



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

*“El represor transcripcional REST/NRSF está directamente involucrado en la
regulación transcripcional de PDX1 en células beta pancreáticas”*

TESIS

Que presenta

M. en C. ROMERO HERNÁNDEZ OCTAVIO

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis:

DR. JOSÉ ISABEL TAPIA RAMÍREZ

Ciudad de México

Agosto, 2022

Dedicatoria: A mis abuelas, mis padres, mis hermanas, sobrinos y a todos los que me apoyaron a conseguir este logro.

Agradecimientos:

Al Dr. José Tapia Ramírez, M. en C. Humberto Santana, Josué Ramírez, compañeros y personal del laboratorio 2 del área 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular, por las facilidades durante mi estancia en el CINVESTAV.

A mis asesores la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, la Dra. Georgina Victoria Acosta, el Dr. Efraín Garrido Guerrero y el Dr. Manuel Hernández por su apoyo y aportaciones en este trabajo.

A la QFB Anaí Fuentes del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (UNAM), Al QFB Víctor Rosales de la unidad de citometría LaNSE, CINVESTAV, a los técnicos Víctor Tapia Ramírez y José Luis Barrera Calderón del laboratorio 2 del Depto. de Genética y Biología Molecular, así como a Gabriela Mora por las facilidades para con el departamento.

A mis compañeros de generación y profesores por ayudarme en mi formación durante este proceso.

Agradezco al CINVESTAV por la oportunidad de pertenecer a este prestigioso programa de Doctorado, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con el cual pudimos materializar este logro de la obtención del grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Genética y Biología Molecular.

Resumen

REST/NRSF (RE1-Silencing Transcription Factor) es un factor de transcripción bien estudiado que se caracteriza como miembro de la familia de proteínas Gli-Kruppel y que posee dominios de dedos de zinc los cuales permiten su unión al DNA. Su principal actividad se ha definido como un represor de genes neuronales en células no neuronales con capacidad de unirse a sus genes blanco a través de un elemento de 21 pb denominado elemento RE1. A su vez, REST recluta múltiples cofactores, incluidos HDAC1, HDAC2 y mSin3A, así como el cofactor CoREST para reprimir la transcripción de genes blanco. Recientemente se ha demostrado que REST es un importante regulador negativo de la diferenciación endocrina durante la formación del páncreas. Uno de los principales genes involucrados en la diferenciación y función del páncreas es el gen *PDX1*, que se ha propuesto que pudiera estar siendo regulado por REST a través de modificaciones a nivel de remodelación de la cromatina. En el presente trabajo, encontramos que el gen *PDX1* en una región de 223 pb ubicada en -2535 pb, contiene dos elementos con alta similitud al elemento consenso RE1. Los ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) demostraron la formación del complejo DNA-proteína con elementos RE1.1-like y RE1.2-like. Además, el factor de transcripción REST se une a ambos de manera específica, como lo demuestran los ensayos EMSA de competencia y super-retardamiento. El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina reveló que REST *in vivo* se asocia a elementos RE1-like del gen *PDX1*. Los ensayos de western blot realizados con transfectantes estables que expresan constitutivamente REST en una línea de células beta pancreáticas humanas, demuestran que REST regula positivamente la expresión del gen *PDX1*. Nuestros hallazgos indican que REST activa la expresión de Pdx1, sin embargo, este aumento de Pdx1 contrasta con una nula expresión de insulina, lo que sugiere que en la regulación de Pdx1 e insulina aún existen mecanismos desconocidos en los que REST podría participar activamente.

Abstract

REST/NRSF (RE1-Silencing Transcription Factor) is a well-studied transcription factor that is characterized as a member of the Gli-Kruppel protein family and has zinc finger domains that allow its binding to DNA. Its main activity has been defined as a repressor of neuronal genes in non-neuronal cells with the ability to bind to their target genes through a 21-bp element called the RE1 element. In turn, REST recruits multiple cofactors, including HDAC1, HDAC2, and mSin3A, as well as the cofactor CoREST to repress the transcription of target genes. REST has recently been shown to be an important negative regulator of endocrine differentiation during pancreatic formation. One of the main genes involved in the differentiation and function of the pancreas is the *PDX1* gene, which has been proposed to be regulated by REST through modifications at the level of chromatin remodeling. In the present work, we found that the *PDX1* gene, in a 223 bp region located at -2535 bp, contains two elements with high similarity to the RE1 consensus element. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) demonstrate DNA-protein complex formation with RE1.1-like and RE1.2-like elements. In addition, REST transcription factor binds both specifically, as shown by the EMSA competition and super-retardation assays. Chromatin immunoprecipitation assay revealed that REST in vivo associates with RE1-like elements of the *PDX1* gene. Western blot assays performed with stable transfectants constitutively expressing REST in a human pancreatic beta cell line demonstrate that REST upregulates *PDX1* gene expression. Our determinations indicate that REST activates the expression of Pdx1, however, this increase in Pdx1 contrasts with a null expression of insulin, suggesting that in the regulation of Pdx1 and insulin there are still unknown mechanisms in which REST could actively participate.

Contenido

| | |
|---|----|
| Dedicatoria: | 1 |
| Agradecimientos: | 1 |
| Resumen | 2 |
| Abstract | 3 |
| Introducción | 6 |
| Antecedentes | 15 |
| Sitios RE1-like presentes en el promotor de <i>PDX1</i> | 15 |
| Unión <i>in vitro</i> de REST con elementos RE-like | 15 |
| Unión <i>in vivo</i> de REST con elementos RE-like | 20 |
| Justificación | 22 |
| Hipótesis | 22 |
| Objetivo general | 23 |
| Objetivos Particulares | 23 |
| Estrategia experimental | 24 |
| Materiales y Métodos | 28 |
| Cultivo Celular | 28 |
| Plásmido pQBI25-REST..... | 28 |
| Transfección estable de células 1.1E7 | 29 |
| Western Blot..... | 30 |
| Lisis celular..... | 30 |
| SDS-PAGE y transferencia | 31 |
| Inmunodetección | 31 |
| Ensayos de gen reportero | 32 |
| Construcción de plásmidos | 32 |
| Ensayo de gen reportero..... | 34 |
| Resultados | 35 |
| Obtención de un modelo de células β pancreáticas humanas que expresan REST de forma estable | 35 |
| Linearización de pQBI25-REST | 35 |
| Transfección estable de células 1.1E7 | 36 |

| | |
|---|-----------|
| REST regula positivamente Pdx1 y negativamente la expresión de insulina en células β pancreáticas humanas | 38 |
| Western Blot..... | 38 |
| Ensayo de gen reportero | 40 |
| Discusión de Resultados | 42 |
| Conclusiones | 47 |
| Perspectivas | 48 |
| Anexos A Material adicional | 49 |
| Anexos B Soluciones y Buffers | 56 |
| Bibliografía | 58 |

Introducción

Mecanismos reguladores e implicaciones moleculares relacionados con Diabetes tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es considerada una condición metabólica con un aumento constante en la prevalencia e incidencia entre la población mundial, así como tasas altas en morbilidad y mortalidad sin importar el nivel socioeconómico. Esta condición es considerada una enfermedad crónico-degenerativa que implica diversos trastornos metabólicos encabezados el alto nivel de glucosa sanguínea, elemento que favorece complicaciones neuropáticas y micro-macrovasculares.

La Organización mundial de la salud relaciona el incremento en la incidencia de la DM con el aumento poblacional, la longevidad, el aumento de la obesidad, una mala alimentación y llevar un estilo de vida sedentaria. En conclusión, estamos ante problema de salud pública a nivel mundial de grandes proporciones.

A raíz de esto se han empleado campañas de prevención, métodos de diagnóstico y tratamiento oportunos, así como brindar información veraz al paciente para que posea mayor conocimiento de las implicaciones de esta enfermedad. Siguiendo esa línea en los últimos años se han realizado múltiples estudios y ensayos clínicos, para discernir nuevos elementos y mecanismos que permitan conocer más la patogenia de esta enfermedad. Adicionalmente se ha estudiado sobre mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la enfermedad, sobre todo a nivel celular, analizando la función de las células b pancreáticas presentes en los islotes de Langerhans, su proceso de diferenciación, así como su reprogramación para el uso de trasplantes celulares, mientras que a nivel genético se ha llegado al descubrimiento de genes, así como la implicación de factores de transcripción y otras biomoléculas que predisponen a esta condición.

La DM2 es caracterizada principalmente por una resistencia a la insulina por parte del paciente, así como por una alteración en la correcta función de las células β . Consumir alimentos en exceso, así como la obesidad conduce a la generación de esta resistencia, lo que desencadena que las células β secreten una mayor cantidad de insulina para contrarrestar esta resistencia a la insulina. Adicional a esto, las células adiposas comienzan a secretar mayor cantidad de ácidos grasos libres (AGL), así como citocinas inflamatorias, lo que provoca un daño gradual a la célula β y su función lo que favorece el desarrollo de la diabetes. Esta lipotoxicidad que se presenta en las células β , favorece un estado de estrés oxidativo, lo que conduce a que estas células disminuyan producción de insulina [1-5]. La causa principal para el desarrollo de la DM2 no es necesariamente el aumento de la resistencia a la insulina, sino que esta enfermedad tiene bastantes implicaciones moleculares y mecanismos de regulación génica que coexisten en un entorno de una disfunción celular, lo cual se refleja en un deterioro gradual del paciente, así como en complicaciones de salud ligadas a esta disfunción. Con los hallazgos encontrados recientemente se ha propuesto que la diabetes tipo 2 es una enfermedad poligénica que implica una insuficiencia primaria de las células β , por lo cual es de gran importancia estudiar todos los mecanismos regulatorios de estos genes y otros procesos que pudieran estar implicados en favorecer el desarrollo de esta condición [6].

Recientemente se ha planteado un nuevo concepto para explicar la insuficiencia de las células β en pacientes con DM2; dicho concepto asegura que la pérdida de la masa de células β está asociado a un proceso de desdiferenciación celular y no a procesos apoptóticos que pudiera sufrir la célula. Los resultados de estos experimentos realizados en este linaje celular demuestran que células β no diferenciadas se convierten en células progenitoras y posteriormente su destino es terminar siendo una célula α . Adicionalmente estos resultados también muestran que el proceso de desdiferenciación de células β podría desempeñar un rol muy importante en el desarrollo de la disfunción pancreática y culminar en la DM2 [7].

A su vez, el efecto del estrés oxidativo sobre el deterioro de la función de la célula β es otro elemento importante implicado en el desarrollo de la DM2. Anteriormente se ha demostrado que, en aislados de islotes de rata expuestos a estrés oxidativo, disminuye la actividad del promotor de insulina, así como su expresión. También se demostró que con un tratamiento antioxidante se puede revertir la disminución de la unión de los factores Pdx1 y MAFA al promotor de insulina. Esto nos sugiere que la hiperglucemia constante suprime secreción y expresión de insulina debido que conduce a un aumento del estrés oxidativo, acompañado por una reducción de la expresión y/o actividad de unión al promotor de insulina del factor de transcripción Pdx1 [8].

En base a esto se concluyó que en condiciones diabéticas hay una disminución de la función y expresión, de factores de transcripción importantes para el gen de insulina. Este proceso se conoce como glucotoxicidad (**imagen 1**) y a pesar de los hallazgos obtenidos diversos mecanismos que podrían estar involucrados en este proceso aún no han sido discernidos [9].

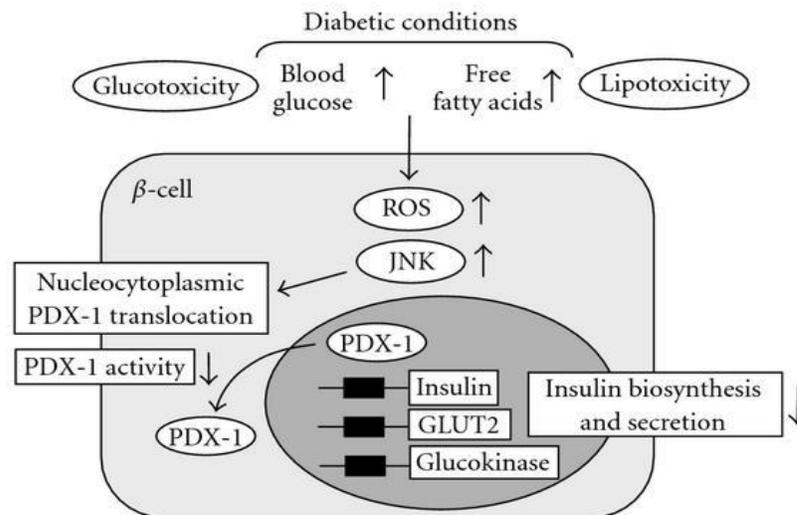


Imagen 1. Efecto del estrés oxidativo en la célula pancreática: En condiciones diabéticas, existe un estado de glucotoxicidad y lipotoxicidad por el aumento de concentración de glucosa y ácidos grasos libres en sangre, esto se ve reflejado en la célula β en un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que conlleva un aumento en la actividad de la vía JNK, lo que provoca una translocación de Pdx1 del núcleo al citoplasma, impidiendo que este factor de transcripción ejerza su correcta función sobre los genes blanco, dando como

resultado una disminución de la biosíntesis y secreción de insulina, así como otras proteínas de importancia para el correcto metabolismo de los carbohidratos como lo son el transportador de glucosa GLUT2 y la enzima glucocinasa [10].

Alteraciones génicas en células β pancreáticas

Diversas formas de diabetes se asocian con alteraciones genéticas en las células β pancreáticas. La hiperglucemia en una edad temprana es una constante asociada a estas formas de Diabetes, las cuales conocen como diabetes tipo MODY y están caracterizadas por una alteración los niveles de secreción de la insulina, pero con afección mínima en su función. En esta condición un patrón autosómico dominante es heredado. La forma más común está asociada con mutaciones en un gen que codifica para un factor de transcripción hepático (HNF-1 α). Otra forma se encuentra asociada con mutaciones en el gen de la glucocinasa y lo cual conduce a la expresión molécula de glucocinasa disfuncional. La glucocinasa es una enzima primordial del ciclo de Krebs la cual transforma la glucosa en glucosa-6-fosfato, lo que a su vez promueve la secreción de insulina por parte de las células β , otorgándole un rol a esta enzima como "sensor de glucosa". Debido a las alteraciones génicas que sufre esta enzima, el aumento de los niveles de glucosa en sangre es necesario para normalizar la secreción de insulina. Otras formas más raras están relacionadas con mutaciones en genes que codifican para factores de transcripción, como HNF-4 α , HNF-1 β , NeuroD1 y Pdx1 [11].

Similitudes del tejido pancreático y el tejido neuronal

El tejido pancreático es un conjunto complejo de células que ha sido ampliamente estudiado y muchos de sus factores de transcripción han sido caracterizados y vinculados a procesos específicos para el desarrollo y mantenimiento del tejido. A menudo, las células pancreáticas, en particular las células beta, se han contrastado con las células de origen neural, tanto en genotipo como en función [12] [13]. Con frecuencia se ha sugerido que los

antiguos programas de desarrollo en común pueden regir la diferenciación de las células de los islotes y las neuronas [14].

Se ha informado que mecanismos de silenciamiento equivalentes controlan un grupo de genes específicos de neuronas que existen tanto en células beta neuronales como pancreáticas [12]. Si bien varios tejidos tienen numerosos factores de transcripción en común durante el desarrollo, el páncreas y el sistema nervioso experimentan múltiples procesos biológicos que involucran la acción de factores de transcripción comunes que activan o reprimen genes que definen el tejido, tal es el caso de algunas moléculas como como 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 dendritas de células granulares [16] y ha demostrado inducen la diferenciación y proliferación de las células pancreáticas [17], y el péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) que promueve la supervivencia celular en las células beta y las neuronas [18].

REST y su papel como represor transcripcional de genes pancreáticos

REST es un factor de transcripción bien estudiado, caracterizado como miembro de la familia Gli-Kruppel de proteínas con dedos de zinc. Su actividad principal se ha definido como un represor de genes neuronales en células no neuronales con la capacidad de unirse a sus genes diana a través de un elemento de 21 pb denominado RE-1 [19] [20] [21]. Recluta múltiples cofactores, incluidos HDAC-1, HDAC-2 y mSin3A, así como el cofactor CoREST para afectar la transcripción en los genes diana [22] [23] [24]. Como se describe en numerosos informes, REST silencia muchos genes en células neuronales y no neuronales [19] [25] [21] [26] [27]. Algunos de estos genes regulados por REST son de origen pancreático y desempeñan funciones importantes en la homeostasis de las células productoras de insulina. Tal es el caso de los genes islet-brain 1 (IB1) [28], paired box gene 4 (pax 4) [29] y Connexin36 (Cx36) [30]. Al realizarse una búsqueda bioinformática de

elementos RE1 putativos en genes pancreáticos, se encontraron diversas secuencias candidatas presentes en estos genes conservados entre diferentes especies, que pudieran participar en la regulación de genes pancreáticos importantes entre ellos *PDX1* y algunos otros para los cuales ya se ha comprobado previamente que estos motivos son regulados por REST (tabla 1) [29].

TABLE I
Putative NRSE motifs in pancreas-specific transcription-factor genes

| Gene | Species | Sequence | Location |
|---------------------|-----------|--|----------|
| Consensus | | TTC AGCACCC acGG ACAG ngcC | |
| <i>Pdx1</i> | Human | GG---C--c-----T-t-- | Coding |
| | Mouse | GGA--TC-Tc-----T-t-- | |
| | Rat | GGA--TC--c-----T-t-- | |
| | Hamster | GGA--TC--c-----T-t-- | |
| <i>Neurogenin3</i> | Human | C--G-A-T-g-----T----- | Intron |
| <i>NeuroD/Beta2</i> | Human | -A-G-T---t-----t-- | Coding |
| | Pig | -A-G-----t-----t-- | |
| | Mouse | -A-G-----t-----t-- | |
| | Rat | -A-G-----t-----t-- | |
| | Chicken | -A-G-----t-----t-- | |
| | Xenopus | -ATG-T---t-----t-- | |
| | Zebrafish | -A-G-T--A-t-----t-T | |
| <i>Hes1</i> | Human | -C---G---a---G--a-gT | 5'UTR |
| | Mouse | -C---G---a---G--a-gT | |
| | Rat | -C---G---a---G--a-gT | |
| | Human | -G--TG--ca-AT--AT--- | Coding |
| | Mouse | -G--TG--ca-AT--A---- | |
| | Rat | -G--TG--ca-AT--A---- | |
| <i>p48</i> | Mouse | --GGC---ca-----t-- | Promoter |
| <i>Pax4</i> | Mouse | -----t--G---a-A | Promoter |

Tabla 1. Motivos putativos RE1 en genes de factores de transcripción específicos de páncreas. Se realizó búsqueda bioinformática dirigida a genes que pudieran tener elementos RE1 y 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 [29].

El factor de transcripción Pdx1, su función como activador del gen de insulina y el rol que desempeña en la diferenciación de células-β pancreáticas.

Pdx1 es un factor de transcripción que se expresa principalmente en las células progenitoras del páncreas primitivo y, a medida que las células se

acercan a la etapa adulta, Pdx1 disminuye, pero reaparece más tarde casi exclusivamente en las células β [31]. Este factor juega un papel importante en el desarrollo del páncreas y también se considera crucial para la función de la célula β madura [32] [33] [34]. Muchos estudios han reportado que Pdx1 participa en la regulación transcripcional de numerosos genes específicos de las células β , como la insulina, la glucocinasa, la IAPP y el Glut-2 [35] [36].

El gen *PDX1* y su región de regulación transcripcional

Previamente se ha encontrado que el gen *PDX1* contiene varios sitios reguladores dentro de un área delimitada circunscrita a 4,5 kb río arriba del SIT [37], y tres secuencias pequeñas designadas como PH1, PH2 y PH3 que están altamente conservadas en ratas y humanos (**imagen 2**) [38]. Esta región está conservada filogenéticamente en mamíferos y ha demostrado en roedores ser suficiente tanto para el desarrollo adecuado de los islotes, así como para la expresión específica de *PDX1* [37] [38]. A su vez esta área contiene sitios de unión para factores de transcripción endodérmicos y específicos del páncreas, como Foxa2, Ptf1a, HNF1 α , MafA, HNF6, Pax6, SP1, SP3 y el propio Pdx1 [39] [40] [41]. Adicionalmente se ha encontrado que la proteína USF-1 también es un potente activador de la transcripción de *PDX1* [42].

Asociación de proteínas pertenecientes al complejo correpressor reclutado por REST, al promotor del gen *PDX1*

Un trabajo publicado recientemente que mostró la implicación de Pdx1 en el desarrollo del páncreas en ratas, incluye los hallazgos del retraso del crecimiento del páncreas intrauterino en la condición fetal [44]. Bajo esta condición, se ha encontrado una asociación significativa del promotor de *PDX1* con la proteína remodeladora de la cromatina histona desacetilasa 1 (HDAC1) y el correpressor mSin3A, ambas proteínas son reclutadas por REST para la represión transcripcional de sus genes blanco, lo que podría indicarnos que quizá ambas proteínas estén siendo reclutadas por REST, que también podría

estar asociado a este promotor. Adicionalmente la presencia de LA HDAC1 y mSin3A en el promotor proximal de *PDX1* evitan la unión de USF-1, que como se mencionó anteriormente es un activador de la transcripción de *PDX1* (Imagen 4) [45].

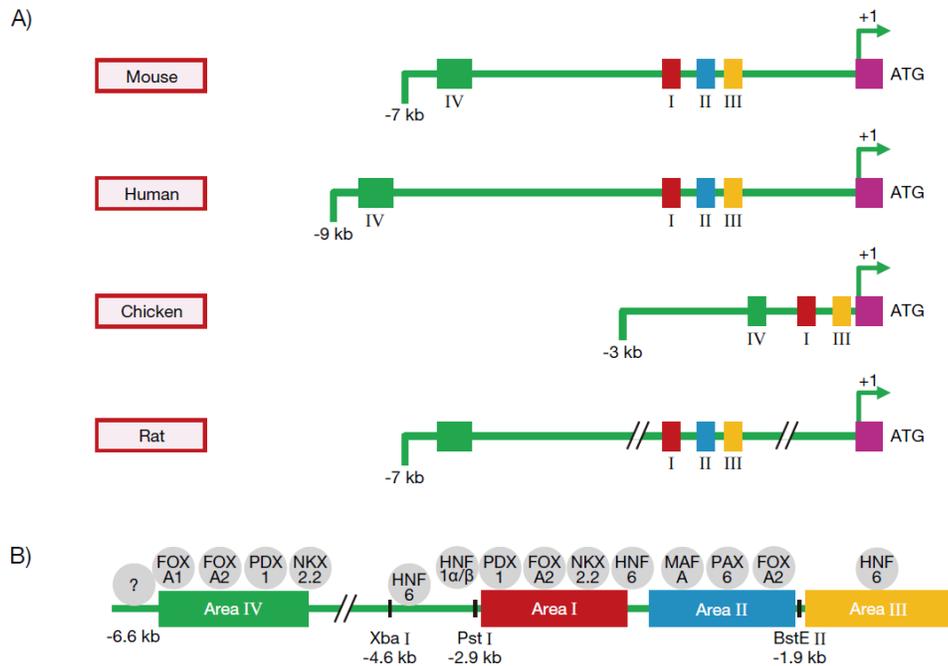


Imagen 3. Elementos-cis potenciadores conservados en la región 5' río arriba del gen *PDX1*. A) Muestra la región 5' flanqueante del gen *PDX1* en ratón, humano, pollo y rata. Las áreas I, II, III y IV son regiones potenciadoras conservadas, que determina el perfil de expresión de *Pdx1* durante el Desarrollo del páncreas. B) Muestran los factores de transcripción que poseen sitios de unión dentro de regiones potenciadoras conservadas [43].

Después de considerar la relevancia de REST en el control transcripcional de diversos genes de origen pancreático implicados con la diferenciación de células- β y de su correcta función, el objetivo de nuestro trabajo fue el de comprobar si efectivamente REST se une a la región reguladora del gen *PDX1*. Para esto primero estudiamos la región reguladora de *PDX1* en busca de posibles sitios de unión para REST. Posteriormente realizamos ensayos de unión *in vitro* e *in vivo* de la proteína REST con secuencias RE1 candidatas de unión a REST del gen *PDX1* en células en la línea celular inmortalizada HeLa,

la razón de utilizar esta línea celular es porque estas células expresan REST en buena cantidad, pero no Pdx1 [46], [47].

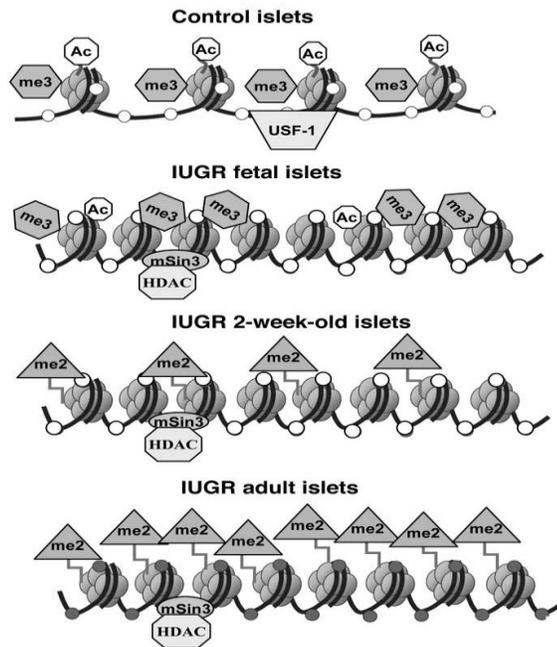


Imagen 4. Resumen de cambios epigenéticos en PDX1 en ratas IUGR durante el desarrollo de diabetes tipo 2. En las células β pancreáticas (fila superior), el promotor proximal de PDX1 normalmente se encuentra en una forma no metilada (círculos abiertos) estado de cromatina abierta, lo que permite el acceso a los factores de transcripción como USF-1 y asociado con nucleosomas caracterizados por histonas H3 y H4 acetiladas (Ac, octágonos) y con H3K4me3 (Me3, hexágonos). En IUGR fetal e islotes de 2 semanas (segunda y tercera fila), la acetilación de histonas se pierde progresivamente a través de la asociación con un complejo represor mSin3A-HDAC1-DNMT1, desapareciendo H3K4me3 y apareciendo H3K9me2 (Me2, triángulos) después del nacimiento. Los islotes adultos IUGR (cuarta fila) se caracterizan por cromatina inactiva con H3K9me2 y metilación extensa del DNA (círculos rellenos) que se bloquean en el estado transcripcionalmente silencioso de PDX1[45].

Antecedentes

Previamente en nuestro grupo de trabajo hemos realizado la búsqueda y selección de posibles secuencias RE1-like, presentes en la región promotora del gen *PDX1*, así como ensayos unión entre elementos RE1-like y REST, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* y a continuación se muestran los resultados obtenidos, estos resultados, así como metodologías y material suplementario se pueden consultar en la Tesis de maestría (Romero, 2016).

Sitios RE1-like presentes en el promotor de *PDX1*

La búsqueda de elementos RE1-like se realizó utilizando el software MatInspector (Genomatix, Ann Arbor, MI) [48], en una región que abarca los nucleótidos -8656 a +4500 en relación con el sitio de inicio de la transcripción (SIT), del gen humano *PDX1* (Accesión número NT_024524). Los elementos candidatos RE1 se alinearon en contra la secuencia consenso de RE1 (EIDorado Database, 2016). Adicionalmente buscamos regiones conservadas de las secuencias entre diferentes especies y evaluamos la similitud con los nucleótidos centrales para la unión a REST utilizando la base de datos BLAST.

De los resultados obtenidos de la búsqueda bioinformática, seleccionamos 5 secuencias candidatas RE1-like (**tabla 2**), los sitios se ubican hacia regiones aguas arriba del promotor e interesantemente también en la región aguas abajo del sitio de inicio de la traducción. Los elementos RE1-like muestran fuerte similitud con la secuencia consenso del elemento RE1.

Unión *in vitro* de REST con elementos RE-like

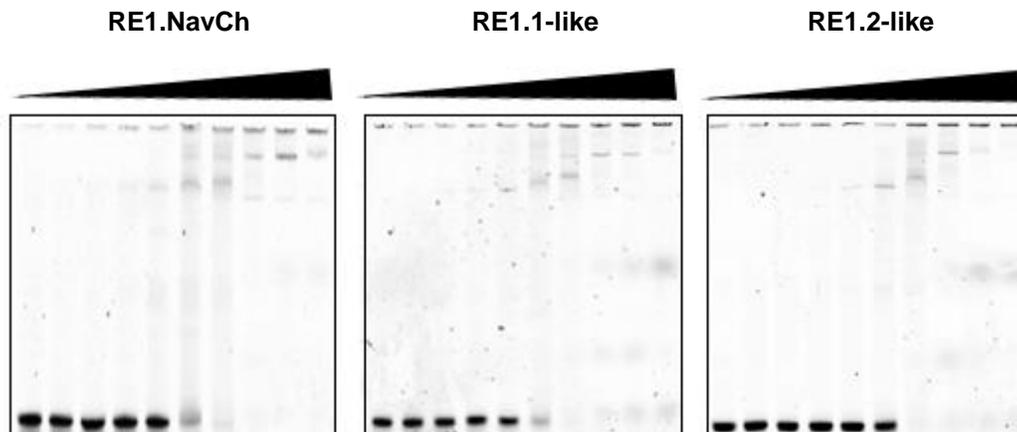
Para demostrar si las secuencias candidatas son capaces de unirse a REST de manera *in vitro*, se emplearon ensayos EMSA empleando la sonda fluorescente LUEGO [49]. En la (**fig. 1**) se muestran los ensayos de unión utilizando las secuencias candidatas de los elementos RE1-like, con diferentes concentraciones de proteína nuclear, obtenidas de células HeLa. Para estos ensayos, determinamos la concentración adecuada de extracto de proteína nuclear capaz de formar un complejo de retardamiento en gel de acrilamida.

| Sitio | Secuencia | Similitud | Ubicación |
|--------------|--|-----------|-----------|
| RE1-CONSENSO | 5'-tt CAGCAC ac GG AcAGmgcC-3' | - | - |
| RE1.1 | 5'-GCT AGATCCAC GG GGAAGTAC-3' | 71.42% | -2535 |
| RE1.2 | 5'-GGAATAC CCCG GGCGAT CCC -3' | 66.66% | -2312 |
| RE1.3 | 5'-ATT AGGTGCC GG G CCCCAC G-3' | 61.90% | -1754 |
| RE1-4 | 5'- TTCTGCAC CACTAC CACCTCC -3' | 85.71% | +3269 |
| RE1-5 | 3'- TCAACATGAC AG CCAGCTC -5' | 80.95% | +4350 |

Tabla 2. Motivos putativos RE1 en el gen PDX1

Esta tabla muestra las cinco secuencias RE1-like seleccionadas, que se obtuvieron utilizando la herramienta informática Genomatix MatInspector, así como la secuencia consenso de RE1 de unión a REST. Tanto en la secuencia consenso como en las secuencias problema, aquellas bases consideradas importantes para la unión de REST están resaltadas en negrita. En el recuadro se encuentran dos guaninas consideradas por algunos autores como esenciales para la unión a REST. En las secuencias RE-like, las coincidencias adicionales con la secuencia de consenso se resaltan en rojo. En el lado derecho de las secuencias se muestra el porcentaje de similitud y en el recuadro siguiente la distancia en pb desde el sitio de inicio de la transcripción del gen PDX1.

En todos los elementos RE1-like se observa un complejo de retardamiento, incluyendo el control positivo correspondiente al elemento RE1 del canal de sodio dependiente de voltaje tipo II, RE1.NavCh [50].



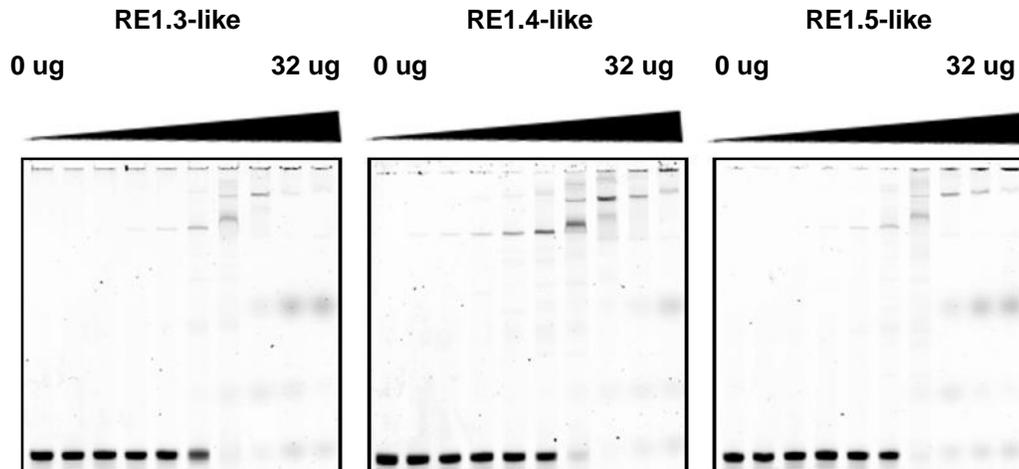


Figura 1. Unión de REST a elementos RE1-like presentes en el gen PDX1. La Figura 1 muestra un ensayo de cambio de movilidad por electroforesis (EMSA) en el que se determinó la interacción entre los motivos RE1.NavCh y RE1-like con un extracto nuclear de proteína de células HeLa. En la primera imagen del gel que contiene la sonda con el RE1.NavCh (control positivo), observamos en el primer carril la sonda libre fluorescente, en los siguientes carriles se añadió el doble de cantidad de extracto proteico de forma creciente a partir de 0.125 ug/uL hasta alcanzar una concentración de 32 ug/uL. El mismo experimento se llevó a cabo para las diferentes sondas problema respectivamente. Empezamos a ver más claramente la formación de un complejo de retardo a partir del carril 3 correspondiente a una concentración de 0,25 ug/uL de extracto proteico, y en el carril 8 se observa un agotamiento completo de la sonda libre. Todos los elementos RE1-like mostraron un patrón de retardamiento similar con respecto al control positivo. Los ensayos se llevaron a cabo en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 8%, a 100 voltios durante 1 hora y 20 minutos.

Para determinar si este complejo de retardamiento estaba formado por el factor de transcripción REST unido a las secuencias RE1-like, llevamos a cabo ensayos de competencia, utilizando una secuencia blanco-específica del factor de transcripción REST, en este caso, usamos el RE1.NavCh como control positivo, en el que se ha demostrado ampliamente la unión a REST (20). Como competidor inespecífico utilizamos una secuencia heteróloga que se une a otro factor de transcripción diferente a REST, en este caso se une al factor de transcripción AP1. Esperamos en los ensayos de competencia que la adición de la sonda RE1.NavCh no fluorescente compita con las sondas similares a RE1-like fluorescentes y los complejos de retardo disminuyan.

Los resultados, como se esperaba, muestran competencia con la sonda homóloga del canal de sodio dependiente de voltaje tipo II (RE1.NavCh) y un comportamiento similar por parte de RE1.1 y RE1.2-like (**fig. 2A**). Sin embargo, las secuencias RE1-like 4 y 5 que se encuentran en la región aguas abajo de *PDX1* muestran un menor grado de competencia. Es difícil en este punto determinar por qué compiten menos con la sonda homóloga, y solo podemos especular que estos elementos tienen una mayor afinidad por REST y, por lo tanto, es difícil que la sonda homóloga no fluorescente elimine la proteína unida, o que otra proteína distinta REST da mayor estabilidad a estos complejos. Un hecho relevante en los resultados con las secuencias RE1-like 4 y 5 es que estas secuencias carecen de las bases GG contiguas (posición 12 y 13 en la secuencia consenso de 21 pb del elemento RE1) y en su lugar tienen las bases TA y AG (**tabla 2**). En este sentido, los resultados sugieren una mayor afinidad de la proteína por los elementos RE1.4 y 5-like que por la secuencia RE1-NavCh. Sin embargo, a pesar de mostrar una alta afinidad de unión hacia REST, no podríamos considerarlos como sitios de unión canónicos de REST porque están muy alejados del área delimitada para la correcta unión de los factores de transcripción respecto al SIT. Además, estos resultados plantean la necesidad de estudiar con mayor detalle la unión del factor REST a estas secuencias y su posible papel regulador. Los porcentajes de competencia se resumen en la **fig. 2B**.

Para determinar si los complejos formados y desplazados en los geles nativos corresponden con la unión específica del factor de transcripción REST, se procedió a realizar ensayos de super-retardamiento, empleando un anticuerpo específico dirigido en contra REST, y como control negativo utilizamos anti-HA. Los resultados se muestran en la **fig. 2C**, en la que podemos observar el desplazamiento de los complejos DNA-proteína cuando se añade el anticuerpo específico de REST, pero no así con la adición del anticuerpo anti-HA. La adición del anti-REST genera una banda con mayor retardamiento con cada uno de los elementos RE1-like, en algunos casos se observa con mayor

claridad el complejo, especialmente con los elementos tipo RE1.1 y RE1.2-like (fig. 2C).

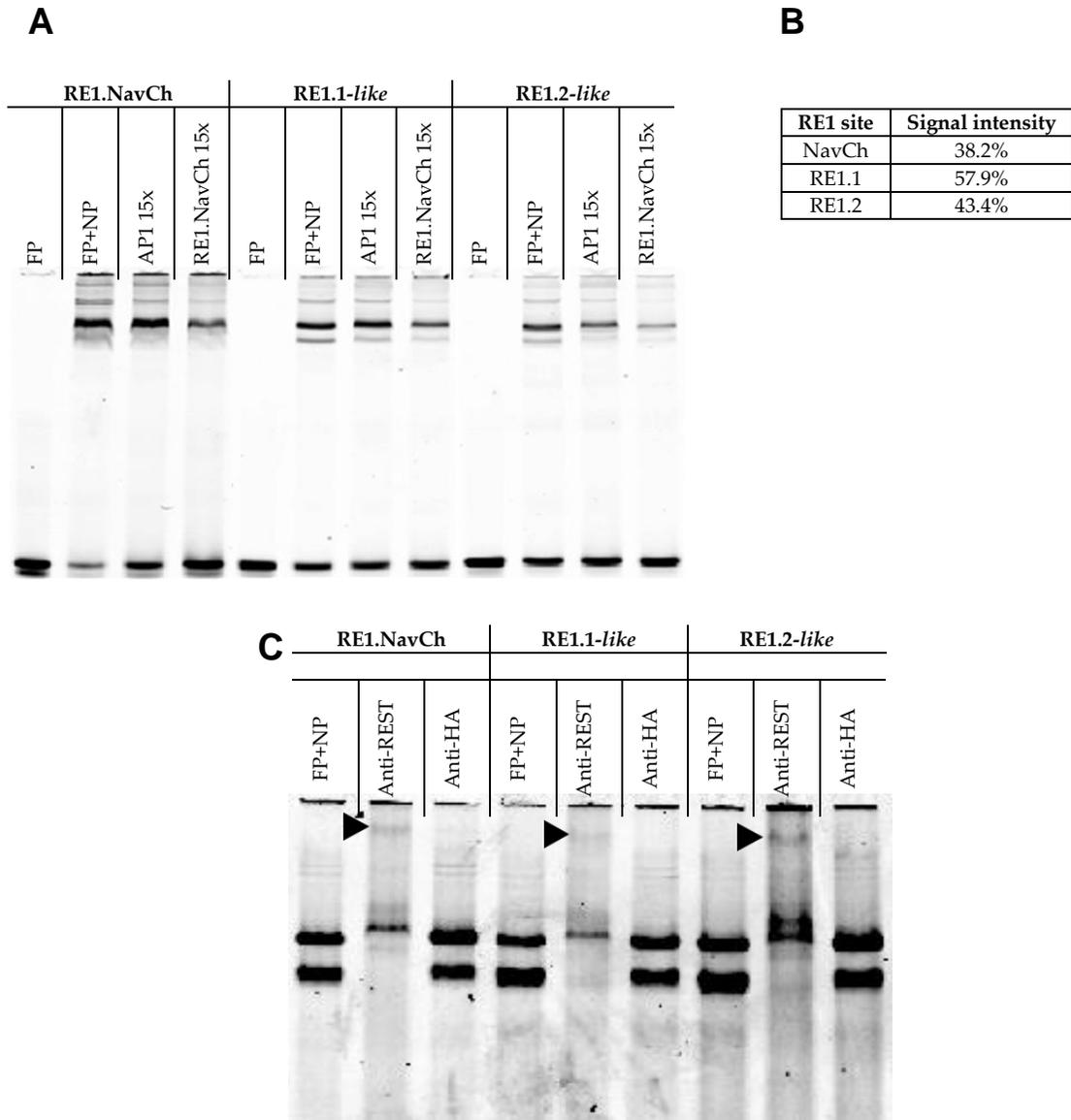


Figura 2. Unión in vitro de REST a elementos RE1-like presentes en el promotor de PDX1

A) Muestra los ensayos de competencia para RE1.NavCh y elementos RE1-like 1 y 2. Para todos los conjuntos que se muestran, el carril 1 muestra la sonda fluorescente libre, en el carril 2 se observa el patrón de retardamiento cuando se agrega el extracto de proteína nuclear de HeLa (6 ug), en el carril 3 se agrega tanto el extracto nuclear como un competidor no específico (oligonucleótido heterólogo AP1x15), y en el carril 4 se agregó un competidor específico en frío sin fluorescencia (RE1.NavChx15) que compite con la sonda correspondiente. **B)** Se realizó un análisis con la herramienta bioinformática GelQuantNET, para determinar los porcentajes de intensidad del patrón de bandas de retardamiento del carril 4 con respecto al

carril 2 que consideraremos como nuestro 100%, RE1-like 1, 2, mostraron un comportamiento como el control positivo RE1.NavCh. **C)** Muestra los ensayos de super-retardamiento para la sonda de control positivo RE1.NavCh y RE1-like. En el carril 1 se muestra el patrón de retardamiento cuando se agregó la sonda y el extracto de proteína nuclear, en el carril 2 se agregó la sonda con el extracto de proteína nuclear, así como un anticuerpo anti-REST, en el carril 3 se agregó la sonda con el extracto de proteína nuclear, así como un anticuerpo anti-hemaglutinina no específico. En el carril 2 de cada gel aparece una banda en la parte superior a la altura indicada por la flecha, el cual es un supercomplejo proteína-sonda-anticuerpo. El panel superior de cada gel indica la sonda RE-1 utilizada para cada ensayo (RE1-like y el control positivo correspondiente a la sonda RE1-NavCh).

Unión *in vivo* de REST con elementos RE-like

Para determinar si REST se une a las secuencias RE1-like en las regiones de cromatina en las células HeLa, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Para lo cual se utilizó la técnica de PCR empleando el DNA purificado obtenido de la inmunoprecipitación con un anticuerpo específico anti-REST y un anticuerpo anti-IgG, así como un input que representa el 1% de la cromatina total. Adicionalmente se diseñó un par de oligonucleótidos para amplificar cada una de las secuencias que flanquean a los elementos (RE.1 y 2-like), el control positivo RE1.NavCh, así como una secuencia perteneciente al gen que codifica la proteína ribosomal RPL30 utilizada como control negativo. (banda de 363 pb). Cuando los ensayos de PCR se realizaron con el DNA inmunoprecipitado con IgG no se aprecia amplificación con ningún par de oligonucleótidos. Cuando se realizó la PCR con DNA inmunoprecipitado con el anticuerpo contra REST se encontró que amplifican las secuencias que contienen los elementos RE1.NavCh(167 pb), RE1.1-like (188 pb) y RE1.2-like (147 pb) (**fig. 3**). El ensayo de amplificación se realizó utilizando la misma cantidad de cromatina y concentraciones equimolares de los oligonucleótidos de amplificación para cada secuencia y aunque es un ensayo semicuantitativo, podemos ver que la amplificación del elemento RE1.2-like es más intensa que para el elemento RE1.1-like. Esto nos sugiere que la afinidad del elemento RE1.2 es mayor y quizás participe de manera más clara en la regulación de este gen. Adicionalmente el control

negativo RPL30(363 pb) sólo amplifica con el input de cromatina total, lo que valida nuestros ensayos.

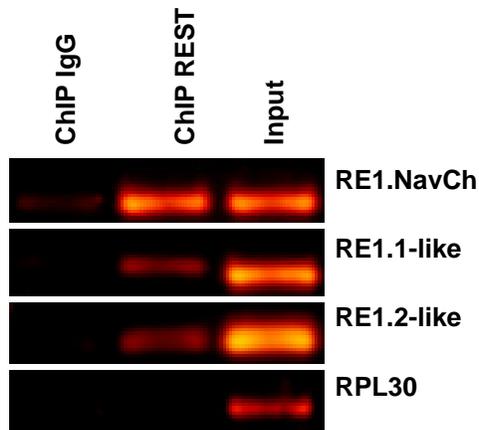


Figura 3. Inmunoprecipitación de la cromatina. En la figura se muestra el corrimiento en un gel de agarosa al 2% (80 min a 100 volts) de las reacciones de PCR a partir de 3 tipos de DNA purificados a partir de la ChIP (Anti-IgG, Anti-REST, Input 1%). Cada par de oligonucleótidos flanquean tanto el control negativo (RPL30), el control positivo (RE1-NavCh) y los elementos RE1 (RE1.1 y 2-like).

Los resultados anteriores sugieren que REST se encuentra en efecto unido a la región de regulación transcripcional del gen *PDX1*. Por lo tanto, el siguiente paso de nuestro trabajo será indagar el efecto de la unión de REST en la regulación transcripcional del gen *PDX1* empleando como modelo la línea celular 1.1E7 caracterizada por ser una línea de células β pancreáticas humanas capaces de secretar insulina, todo esto para poder evaluar el contexto biológico de estas interacciones.

Justificación

Debido a que el gen *PDX1* contiene elementos RE1-like que interaccionan *in vitro* e *in vivo* con la proteína REST, este factor estaría regulando la transcripción de este gen y a su vez participando de manera indirecta en la regulación de la expresión de la insulina, hormona indispensable para el correcto metabolismo de carbohidratos y cuya ausencia podría desencadenar diabetes tipo 2.

Hipótesis

El gen *PDX1* poseen elementos RE1-like que interaccionan con el factor de transcripción REST, mediante los cuales REST regula la transcripción de este gen.

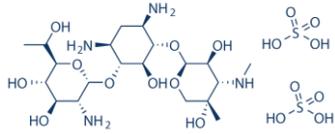
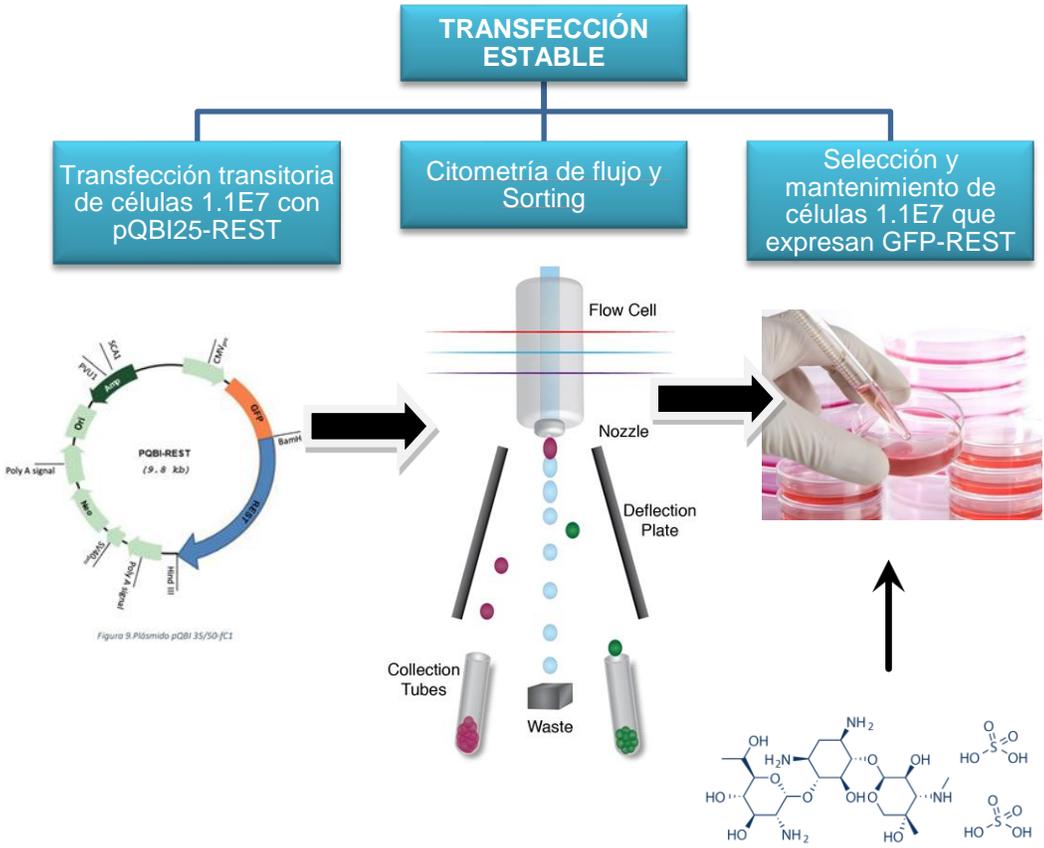
Objetivo general

Determinar si el factor de transcripción REST regula la transcripción del gen *PDX1* mediante la interacción con sitios RE1-like.

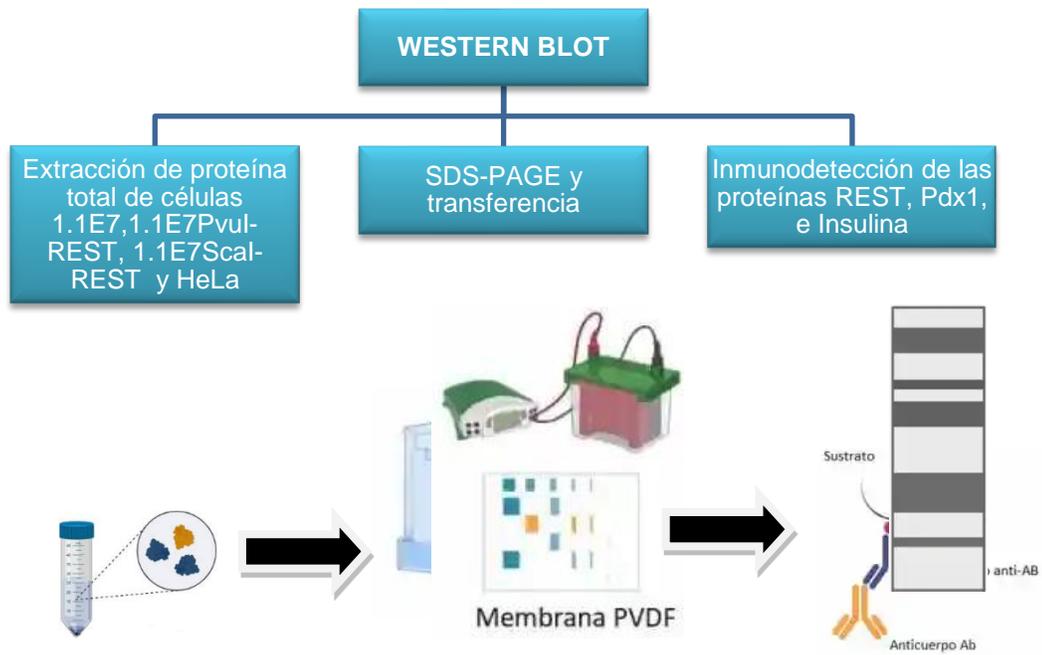
Objetivos Particulares

1. Obtener un modelo celular de células β pancreáticas humanas que sobre expresen de manera estable la proteína REST.
2. Establecer la correlación entre la sobreexpresión de REST y la regulación del gen *PDX1* e insulina en la línea 1.1E7 de células β pancreáticas humanas.
3. Determinar el efecto de la interacción de REST con elementos RE1-like presentes en el gen de *PDX1*, mediante ensayos con un gen reportero (luciferasa).

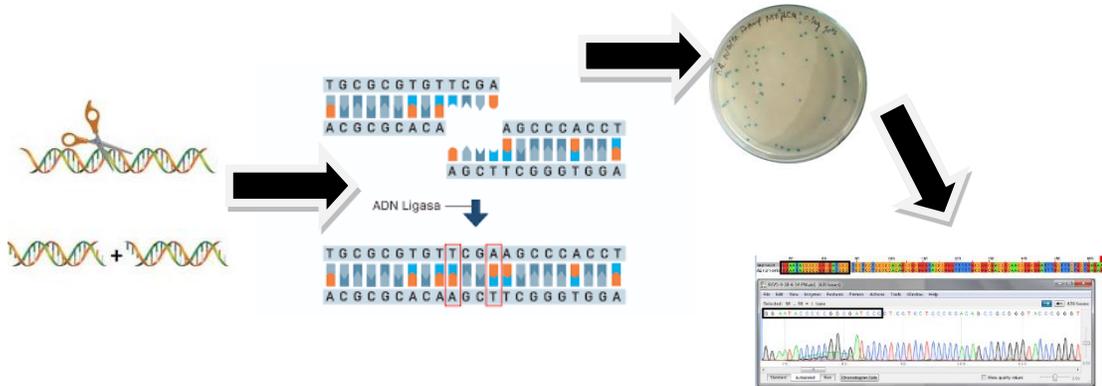
Estrategia experimental



G418



CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS



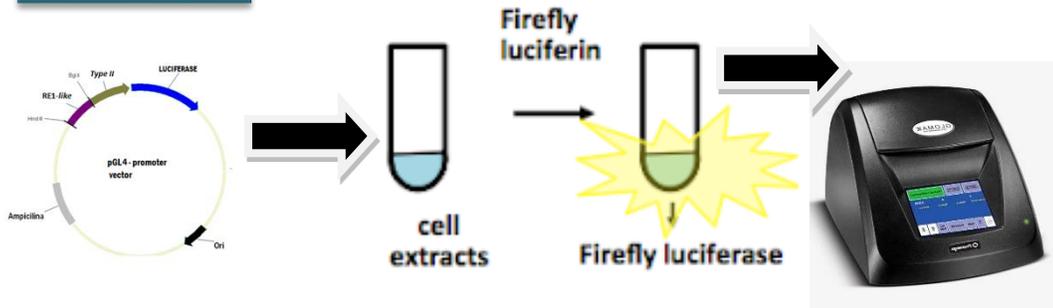
ENSAYO DE LUCIFERASA

Transfección 1.1E7 y 1.1E7PvuI-REST con pRPML2 y pRXPML2

Lisar las células y aislar el sobrenadante

Añadir el sustrato de la enzima luciferasa

Determinación de Luminiscencia



Materiales y Métodos

Cultivo Celular

Las células β 1.1E7 provenientes de islotes de páncreas humano, fueron obtenidas de la European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), y es una línea celular obtenida por electrofusión de células beta pancreáticas humanas y la línea celular PANC-1 humana inmortalizada. La línea celular 1.1E7, así como sus transfectantes estables que expresan REST, 1.1E7Pvul-REST y 1.1E7Scal-REST se cultivaron en medio RPMI-1640 con 2 mM de L-glutamina y se suplementaron con 10% de suero fetal bovino. Las células HeLa se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero neonatal bovino al 10%. Todos los medios utilizados para el cultivo contenían 100 unidades/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina. Adicionalmente, se añadieron 1000 μ g/mL del antibiótico G418 (Geneticina), el cuál es un análogo de Neomicina), a las células 1.1E7Pvul-RESTy 1.1E7Scal-REST para selección y 500 μ g/mL cada 48 h para su mantenimiento. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con un 5 % CO₂.

Plásmido pQBI25-REST

El fragmento *Bam*HI-*Pvu*II del plásmido pGAL4-N1 (que contiene el extremo amino de REST) se unió con el fragmento *Pvu*II-*Xho*I del plásmido REEX1 (que contiene el resto de REST) obteniendo el fragmento *Bam*HI-*Pvu*II-*Xho*I (que contiene REST completo). El fragmento *Bam*HI-*Xho*I se clonó en el plásmido; pFast Bac Htc-REST. A partir de pFast Bac Htc-REST se obtuvo el fragmento *Bam*HI-*Hind*III, que contiene REST completo, y se clonó entre los sitios *Bam*HI y *Hind*III del plásmido pQBI25-fc1 (Quantum Biotechnologies, Inc) obteniendo así el plásmido pQBI25-REST, que está compuesto por un promotor de CMV, GFP-REST como proteína de fusión y gen de resistencia a neomicina (**fig. 1SA**).

Transfección estable de células 1.1E7

La transfección estable se llevó a cabo utilizando el kit de lipofectamina LTX™ con reactivo plus™ (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante y siguiendo la metodología utilizada en [51]. Primeramente, se realizó un único corte mediante una reacción de restricción utilizando las enzimas de restricción *PvuI* y *ScaI* (Promega) de manera independiente en la región que codifica para la proteína de resistencia a ampicilina en el plásmido pQBI25-REST (9.9 kb) (**fig. 1SA**), proporcionado por el Dr. Raúl Orozco, Cinvestav). El resultado de la reacción de restricción se inactivó a 80 °C durante 20 min y posteriormente se comprobó la correcta linearización del plásmido pQBI25-REST en un gel de agarosa al 1.2 %. Posteriormente se cultivaron células 1.1E7 en placas de 100 mm durante 24 h hasta que alcanzaron una confluencia de 40%. El medio OptiMEM, el reactivo plus y el DNA plasmídico linearizado con las enzimas (*PvuI*, *ScaI*) se mezclaron y se incubaron durante 5 min. Después se agregó la Lipofectamina LTX a la mezcla, se incubó por 30 minutos a 42 °C en un termomixer comfort (Eppendorf, 22027) sin agitación y luego se retiró el medio de las placas de 100 mm y se realizaron dos lavados con PBS 1x y posteriormente se añadió a las placas la mezcla de complejos lipofectamina-DNA y se incubaron a 37 °C por 4 horas en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂ (los complejos con las células se mezclaron cada 30 min). Después de las 4 h de incubación se añadió a las células medio post-transfección, (RPMI suplementado con suero fetal bovino al 5%, glutamina al 0.5%, aminoácidos al 5% y sin antibiótico) y las células se volvieron a incubar durante 24 horas. Después de la incubación las células fueron analizadas bajo un microscopio de fluorescencia para corroborar la expresión de proteína verde fluorescente (GFP).

Las células se cosecharon con PBS1X y se incubaron en hielo, hasta realizarse el sorting (no hacerlo después de más de 2 horas). Finalmente, mediante citometría de flujo utilizando el equipo MoFlo Astrios Cell Sorter (Beckman Coulter), se realizó un sorting celular utilizando la marca de GFP en las células transfectadas para separarlas de las no transfectadas. Las células

transfectadas con el plásmido pQBI25-REST linearizado con *PvuI* y *Scal* respectivamente, se recuperaron y resuspendieron en medio RPMI condicionado y se incubaron durante 48 horas para su recuperación. Después de 48 horas, se adicionaron 1000 ug/mL de antibiótico de selección G418 y después 500 ug/mL para el mantenimiento celular, en este paso se obtuvieron las células transfectadas correctamente con pQBI25-REST restringido con *PvuI* (1.1E7*PvuI*-REST) y las transfectadas con pQBI25-REST restringido con *Scal* (1.1E7*Scal*-REST).

Western Blot

Lisis celular

Se cultivaron cajas p100 de células 1.1E7, 1.1E7*PvuI*-REST, 1.1E7*Scal*-REST y HeLa durante 24h. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 3 mL de PBS 1X (añadir suavemente el PBS 1X para no despegar las células). Se retiró el PBS y se añadió 0.4 uL de tripsina a cada caja, (mezclar suavemente hasta cubrir totalmente la superficie del plato con la tripsina y dejar actuar por 5 min). Se observó al microscopio para corroborar que se han redondeado y separado las células. Posteriormente se agregó medio suplementado con suero 10% para inactivar la tripsina y se cosecharon las células con una micropipeta de 1000 uL en un tubo de 15 uL. Después se equilibró con otro tubo de 15 mL y se centrifugó a 800 RPM por 5 minutos, se decantó el sobrenadante teniendo cuidado de no tirar el botón celular, se añadieron 3 mL de PBS 1X y se volvió a centrifugar a 800 RPM, se repitió el lavado con PBS 1X y se eliminó la mayor cantidad posible de PBS 1X residual del tubo con una micropipeta. El paquete celular se resuspendió en 200 uL de buffer RIPA, pH 8.0 (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 1 % y Tritón 1%), añadiendo 4 uL de un coctel inhibidor de proteasas y fosfatasa 100X (SIGMA-ALDRICH) y se transfirió a un tubo de 1.5 mL. Posteriormente se incubó el tubo durante 1 hora y 30 minutos en el cuarto frío (4° C), mezclando en el vórtex. Finalmente se centrifugó el tubo por 20 min a 12000 RPM a 4°C y se decantó el sobrenadante el cual contenía los

extractos proteicos totales en otro tubo. Los extractos proteicos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

SDS-PAGE y transferencia

Los extractos proteicos fueron luego cuantificados por el método de Lowry y separados en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) añadiendo 30 ug de proteína y empleando solución amortiguadora de corrida TBE 1X (Tris 2.5 mM, glicina 19.1 mM, SDS 0.1%) a las siguientes resoluciones: 8% para la detección de la proteína REST, 17% para la detección de Insulina y 10% para la detección del factor de transcripción Pdx1 y el control de carga β -actina; se aplicó un voltaje de 120 V durante 2 h para REST y 1.5 h para las demás proteínas. Posteriormente los geles se tiñeron con azul de Coomassie para la visualización de las proteínas. Después de evaluar la calidad de los extractos proteicos, se repitió el procedimiento para realizar su transferencia a membranas de PVDF (activadas previamente con metanol durante 5 min) a 4°C usando la celda Mini Trans-Blot® en el sistema de transferencia Mini-PROTEAN® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y empleando el amortiguador de transferencia 1X (39 mM de glicina, 48 mM de Tris base, 0.037% de SDS y metanol 20%) a las siguientes condiciones; 65 V/2 h para REST, 100 V/1,5 h para Pdx1 y 0,36 mA/3 h para Insulina. Después de la transferencia las membranas se tiñeron con rojo Ponceau (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), para comprobar la presencia de proteínas y la correcta transferencia.

Inmunodetección

Después de verificar la transferencia de proteínas, las membranas se lavaron con agua destilada y posteriormente se bloquearon en el cuarto frío (4 °C) en agitación durante toda la noche empleando TBS-T 1X (Tris-HCl 10 mM pH=7.9, NaCl 150 mM, 0.05 % Tween 20) suplementada con leche descremada en polvo al 12 % para las proteínas REST, Pdx1 y β -actina y al 15 % para insulina, posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con los anticuerpos primarios (los anticuerpos primario y secundario se diluyeron con leche descremada en polvo al 3 %).. Se utilizó un

anticuerpo policlonal de conejo anti-REST (07-579, Millipore) a una dilución de 1/1000, un anticuerpo policlonal de conejo anti-Pdx1 (H-140, Santa Cruz) a una dilución de 1/750, un anticuerpo policlonal de conejo anti-insulina (H-86, Santa Cruz) a una dilución de 1/500 y un anticuerpo policlonal de ratón anti β -actina (Donado por el Dr. José Manuel Hernández, Cinvestav) a una dilución de 1/500. Las membranas se lavaron tres veces con TBST que contenía Tween 20 al 0,05 % durante 10 minutos por lavado. Posteriormente se añadieron como anticuerpos secundarios IgG anti-conejo bovino conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) e IgG anti-ratón de burro (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) a una dilución de 1/7500. Las membranas se lavaron en TBST y luego se revelaron con Western LightningTM ECL Pro, Enhanced Chemiluminescence Substrate (Perkin Elmer Inc., España). Para el revelado se utilizó película de autorradiografía Kodak BioMax MR.

Ensayos de gen reportero

Construcción de plásmidos

Para la construcción de los plásmidos empleados en ensayos de luciferasa, se partió del plásmido pRPM (Donado por el M. en C. Humberto Santana, Cinvestav) que contiene el promotor mínimo indispensable del gen de canal de sodio tipo II (PMNaCh), así como su elemento RE1 de unión a REST (RE1.NavCh) y del plásmido pGL4.16 (Promega) que no cuenta con promotor y contiene el gen reportero luciferasa de luciérnaga (Luc2).

pRPML2: El plásmido pRPM se cortó con las enzimas de restricción *XhoI/Smal* para liberar el fragmento que contiene el RE1.NavCh y el Promotor mínimo indispensable de canal de sodio tipo II. De igual manera el plásmido pGL4.16 se cortó con las enzimas *XhoI/EcoRV* para dejar los sitios disponibles para hibridar con el fragmento liberado de pRPM, al finalizar la reacción de restricción se inactiva a 80 °C por 20 min. A continuación, se realiza la ligación de los plásmidos restringidos utilizando la T4 DNA ligasa, para obtener el plásmido pRPML2, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente se comprobó la correcta ligación del fragmento de pRPM al plásmido pGL4.16,

restringiendo al plásmido pRPML2 con *XhoI* y *EcoRI*, y analizando el DNA en un gel de agarosa al 1.2 %.

pPML2: El plásmido pRPM se cortó con las enzimas de restricción *BglII/SmaI* para liberar el fragmento que contiene promotor mínimo indispensable del canal de sodio tipo II. De igual manera el plásmido pGL4.16 se cortó con las enzimas *BglII/HindIII* para dejar los sitios disponibles para hibridar con el fragmento liberado de pRPM, al finalizar la reacción de restricción se inactiva a 80 °C por 20 min. A continuación, se realiza la ligación de los plásmidos restringidos utilizando la T4 DNA ligasa, para obtener el plásmido pPML2, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente se comprobó la correcta ligación del fragmento de pRPM al plásmido pGL4.16, restringiendo al plásmido pRPML2 con *XhoI* y *EcoRI*, y analizando el DNA en un gel de agarosa al 1.2 %.

pR2PML2: Utilizando los mismos oligonucleótidos para amplificar por PCR el sitio RE1.2 añadiendo los sitios de restricción de *SacI* y *XhoI* a los extremos de estos oligonucleótidos, realizamos una reacción de amplificación con DNA genómico obtuvimos el fragmento de la región flanqueante de este elemento RE1 con los sitios de restricción *SacI* y *XhoI* a los extremos. Adicionalmente se cortó con las enzimas de restricción *SacI/XhoI* el plásmido pPML2. A continuación se realiza la ligación del plásmido restringido con el fragmento de la región que contiene al RE1.2-like, utilizando la T4 DNA ligasa, para obtener el plásmido pR2PML2. Finalmente se comprobó la correcta ligación del plásmido, restringiendo al plásmido pR2PML2 con *SacI/EcoRI*, y analizando el DNA en un gel de agarosa al 1.2 %, así como la secuenciación del plásmido para verificar que el sitio RE1.2 está íntegro y clonado correctamente.

pR4PML2: Utilizando los mismos oligonucleótidos para amplificar por PCR el sitio RE1.4 añadiendo los sitios de restricción de *SacI* y *XhoI* a los extremos de estos oligonucleótidos, realizamos una reacción de amplificación con DNA genómico obtuvimos el fragmento de la región flanqueante de este elemento RE1 con los sitios de restricción *SacI* y *XhoI* a los extremos. Adicionalmente

se cortó con las enzimas de restricción *SacI/XhoI* el plásmido pPML2. A continuación se realiza la ligación del plásmido restringido con el fragmento de la región que contiene al RE1.4-like, utilizando la T4 DNA ligasa, para obtener el plásmido pR4PML2. Finalmente se comprobó la correcta ligación del plásmido, restringiendo al plásmido pR4PML2 con *SacI/EcoRI*, y analizando el DNA en un gel de agarosa al 1.2 %, así como la secuenciación del plásmido para verificar que el sitio RE1.4 está íntegro y clonado correctamente.

Ensayo de gen reportero

El ensayo de luciferasa se realizó, cultivando células 1.1E7 y 1.1E7PvuI-REST hasta una confluencia de 80% aproximadamente. Después se realizó la transfección transitoria con el kit de lipofectamina LTX™ con reactivo plus™ (Invitrogen) en ambas líneas celulares utilizando los plásmidos pPML2 y pRPML2, siguiendo los mismos parámetros descritos en apartados anteriores. A las 24 horas después de la transfección, se cosecharon las células, se cuantificaron y se colocaron 7×10^5 células en un tubo de ensayo. A continuación, se realizó el ensayo de luciferasa empleando el kit de luciferase assay system de Promega siguiendo el protocolo del fabricante. Se añadió el buffer de lisis a nuestros tubos y se dejó incubar por 5 min, a continuación, se mezclaron 20 uL del lisado con 100 uL del buffer Luciferase Assay Reagent y se cuantificó la luz producida. Para la lectura de las unidades relativas de luz relacionadas con la expresión de luciferasa empleamos el luminómetro The GloMax® 20/20 (Promega).

Resultados

Obtención de un modelo de células β pancreáticas humanas que expresan REST de forma estable

Para determinar si la unión de REST con motivos RE-like del gen *PDX1* es funcional, decidimos generar un modelo biológico en el que podamos estudiar las diferencias entre la expresión de genes importantes para la función pancreática como lo son Pdx1 e insulina, cuando se sobre expresa REST en células β pancreáticas. Partimos de una línea celular de células β pancreáticas humanas secretoras de insulina (1.1E7), en las que REST no se expresa en condiciones basales. Por tanto, mediante la transfección en esta línea celular utilizando un plásmido que contenga la secuencia codificante para la proteína REST, obtendremos como resultado células β pancreáticas que sobre expresan REST y así poder evaluar cómo afecta la presencia de esta proteína a los niveles de expresión de genes importantes respecto a la línea 1.1E7.

Linearización de pQBI25-REST

La transfección transitoria con plásmidos de gran tamaño muchas veces genera problemas y baja eficiencia de transfección, como en este caso con el plásmido que codifica para REST completo, pQBI-25REST, 9,9 Kb (**fig. 1SA**) en la línea celular 1.1E7. Después de la transfección transitoria de pQBI25-REST en su forma circular obteníamos una eficiencia de transfección promedio de 11% (**fig. 4A**). Debido a que la eficiencia de transfección era relativamente baja y a que realizar múltiples transfecciones transitorias para los ensayos posteriores significarían bastante gasto tanto de reactivos como de tiempo y material, optamos por realizar una transfección estable de REST en 1.1E7. Para esto generamos un corte único en el plásmido pQBI25-REST con las enzimas de *PvuI* o *ScaI* (por separado) para linealizar el plásmido circular, evitando afectar otras regiones esenciales para el funcionamiento del plásmido y la correcta expresión de REST, manteniendo intactas las regiones que

codifican para la proteína GFP y la resistencia a Neomicina para la selección en células eucariotas, así como sitios de poliadenilación y promotores.

Transfección estable de células 1.1E7

Después de verificar la correcta linearización del plásmido (**fig. 2SB**), se procedió a la transfección con lipofectamina LTX plus en las células 1.1E7 y después de 24 h se corrobora que la transfección es correcta en células 1.1E7 a través del análisis de la expresión de GFP mediante un microscopio de fluorescencia. Tras comprobar la fluorescencia, se cosechan las células en PBS1x. Una ventaja de utilizar el plásmido lineal respecto al circular es que la linearización promueve su integración en el genoma de las células β al realizar la transfección, sin embargo, una desventaja es que la eficiencia de transfección disminuye más de la mitad respecto al plásmido circular (**fig. 4A, 4B**), por lo cual al tener pocas células transfectadas con el plásmido, realizamos en sorting células empleando citometría de flujo para separar y seleccionar únicamente las células transfectadas.

Sorting celular

Se realizó el sorting celular, para separar aquellas células que expresan GFP de las que no. Las células recuperadas que expresaban GFP transfectadas con pQBI-25REST restringido con *PvuI* fueron nombradas (1.1E7PvuI-REST) y las células transfectadas con DNA restringido con *Scal* (1.1E7Scal-REST) **fig. 4C**, a las cuales se les añadió un medio condicionado para su recuperación y a las 48 h se realizó la selección con el antibiótico G418 (1000 ug/mL) para que sólo las células que expresen la resistencia a Neomicina sobrevivan. Posterior a esto las células se siguieron cultivando con (500 ug/mL) de G418 durante varias semanas hasta obtener confluencia y estabilidad para poder ser congeladas para los ensayos posteriores.

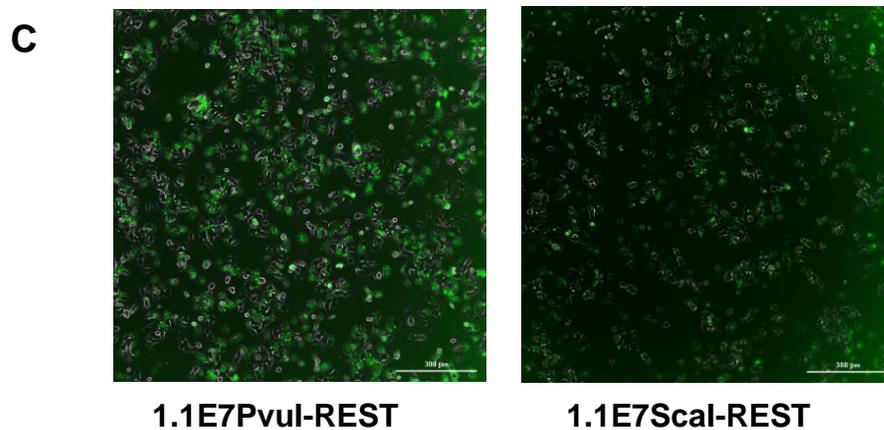
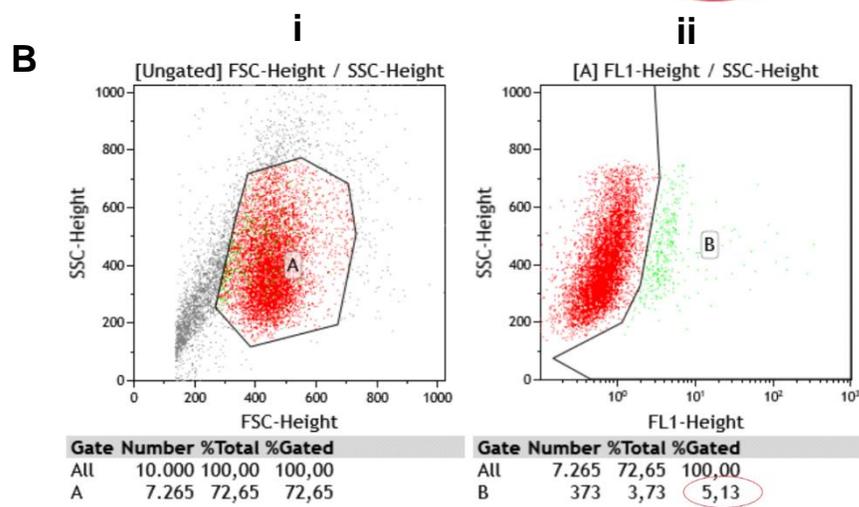
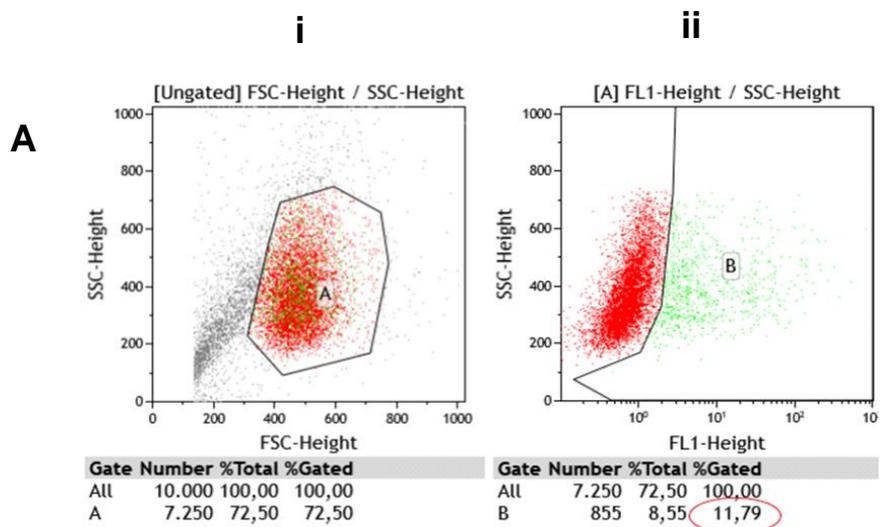


Figura 4. Un modelo biológico de células β pancreáticas que expresan REST de forma estable. En **Ai** se muestran los diagramas de puntos del sorting por citometría de flujo de células transfectadas con el plásmido pQBI-25REST usando la marca fluorescente cy5. De una muestra de 7250 células, 850 células expresan GFP correspondiente al 11,79%. **Aii** Muestra los gráficos de puntos del sorting de las células transfectadas con el plásmido pQBI-25REST linealizado con la enzima de restricción PvuI utilizando el mismo marcador fluorescente. De una muestra de 7265 células, 373 células expresan GFP correspondiente al 5,13%. **C)** Muestra los dos transfectantes estables 1.1E7PvuI-REST y 1.1E7Scal-REST expresando la proteína GFP, analizados por microscopía de fluorescencia, muestran la expresión de la proteína GFP. Curiosamente, tanto la masa celular como el tamaño de las células 1.1E7Scal-REST disminuyen, en comparación con 1.1E7PvuI-REST, donde se observa una mayor proliferación celular, así como un tamaño y una morfología más cercanos a las células 1.1E7.

REST regula positivamente Pdx1 y negativamente la expresión de insulina en células β pancreáticas humanas

Western Blot

Para verificar si REST ejerce un tipo de regulación transcripcional funcional en el gen *PDX1* por interacción con elementos RE1-like, se utilizaron células 1.1E7PvuI-REST, 1.1E7Scal-REST, para evaluar los niveles de Pdx1 e Insulina cuando se sobre expresa REST, mediante ensayos de Western Blot. Junto con las líneas celulares se utilizó la línea 1.1E7 para compararla con las transfectantes estables, y la línea HeLa como control positivo para REST.

La **fig. 5** muestra los resultados de la evaluación de los niveles de proteína. Como era de esperarse REST mostró una alta expresión en las células 1.1E7Scal-REST, muy similar a lo que sucede en células HeLa, en las que REST se expresa en gran proporción. Además, también se observa una ligera expresión de REST en las células 1.1E7PvuI-REST en comparación con las células 1.1E7 las cuales muestra una mínima expresión de esta proteína. Sin embargo, Pdx1 mostró niveles aumentados en las células 1.1E7PvuI-REST y 1.1E7Scal-REST, en comparación con las células 1.1E7. Finalmente, la insulina solo se expresa en las células 1.1E7. Para la normalización de los ensayos se ha utilizado como control de carga β -actina.

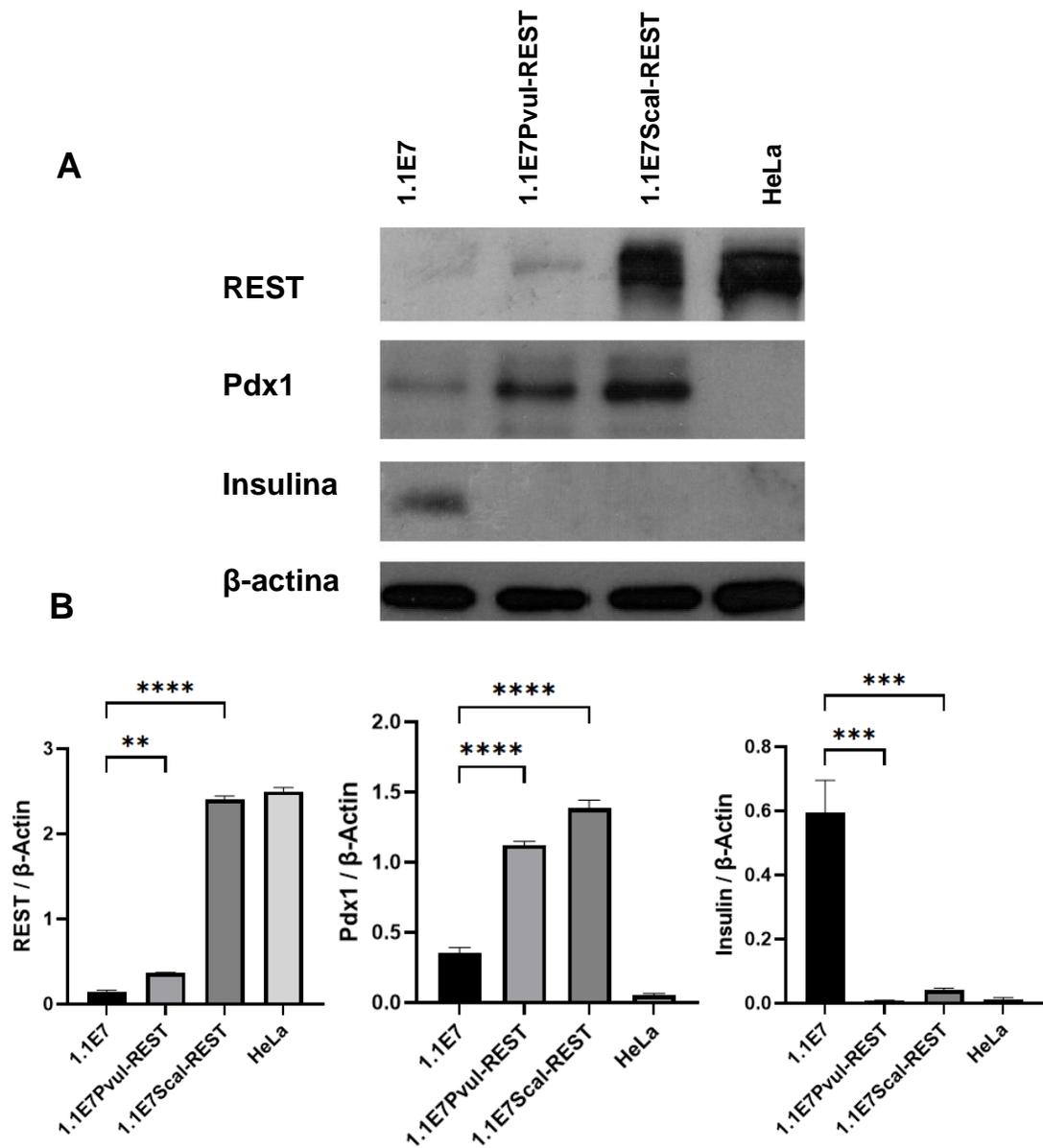


Figura 5. Respuestas transcripcionales de Pdx1 e insulina a REST

A) La figura muestra el análisis de transferencia Western para las proteínas REST, Pdx1 e Insulina utilizando β -actina como control de carga, en las líneas celulares 1.1E7, 1.1E7Pvul-REST, 1.1E7Scal-REST y HeLa. REST muestra una expresión significativa en células 1.1E7Scal-REST y HeLa y ligeramente en 1.1E7Pvul-REST. La proteína Pdx1 muestra un aumento gradual en la expresión si se compara con 1.1E7 de tipo salvaje mediante 1.1E7Scal-REST y 1.1E7Pvul-REST. La expresión de insulina solo está presente en las células 1.1E7, las células que fueron transfectadas con pQBI25-REST y HeLa no muestran la expresión de esta proteína. B) Realizamos un análisis de densitometría usando GelQuantNET en nuestro Western blot y analizamos la significación usando ANOVA unidireccional con la prueba de

Tukey, $p < 0.05$ con el software GraphPad Prism9. Cada experimento se realizó por triplicado. Los resultados se expresan como media + S.E.

Ensayo de gen reportero

Una vez comprobado el efecto de la presencia de REST en la línea de células β pancreáticas mediante western blot, decidimos llevar a cabo los ensayos de luciferasa tanto en la línea celular 1.1E7 como en 1.1E7Pvul-REST, para comprobar el efecto de REST en la expresión de un gen reportero. Para ello realizamos la transfección transitoria en ambas líneas celulares, utilizando el plásmido pPML2 y pRPML2, para evaluar la expresión de luciferasa midiendo las unidades relativas de luz (URL) mediante un luminómetro (**fig. 6**). La información adicional y el proceso de construcción de los plásmidos (**fig. 2,3,4,5S**) se encuentra en el Anexo A.

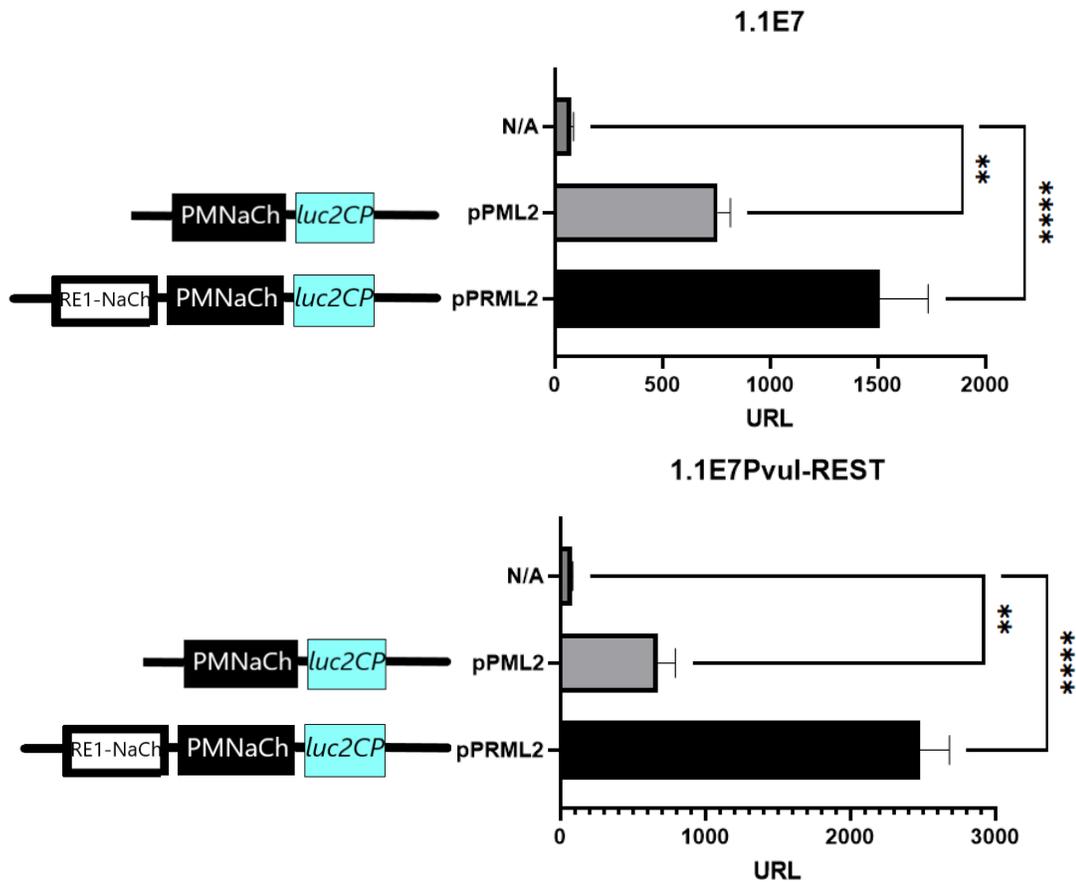


Figura 6. Efecto de REST sobre la expresión de luciferasa en células 1.1E7. En la imagen apreciamos los ensayos de luciferasa tanto en la línea 1.1E7, así como en la transfectante estable 1.1E7Pvul-REST. Cuando se realizó la transfección transitoria del plásmido pPRML2

que contiene el sitio RE1.NavCh se apreció una mayor expresión de Luciferasa, respecto a la transfección con el plásmido pPML2 el cual no posee el elemento RE1-like, tanto en las células 1.1E7 como en 1.1E7Pvul-REST, como control negativo empleamos las células sin transfectar (N/A). Sin embargo, al comparar la expresión de luciferasa entre las dos líneas, se ve claramente que en la línea que expresa REST hay un aumento considerable en la expresión de luciferasa, lo que indicaría que la presencia de REST está realizando una regulación positiva y específica mediante la unión a este elemento RE1.NavCh, para este ensayo se usaron 7×10^5 células de cada una de las líneas celulares.

Cabe mencionar que estos ensayos solo son preliminares y se tienen que estudiar a detalle más adelante, empleando los controles adecuados y las dos construcciones adicionales que realizamos (pR2PML2 y pR4PML2) las cuales contienen los sitio RE1-like 2 y 4 respectivamente, para así comparar su comportamiento con el control positivo (RE1.NavCh). Además, faltaría realizar estos ensayos en otro modelo biológico distinto, como lo son las células HeLa que también expresan la proteína REST, pero sin embargo en este modelo se ha visto que la presencia de REST reprime la expresión de luciferasa, a diferencia de nuestro modelo en el cual, pareciera que la presencia de REST activa la expresión de luciferasa.

Discusión de Resultados

Los ensayos de movilidad electroforética (EMSA) mostraron comportamientos similares entre los complejos formados por la proteína nuclear y los elementos RE1.NavCh, RE1.1 y RE1.2-like del gen *PDX1*, interesantemente estos dos sitios se encuentran localizados en la región río arriba del promotor de *PDX1* (**tabla 2**). Adicionalmente, los tres elementos RE1-like restantes también mostraron un grado de unión a REST (**fig. 1**), sin embargo, RE1.3-like es el elemento con menor similitud respecto a la secuencia consenso RE1, y los dos elementos restantes se encuentran localizados en la región río abajo *PDX1* lejos del promotor (RE1.4 y 5-like), por lo cual se descartaron a estas tres secuencias candidatas para ser consideradas como elementos RE1 canónicos de regulación de *PDX1* y de experimentos posteriores.

Para los ensayos de competencia se tomó como referencia la intensidad de la banda correspondiente al complejo de unión de RE1.NavCh con la proteína REST (**fig. 2**), y a partir de esta se realizó un análisis para determinar qué secuencias RE1-like mostraban un patrón de intensidad similar o mayor, encontrando que los elementos RE1.1 y RE1.2-like mostraron un comportamiento similar al elemento de referencia RE1-NavCh (control positivo), y que cuando se agregó un competidor en frío específico, hubo una disminución en la intensidad de las bandas, lo que nos indica que están compitiendo por la misma proteína ambas secuencias (**fig. 1, carril 2**).

Para demostrar que los complejos observados en los ensayos EMSA eran específicos de la interacción del factor de transcripción REST y los elementos RE1, se realizaron ensayos de super-retardamiento utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra REST y un anticuerpo no relacionado (anti-HA) como control negativo. Los resultados muestran que los complejos de retardamiento observados se desplazan hacia arriba cuando utilizamos el anticuerpo específico contra REST, observándose un super-retardamiento tanto en los complejos RE1.NavCh como con los elementos RE1.1 y RE1.2-like del gen *PDX1*, mientras que los complejos de retardamiento cuando se les

agrega el anticuerpo anti-HA no muestran cambio alguno en la movilidad electroforética. Estos resultados nos sugieren que los complejos formados con los elementos RE1-like del gen *PDX1* se deben a la unión del factor de transcripción REST y muy probablemente esta proteína podría estar participando activamente en la regulación de *PDX1*, el cual a su vez es un factor de transcripción importante para el mantenimiento y diferenciación de las células β pancreáticas. Así como de la biosíntesis y secreción de insulina.

Para demostrar que la unión de REST a los elementos RE-1.1 y RE1.2-like de *PDX1*, es específica y para comprobar que esta interacción ocurre fisiológicamente en las células en condiciones *in vivo*, procedimos a realizar ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en células HeLa. Los resultados de los ensayos de ChIP muestran que cuando se emplea el DNA obtenido de la precipitación con el anticuerpo contra REST para la reacción de PCR se obtiene amplificación cuando se utilizan los oligonucleótidos que flanquean los sitios RE1.NavCh y RE1.1 y RE1.2. RE1.NavCh al ser un sitio de unión comprobado a REST su producto de amplificación muestra una alta intensidad, respecto a los otros dos sitios, sin embargo, ambos sitios también parecen ser sitios de unión a REST en mayor medida el sitio RE1.2.

Para demostrar que la unión de REST a los elementos RE1-like es funcional, se decidió llevar a cabo el diseño y obtención de transfectantes estables utilizando la línea celular 1.1E7. Se obtuvieron dos líneas transfectantes estables que expresan REST por medio de la transfección de un plásmido que porta el gen REST (pQBI25-REST); la primera llamada 1.1E7PvuI-REST obtenida al utilizar el plásmido pQBI25-REST restringido con *PvuI*, y la segunda llamada 1.1E7ScaI-REST utilizando el plásmido cortado con *ScaI*. Ambas líneas celulares fueron seleccionadas por citometría de flujo y sorting, ya que expresan una proteína de fusión GFP-REST y además expresan el gen de resistencia al antibiótico Neomicina. El análisis de expresión de REST mostró que ambas líneas celulares expresan constitutivamente REST. Sin embargo, la transfectante 1.1E7ScaI-REST muestra una sobreexpresión 3

veces mayor que 1.1E7Pvul-REST, así como la pérdida de la morfología característica de las células 1.1E7 y una proliferación más lenta (**fig. 4C**).

Los ensayos de western blot demostraron que la presencia de REST en células pancreáticas resulta inesperadamente, en que REST en lugar de silenciar la expresión del Pdx1, provoca un aumento de 2-3 veces más respecto a las células control, esto es interesante por el contraste con la cantidad en la expresión de Insulina la cual se ve abatida en este tipo de células que expresan REST y que es algo que coincide con reportes previos en los cuales, la presencia de esta proteína en estudios islotes pancreáticos resulta en la disminución de la expresión de insulina [52].

Los resultados obtenidos por ensayos preliminares de gen reportero indican que la presencia de REST en la línea celular 1.1E7Pvul-REST, después de transfectar estas células con el plásmido pRPML2 (el cual contiene el RE1.NavCH y el PMI del gen de canal de sodio tipo II), aumenta sustancialmente la expresión de luciferasa en comparación con células 1.1E7, lo que correlaciona con los resultados obtenidos en los ensayos de western blot, en donde REST funciona como un potenciador de la expresión de Pdx1. De cualquier manera, faltaría evaluar la expresión de luciferasa con los sitios RE1-like de *PDX1* que clonamos en los plásmidos pR2PML2 y pR4PML2 y empleando los controles adecuados, para validar estos resultados.

Con todo lo anterior podemos inferir que REST en efecto se une a los elementos RE1.1 y RE1.2-like de *PDX1* e interesadamente en estas líneas celulares dicha unión promueve el aumento en la expresión de la proteína Pdx1. Estudios previos han demostrado que REST puede tener actividad potenciadora y activadora. Este tipo de regulación positiva ejercida por REST completo ya se ha visto previamente en el linaje neuronal con la regulación transcripcional de genes como Dynamin I [53] tirosina hidroxilasa [54] y se informó anteriormente que REST activa sus genes blanco mediante el reclutamiento de proteínas coactivadoras como hidroxilasa 3 de translocación diez-once (TET3) y proteína 3 del dominio SET de unión al receptor nuclear

(NSD3) [56]. También encontramos que la sobreexpresión de la proteína Pdx1 no conduce a un aumento en la expresión de insulina. Por el contrario, los resultados muestran que se inhibe la expresión de insulina; desconocemos el mecanismo que conduce a esta no expresión del gen que regula los niveles de glucosa. Sin embargo, una posible explicación sería que, aunque REST promueva la expresión de Pdx1 en este tipo de células, su función como represor de otros genes importantes para la biosíntesis y secreción de insulina como se ha reportado previamente [56] podría ser de mayor relevancia que la regulación positiva de Pdx1, resultando esto en la disminución de la expresión de insulina. Otra posible explicación sería que Pdx1 a pesar de aumentar su expresión en esta línea celular no lleva a cabo su función al encontrarse inactiva o no encontrarse en el núcleo, de cualquier modo, estas posibilidades serán evaluadas más adelante, todo este conjunto de posibles mecanismos es desglosado en la **(fig. 7)**. De cualquier modo, el efecto de REST en los niveles de Pdx1 e insulina en células β pancreáticas es innegable. Nuestros resultados demostraron, que la sobre expresión de REST influye en la regulación de la mayoría de los genes endocrinos implicados en el correcto funcionamiento de las células β pancreáticas humanas. Todo lo anterior indica que la regulación que REST ejerce sobre genes pancreáticos, así como en algunos miRNAs [57] es muy relevante y aún no ha sido del todo discernida, dejando la puerta abierta a descubrir nuevos mecanismos mediados por REST implicados en la alteración de la función de las células β y el desarrollo de enfermedades como la diabetes.

Finalmente, podemos utilizar la línea celular generada (1.1E7Scal-REST) que expresa REST de manera estable (y en mayor cantidad que la otra transfectante), como un modelo de estudio para buscar nuevos mecanismos de regulación de genes pancreáticos en los cuales la proteína REST podría estar implicada.

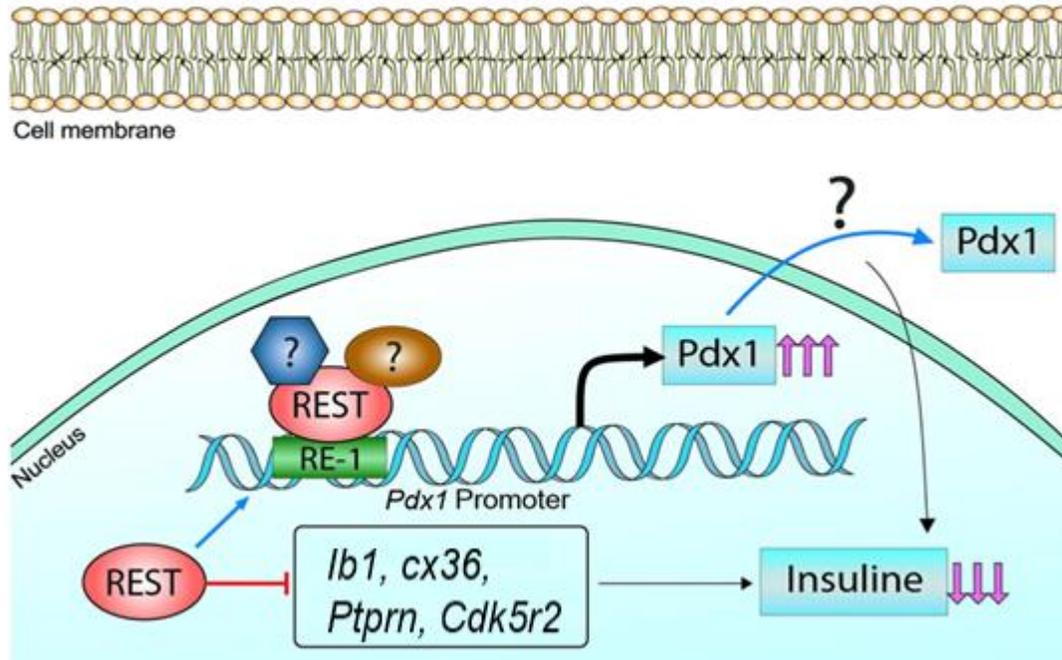


Figura 7. El efecto de REST en células β -pancreáticas. En la figura se muestra un mecanismo propuesto en base a nuestros hallazgos mediante el cual REST regula al gen de PDX1. REST se une a elementos RE1-like presentes en el promotor de PDX1 y es posible que reclute otras enzimas coactivadoras o remodeladoras de la cromatina para promover la expresión de Pdx1. Sin embargo, podría ser que el Pdx1 sobre expresado se encuentre inactivo o que haya sido traslocado al citoplasma, adicionalmente podría ser que REST este regulando de manera negativa genes importantes involucrados en la biosíntesis de la insulina, lo que implica una reducción sustancial en la expresión de esta proteína y justificaría los niveles de insulina a la baja.

Conclusiones

Se determinó la unión *in vitro* e *in vivo* del factor de transcripción REST a dos elementos RE1 (RE1.1 y RE1.2-like) en la región de regulación transcripcional del gen *PDX1*, mediante ensayos EMSA y ChIP respectivamente.

Derivado de este trabajo se obtuvo un modelo biológico (1.1E7Scal-REST) de células β -pancreáticas humanas las cuales sobre expresan la proteína REST de forma estable. Esto es de gran relevancia ya que se ha demostrado que REST regula varios genes y está implicado con el correcto metabolismo de este tipo de células, con el cual se puede ampliar el estudio de este factor de transcripción y de cómo interviene en la regulación de genes pancreáticos, así como en la función de estas células.

Nuestros resultados obtenidos mediante ensayos de western blot muestran que la presencia de REST en las transfectantes estables 1.1E7Pvul-REST y 1.1E7Scal-REST, induce un aumento en los niveles de expresión de Pdx1 el cual es un factor de transcripción primordial para la correcta función y diferenciación de estas células. Este incremento de los niveles de Pdx1 podría deberse a que REST se une a los elementos RE1-*like* presentes en el promotor de *PDX1* (RE1.1, RE1.2-like), actuando como un activador de la transcripción, y/o actuando de manera indirecta, apagando genes que reprimen la expresión de Pdx1. Curiosamente este aumento de los niveles de Pdx1 no se ve reflejado en un aumento en la expresión de insulina, lo que podría indicar que Pdx1 este tipo de células se encuentra en forma inactiva, no sé encuentra localizado en el núcleo o bien que simplemente la represión transcripcional ejercida por REST hacia otros genes de importancia para la biosíntesis y secreción insulina es de mayor relevancia que el aumento de Pdx1.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo nos proporcionan información valiosa sobre el entorno molecular y el contexto biológico de la línea celular 1.1E7 y lo que podría tratarse de un nuevo mecanismo regulador de Pdx1 e insulina en células β -pancreáticas humanas.

Perspectivas

Realizar la búsqueda de posibles coactivadores o proteínas remodeladoras de la cromatina, que sean reclutadas por REST que nos permitan discernir el mecanismo mediante el cual se promueve la expresión de Pdx1 en las líneas 1.1E7Pvul-REST y 1.1E7Scal-REST.

Determinar si la proteína Pdx1 presente en estas en estas líneas celulares se encuentra en su forma activa fosforilada y evaluar si es capaz de ejercer su función como factor de transcripción de sus genes blanco en células β .

Evaluar si la proteína Pdx1 presente en estas líneas celulares efectivamente se encuentra localizada en el núcleo en donde ejerce su función como factor de transcripción, mediante un análisis de microscopía confocal y western blot de los distintos compartimentos celulares.

Realizar estudios de proteómica en estas líneas celulares, para evaluar las diferencias entre el proteoma de estas y las células 1.1E7, haciendo énfasis en factores de transcripción o proteínas involucradas en la regulación y biosíntesis de Pdx1 e insulina, para determinar nuevos mecanismos de regulación transcripcional, involucrados con estos genes en células β pancreáticas que expresan REST.

Anexos A Material adicional

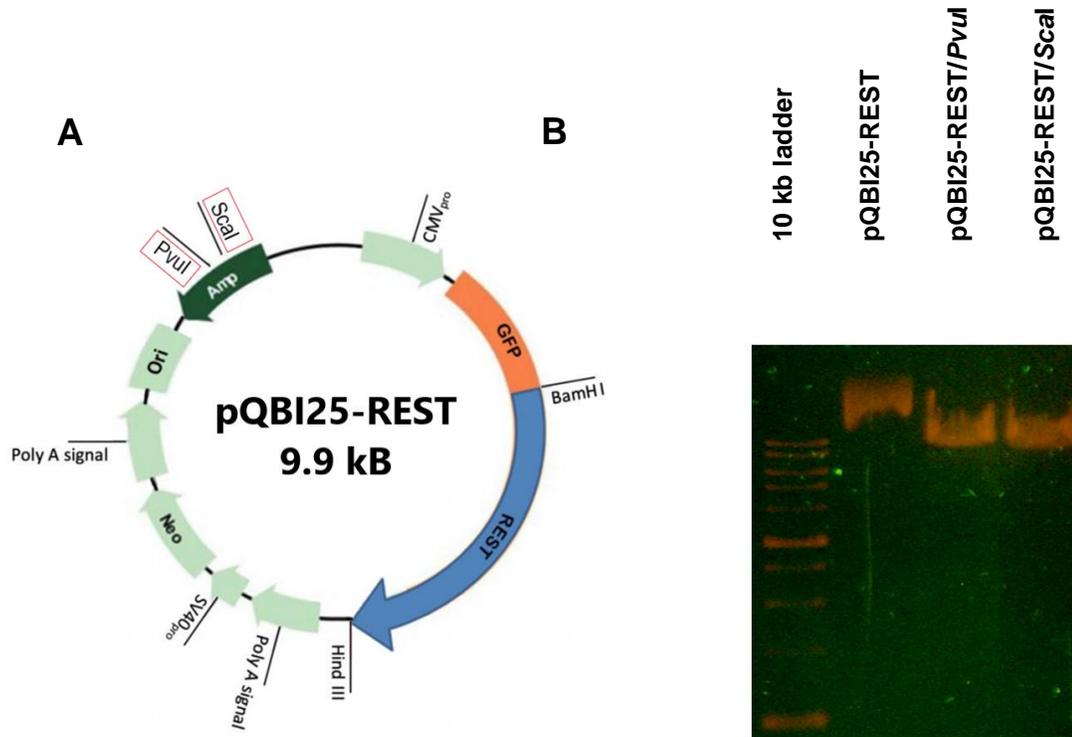


Fig.1S pQBI25-REST. A) pQBI25-REST contiene todo lo necesario para la expresión de la proteína REST en células eucariotas, REST se encuentra como proteína de fusión en conjunto con GFP, lo que le permite seguir la expresión de ambas proteínas por fluorescencia, así como poder separarlas y seleccionarlas con esa marca fluorescente. Los cortes realizados con las enzimas de restricción Scal o PvuI se realizaron específicamente en el casete de ampicilina para permitir su integración en el DNA genómico de las células, así como para evitar dañar otros sitios esenciales del plásmido y no afectar su correcta expresión. B) Después de la linealización del plásmido pQBI25-REST, el resultado de la reacción se inactivó a 80 °C durante 20 min. Para comprobar la correcta linealización del plásmido pQBI25-REST con las enzimas de restricción PvuI o Scal se realizó una electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1.2%, en el carril 2 observamos el DNA correspondiente al plásmido pQBI25-REST sin restricción, el carril 3 y 4 muestran el DNA del plásmido linealizado por las enzimas PvuI y Scal, respectivamente. Este DNA lo usamos posteriormente en los ensayos de transfección.

Construcción de plásmidos con gen reportero

Para la construcción de los plásmidos que empleamos después en los ensayos de luciferasa, partimos de un plásmido pRPM que contiene el promotor mínimo

indispensable de canal de sodio tipo II (PMNaCh) que incluye el sitio RE1 de unión a REST y del plásmido pGL4.16 del cual contiene el gen de luciferasa de luciérnaga (Luc2).

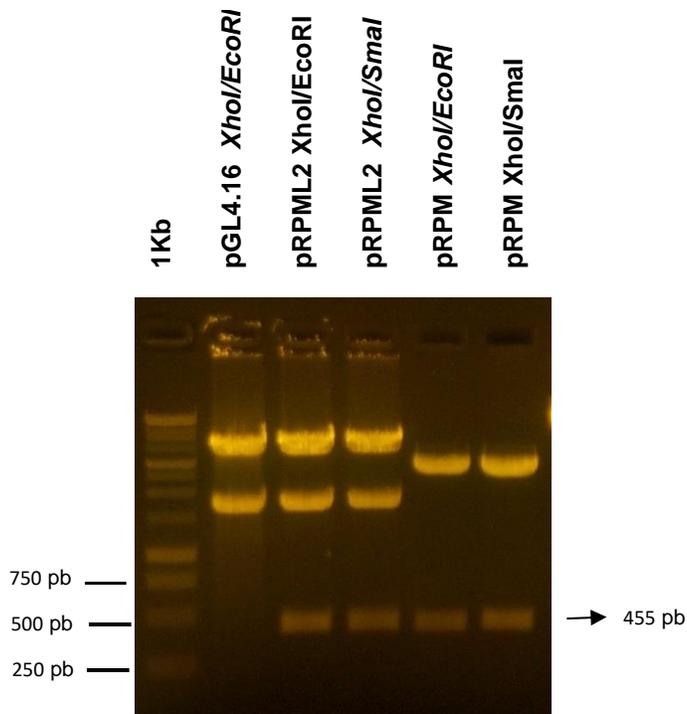
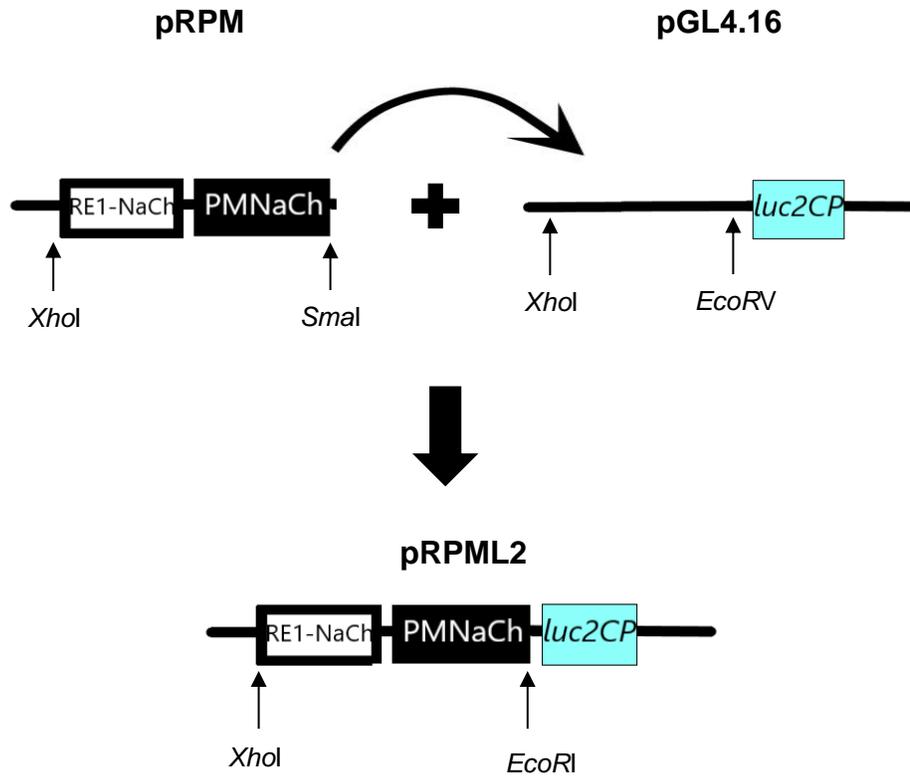


Fig.2S. Plásmido pRPML2. Análisis por PCR de la construcción pRPML2, el cual contiene el promotor mínimo indispensable de NavCh, el sitio RE1.NavCh y el gen de luciferasa 2. Al cortar este plásmido el par de enzimas de restricción XhoI-EcoRI, se libera un fragmento que contiene el PMNaCh con el adyacente sitio RE1 NavCh, en la imagen se muestra la comparativa de dos clonas candidatas con el plásmido pGL4.16 y el plásmido pRPM, el gel de agarosa se usó al 1.2% con un tiempo de corrida de 1 h a 100 Volts.

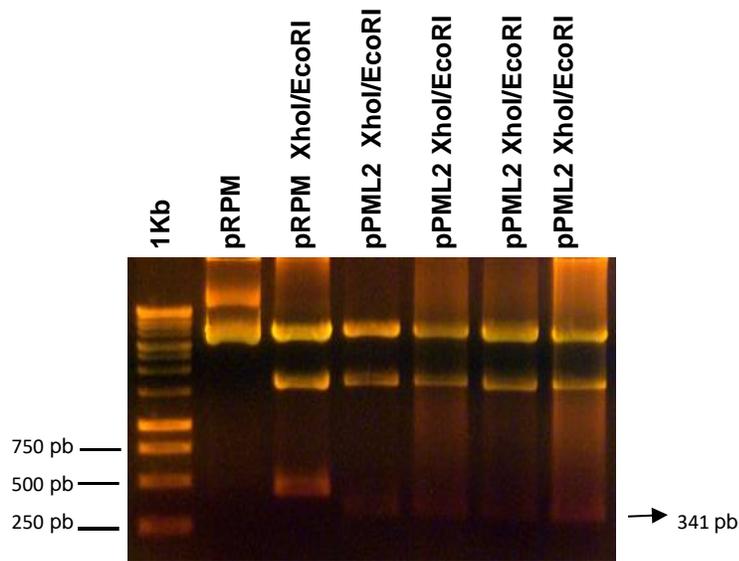
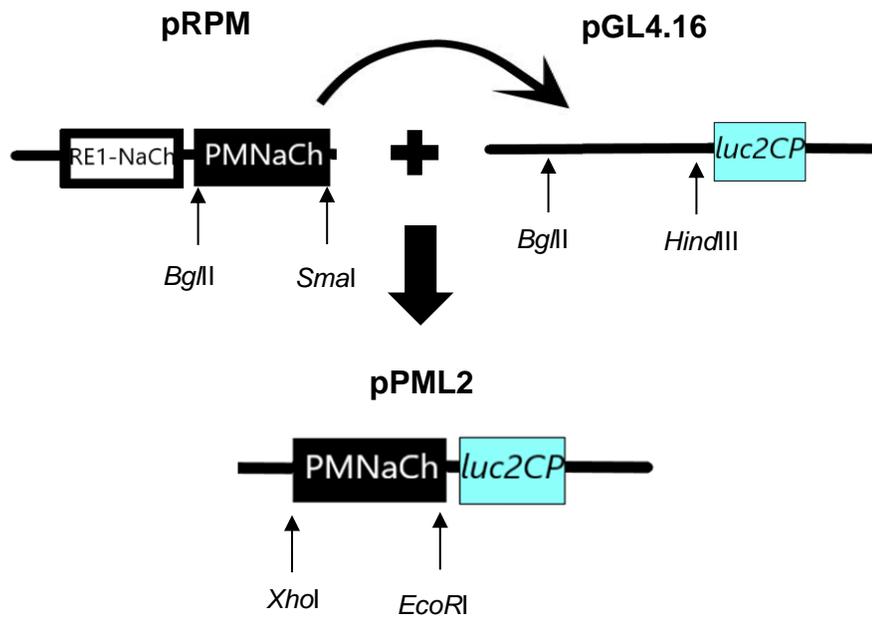
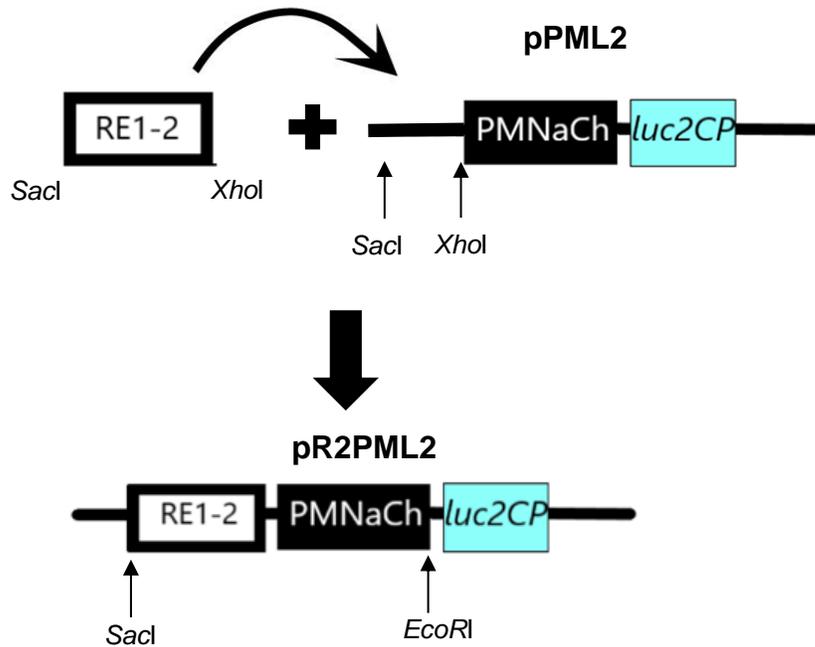


Fig. 3S. Plásmido pPML2. Análisis por de la construcción pPML2, el cual contiene el promotor mínimo indispensable de NaCh, gen de luc2, sin el sitio RE1.NavCh. Al cortar este plásmido el par de enzimas de restricción XhoI-EcoRI, se libera un fragmento que contiene el PMNaCh, en la imagen se muestra la comparativa con el plásmido pRPM carril 2 con 4 de las clonas candidatas resultantes, el gel de agarosa se usó al 1.2% con un tiempo de corrida de 1 h a 100 Volts.

pR2PML2

De acuerdo con los resultados anteriormente los cuales sugieren que RE1.2 es el elemento que se une a REST que estaría más involucrado con su regulación, decidimos construir un plásmido que tuviera este elemento para ver si su presencia modifica la regulación de la expresión de la luciferasa.



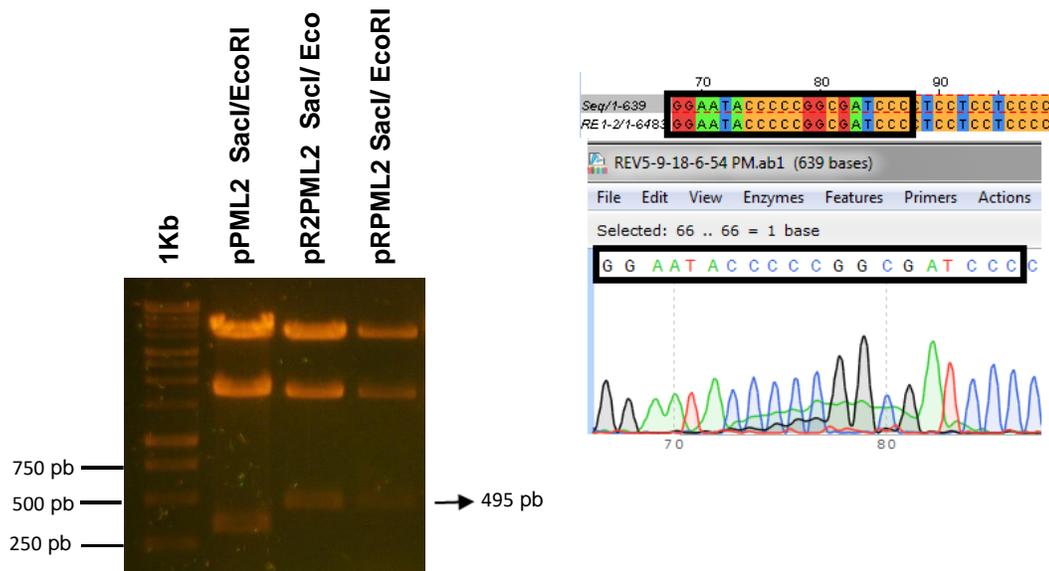


Fig. 4S. Plásmido pR2PML2. Análisis por de la construcción pR2PML2, el cual contiene el promotor mínimo indispensable de NaCh, el gen de luc2, y el sitio RE1-2. Al cortar este plásmido el par de enzimas de restricción SacI-EcoRI, se libera un fragmento que contiene la región que contiene el RE1.2-like unido al PMNaCh, en la imagen se muestra la comparativa con el plásmido pPRPM carril 2 con dos de las clonas candidatas resultantes, así como el análisis de la secuenciación del plásmido para verificar la integridad del sitio RE1.2-like utilizando el software SnapGene viewer, el gel de agarosa se usó al 1.2% con un tiempo de corrida de 1 h a 100 Volts.

pR4PML2

Adicionalmente al sitio RE1.2 se decidió emplear también el RE1.4-like debido a que es el sitio que mayor similitud tenía con la región consenso, sin embargo, no posee las dos guaninas indispensables para unión a REST lo cual pudiera servirnos como un control negativo para nuestro análisis y para verificar la importancia de la integridad del core en las secuencias de unión a REST.

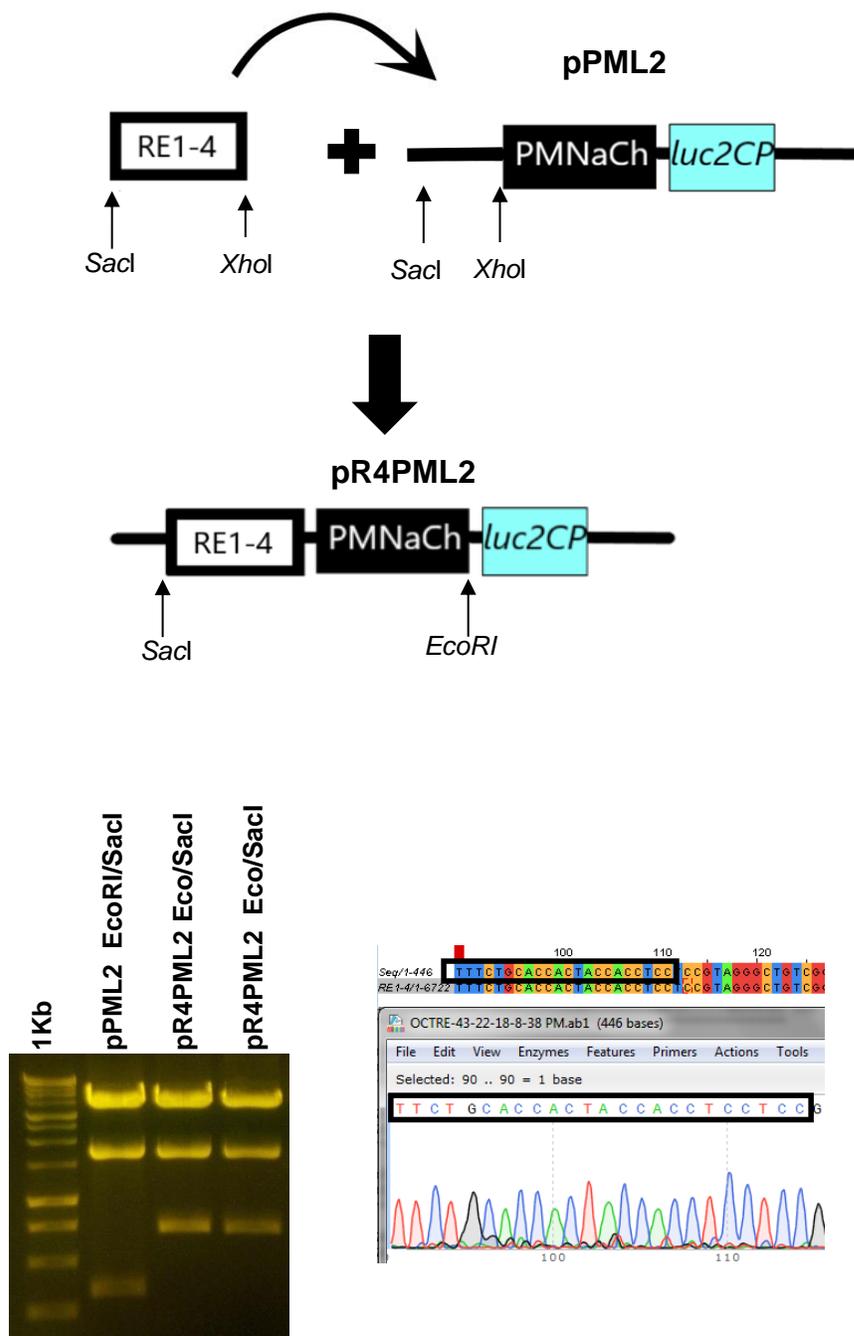


Fig. 5S. Plásmido pR4PML2. Análisis por de la construcción pR4PML2, el cual contiene el promotor mínimo indispensable de NaCh, el gen de luc2, y el sitio RE1.4. Al cortar este plásmido el par de enzimas de restricción SacI-EcoRI, se libera un fragmento que contiene la región que contiene el RE1.4-like unido al PMNaCh, en la imagen se muestra la comparativa con el plásmido pPRPM carril 2 con dos de las clonas candidatas resultantes, así como el análisis de la secuenciación del plásmido para verificar la integridad del sitio RE1.4-like

utilizando el software SnapGene viewer, el gel de agarosa se usó al 1.2% con un tiempo de corrida de 1 h a 100 Volts.

Anexos B Soluciones y Buffers

A. Soluciones para western blot

Buffer de electroforesis de proteína SDS PAGE 10X

| | |
|---------------------------------|---------|
| Tris-Base | 30.2 g |
| Glicina | 144.1 g |
| SDS | 10 g |
| Aforar a 1 L con agua destilada | |

TBS-T 10X pH= 7.6

| | |
|--|---------|
| Tris-base | 13.9 g |
| NaCl | 87.66 g |
| Tris-HCl | 60.6 g |
| Aforar a 1 L con agua destilada | |
| Añadir Tween 20 al 0.5% y preparar al 1X antes de su uso | |

Buffer de transferencia 10X pH= 8.3

| | |
|---|--------|
| Tris-base | 58.1 g |
| Glicina | 28.8 g |
| Aforar a 1L con agua destilada | |
| Para su uso hacerlo 1X y agregarle 20% de metanol | |

Gel desnaturizante SDS-PAGE 8% (10 mL)

| | |
|---------------------|----------|
| H ₂ O | 4.6 mL |
| 30% Acrilamida mix | 2.7 mL |
| 1.5 M Tris (pH=8.8) | 2.5 mL |
| 10% SDS | 0.1 mL |
| 10% APS | 0.1 mL |
| TEMED | 0.012 mL |

Gel STACK (4mL)

| | |
|----------------------|---------|
| H ₂ O | 2.7 mL |
| 30% Acrilamida mix | 0.67 mL |
| 1.0 M Tris (pH= 6.8) | 0.5 mL |
| 10% SDS | 0.04 mL |
| 10% APS | 0.04 mL |

| | |
|-------|----------|
| TEMED | 0.004 mL |
|-------|----------|

B. Anticuerpos para Western Blot

| Anticuerpo | Tipo | Región de unión | Tamaño (KDa) | Marca |
|-----------------|--------------------------|----------------------|--------------|------------|
| Insulin (H-86) | IgG policlonal de conejo | Aminoácidos 25-110 | 34 | Santa Cruz |
| PDX-1 (H-140) | IgG policlonal de conejo | Aminoácidos 1-140 | 46 | Santa Cruz |
| β -Actina | IgG policlonal de ratón | - | 43 | - |
| REST (07-579) | IgG policlonal de conejo | Aminoácidos 801-1097 | 116 | Millipore |

Bibliografía

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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 AI, 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.
- [5] 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.
- [7] 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 β -cells against glucose toxicity. *Diabetes* 48:2398–2406.

- [9] Kaneto H, Matsuoka T aki. 2012. Involvement of oxidative stress in suppression of insulin biosynthesis under diabetic conditions. *Int J M*
- [10] Hideaki Kaneto, Takeshi Miyatsuka, Dan Kawamori and Taka-aki Matsuoka, Pleiotropic Roles of PDX-1 in the Pancreas, The review of diabetic studies, 2008,4,4,209-225.
- [11] American Diabetes Association. 2011. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34 Suppl 1: S62–9.
- [12] F. Atouf, P. Czernichow, and R. Scharfmann. Expression of neuronal traits in pancreatic beta cells. The implication of neuron-restrictive silencing factor/repressor element silencing transcription factor, a neuron-restrictive silencer. *J Biol Chem*, 272(3):1929–1934, Jan 1997.
- [13] Parviz M Pour and Murat Saruc. The pattern of neural elements in the islets of the normal and diseased pancreas and in isolated islets. *JOP*, 12(4):395–403, Jul 2011.
- [14] Yuichi Hori, Xueying Gu, Xiaodong Xie, and Seung K Kim. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. *PLoS Med*, 2(4):e103, Apr 2005.
- [15] Runhild Gammelsaeter, Thierry Coppola, Païkan Marcaggi, Jon Storm-Mathisen, Farrukh A Chaudhry, David Attwell, Romano Regazzi, and Vidar Gundersen. A role for glutamate transporters in the regulation of insulin secretion. *PLoS One*, 6(8):e22960, 2011.
- [16] Domenico Del Turco, Carl Gebhardt, Guido J Burbach, Samuel J Pleasure, Daniel H Lowenstein, and Thomas Deller. Laminar organization of the mouse dentate gyrus: insights from beta2/neuro d mutant mice. *J Comp Neurol*, 477(1):81–95, Sep 2004.
- [17] Young-Hye You, Dong-Sik Ham, Heon-Seok Park, Marie Rhee, Ji-Won Kim, and Kun-Ho Yoon. 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(2):119–129, Apr 2011.

[18] P. L. Brubaker and D. J. Drucker. Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology*, 145(6):2653–2659, Jun 2004.

[19] P. Kallunki, G. M. Edelman, and F. S. Jones. The neural restrictive silencer element can act as both a repressor and enhancer of I1 cell adhesion molecule gene expression during postnatal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6):3233–3238, Mar 1998.

[20] J. Tapia-Ramírez, B. J. Eggen, M. J. Peral-Rubio, J. J. Toledo-Aral, and G. Mandel. 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(4):1177–1182, Feb 1997.

[21] Rubén García-Sánchez, Jorge Ayala-Luján, Ascensión Hernández-Peréz, Tomás Mendoza-Figueroa, and José Tapia-Ramírez. 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*, 1620(1-3):39–46, Mar 2003.

[22] Haidong Gu, Yu Liang, Gail Mandel, and Bernard Roizman. 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(21):7571–7576, May 2005.

[23] A. You, J. K. Tong, C. M. Grozinger, and S. L. Schreiber. Corest is an integral component of the corest- human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4):1454–1458, Feb 2001.

[24] A. Roopra, L. Sharling, I. C. Wood, T. Briggs, U. Bachfischer, A. J. Paquette, and N. J. Buckley. Transcriptional repression by neuron-restrictive

silencer factor is mediated via the sin3-histone deacetylase complex. *Mol Cell Biol*, 20(6):2147–2157, Mar 2000.

[25] K. Palm, N. Belluardo, M. Metsis, and T. Timmusk. Neuronal expression of zinc finger transcription factor rest/nrsf/xbr gene. *J Neurosci*, 18(4):1280–1296, Feb 1998.

[26] Chun Sung Kim, Hack Sun Choi, Cheol Kyu Hwang, Kyu Young Song, Byung-Kwon Lee, Ping-Yee Law, Li-Na Wei, and Horace H Loh. 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(22):6392–6403, 2006.

[27] Andrew J Bingham, Lezanne Ooi, Lukasz Kozera, Edward White, and Ian C Wood. The repressor element 1-silencing transcription factor regulates heart-specific gene expression using multiple chromatin-modifying complexes. *Mol Cell Biol*, 27(11):4082–4092, Jun 2007.

[28] A. Abderrahmani, M. Steinmann, V. Plaisance, G. Niederhauser, J. A. Haefliger, V. Mooser, C. Bonny, P. Nicod, and G. Waeber. The transcriptional repressor rest determines the cell-specific expression of the human mapk8ip1 gene encoding ib1 (jip-1). *Mol Cell Biol*, 21(21):7256–7267, Nov 2001.

[29] Daniel M Kemp, Julia C Lin, and Joel F Habener. Regulation of pax4 paired homeodomain gene by neuron-restrictive silencer factor. *J Biol Chem*, 278(37):35057–35062, Sep 2003.

[30] David Martin, Thomas Tawadros, Laure Meylan, Amar Abderrahmani, Daniele F Condorelli, Gérard Waeber, and Jacques-Antoine Haefliger. 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(52):53082–53089, Dec 2003.

[31] Helena Edlund. Pancreatic organogenesis—developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet*, 3(7):524–532, Jul 2002.

- [32] Guoqiang Gu, Juliana R Brown, and Douglas A Melton. Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis. *Mech Dev*, 120(1):35–43, Jan 2003.
- [33] Maria E Wilson, David Scheel, and Michael S German. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev*, 120(1):65–80, Jan 2003.
- [34] Daniella A Babu, Tye G Deering, and Raghavendra G Mirmira. A feat of metabolic proportions: Pdx1 orchestrates islet development and function in the maintenance of glucose homeostasis. *Mol Genet Metab*, 92(1-2):43–55, 2007.
- [35] D. Melloul, S. Marshak, and E. Cerasi. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*, 45(3):309–326, Mar 2002.
- [36] Hongxiang Hui and Riccardo Perfetti. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *Eur J Endocrinol*, 146(2):129–141, Feb 2002.
- [37] M. Gannon, L. W. Gamer, and C. V. Wright. Regulatory regions driving developmental and tissue-specific expression of the essential pancreatic gene *pdx1*. *Dev Biol*, 238(1):185–201, Oct 2001.
- [38] S. Marshak, E. Benshushan, M. Shoshkes, L. Havin, E. Cerasi, and D. Melloul. 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(20):7583–7590, Oct 2000.
- [39] K. Gerrish, M. Gannon, D. Shih, E. Henderson, M. Stoffel, C. V. Wright, and R. Stein. Pancreatic beta cell-specific transcription of the *pdx-1* gene. the role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3beta sites. *J Biol Chem*, 275(5):3485–3492, Feb 2000.
- [40] E. Ben-Shushan, S. Marshak, M. Shoshkes, E. Cerasi, and D. Melloul. 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(20):17533–17540, May 2001.

[41] K. Gerrish, M. A. Cissell, and R. Stein. The role of hepatic nuclear factor 1 alpha and pdx-1 in transcriptional regulation of the pdx-1 gene. *J Biol Chem*, 276(51):47775–47784, Dec 2001.

[42] J. Qian, E. N. Kaytor, H. C. Towle, and L. K. Olson. Upstream stimulatory factor regulates pdx-1 gene expression in differentiated pancreatic beta-cells. *Biochem J*, 341 (Pt 2):315–322, Jul 1999.

[43] Yoshio Fujitani, Transcriptional regulation of pancreas development and β -cell function, *Endocrine Journal, Review*, 2017, 64 (5), 477-486

[44] Rebecca A Simmons. Developmental origins of beta-cell failure in type 2 diabetes: the role of epigenetic mechanisms. *Pediatr Res*, 61(5 Pt 2):64R–67R, May 2007.

[45] Jun H Park, Doris A Stoffers, Robert D Nicholls, and Rebecca A Simmons. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of pdx1. *J Clin Invest*, 118(6):2316–2324, Jun 2008.

[46] Carol Hamelink, Sung Ho Hahm, Heather Huang and Lee E. Eiden, A restrictive element 1 (RE-1) in the VIP gene modulates transcription in neuronal and non-neuronal cells in collaboration with an upstream tissue specifier element, *Journal of Neurochemistry*, 88, 1091–1101, 2004

[47] Antonio Fernández Pérez and Mario Vallejo, Pdx1 and USF transcription factors co-ordinately regulate Alx3 gene expression in pancreatic β -cells. *Biochem*. 463 (2): 287–296, 2014.

[48] K. Cartharius, K. Frech, K. Grote, B. Klocke, M. Haltmeier, A. Klingenhoff, M. Frisch, M. Bayerlein, and T. Werner. MatInspector and

beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, 21(13):2933–2942, Jul 2005.

[49] Nicolas Jullien and Jean-Paul Herman. LUEGO: a cost and time saving gel shift procedure, *BioTechniques*, Vol. 51, 4:267–269, 2011.

[50] J. A. Chong, J. Tapia-Ramírez, S. Kim, J. J. Toledo-Aral, Y. Zheng, M. C. Boutros, Y. M. Altshuller, M. A. Frohman, S. D. Kraner, and G. Mandel. Rest: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell*, 80(6):949–957, Mar 1995.

[51] Grant Stuchbury, Gerald Münch. Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA. *Cytotechnology*, 62:189–194, 2010.

[52] D. Martin, F. Allagnat, G. Chaffard, D. Caille, M. Fukuda, R. Regazzi, A. Abderrahmani, G. Waeber, P. Meda, P. Maechler, J.-A. Haefliger. Functional significance of repressor element 1 silencing transcription factor (REST) target genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia* (2008) 51:1429–1439.

[53] Jiyun Yoo, Moon-Jin Jeong, Sang Seop Lee, Kyung Im Lee, Byoung-Mog Kwon, Dong Sun Kim, Young-Mee Park, and Mi Young Han, The Neuron Restrictive Silencer Factor Can Act as an Activator for Dynamin I Gene Promoter Activity in Neuronal Cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2001) 283, 928–932.

[54] Edward Pajarillo, Asha Rizor, Deok-Soo Son, Michael Aschner, and Eunsook Lee, The transcription factor REST up-regulates tyrosine hydroxylase and antiapoptotic genes and protects dopaminergic neurons against manganese toxicity, *Biol. Chem.* (2020) 295(10) 3040 –3054.

[55] Arshan Perera, David Eisen, Thomas Carell, Stylianos Michalakis, TET3 Is Recruited by REST for Context-Specific Hydroxymethylation and Induction of Gene Expression, *Cell Reports* 11, 283–294

[56] David Martin and Anne Grapin-Botton, The Importance of REST for Development and Function of Beta Cells, REVIEW article, *Front. Cell Dev. Biol.*, 2017. Vol.5:12