

SILENCIAMIENTO DE LA FOSFOGLUCOSA ISOMERASA (PGI) EN FIBROBLASTOS INMORTALIZADOS DE RATÓN. MEDIANTE LA TÉCNICA DEL RNA DE INTERFERENCIA

Silencing Glucose-6-phosphate Isomerase (PGI) in Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs). Through RNA Interference (RNAi) Method

Silvia FERNÁNDEZ SOBERÓN; Juan P. BOLAÑOS

Institute of Functional Biology and Genomics (IBFG), University of Salamanca-CSIC, Spain. Teléf.: +34 923 294 526. Fax: +34 923 294 579

Correo-e: jbolanos@usal.es

RESUMEN: Se introdujo un fragmento de sh-RNA específico en un plásmido vector pSUPER-NeoGFP con el que se transformó un cultivo celular de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). El sh-RNA fue construido para la inhibición específica de la expresión celular de la glucosa-6-fosfato isomerasa (PGIm). La glucosa-6-fosfato isomerasa es la segunda enzima de la glucólisis que cataliza la isomerización de glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato.

Un polímero catiónico de polietilén glicol fue utilizado como vehículo para transformar las células. Se transformaron dos cultivos celulares, uno usado como control transformado solo con el plásmido vector y otro con el plásmido con el sh-RNA. La inhibición celular y el metabolismo fueron controlados con la medida de la producción de lactato como marcador de la eficiencia de la glucólisis. Y con una RT-PCR para cuantificar la expresión de la PGIm.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de lactato entre ambos cultivos, pero sí se observó una disminución de la expresión génica de la PGIm.

Palabras clave: sh_RNA; silenciamiento; transformación; glucosa-6-fosfato isomerasa.

ABSTRACT: A target-specific small hairpin RNA (shRNA) was added into a plasmid delivery system (pSUPER-NeoGFP) and introduced into a cell culture of mouse embryonic fibroblasts (MEFs). The shRNA was constructed for suppressing the expression in mice cells glucose-6-phosphate isomerase PGI_m. Glucose-6-phosphate isomerase is an enzyme that catalyses the conversion of glucose-6-phosphate into fructose 6-phosphate in glycolysis' second step. A PEI-polyethylene glycol conjugate was used as a pSUPER-NeoGFP-shPGI plasmid carrier.

Two cultures of cells were transformed one used as control with the plasmid delivery system (pSUPER-NeoGFP) and the other with the plasmid with the sh-PGI. The gene inhibition and cellular uptake behaviours were explored by the measurement of lactic acid as a marker of the efficiency of glycolysis and with a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to quantify PGI_m expression.

No significant differences were found in the lactic acid production while a decrease in the PGI_m expression was observed.

Key words: sh_RNA; silencing; transformation; glucose-6-phosphate isomerase.

INTRODUCCIÓN

Desde que se comenzó a estudiar el genoma y su expresión se han buscado herramientas para silenciar genes concretos o su expresión. Algunas de ellas se basan en el mecanismo del ARN de interferencia que permite silenciar la expresión de genes concretos. Uno de los tipos de ARN de interferencia utilizado para el silenciamiento de la expresión génica es el sh-RNA (small hairpin RNA). Los sh-ARN son pequeños fragmentos de RNA artificiales con forma de horquilla de aproximadamente 20 pares de bases (pb) complementarias a la secuencia del gen cuya expresión se intenta reducir. Estos fragmentos de sh-RNA se incorporan en vectores como plásmidos o vectores virales y bacterianos mediante los que se incorporan en el genoma de la célula transfectada. Una vez en él, se transcribe por una nucleasa produciendo pri-microRNA que son procesados por la nucleasa Drosha, dando como resultado un pre-shRNA que es trasladado al núcleo por la exportina 5. Este producto es procesado por la proteína Dicer, que lo corta en pequeños fragmentos de RNA. Después, es incluido en un complejo inductor del silenciamiento RISC, según sus siglas en inglés. Para que se active este complejo

se degrada una de las hebras y la otra dirige el RISC hacia las moléculas de ARN mensajero con secuencia complementaria. Una vez unido el complejo RISC al ARNm lo destruye, impidiendo su traducción y disminuyendo la expresión del gen.

En el siguiente trabajo desarrollaremos la construcción de un plásmido de sh-RNA para silenciar la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa de ratón (PGIm). Esta enzima es una de las primeras enzimas de la glucólisis y cataliza la reacción de isomerización de la glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato. Por tanto inhibiéndola esperamos ver reducido el rendimiento de la glucólisis.

Se incorporarán las secuencias de RNA de interferencia complementarias al gen de la PGI en un plásmido vector. Para comprobar la eficacia del silenciamiento mediante el plásmido construido, se transfectará con él una línea celular de fibroblastos embrionarios inmortalizados de ratón (MEFS). Y mediremos la velocidad de producción de lactato en las células transfectadas y en células control. Mediante la determinación de lactato podremos comparar el rendimiento de la glucólisis en ambos tipos de células y así comprobar cómo afecta al metabolismo la inhibición de la enzima. Además mediremos mediante una PCR cuantitativa la cantidad de ARN mensajero en las células transfectadas y en las células control para medir la inhibición de la expresión génica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elección de la secuencia de shRNA y creación del plásmido

La secuencia del gen de la fosfoglucoisomerasa se obtiene de bases de datos genéticas⁴ y se encarga un sh-RNA con la secuencia complementaria a su ARNm (5'- GATGAAGGGGAAGTTGCCT). Esta es la secuencia a introducir en el plásmido vector de RNA de interferencia.

Utilizamos en plásmido vector pSUPERneo+GFP que incluye un gen de resistencia a ampicilina y un gen de expresión de la proteína verde fluorescente que nos servirán para discriminar las bacterias y células transfectadas correctamente de las que no lo están.

El plásmido se encuentra conservado en un cultivo bacteriano DH5 α congelado a -80°C se extrae una colonia de dicho cultivo y se incuba una noche en medio 2xYT con ampicilina. Se extrae el DNA bacteriano con el kit Midiprep.

Para comprobar que el plásmido extraído es el correcto se realiza un análisis de restricción del DNA obtenido con las enzimas Fsp I y Pvu II utilizando un marcador de peso molecular de 1kb.

Para incluir el fragmento de sh-RNA de la PGIm en el plásmido, se utilizan unas secuencias de nucleótidos conocidas del plásmido llamados polylinker.

Transformación de bacterias para que amplifiquen el plásmido

Para amplificar el plásmido creado transformaremos bacterias de *E. coli* y cultivamos en medio LB con ampicilina. El plásmido se introduce en las bacterias por choque térmico teniéndolas 45” a 42°C. Tras una incubación de 24 horas se extrae el ADN de 16 colonias con una MidiPrep para realizar un análisis de restricción que sirva para comprobar cuáles han sido transfectadas con el plásmido correcto. En este análisis de restricción se digiere con EcoRI y Hind III y se realiza una electroforesis.

Una vez seleccionadas las colonias 4, 5 y 10 por ser en las que más claramente se aprecia la diferencia de tamaño en los fragmentos, se cultivan y se extrae su RNA. De esta forma ya tenemos el plásmido completo y concentrado para introducirlo en cualquier célula.

Cultivo celular para su transfección

Para la transformación se utiliza un cultivo celular secundario de fibroblastos embrionarios inmortalizados de ratón (MEFS). Hemos mantenido este cultivo durante dos semanas cambiándolos de frasco de cultivo en diluciones 1:5 cada dos días, en medio DMEM, una variedad del medio mínimo basal con 4 veces más de concentración de aminoácidos y vitaminas. Tras esas dos semanas las células han cambiado su morfología mostrando que ya estaban maduras y listas para transfectarse.

Transfección de MEFs con PEI

Se pasa el cultivo celular a 3 placas petri de 20 cm². Para la transfección utilizaremos polietilenimina (PEI), un polímero catiónico que desestabiliza la membrana celular permitiendo que penetre el plásmido dentro de la célula. Este proceso se llevará a cabo en medio opti-MEM. En dos placas transfectaremos las células con un control positivo, un plásmido inhibidor de la luciferasa (sh-LUC), otras tres transfectaremos con el plásmido que hemos construido inhibidor de la PGI de ratón (sh-PGI_m).

Para cada placa de 20 cm² se preparan dos mezclas, una de DNA y otra de PEI. De DNA preparamos dos mezclas, una con 8 µg con sh-LUC y otra con sh-mPGI, completamos hasta 0,5 mL con opti-MEM. La mezcla de PEI contiene 4 µL de PEI por cada cm², es decir 80 µL de PEI por cada placa, se completa con opti-MEM hasta 0,5 mL.

Se añade la mezcla de PEI sobre las de DNA y se incuban 10 minutos a temperatura ambiente. Se añade 1 mL de esta última mezcla a cada placa con 1,5

mL de opti-MEM e incubamos 1 hora en estufa 37°C grados. Pasado el tiempo reemplazamos la mezcla de transfección con medio de cultivo.

Determinación de L(+)-Lactato

Una vez las células han sido transfectadas y lavadas con PBS extraemos muestras de medio para la determinación de lactato a los 10', 30', 60' y 90'. Y a las 24 horas. Medimos la concentración mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm realizando cada determinación por duplicado. Estas medidas las normalizaremos entre la concentración de proteínas.

Determinación de proteínas

Se determina la concentración de proteínas en la última placa que habíamos reservado para ello, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 565 nm y referenciando con la recta patrón realizada.

Determinación de ARN

Una vez tomadas las medidas de lactato se lisan las células purificando su RNA para proceder a la medida del ARN mensajero de PGI_m mediante una qRT-PCR. Con esta técnica conoceremos la cantidad de RNAm de PGI presente en cada muestra celular, pudiendo comparar así las muestras transfectadas con las células control para comprobar si hemos conseguido reducir la cantidad de RNAm como pretendíamos. Estas concentraciones se referencian con un gen control o housekeeping, en este caso el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). Este gen está presente en todas las células y a partir de él son normalizados los resultados obtenidos del gen a medir. Como marcador de fluorescencia en la qRT-PCR utilizaremos SYBR.

RESULTADOS

Resultados de la determinación de L(+)-Lactato normalizado por proteínas

Los valores de L(+)-Lactato obtenidos en las medidas se muestran en la Tabla 1. En la primera columna se presentan las absorbancias, en la segunda tras haber restado la media de los blancos para eliminar las absorciones de las impurezas. Después se han calculado las concentraciones producidas de lactato por μL y mg en 24 horas. Tras hallar la media y la desviación estándar y normalizar todos los datos entre la concentración de proteínas obtenida 0,678 mg/pocillo. Hemos obtenido unos resultados sin diferencias estadísticamente significativa entre muestras control y

muestras transfectadas, por tanto no útiles para la comprobación del silenciamiento mediante el plásmido sh-RNA.

	Abs.	Abs-B	Lac (mol/ml) /24h	(mol/mg) /24h	Media	Desviación estándar
Controles	2,39	1,71	2,750	4,06		
	2,49	1,81	2,914	4,30		
	2,51	1,83	2,943	4,34	4,43	0,10
	2,58	1,90	3,052	4,50		
	2,67	1,99	3,203	4,73		
	2,63	1,95	3,133	4,62		
sh-RNA	2,79	2,11	3,390	5,00		
	2,76	2,08	3,340	4,93		
	2,56	1,88	3,020	4,46	4,68	0,16
	2,51	1,83	2,946	4,35		
Blancos			0,687		0,672	
Media			0,6795			

TABLA 1: Resultados de la medida de la concentración de lactato en los que se recogen las medias y la desviación estándar de cada conjunto de datos.

Que no haya diferencias estadísticamente significativas en la producción de lactato entre células transfectadas y sin transfectar no significa necesariamente que el silenciamiento haya ido mal, puede ser debido a rutas alternativas de utilización de la glucosa o a rutas paralelas que permiten incorporarse a la glucosa a la glucólisis sin ser transformada por la PGI.

Para comprobar la eficacia de la transfección analizaremos otras pruebas como la qRT-PCR realizada.

Resultados de la qRT-PCR

Los resultados de la qRT-PCR se analizan mediante la siguiente fórmula:

$$R = 2^{-DDCT}$$

Donde:

- R= Expresión relativa del gen silenciado respecto del control
- CT = ciclo
- DDCT = DCT del gen muestra (gen silenciado) – DCT del gen calibrador (gen no silenciado)

- $DCT \text{ del gen muestra} = CT \text{ del gen muestra (PGI en muestras silenciadas)} - CT \text{ del housekeeping (GAPDH en muestras silenciadas)}$
- $DCT \text{ del gen calibrador} = CT \text{ gen calibrador (PGI en muestras no silenciadas)} - CT \text{ housekeeping (GAPDH en muestras no silenciadas)}$

Si tomamos como 100% la concentración de RNA mensajero en las células control y comparamos con los resultados de las células transfectadas obtenemos que la cantidad de RNA mensajero de PGI_m ha disminuido un 52,5% en las muestras de células transfectadas. Los resultados están recogidos en la gráfica de barras junto con su error estándar de la media. Con esta disminución de la concentración de RNA mensajero podemos concluir, por tanto, que la transfección ha sido correcta y el plásmido obtenido logra reducir la expresión de la PGI.

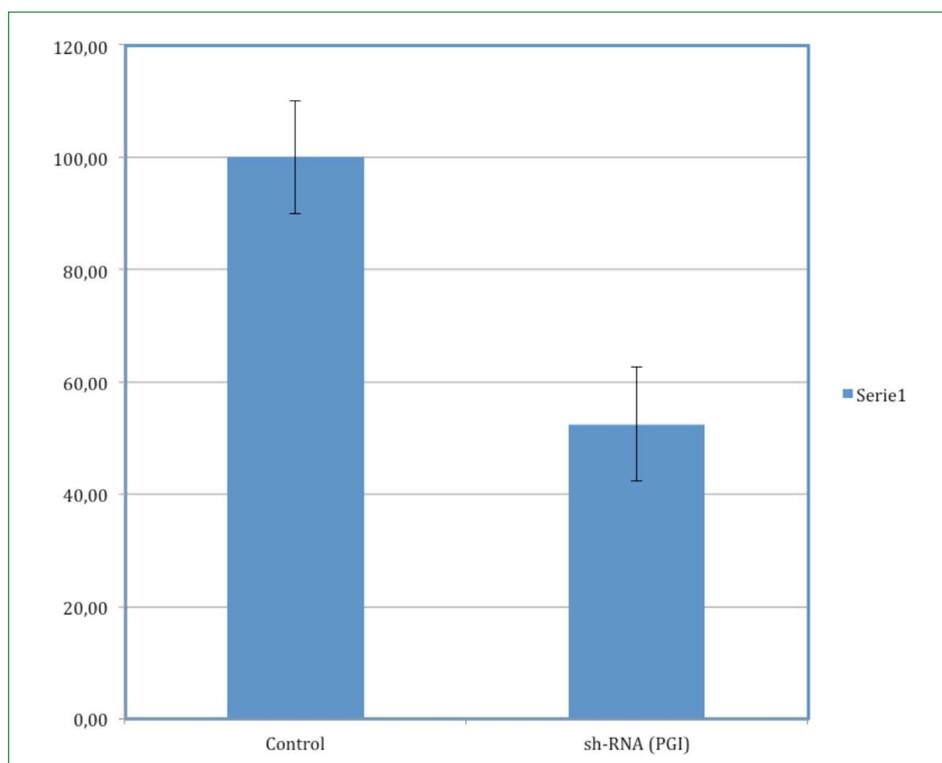


FIGURA 2: Resultados de la qRT-PCR. Se muestra una reducción del 52,5% de la concentración de RNAm de PGI_m respecto del control. Los valores de CTs de los genes estudiados se han normalizado entre un gen control interno, el gen de la GAPDH.

CONCLUSIONES

Se ha creado una herramienta de silenciamiento genómico que se puede utilizar para el estudio de vías metabólicas de la glucosa. En los resultados obtenidos al probar nuestro plásmido, se ha observado que, pese a que conseguimos reducir la expresión de la enzima, los resultados de lactato, y por tanto el rendimiento de la glucolisis, no presentan variaciones estadísticamente significativas. Estos resultados confirman y siguen en la línea con los obtenidos en recientes artículos publicados por los grupos de trabajo del laboratorio, en los que se muestra una desviación de la glucosa a la vía de las pentosas fosfato en detrimento de la glucolisis. Se abren así nuevas vías de estudio de la correlación entre la glucolisis y otras rutas metabólicas para las cuales se podrá utilizar el silenciamiento de genes a partir del plásmido creado en nuestro trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Nelson DL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. Vol 1. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, cop.; 2008.
- Reynolds A *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnol.* 2004; 22(3): 326-330.
- Rodríguez-Rodríguez P, Fernández E, Bolaños JP. Underestimation of the pentose-phosphate pathway in intact primary neurons as revealed by metabolic flux analysis. *J Cerebr Blood F Met.* 2013; 33(12): 1843-1845.
- Voet D, Voet Jc, Pratt CW. Fundamentals of biochemistry. 5th ed. New York: John Wiley and Sons; 1998.

