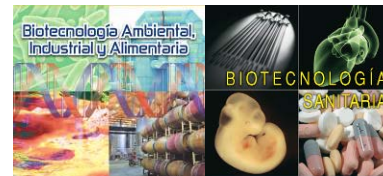


Trabajo Fin de Máster

Regulación de la Expresión del Factor de Transcripción Pdx1 por Altas Concentraciones de Óxido Nítrico en Células Madre Embrionarias de Ratón



Carmen Salguero Aranda¹, Rafael Tapia Limonchi², Ana B. Hitos Prados², Irene Díaz Contreras², Abdelkrim Hmadcha¹, Bernat Soria¹, Juan R. Tejedo² y Francisco J. Bedoya^{2*}

¹Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Fundación Progreso y Salud, CIBERDEM, RED-TERCEL, Sevilla, España.

²Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)- Universidad Pablo de Olavide, CIBERDEM, RED-TERCEL, Sevilla, España.

Palabras clave: Óxido nítrico, Célula madre embrionaria de ratón, Endodermo definitivo, Diferenciación • Pdx1 • Egr1

RESUMEN

Estudios previos en nuestro laboratorio muestran que el óxido nítrico a altas concentraciones promueve la diferenciación de células madre embrionarias de ratón (mESC), e induce la expresión de genes de endodermo, entre ellos el factor de transcripción Pdx1, “*Pancreas/duodenum homeobox protein 1*”. Pdx1, tiene un rol importante en el desarrollo embrionario del páncreas y en la células beta madura. Con el fin de conocer los mecanismos por los que el NO incrementa la expresión de Pdx1, hemos estudiado la región promotora de este gen, encontrando que la expresión de Pdx1 se asocia con la liberación del factor de transcripción Egr1. Además, análisis epigenéticos del promotor muestran que la expresión de Pdx1 va asociada a un cambio en el patrón de metilación de su promotor y a la ocupación de marcas de histonas activadoras (H3Ac y H3K4me3) y a la desocupación de modificadores represores de histonas (HDAC) en el promotor de Pdx1.

1. INTRODUCCIÓN

Nuestro laboratorio estudia el impacto de la exposición de las células pluripotentes (células madre embrionarias (ESC) y células de pluripotencia inducida (iPS)), a altas concentraciones de óxido nítrico (NO), sobre la regulación de los genes que controlan la autorrenovación. Estudios previos muestran que la exposición de mESC a altas concentraciones del donador de óxido nítrico (NO),

DETA-NO (500 μ M) produce la represión de genes de pluripotencia tales como Nanog u Oct4 y provoca eventos tempranos de diferenciación con la adquisición de la morfología epitelial y la expresión de marcadores de endodermo definitivo, como *foxA2*, *gata4*, *hn1f- β* , *sox17* y *pdx1* [1]. El factor de transcripción Pdx1 es requerido para el desarrollo embrionario del páncreas y regula la red transcripcional de las células productoras de insulina, por lo que un fallo en la expresión de este factor puede desencadenar diabetes [2,3]. Debido a la alta prevalencia de esta enfermedad se están buscando distintas estrategias para paliarla. Una de ellas es la diferenciación de células embrionarias mediante protocolos de diferenciación empleando pequeñas moléculas en el medio de cultivo [4-6]. Debido a la importancia de Pdx1, decidimos estudiar en el mecanismo de regulación de Pdx1 por NO en mESC. Existen evidencias de que los donadores de óxido nítrico modifican la metilación de ADN [7], y que la metilación de la Isla CpG proximal del promotor de Pdx1 está relacionada con el silenciamiento de Pdx1 en la enfermedad de retardo de crecimiento intrauterino (IUGR) [8,9]; por lo que decidimos hacer un estudio del grado de metilación del promotor de Pdx1. Además, estudiamos la ocupación del promotor por factores de transcripción y las modificaciones epigenéticas de histonas. Destacamos el papel del factor de transcripción “Early growth response protein 1” (Egr1); ya que además de estar descrito en la bibliografía su rol

regulador sobre *Pdx1* [10], pertenece a la familia de proteínas de dedos de zinc C₂H₂, por lo que las cisteínas pueden ser modificables postraduccionalmente por el óxido nítrico y la metilación de su sitio de unión al ADN afecta a la ocupación de este factor de transcripción [11]. Actualmente, estamos estudiando el posible mecanismo regulador del complejo Polycomb2 (PCR2) y la proteína Histona Acetiltransferasa P300, sobre *Pdx1*, ya que ambas proteínas parecen tener un rol importante en la regulación de *pdx1* en células embrionarias o durante el desarrollo [12,13]. Los resultados preliminares muestran que estas proteínas presentan un papel represor sobre *Pdx1*, en mESC; pero debemos hacer más experimentos que demuestren nuestra hipótesis.

2. RESULTADOS

En nuestro estudio nos centramos en 2000 pares de bases (pb) aguas arriba del inicio de la traducción del gen *Pdx1*. Mediante el uso de la base de datos Jaspar se obtuvo una lista de distintos factores de transcripción que presentan sitios consenso de unión al promotor de *Pdx1*, entre ellos el factor de transcripción Egr1. Decidimos estudiar el rol regulador de Egr1 sobre *Pdx1*, debido a que está descrito su papel regulador sobre *Pdx1*, aunque el detalle de los mecanismos moleculares que regulan este proceso no son conocidos, por lo que son susceptibles de ser estudiados. Para estos estudios utilizamos diversas aproximaciones experimentales tales como PCR cuantitativa, medición de la metilación de ADN, inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), ensayos de pérdida y ganancia de función de Egr1, entre otras. Los resultados obtenidos hasta el momento, muestran que Egr1 presenta un papel represor sobre la expresión de *Pdx1*.

Para estudiar el grado de metilación del promotor de *Pdx1* utilizamos el software Methylprimers Express v1.0. (Applied Biosystems), y diseñamos cebadores para las regiones de interés para las islas CpG localizadas en (-1900, -1600) y (-400, 600) pb respecto al inicio de la traducción. Analizamos mediante BSP (Bisulfite Sequencing PCR) la isla CpG distal, unas 2000 pb aguas arriba del inicio de la traducción; el sitio de unión de Egr1 y la isla proximal (-400, 600 pb), que incluye el inicio de la transcripción y traducción. Los resultados obtenidos muestran que el grado de metilación de la isla distal y del sitio de unión de Egr1, es mucho más elevado que el grado de metilación de la isla proximal, y que

existen cambios puntuales de metilación tras el tratamiento con NO. En concreto, en el sitio CpG del sitio consenso de Egr1 aumenta la metilación tras el tratamiento con DETA-NO, por lo que la liberación de Egr1 de *Pdx1* puede estar afectada por este aumento de metilación en su sitio de unión.

Para el estudio de las modificaciones epigenéticas de histonas realizamos ChIP de las marcas de histonas activadoras H3K4me3 y H3Ac, encontrándose que las células tratadas con NO presentan una ocupación mayor de estas histonas que las células control, en la zona promotora del gen *Pdx1*. Además, estudiamos el papel de la histona desacetilasa HDAC1, que está relacionada con el silenciamiento génico de *Pdx1* [8,9], en nuestro sistema experimental. Los resultados de ChIP muestran que la ocupación de HDAC1 disminuye en las células tratadas con DETA-NO, en un contexto en que *Pdx1* incrementada su expresión.

Por otro lado, debido a que ha sido propuesto que P300 actúa como represor del gen *Pdx1* y que modula la elección en la diferenciación entre hígado y páncreas durante el desarrollo [12], y el complejo represor Polycomb2 es importante en el control de genes de células embrionarias, en el mantenimiento de la pluripotencia y durante el desarrollo [13], nosotros actualmente estamos analizando el papel de p300 en nuestro esquema experimental. Los resultados recopilados hasta el momento muestran que P300 y Jarid-2 ocupan el promotor de *Pdx1* en las células embrionarias pluripotentes, no encontrándose en condiciones de diferenciación. De esta manera, es posible que tanto p300 como Jarid-2 tengan un papel regulador sobre la expresión de *Pdx1*, pero es necesario realizar más experimentos que muestren el rol regulador de estas proteínas sobre la expresión de *Pdx1* y su relación con el tratamiento de DETA-NO.

2. CONCLUSIONES

En vista a los resultados obtenidos, proponemos un modelo de regulación de *Pdx1* por altas concentraciones de óxido nítrico (Figura 1), en el cual se destaca el papel represor del factor de transcripción Egr1, la metilación específica de sitios CpG del promotor de *Pdx1*; en concreto el sitio de unión de Egr1, y la ocupación de marcas de histonas activadoras como la histona H3 acetilada y H3K4m3; y la disminución de marcas represoras como la histona desacetilasa HDAC1. Actualmente estamos estudiando la ocupación de componentes del complejo Polycomb sobre el

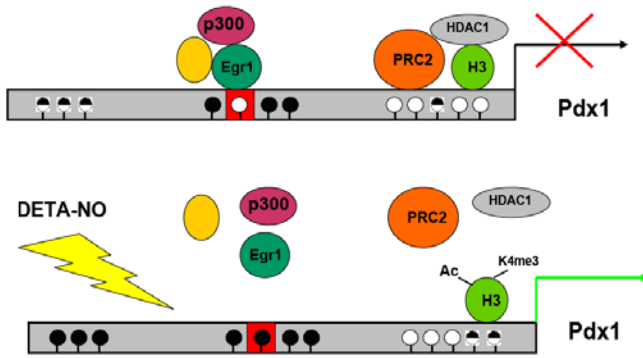


Figura 1. Esta figura representa el promotor de Pdx1. Los sitios CpG se representan por círculos, siendo los blancos sitios CpG desmetilados, los blancos y negros sitios CpG parcialmente metilados y los negros, sitios CpG metilados en todos los clones estudiados. Los factores de transcripción involucrados en la regulación de Pdx1 se representan por círculos de distintos colores. Aquellos que tenemos conocimiento de su papel regulador los hemos nombrado en la figura y el círculo amarillo representa otras proteínas que creemos que pueden estar formando complejo con Egr1 pero aún no sabemos de qué proteína se trata. Las modificaciones epigenéticas de las histonas también se representan en la figura. La cruz roja hace referencia a la represión del gen, mientras que la flecha verde indica expresión de Pdx1.

promotor de Pdx1, como son Jarid-2 y EZH2, y los resultados preliminares muestran que tiene un papel represor sobre Pdx1, al igual que la histona acetiltransferasa P300.

BIBLIOGRAFIA

1. Mora-Castilla S, Tejedo JR, Hmadcha A et al. Nitric oxide repression of Nanog promotes mouse embryonic stem cell differentiation. *CELL DEATH DIFFER* 2010;17:1025-1033.
2. Thomas MK, Lee JH, Rastalsky N et al. Hedgehog signaling regulation of homeodomain protein islet duodenum homeobox-1 expression in pancreatic beta-cells. *ENDOCRINOLOGY* 2001;142:1033-1040.
3. Babu DA, Deering TGM, Mirmira RG. A feat of metabolic proportions: Pdx1 orchestrates islet development and function in the maintenance of glucose homeostasis. *MOL GENET METAB* 2007;92:43-55.
4. Johannesson M, Stahlberg A, Ameri J et al. FGF4 and retinoic acid direct differentiation of hESCs into PDX1-expressing foregut endoderm in a time- and concentration-dependent manner. *PLoS ONE* 2009;4:e4794.
5. Borowiak M, Maehr R, Chen S et al. Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *CELL STEM CELL* 2009;4:348-358.

6. Van Hoof D, D'Amour K, German MS. Derivation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *STEM CELL RES* 2009;3:73-87.
7. Hmadcha A, Bedoya FJ, Sobrino F et al. Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1beta via nitric oxide production. *J EXP MED* 1999;190:1595-1604.
8. Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD et al. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J CLIN INVEST* 2008;118:2316-2324.
9. Pinney SE, Jaeckle Santos LJ, Han Y et al. Exendin-4 increases histone acetylase activity and reverses epigenetic modifications that silence Pdx1 in the intrauterine growth retarded rat. *DIABETOLOGIA* 2011;54:2606-2614.
10. Eto K, Kaur V, Thomas MK. Regulation of pancreas duodenum homeobox-1 expression by early growth response-1. *J BIOL CHEM* 2007;282:5973-5983.
11. Ogishima T, Shiina H, Breault JE et al. Promoter CpG hypomethylation and transcription factor EGR1 hyperactivate heparanase expression in bladder cancer. *ONCOGENE* 2005;24:6765-6772.
12. Xu CR, Cole PA, Meyers DJ et al. Chromatin "prepattern" and histone modifiers in a fate choice for liver and pancreas. *SCIENCE* 2011;332:963-966.
13. Pasini D, Cloos PA, Walfridsson J et al. JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *NATURE* 2010;464:306-310.