en
Sitio	Secuencia	Similitud	pdx-1
RE1-			
CONSENSO	5'-ttC <b>AG</b> C <b>ACCac<mark>GG</mark>AcAG</b> mgcC-3'	-	-
RE1-1	5'-GCT <b>AG</b> AT <b>CC</b> AC <mark>GG</mark> GG <b>A</b> AGTA <mark>C</mark> -3'	71.42%	-2535
RE1-2	5'-GGA <b>A</b> TAC <b>CC</b> CC <mark>GG</mark> CG <b>A</b> TCCCC-3'	66.66%	-2312
RE1-3	5'-ATT <b>AG</b> GTG <b>C</b> CC <mark>GG</mark> GCCCCACG-3'	61.90%	-1754
RE1-4	5'-TTCT <b>G</b> CAC <b>C</b> AC <mark>TA</mark> CC <b>A</b> CCTCC-3'	85.71%	+3269
RE1-5	3'-TTC <b>A</b> ACATGAC <mark>AG</mark> CC <b>AG</b> CTC-5'	80.95%	+4350

**Tabla 1.** En la tabla se muestran las cinco secuencias RE1-like seleccionadas las cuales se obtuvieron mediante la herramienta informática MatInspector de Genomatix, así como la secuencia consenso RE1 de unión a REST. Tanto en la secuencia consenso como en las secuencias problema, se resaltan en negritas aquellas bases consideradas importantes para la unión de REST. Resaltadas en amarillo se muestran dos guaninas consideradas por algunos autores como indispensables para la unión a



REST. En las secuencias problema los matchs adicionales con la secuencia consenso están remarcados en rojo. Al lado derecho de las secuencias se muestra el porcentaje de similitud y en el siguiente recuadro la distancia en pb del sitio de inicio de la transcripción del gen pdx-1.



**Figura 1.** En el inciso a se observa el diagrama del sistema LUEGO. En ambos incisos b y c se observa el corrimiento de las combinaciones entre los 3 oligos para formar las sondas control en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 10% durante 40 min. Todas las imágenes de este tipo de ensayos se



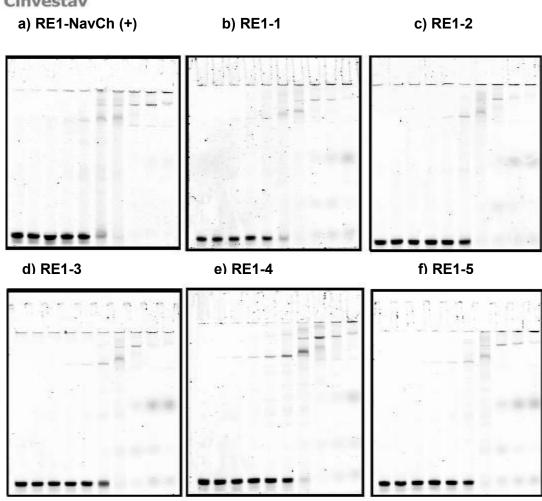
obtuvieron mediante el escáner con detección de fluorescencia Thypoon 9410 de Amersham Biosciences®.

## Ensayos de retardamiento y competencias.

En la figura 2 se muestran los ensayos de unión utilizando cada uno de los elementos RE1-like, con diferentes concentraciones de proteína nuclear, obtenida de células HeLa, la razón de utilizar esta línea celular es porque expresa en grandes cantidades el factor de transcripción REST. Para estos ensayos primero determinamos la concentración adecuada de proteína nuclear capaz de formar un complejo que pudiera ser retardado en los geles nativos; las cantidades fueron las siguientes carriles: 1= 0 ug/uL, 2= 0.13 ug/uL, 3= 0.25 ug/uL, 4= 0.51 ug/uL, 5= 1.03 ug/uL, 6= 2.06 ug/uL, 7= 4.12 ug/uL, 8= 8.25 ug/uL, 9= 16.5 ug/uL, 10= 33ug/uL. El retardamiento se observa en todos los elementos RE1-like, incluyendo nuestro control positivo correspondiente al elemento RE1 del canal de sodio dependiente de voltaje (RE1-NavCh) (figura 2-a). Cabe mencionar que en el caso del elemento RE1-4 like, el complejo formado es más claro y abundante (figura 2-e).

Para determinar si este complejo de retardamiento estaba formado por el factor de transcripción REST unido a las secuencias RE1-like, se procedió a realizar ensayos de competencia, utilizando para ello una secuencia blanco específica del factor de transcripción REST, en este caso es la secuencia RE1-NavCh, en la cual se ha demostrado ampliamente la unión a REST. Como competidor inespecífico utilizamos una secuencia heteróloga que une otro factor de transcripción diferente a REST, en este caso une al factor de transcripción AP1. De tal forma que lo que esperamos en los ensayos de competencia es que al adicionar la sonda RE1-NavCh no fluorescente, compita con las sondas RE1-likes fluorescentes, y no se formen o disminuyan los complejos retardados.





**Figura 2.** En el inciso a se muestra el patrón de bandas de retardamiento para la sonda control positivo (RE1-NavCh), cuando esta se hace interactuar con concentraciones crecientes de extracto de proteína nuclear de células HeLa, en cada uno de los carriles (1= 0 ug/uL, 2= 0.13 ug/uL, 3= 0.25 ug/uL, 4= 0.51 ug/uL, 5= 1.03 ug/uL, 6= 2.06 ug/uL, 7= 4.12 ug/uL, 8= 8.25 ug/uL, 9= 16.5 ug/uL, 10= 33 ug/uL ). En los incisos b, c, e, y f se realizó el mismo experimento para las distintas sondas problema respectivamente (RE1-1, RE1-2 RE1-3 RE1-4 RE1-5) observándose un patrón de bandas similar con respecto al del control positivo. El corrimiento fue en un gel acrilamida-bisacrilamida al 8% durante 1 hora 20 min.



En la figura 3 se observan los resultados de estas competencias con cada uno de los elementos RE1-like, competidos con la sonda RE1-NavCh y con la sonda heteróloga AP1. Los resultados como esperábamos muestran una competencia con la sonda homóloga del canal de sodio dependiente de voltaje (RE1-NavCh), Sin embargo las secuencias RE1-like 4 y 5 que se encuentran ubicadas en las zonas codificantes de pdx-1, muestran un menor grado de competencia. Es difícil en este punto determinar por qué compiten menos con la sonda homóloga, y sólo podríamos especular que estos elementos tienen mayor afinidad por REST y por ello es difícil que la sonda homóloga no fluorescente, le pueda quitar la proteína unida, o bien que adicional a REST existe otra proteína que le dé mayor estabilidad a estos complejos. Los porcentajes de competencia se resumen en la tabla 2. Un dato relevante en los resultados con las secuencias RE1-like 4 y 5 es que estas secuencias carecen de las bases contiguas GG (posición 12 y 13 en la secuencia de 21 pb consenso del elemento RE1) en su lugar tienen las bases TA y AG (ver tabla 1). En ese sentido los resultados sugieren mayor afinidad de la proteína por el elemento RE1-4 y 5 que por la secuencia RE1-NavCh, lo cual sugiere que estas secuencias podrían jugar un papel regulatorio más importante que las secuencias RE1-like ubicadas en la región upstream de pdx-1. Adicionalmente plantean la necesidad de estudiar en mayor detalle, la unión del factor REST a estas secuencias, y su posible papel regulatorio. Puede tratarse de un mecanismo más fino de regulación de la expresión genética.



# Ensayos de competencia

Sonda	RE1-NavCh (+)				RI	E1-1			RE <sup>2</sup>	1-2		
PN (6ug)	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Comp	-	-	AP1 (15X		-	-	AP1 (15X)	NavCh (15X)	-	-	AP1 (15X)	NavCh (15X)
				4								
Sonda	•	RI	<b>■</b>	_	_	R	E1-4	_	_	RE	:1-5	_
PN (6ug)	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Comp	-	-	AP1 (15X)	NavCh (15X)	-	-	AP1 (15X		-	-	AP1 (15X)	
-					4				**			
				*	-141 -141							
	-	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_



**Figura 3.** En la figura se puede observar los ensayos de competencia para el RE1-NavCh y los cinco elementos RE1-like. En el carril 1 se muestra la sonda libre, en el carril 2 se observa el patrón de retardamiento cuando se le agrega extracto de proteína nuclear, en el carril 3 se agregó tanto extracto nuclear y un competidor inespecífico (oligonucleótido heterólogo AP1), en el carril 4 se agregó un competidor específico (RE1-NavCh) sin marcar el cual compite con la sonda.

Adicionalmente se determinó el porcentaje de intensidad del patrón de bandas de retardamiento al que corresponderían los dos carriles, tanto el que contiene el competir inespecífico o heterólogo (AP1), como el carril con el competidor específico (RE1-NavCh), los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Sitio RE1	% carril 2	% carril 3 (AP1)	% carril 4 (RE1-NavCh)
NavCh	100	92.1	38.2
RE1-1	100	<mark>94.5</mark>	<del>57.9</del>
RE1-2	100	<mark>81.6</mark>	43.4
RE1-3	100	80.1	<mark>52.9</mark>
RE1-4	100	90.1	65.1
RE1-5	100	93.0	87.1

**Tabla 2.** Se realizó un análisis con la herramienta bioinformática GelQuantNET para determinar los porcentajes de la intensidad del patrón de bandas de retardamiento de los carriles 3 y 4 respecto al carril 2 que



consideraremos como nuestro 100%, se señalan en amarillo aquellos sitios RE1- *like* que mostraron un comportamiento similar al control positivo remarcado en rojo.

#### Ensayos de super-retardamiento con anticuerpos anti-REST

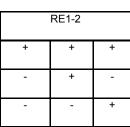
Con la finalidad de determinar si los complejos formados y retardados en geles nativos corresponden a la unión específica del factor de transcripción REST, se procedió a realizar ensayos de super-retardamiento, utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra REST, y como control negativo utilizamos anticuerpos anti-HA. Los resultados se muestran en la figura 4, en los cuales podemos observar la desaparición de los complejos formados, cuando se adiciona el anticuerpos específico contra REST a la sonda RE-1 y proteína nuclear, no así con la adición del anticuerpo anti-HA. La adición del anti-REST produce una banda con un super-retardamiento mayor con cada uno de los elementos RE1-like analizados, en algunos casos el complejo se observa con mayor nitidez, sobre todo con los elementos RE1-like 4 y 5 (figura 5 RE1-4 y RE1-5) Lo anterior nos permite sugerir que lo que observamos en los ensayos de retardamiento y competencia con estos elementos (figura 2 y 3), puede deberse a una mayor afinidad de REST a estas secuencias blanco.

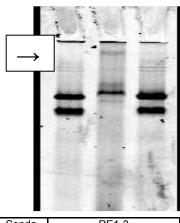


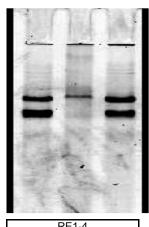
# Super-retardamiento

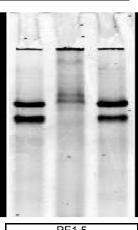
oupor rotardamionto							
Sonda		RE1-NavCh					
PN (6ug)	+	+	+				
anti-REST	ı	+	1				
anti-HA	ı	-	+				

	RE1-1	
+	+	+
-	+	-
-	-	+

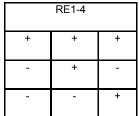




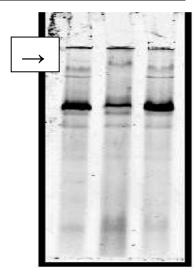


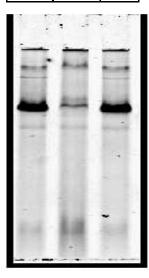


		160	15.7			
Sonda	RE1-3					
PN (6ug)	+	+	+			
anti-REST	1	+	-			
anti-HA	-	-	+			



RE1-5							
+	+	+					
-	+	1					
-	-	+					





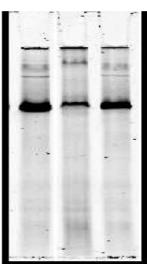




Figura 4. En la figura se muestran los ensayos de retardamiento para la sonda control positivo RE1-NavCh, y las sondas problema RE1-like. En el carril 1 se muestra el patrón de retardamiento cuando se añade la sonda y el extracto de proteína nuclear, en el carril 2 se añadió la sonda con el extracto de proteína nuclear así como un anticuerpo anti-REST, en el carril 3 se añadió la sonda con el extracto de proteína nuclear así como un anticuerpo inespecífico anti-Hemaglutinina. En el carril 2 de cada gel aparece una banda en la parte superior a la altura señalada por la flecha, lo que se presume como un supercomplejo proteína-sonda-anticuerpo. En al panel superior de cada gel se indica la sonda RE-1 utilizada para cada ensayo (RE1- 1 a 5, y el control positivo correspondiente a la sonda RE1-NavCh)

#### Ensayos de Inmunoprecipitación de la cromatina

Con el objetivo de determinar si REST se encontraba unido a las secuencias RE-1 like en regiones de la cromatina, se procedió a realizar ensayos ChIP, para ello se determinaron las condiciones de inmnoprecipitación con los controles adecuados de anticuerpos específicos y no específicos, en el anexo A se muestran los ensayos control y ensayos preliminares para determinar las condiciones adecuadas de entrecruzamiento, cuantificación de la cromatina, fraccionamiento, inmunoprecipitación y amplificaciones preliminares. En la figura 6 se muestran los ensayos representativos de los ensayos de inmunoprecipitación en donde se amplificaron las secuencias que flanquean cada uno de los elementos RE1-like (RE-1, 2, 3, 4 y 5). El control positivo de RE1-NavCh nos amplifica la banda esperada de 167 pb. que incluye al elemento consenso RE-1. El control negativo no amplifica la banda que incluye a RPL30 y solo nos amplifica el Input de cromatina total (banda de 363 pb). Cuando se realizaron los ensayos de amplificación con la cromatina inmunoprecipitada y los primers diseñados para amplificar las secuencias flanqueantes que incluyen cada uno de los elementos RE1-like,

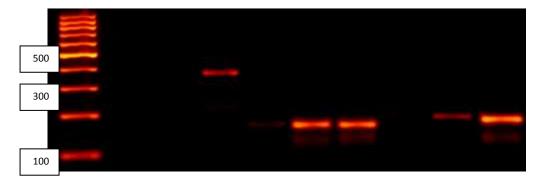


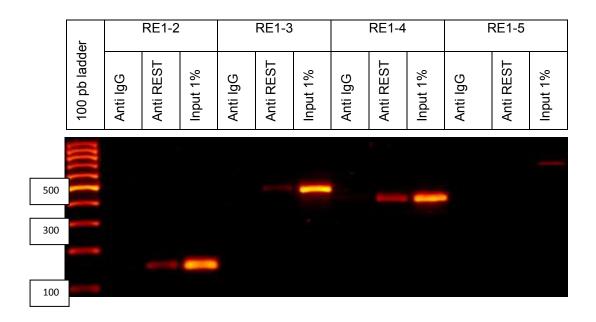
se encontró que amplifican las secuencias esperadas; para el elemento RE1-1 amplifica un secuencia de 188 pb, RE1-2 de 147 pb, RE1-3 de 448 pb, RE1-4 de 386 pb, siendo RE1-5 de 648 pb el único que no genera producto de amplificación (esto pudiera relacionarse al tamaño de fragmentación). El ensayo de amplificación se realizó utilizando la misma cantidad de cromatina y concentraciones equimolares de los primers de amplificación para cada elemento RE1-*like*, y aunque es un ensayo semicuantitativo, podemos ver que el amplificado del elemento RE1-4 es más intenso. Los resultados anteriores nos permiten sugerir que aunque los 5 elementos encontrados en las secuencias RE1-*like* del gene *pdx-1*, unen al factor de transcripción REST, la afinidad del elemento RE1-4 es mayor y puede estar participando de una manera más clara en la regulación de este gen.



# Inmunoprecipitación de la Cromatina

- O	RPL30 (-)			RE1-NavCh			RE1-1		
100 pb laddeı	Anti IgG	Anti REST	Input 1%	Anti IgG	Anti REST	Input 1%	Anti IgG	Anti REST	Input 1%





**Figura 5.** En la figura 5 se muestra el corrimiento en un gel de agarosa al 2% (80 min a 100 volts) de las reacciones de PCR a partir de 3 tipos de DNA



purificados a partir de la ChIP (Anti-IgG, Anti-REST, Input 1%). Por cada par de primers que flanquean tanto el control negativo (RPL30), el control positivo (RE1-NavCh) y las sondas problema (RE1-1, RE1-2, RE1-3, RE1-4 y RE1-5), para este ensayo se emplea un marcador de DNA 100-1000 pb.



#### Discusión de Resultados

En los ensayos de retardamiento se observó un patrón de bandas muy similar entre el control positivo RE1-NavCh y los 5 elementos RE1-like, lo que sugiere que todos los elementos tienen la capacidad de unirse a proteínas de tipo nuclear como REST.

En los ensayos de competencia se tomó como referencia el patrón de intensidad de bandas de cada uno de los carriles de RE1-NavCh, y a partir de este se realizó un análisis porcentual para determinar cuales eran los sitios que mostraban un patrón de intensidad de bandas similar al del control positivo, encontrándose que los sitios RE1-1, RE1-2 y RE1-3 mostraban un comportamiento similar al control positivo, ya que cuando se les añadía el competidor específico en frío se veía claramente una competencia por el sitio de unión a proteína en contra de la sondas marcadas al haber una disminución en la intensidad de bandas del carril 4.

En los ensayos de super-retardamiento se emplearon dos tipos de anticuerpos uno inespecífico (anti-HA) y otro específico (anti-REST). Al añadirle el anticuerpo inespecífico no se aprecia un cambio respecto al patrón de retardamiento cuando no se le añade anticuerpo, mientras que cuando añadimos el anticuerpo específico se aprecia la disminución en la intensidad de las bandas principales y la aparición de un supercomplejo en cada uno de los sitios RE1-like, aunque en RE1-4 y RE1-5 se aprecia un poco de mayor intensidad respecto a los demás sitios.

En el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se obtuvo lo esperado para nuestro par de primers control negativo (RPL30) ya que en la reacción de PCR cuando se emplea como templado el DNA purificado que se obtuvo de la inmunoprecipitación con el anticuerpo específico anti-REST y



el inespecífico anti-IgG ninguno de los dos genera amplicón porque el anticuerpo no va dirigido en contra de proteínas unidas al DNA, y en cambio en el DNA que representa el 1% de la cromatina total (input 1%) si observamos el amplicón. Nuestro par de primers control positivo (RE1-NavCh) también nos da resultados esperados, ya que en la reacción de PCR cuando se emplea como templado el DNA purificado que se obtuvo de la inmunoprecipitación con el anticuerpo inespecífico anti-lgG sólo alcanzamos a distinguir una señal de fondo muy esperado en este tipo de ensayos, pero que de ninguna manera se compara al amplicón que se genera en el carril siguiente en el cual se añadió el anticuerpo anti-REST ya que se ve una aprecia una señal fuerte lo que nos indica que efectivamente nuestro anticuerpo va dirigido en contra de la proteína REST. En base a estos resultados correlacionamos los de los demás sitios RE1-like y observamos que muestra el mismo comportamiento que el control positivo a excepción de RE1-5, sin embargo en el carril donde se muestra la reacción de PCR con el DNA obtenido con en anticuerpo anti-REST se aprecia una variación en la intensidad de las bandas, siendo de mayor intensidad la banda de los sitios RE1-NavCH y RE1-4, (en menor medida RE1-2), lo que nos sugiere que estos dos sitios muestran una mayor afinidad hacía el factor de transcripción REST.



#### **Conclusiones**

Los ensayos de retardamiento y competencia, sugieren que el factor de transcripción, REST se une a las secuencia RE1-like (1, 2 y 3) encontradas en la región regulatoria, y que la afinidad sobre las secuencias RE1 4 y 5, encontradas en la región codificante, es mayor porque la sonda homóloga fría no es capaz competir de manera efectiva.

Los ensayos de super-retardamiento, con el anticuerpo anti-REST, muestran un complejo de mayor intensidad con las secuencias RE1-4 y RE1-5.

El análisis de amplificación de ChIP muestra a los elementos RE1-NavCh y RE1-4 como sitios de unión preferencial REST.

El conjunto de resultados obtenidos nos permiten sugerir que la afinidad de REST sobre las regiones RE1-like del gen pdx-1 es diferencial, y al parecer la regulación podría estar dado por RE1-4 y RE1-2.

#### Perspectivas

Para determinar si la interacción de REST sobre *pdx-1* que se ha comprobado en los ensayos anteriores es funcional, se deben llevar a cabo ensayos de funcionalidad con un gen reportero (luciferasa) para evaluar si al clonar los elementos RE1-2 y RE1-4 en el vector del gen reportero resultan en la represión de la producción de la proteína.

También se propone realizar una reproducción del ensayo ChIP y EMSA en la línea celular-β pancreática de humano 1.4 E7 (obtenida mediante electrofusión), para analizar si existe o no una interacción de REST en está línea celular, ya que es una línea celular productora de insulina y en donde se presume PDX-1 está realizando su función correcta.

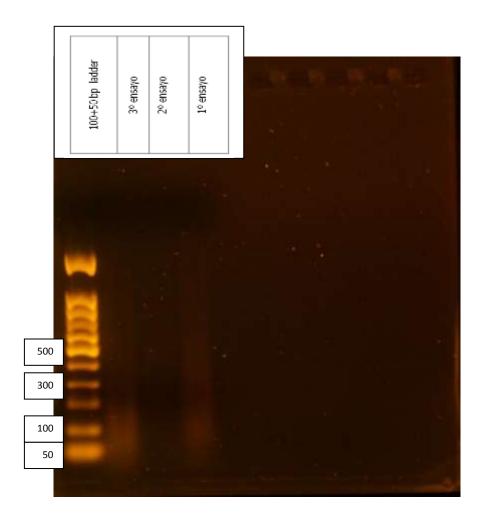


Así mismo sería necesario evaluar los niveles de transcrito y de la proteína REST, PDX-1 e Insulina en la línea celular 1.4E7 al sobre-expresar REST.



# Anexo A: Material adicional (figuras S-1, S2 y S3).

Análisis de la fragmentación de la cromatina utilizando el Bioruptor®, para el ensayo 1 y 3 se emplearon las condiciones descritas anteriormente, para el ensayo 2 se probo con 4 rondas en vez de 3. Para nuestros ensayos de ChIP se emplearon las condiciones del carril 2 y 4.



**Figura S1.** Análisis de la eficiencia de fragmentación en un gel de agarosa 1.2%

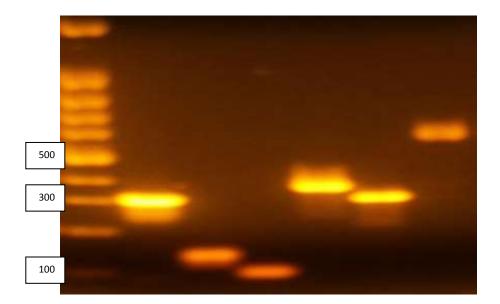


# **Ensayo preliminar ChIP**

Se realizaron varios ensayos preliminares de inmunoprecipitación de cromatina para encontrar las condiciones óptimas para trabajar con la línea celular HeLa. A continuación se muestra uno de ellos en el cual no se incluye el control positivo (RE1-NavCh).

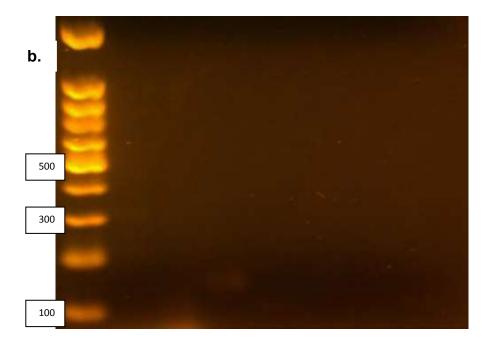
a.

100 bp ladder	RPL30/Input 1%	RE1-1/Input 1%	RE1-2/Input 1%	RE1-3/Input 1%	RE1-4/Input 1%	RE1-5/Input 1%
100	₩	22	<b>8</b>	8	<u>%</u>	22



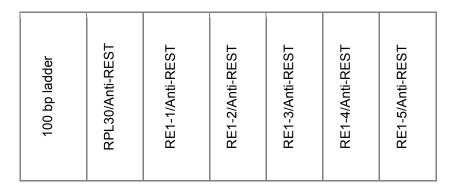


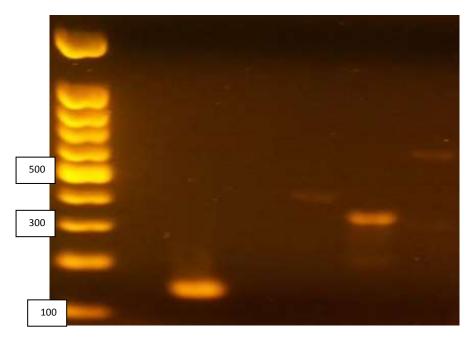
100 bp ladder	Control (-) RXN	RPL30/Anti-lgG	RE1-1/Anti-lgG	RE1-2/Anti-IgG	RE1-3/Anti-lgG	RE1-4/Anti-lgG	RE1-5/Anti-lgG



**Figura S2.** En la figura se muestran los set de reacciones para los 6 pares de primers diseñados para el ChIP, en **a.** con el DNA obtenido mediante el input 1% y en **b.** mediante el anticuerpo anti-IgG. Obteniéndose los resultados esperados.







**Figura S3.** En la figura se muestran los sets de reacciones para los 6 pares de primers diseñados para el ChIP, con el DNA obtenido mediante la IP con anticuerpo anti-REST, observando una intensidad mayor de señal en los elementos RE1-1 y RE1-4.



# Anexo B: Soluciones y Buffers:

Para cuantificar proteína se empleó el método de Lowry y se utilizó como blanco el buffer B

#### Composición de Buffers

Α

- i. 25 uL de Hepes (1 M)
- ii. 25 uL de KCl (1 M)
- iii. 37.5 uL de MgCl (0.1 M)
- iv. 1.25 uL de DTT (1 M)
- v. 21.5 uL de PMSF (1%)
- vi. 15 uL Cóctel de inhibidores de proteasas (200X)
- vii. Aforar a 2.5 mL con agua destilada

viii.15 uL Cóctel de inhibidores de proteasas (200X)

ix. Aforar a 1.75 mL con agua destilada

В

- i. 35 uL de Hepes (1 M)
- ii. 147 uL de NaCl (1 M)
- iii. 3.5 uL de EDTA (0.1 M, pH 8.0)
- iv. 26.25 uL MgCl<sub>2</sub> (1 M)
- v. 0.7 uL de DTT (1 M)
- vi. 15.24 uL de PMSF (1%)
- vii. 350 uL Glicerol (50%)



#### Cuantificación de Concentración de Proteínas Método de Lowry.

- 1. Se colocaron 195 uL de agua destilada y 5 uL de muestra o blanco, en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- Se agregaron 1000 uL de solución D al tubo y se agitó vigorosamente por inversión con la mano. Se dejó reposar el tubo por 10 min a temperatura ambiente.
- 3. Se agregaron 100 uL de solución E y se agitó el tubo rápidamente por unos 3 s en el vórtex a máxima velocidad.
- 4. Se dejó reposar el tubo 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se transfirió el contenido del tubo a una celda del espectrofotómetro (cubrir con papel parafilm la celda) y se determinó la densidad óptica (DO) a 660 nm por duplicado.

#### Composición de soluciones

#### Solución A

- i. 4.6792 de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O
- ii. 8 g de NaOH
- iii. Disolver y ajustar volumen a 200 mL con H2O destilada

#### Solución B

- i. 0.5 de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O
- ii. Disolver y ajustar volumen a 50 mL con H2 O destilada

#### Solución C



- i. 1.3425 g de NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H2O
- ii. Disolver y ajustar volumen a 200 mL con H2O destilada

Nota: Almacenar estas soluciones a 4°C

#### Solución D

 Mezclar 50 mL de solución A con 0.5 mL de solución B y 0.5 mL de solución C. Prepararla un poco antes de usarla.

#### Solución E

 Diluir el reactivo de Folin-Ciocalteu en una proporcipon 1:1 con agua destilada.

<u>Proteína estándar para curva de calibración (Albúmina sérica bovina (BSA) cristalina):</u>

 Disolver la BSA en agua destilada, de tal manera que quede a una concentración de 1 mg/mL. Para almacenar a -20 °C

### Buffer de unión para ensayos de retardamiento

- i. 12.5 uL de Tris-HCl pH=7.5 (200 mM)
- ii. 12.5 uL de KCI (1 M)
- iii. 12.5 uL de DTT (20 mM)
- iv. 50 uL de ficoll 3.5%
- v. 2.5 uL de *Poly*(dl-dC)
- vi. Aforar a 100 uL con agua destilada



# Buffer de unión para ensayos de competencias

- i. 12.5 uL de Tris-HCl pH=7.5 (200 mM)
- ii. 12.5 uL de KCI (1 M)
- iii. 12.5 uL de DTT (20 mM)
- iv. 50 uL de PBS (1X)
- v. 2.5 uL de *Poly*(dI-*dC*)
- vi. Aforar a 100 uL con agua destilada

# Buffer de unión para ensayos de super-retardamiento

- i. 3 uL de Tris-HCl pH=7.5 (1 M)
- ii. 15 uL de KCI (1 M)
- iii. 3 uL de DTT (20 mM)
- iv. 6 uL de PBS1X
- v. 3 uL de *Poly*(dl-dC)



#### **Bibliografía**

- Carlsson C, Borg LAH, Welsh N. 1999. Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. Endocrinology 140:3422–3428.
- Joseph JW, Koshkin V, Saleh MC, Sivitz WI, Zhang C-Y, Lowell BB, Chan CB, Wheeler MB. 2004. Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression. J Biol Chem 279:51049–51056.
- Wang X, Li H, De Leo D, Guo W, Koshkin V, Fantus IG, Giacca A, Chan CB, Der S, Wheeler MB. 2004. Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen species-associated lipotoxicity in the pancreatic beta-cell line MIN6. Diabetes 53:129–140.
- 4. Oprescu Al, Bikopoulos G, Naassan A, Allister EM, Tang C, Park E, Uchino H, Lewis GF, Fantus IG, Rozakis-Adcock M, Wheeler MB, Giacca A. 2007. Free Fatty Acid Induced Reduction in Glucose-Stimulated Insulin Secretion: Evidence for a Role of Oxidative Stress In Vitro and In Vivo. Diabetes 56:2927–2937.
- Bikopoulos G, da Silva Pimenta A, Lee SC, Lakey JR, Der SD, Chan CB, Ceddia RB, Wheeler MB, Rozakis-Adcock M. 2008. Ex vivo transcriptional profiling of human pancreatic islets following chronic exposure to monounsaturated fatty acids. J Endocrinol 196:455–464.
- 6. **Shimabukuro M, Ohneda M, Lee Y, Unger RH**. 1997. Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. J Clin Invest **100**:290–295.



- Talchai C, Xuan S, Lin H V., Sussel L, Accili D. 2012. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. Cell 150:1223–1234.
- 8. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J ichiro, Matsuoka T aki, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. 1999. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: Possible protection of pancreatic ??-cells against glucose toxicity. Diabetes 48:2398–2406.
- Kaneto H, Matsuoka T aki. 2012. Involvement of oxidative stress in suppression of insulin biosynthesis under diabetic conditions. Int J Mol Sci.
- American Diabetes Association. 2011. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 34 Suppl 1:S62–9.
- 11. Atouf F, Czernichow P, Scharfmann R. 1997. Expression of neuronal traits in pancreatic beta cells: Implication of neuron-restrictive silencing factor/repressor element silencing transcription factor, a neuron-restrictive silencer. J Biol Chem 272:1929–1934.
- 12. **Pour PM, Saruc M**. 2011. The pattern of neural elements in the islets of normal and diseased pancreas and in isolated islets. J Pancreas **12**:395–403.
- 13. **Hori Y, Gu X, Xie X, Kim SK**. 2005. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. PLoS Med **2**:0347–0356.
- Kemp DM, Lin JC, Habener JF. 2003. Regulation of Pax4 paired homeodomain gene by neuron-restrictive silencer factor. J Biol Chem 278:35057–35062.



- 15. Gammelsaeter R, Coppola T, Marcaggi P, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA, Attwell D, Regazzi R, Gundersen V. 2011. A role for glutamate transporters in the regulation of insulin secretion. PLoS One 6.
- 16. Del Turco D, Gebhardt C, Burbach GJ, Pleasure SJ, Lowenstein DH, Deller T. 2004. Laminar organization of the mouse dentate gyrus: Insights from BETA2/neuro D mutant mice. J Comp Neurol 477:81–95.
- 17. You Y-H, Ham D-S, Park H-S, Rhee M, Kim J-W, Yoon K-H. 2011. Adenoviruses Expressing PDX-1, BETA2/NeuroD and MafA Induces the Transdifferentiation of Porcine Neonatal Pancreas Cell Clusters and Adult Pig Pancreatic Cells into Beta-Cells. Diabetes Metab J 35:119– 29.
- 18. **Brubaker PL, Drucker DJ**. 2004. Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. Endocrinology.
- 19. Kallunki P, Edelman GM, Jones FS. 1998. The neural restrictive silencer element can act as both a repressor and enhancer of L1 cell adhesion molecule gene expression during postnatal development. Proc Natl Acad Sci U S A 95:3233–3238.
- 20. Tapia-Ramírez J, Eggen BJ, Peral-Rubio MJ, Toledo-Aral JJ, Mandel G. 1997. A single zinc finger motif in the silencing factor REST represses the neural-specific type II sodium channel promoter. Proc Natl Acad Sci U S A 94:1177–1182.
- 21. García-Sánchez R, Ayala-Luján J, Hernández-Peréz A, Mendoza-Figueroa T, Tapia-Ramírez J. 2003. Identification of repressor element



- 1 in cytochrome P450 genes and their negative regulation by RE1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor. Biochim Biophys Acta Gen Subj **1620**:39–46.
- 22. **Gu H, Liang Y, Mandel G, Roizman B**. 2005. Components of the REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex are disrupted, modified, and translocated in HSV-1-infected cells. Proc Natl Acad Sci U S A **102**:7571–6.
- 23. You A, Tong JK, Grozinger CM, Schreiber SL. 2001. CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. Proc Natl Acad Sci U S A 98:1454–1458.
- 24. Roopra A, Sharling L, Wood IC, Briggs T, Bachfischer U, Paquette AJ, Buckley NJ. 2000. Transcriptional repression by neuron-restrictive silencer factor is mediated via the Sin3-histone deacetylase complex. Mol Cell Biol 20:2147–2157.
- 25. **Palm K, Belluardo N, Metsis M, Timmusk T**. 1998. Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. J Neurosci **18**:1280–1296.
- 26. Kim CS, Choi HS, Hwang CK, Song KY, Lee B-K, Law P-Y, Wei L-N, Loh HH. 2006. Evidence of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF) interaction with Sp3 and its synergic repression to the mu opioid receptor (MOR) gene. Nucleic Acids Res 34:6392–403.
- 27. Bingham AJ, Ooi L, Kozera L, White E, Wood IC. 2007. The repressor element 1-silencing transcription factor regulates heart-specific gene expression using multiple chromatin-modifying complexes. Mol Cell Biol 27:4082–4092.



- 28. Abderrahmani A, Steinmann M, Plaisance V, Niederhauser G, Haefliger JA, Mooser V, Bonny C, Nicod P, Waeber G. 2001. The transcriptional repressor REST determines the cell-specific expression of the human MAPK8IP1 gene encoding IB1 (JIP-1). Mol Cell Biol 21:7256–67.
- 29. Martin D, Tawadros T, Meylan L, Abderrahmani A, Condorelli DF, Waeber G, Haefliger JA. 2003. Critical Role of the Transcriptional Repressor Neuron-restrictive Silencer Factor in the Specific Control of Connexin36 in Insulin-producing Cell Lines. J Biol Chem 278:53082–53089.
- 30. **Edlund H**. 2002. Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. Nat Rev Genet **3**:524–532.
- 31. **Gu G, Brown JR, Melton DA**. 2003. Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis. Mech Dev.
- 32. **Wilson ME, Scheel D, German MS**. 2003. Gene expression cascades in pancreatic development. Mech Dev.
- 33. **Babu DA, Deering TG, Mirmira RG**. 2007. A feat of metabolic proportions: Pdx1 orchestrates islet development and function in the maintenance of glucose homeostasis. Mol Genet Metab.
- 34. **Melloul D, Marshak S, Cerasi E**. 2002. Regulation of insulin gene transcription. Diabetologia.
- 35. **Hui H, Perfetti R**. 2002. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. Eur J Endocrinol.



- 36. **Gannon M, Gamer LW, Wright C V**. 2001. Regulatory regions driving developmental and tissue-specific expression of the essential pancreatic gene pdx1. Dev Biol **238**:185–201.
- 37. Marshak S, Benshushan E, Shoshkes M, Havin L, Cerasi E, Melloul D. 2000. Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. Mol Cell Biol 20:7583–7590.
- 38. **Gerrish K, Gannon M, Shih D, Henderson E, Stoffel M, Wright CVE, Stein R**. 2000. Pancreatic β cell-specific transcription of the pdx-1 gene. The role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3β sites. J Biol Chem **275**:3485–3492.
- 39. **Ben-Shushan E, Marshak S, Shoshkes M, Cerasi E, Melloul D**. 2001. A pancreatic beta -cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. J Biol Chem **276**:17533–17540.
- 40. **Gerrish K, Cissell MA, Stein R**. 2001. The role of hepatic nuclear factor 1 alpha and PDX-1 in transcriptional regulation of the pdx-1 gene. J Biol Chem **276**:47775–84.
- 41. **Qian J, Kaytor EN, Towle HC, Olson LK**. 1999. Upstream stimulatory factor regulates Pdx-1 gene expression in differentiated pancreatic beta-cells. Biochem J **341 ( Pt 2**:315–322.
- 42. **Simmons RA**. 2007. Developmental origins of beta-cell failure in type 2 diabetes: the role of epigenetic mechanisms. Pediatr Res **61**:64R–67R.



- 43. Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA. 2008. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. J Clin Invest 118:2316–2324.
- 44. **Maue R A, Kraner S D, Goodman R H, Mandel G**. 1990 Neuron-specific expression of the rat brain type II sodium channel is directed by upstream regulatory elements. Neuron **4**:223–231.
- 45. **Nicolas Jullien and Jean-Paul Herman. 2011** LUEGO: a cost and time saving gel shift procedure. BioTechniques, Vol. 51, **4**:267–269