



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA
EL SILENCIADOR DE LA TRANSCRIPCION DEL ELEMENTO
REPRESOR (REST) DE *Xenopus laevis*.

PAULINA REYES HERNANDEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: MANUEL KUKULJAN PADILLA

SANTIAGO, CHILE
2005



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA EL SILENCIADOR DE LA TRANSCRIPCION DEL ELEMENTO REPRESOR (REST) DE *Xenopus laevis*.

PAULINA REYES HERNANDEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: MANUEL KUKULJAN
PROFESOR CONSEJERO:	EDUARDO KESSI
PROFESOR CONSEJERO:	MARCO GALLEGUILLOS

SANTIAGO, CHILE
2005

Agradecimientos

El principal agradecimiento es para mis padres, José y Rosa, por todo su esfuerzo, apoyo y entrega infinita durante toda mi vida.

A mi única y mejor hermana Jo, por las risas y su incondicionalidad de gemela-fantástica.

A mis tatas, tías, tíos, primas y primos, que han estado conmigo tendiéndome siempre una mano y alegrándome con sus palabras.

A mi mejor amiga Pía, que desde el extranjero me anima recordando nuestras gloriosas historias.

A Pamela, que se ha convertido en una gran amiga, por su preocupación y ternura.

A las personas del laboratorio, Jimena, Pato, Carola, Gaby y en especial a Manuel, por toda la comprensión, apoyo y conocimiento. A Mirna, Dayan, Romina, Valeria, Lalo y Rebeca, por esos divertidos almuerzos y cumpleaños. A Carmen, por compartir sus historias y su gran fortaleza de mujer. A Angélica y Fernando, por su trabajo y simpatía. A Elvis, por su ayuda, complicidad y por hacer más divertido los tediosos revelados en el cuarto oscuro.

A la Ruan, Robert, Pluto, Milo y Junior, mis inspiraciones.

....Hija, la vida es como el cachureo.

La misma oportunidad nunca aparece dos veces.

Mi papá.

Índice

	Pág.
Introducción	1
 Revisión bibliográfica	
• <i>Xenopus laevis</i> como organismo modelo.....	3
• Ciclo biológico de los anuros.....	4
• Desarrollo embrionario del sistema nervioso en <i>Xenopus laevis</i>	7
• REST/NRSF.....	12
• Variantes del procesamiento alternativo de REST.....	15
• Estudios de la función de REST en la regulación de la expresión génica.....	17
• Patrón de expresión de REST.....	19
 Objetivos	 21
 Materiales y métodos	
• Generación de proteínas de fusión con GST y REST de <i>Xenopus laevis</i> .	
➤ Amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	22
➤ Clonamiento, transformación y purificación.....	25
➤ Producción bacteriana de la proteína de fusión GST- REST de <i>Xenopus laevis</i>	28
➤ Cuantificación.....	30
➤ Método de fragmentación de tajada de gel húmedo.....	30

- Inmunización de conejos con la proteína de fusión GST- REST de *Xenopus laevis*.
 - Inoculación y Sangrado.....31
- Inmunoreactividad del suero contra REST en embriones de *Xenopus laevis*.
 - Obtención de los embriones de *Xenopus laevis*.....32
 - Preparación de los extractos de embriones.....33
 - Electrotransferencia.....33
 - Inmunohistoquímica.....35
 - Inmunohistoquímica en embriones *in toto*.....35
 - Inclusión de los embriones en parafina.....36
 - Inmunohistoquímica de los cortes.....37

Resultados y discusión

- Generación de proteínas de fusión con GST y REST de *Xenopus laevis*.
 - Amplificación de los fragmentos a partir del cDNA de *Xenopus laevis*.....38
 - Clonación de los fragmentos amplificados en los vectores.....41
 - Producción de la proteína AB2 y AB3.....44
 - Método de fragmentación de tajada de gel húmedo.....49
- Inmunización de conejos con la proteína de fusión GST- REST de *Xenopus laevis*.....50
- Inmunoreactividad del suero antiRESTx.
 - Electrotransferencia.....51
 - Electrotransferencia de embriones inyectados con el morfolino.....54
 - Inmunohistoquímica.....56

Conclusiones.....59

Bibliografía.....60

Anexo

Materiales y soluciones

Índice de figuras

Fig. 1. Ciclo biológico de los anuros.

Fig. 2. Esquema de la inducción y diferenciación mesodérmica y neuronal en *Xenopus laevis*.

Fig. 3. Inducción y diferenciación neuronal.

Fig. 4. Modelo de represión de genes neuronales mediado por REST.

Fig. 5. Patrón de expresión del mRNA de REST.

Fig. 6. Dominios de la proteína REST codificados por los fragmentos amplificados.

Fig. 7. Productos amplificados por PCR.

Fig. 8. Digestión del vector PGEM-T® clonado con los fragmentos AB2 y AB3.

Fig. 9. Digestión del vector de expresión PGEX 2T clonado con los fragmentos AB2 y AB3.

Fig. 10. Inducción de la proteína AB2 y GST.

Fig. 11. Inducción de la proteína AB3.

Fig. 12. Elución de la proteína AB2.

Fig. 13. Electrotransferencia del suero antiRESTx en extractos de embriones de *Xenopus laevis*.

Fig. 14. Electrotransferencia del suero antiRESTx en extractos de embriones inyectados con el morfolino anti REST.

Fig. 15. Inmunohistoquímica en embriones de *Xenopus laevis*.

Índice de tablas

Tabla 1. Partidores específicos y productos del PCR.

Tabla 2. Calendario de inmunizaciones y sangrado.

Abreviaturas

BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro.
BSA	Albúmina sérica de bovino.
cDNA	DNA complementario.
DAB	Diaminobenzidina.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico.
MAB	Tampón de ácido maleico.
MBS	Salino de Barth modificado.
NRSE	Elemento silenciador restrictivo neuronal.
NRSF	Factor silenciador restrictivo neuronal.
pb	Pares de bases.
PBS	Tampón fosfato salino.
RE-1	Elemento represor 1.
REST	Silenciador de la transcripción del elemento represor.
RNA	Ácido ribonucleico.
mRNA	RNA mensajero.
Anti RESTx	Anti REST de <i>Xenopus laevis</i> .

Resumen

La regulación transcripcional negativa es un mecanismo importante de control de la expresión de genes que contribuyen en el fenotipo neuronal. El elemento represor de la transcripción REST/NRSF ha sido propuesto como un regulador negativo de muchos genes de diferenciación neuronal terminal, expresándose en células no neuronales, precursores neuronales y neuronas en diferenciación. El papel de REST *in vivo* durante la diferenciación del sistema nervioso aún se desconoce, dada, entre otras, la letalidad de la pérdida de función de REST en ratones. El laboratorio en el que se desarrolló esta memoria de título ha utilizado otro organismo modelo, *Xenopus laevis*, a partir del cual se han obtenido resultados compatibles con la participación de REST en procesos muy tempranos del desarrollo neural. La interpretación de estos resultados requiere del análisis de los patrones de expresión de la proteína REST, lo que origina el objetivo principal de esta memoria de título: generar anticuerpos policlonales contra REST/NRSF de *Xenopus laevis*, para luego ser probados en embriones de *Xenopus* en diferentes estadios del desarrollo. La electrotransferencia de extractos de embriones, evidenció que el suero antiREST es inmunoreactivo a una proteína de ~200 KDa, la cual está presente en embriones en los estadios de clivaje, blástula, gástrula, neurula y organogénesis. En embriones inyectados con un morfolino antisentido de REST, el suero antiREST no detectó ninguna proteína; a diferencia de los embriones control no inyectados, en los cuales reconoció una proteína de ~200 KDa. Estos resultados son compatibles con la idea de que el suero antiREST reconoce la proteína REST endógena de *Xenopus laevis*. Por otra parte, el suero antiREST no resultó ser de utilidad en el reconocimiento de la proteína REST en embriones y en cortes de ellos mediante inmunohistoquímica.

Summary

Negative regulation of transcription is a relevant control mechanism of gene expression during determination of the neuronal phenotype. The transcriptional repressor REST/NRSF has been proposed as a regulator of many genes that underly terminal neuronal differentiation. Nevertheless, its role *in vivo* remains mostly unknown, given -among others facts- the lethality of the loss of REST function in mice. The laboratory which harbored this thesis has used another model organism, *Xenopus laevis*, to address the role of REST *in vivo*; these studies have led to the idea that REST participates in very early neural development. The interpretation of these results requires the analysis of REST protein expression, which motivates the main goal of this thesis: the production of polyclonal antibodies against *Xenopus* REST and the testing of their ability to identify REST expression during embryonic development. Electrotransference and assay of the embryo extract with the newly produced antisera revealed immunoreactivity to a protein of ~200 kDa, expressed throughout early development, from cleavage stages to organogenesis. Injection of a morpholino antisense oligonucleotide targeting *Xenopus* REST was associated to the decrease of this band. These results suggest that the antisera generated in this thesis is suitable for electrotransference assays and it can be used as an specific tool for the analysis of REST expression. However, this antisera did not prove to be useful for immunohistochemical analysis.

Introducción

La diferenciación de las neuronas es el resultado de un complejo programa de expresión génica. Se han identificado muchos genes que participan en distintas etapas del proceso que va desde la inducción neural a la diferenciación de una neurona postmitótica; sin embargo, muchos aspectos y componentes de estos procesos son todavía desconocidos.

Entre las proteínas involucradas en el proceso se encuentra la proteína REST/NRSF (silenciador de la transcripción del elemento represor RE/factor silenciador restrictivo neuronal). Esta proteína ha sido caracterizada como un represor de la transcripción que ejerce su efecto ligándose a una secuencia específica del DNA, denominada RE-1 (elemento represor 1), y reclutando a esa región complejos con actividad enzimática (Ej. deacetilasa de histonas) que modifican la estructura de la cromatina, impidiendo la transcripción. La secuencia RE-1 se encuentra en regiones regulatorias de muchos genes característicos de la diferenciación neuronal terminal (Ej. canales iónicos, receptores de neurotransmisores); por otra parte, el mRNA que codifica REST/NRSF se expresa preferentemente en tejido no neural. Lo anterior ha permitido postular que REST/NRSF reprime la expresión de genes neurales en tejidos no neurales.

El trabajo en el laboratorio en el que se desarrolló esta memoria de título, ha utilizado el embrión del anuro *Xenopus laevis* para estudiar *in vivo* REST/NRSF. Los resultados muestran que las funciones son complejas, participando aparentemente no sólo en la regulación de la expresión de genes de diferenciación neuronal terminal, sino también en etapas tempranas de la

neurogénesis. El uso de este modelo muestra importantes ventajas por sobre los mamíferos, dada la fácil accesibilidad al estudio de etapas tempranas del desarrollo neural. Por otra parte, la pérdida de función de REST/NRSF en ratones “knock out” induce su muerte en etapas tempranas del desarrollo, por lo que no resultan un modelo adecuado.

Una limitante para estudiar más en detalle la función de la proteína REST/NRSF, en este modelo animal, es la carencia de anticuerpos que permitan estudiar sus patrones de distribución tisular y los eventuales cambios de su expresión durante el desarrollo neural, así como las interacciones con otras proteínas, por ejemplo, mediante ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos. REST/NRSF tiene una estructura modular, con un dominio constituido por ocho motivos que conforman dedos de zinc, los que permiten la interacción con el DNA, y los extremos amino y carboxilo terminales a través de los cuales interactúa con los correpresores Sin3 y CoREST. La conservación de la estructura primaria de REST/NRSF entre las distintas especies es muy baja, lo que no ha permitido usar anticuerpos contra REST/NRSF de origen humano o murino para los estudios en *Xenopus laevis*. Por otra parte, los anticuerpos disponibles contra estas proteínas no han sido de utilidad en técnicas de localización tisular.

En consideración de lo anterior, esta memoria de título, propone la generación de anticuerpos policlonales contra REST/NRSF de *Xenopus laevis*, los que serán probados en técnicas de electrotransferencia e inmunofluorescencia. De esta manera, será posible estudiar directamente la expresión de REST/NRSF en el embrión de *Xenopus laevis* y su eventual patrón de distribución en tejidos en distintas etapas del desarrollo.

Revisión Bibliográfica

Xenopus laevis como organismo modelo

El conocimiento actual del desarrollo embrionario temprano de los vertebrados se debe, en gran medida, a los estudios realizados en embriones de anfibios. En particular, la importancia de los anuros como modelo experimental, radica en las múltiples ventajas comparativas que presentan, dentro de las cuales destaca el hecho que sus embriones pueden ser obtenidos en grandes cantidades y mantenidos fácilmente y en forma económica en el laboratorio (Dawid y Sargent, 1998). El gran tamaño de sus embriones, permite que sean microinyectados y micromanipulados con relativa facilidad. Además, su fecundación es externa, permitiendo la obtención de diferentes estadios sin complicaciones y en un corto tiempo. Una desventaja de las especies tradicionales de anuros, es su apareamiento estacional. *Xenopus laevis*, la rana sudafricana, es una notable excepción: es capaz de reproducirse durante todo el año en respuesta a una simple inyección de hormona gonadotrófica.

El empleo de *Xenopus laevis* como sistema modelo ha contribuido importantemente en la comprensión celular y molecular de eventos tempranos del desarrollo, construcción de mapas de destino celular y organogénesis. Por el contrario, su participación en estudios genéticos se ha dificultado, debido a que posee cuatro copias de cada cromosoma (seudotetraploide), obstaculizando su empleo en experimentos de mutagénesis. *Xenopus laevis*, actualmente se ha convertido, en un modelo primario de la biología molecular, siendo en este contexto, el anfibio mejor conocido y, junto con *Danio rerio*, *Mus musculus* y *Gallus domesticus*, uno de los vertebrados más estudiados (Cannatella y De Sa, 1993). En este contexto, han permitido un nuevo y más sofisticado entendimiento del desarrollo embrionario -en especial de la neurogénesis- a través de técnicas de

inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, experimentos de ganancia y pérdida de función mediante dominantes negativos y oligonucleótidos antisentido, asegurándolo en una posición importante dentro del grupo de los organismos modelo.

Ciclo biológico de los anuros

En los anfibios los factores más influyentes en el comportamiento sexual son: la temperatura, los fotoperíodos, la humedad y la disponibilidad de alimentos (Paniagua *et al.*, 1990). Por esta razón, es evidente que el éxito de la reproducción en estos animales requiere de una perfecta sincronización de procesos fisiológicos y patrones de comportamiento en respuesta a una amplia variedad de estímulos ambientales.

En la mayoría de los anuros, las variaciones estacionales afectan a los componentes neuroendocrinos que regulan diferentes parámetros de la actividad gonadal, particularmente la maduración del ovocito. De esta manera, coincidente con la finalización de los meses de baja temperatura e inicio de la primavera, existe un incremento de la actividad hipofisiaria. Este aumento trae consigo la producción de estrógenos, los que a su vez, estimulan la producción de proteínas del vitelo que se depositarán en el ovocito.

Alcanzada la fase final de la ovogénesis, el ovocito bajo estímulo hormonal reinicia la meiosis, completando la primera división meiótica (Sadler y Maller, 1981; Liu y Patiño, 1993). En este estado son liberados; cubiertos por una secreción gelatinosa que contiene moléculas involucradas en la interacción gamética y que los protege de la deshidratación, ya que se trata de un huevo no amniótico (sin cubierta que evite la desecación ni cavidad amniótica con líquido donde esté inmerso el embrión mientras se desarrolla).

La fecundación es externa en la gran mayoría de los anuros y una vez producida la fertilización se completa la segunda división meiótica, distribuyéndose el citoplasma dentro del huevo y gatillando factores responsables del clivaje. Las células se dividen progresivamente formándose una cavidad denominada blastocele, la cual permitirá los movimientos celulares que comienzan con la gastrulación.

Durante la gastrulación se inicia la migración celular en la región del blastoporo; una invaginación de la superficie del huevo que se encuentra 180° en oposición a la entrada del espermatozoide. De esta manera, las células ingresan y se distribuyen hacia el polo animal formando las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. Con un embrión de tres capas comienza la organogénesis y con ella el desarrollo del sistema nervioso, del cual se hablará más adelante en detalle.

El embrión que pronto se desarrollará a renacuajo, posee branquias y se alimenta de microorganismos. El renacuajo por un proceso fisiológico continuo denominado metamorfosis, experimenta cambios intensos; la respiración pasa a ser pulmonar y cutánea, el corazón ahora tiene tres cavidades, los miembros se desarrollan y la cola involuciona. El aparato digestivo cambiará para adecuarse a la nueva alimentación; insectos, crustáceos, moluscos y pequeños vertebrados.

La rana recién metamorfoseada deja el ambiente acuático para vivir en el terrestre; presenta la forma del cuerpo totalmente semejante a la del adulto pero inmadura sexualmente. En el caso de *Xenopus laevis*, ésta alcanza la madurez sexual a los 10 a 12 meses. Los machos empiezan el cortejo nupcial y delimitan su territorio para atraer a la hembra, se aparean durante todo el año pero es más común en primavera, comenzando así un nuevo ciclo de vida.



Figura 1. Ciclo biológico de los anuros.

Esquema que muestra el ciclo de vida de los anuros. Aparecen en rojo los nombres de los estadios del desarrollo en los cuales se encontraban los embriones utilizados en esta memoria.

Desarrollo embrionario del sistema nervioso en *Xenopus laevis*

El desarrollo del sistema nervioso en *Xenopus laevis* comienza durante la gastrulación con la inducción de la placa neural. Durante la inducción neural, el ectodermo se divide en cuatro grupos de células: la placa neural, que formará el cerebro y la medula espinal; la epidermis, que formará la piel; la cresta neural, que generará diversos tipos de neuronas periféricas, glia y células pigmentarias; y las placodas ectodérmicas, que darán origen a los ganglios craneales, entre otros tipos celulares (Gilbert, 2000).

Para comprender de mejor manera el proceso de formación del sistema nervioso se requiere considerar el desarrollo de otros tejidos, en particular el mesodermo (Gilbert, 2000). La formación de este tejido consta de dos procesos relacionados: la inducción mesodérmica y el establecimiento del patrón dorso-ventral del mesodermo (Harland y Gerhart, 1997). Durante la gastrulación, la blástula se transforma en un embrión con clara polaridad antero-posterior y tres capas germinales. Los movimientos celulares que dan cuenta de este proceso, se inician en el futuro lado dorsal del embrión, específicamente denominada zona marginal. En ésta se forma el labio dorsal del blastoporo, por el cual migrarán las células marginales que darán origen a estructuras anteriores (mesoderma en la cabeza, precursores de la notocorda y somitos) y -a partir de los labios lateral y ventral- migrarán las células que darán origen a estructuras mesodérmicas de carácter más lateral y posterior.

La determinación de los ejes antero-posterior y dorso-ventral del embrión ocurre en relación al sitio de entrada del espermatozoide. La rotación cortical resultante lleva al establecimiento de dos centros organizadores: el centro de Nieuwkoop y el organizador de Spemann. Las señales que emanan del centro de Nieuwkoop gatillan la expresión de genes zigóticos durante la transición de la blástula media. Varios de estos genes están involucrados en la formación del

mesoderma. En paralelo a estos procesos de inducción ocurre el establecimiento del patrón dorso-ventral del embrión. Actualmente, se plantea que las mismas moléculas participarían tanto de la dorsalización del mesodermo como en la del ectodermo (Weinstein y Hemmati-Brivanlou, 1999). Así, se propone que las proteínas secretadas de la región ventral de la zona marginal, como BMP4 y Wnt8, junto con proteínas secretadas por el centro organizador de Spemann, como Noggin, cordina y folistatina, participarían tanto en la especificación ventral y lateral del mesoderma, como en la dorsalización (neuralización) del ectoderma. De esta manera, tanto la inducción neural como el establecimiento del patrón dorso-ventral del ectoderma estarían bajo el control de las mismas señales.

La placa neural está constituida por células indiferenciadas, mitóticamente activas. En etapas definidas del desarrollo, estas células cesan su proliferación y se diferencian en neuronas y glia. Basándose en su origen temporal, posición, estructura y arborización axonal, las células indiferenciadas de la placa neural se pueden dividir en dos grupos. El primer grupo consiste de neuronas y glia que abandonaron el ciclo mitótico en algún punto durante la embriogénesis temprana y que forman un circuito definido que controla la conducta de la larva temprana. El segundo grupo está constituido por células que aún están indiferenciadas y que constituyen precursores proliferantes que producirán la mayoría de las células del sistema nervioso adulto. Las neuronas del embrión temprano se denominan neuronas primarias y las que aparecen tardíamente se han llamado neuronas secundarias (Hartenstein, 1989).

Este proceso de selección de los precursores neurales, dentro de la población de células de la placa neural que dará origen a las neuronas primarias, está bajo el control de dos mecanismos. Por una parte, la inhibición lateral, mediada por Notch y Delta (Chitnis *et al.*, 1995), que opera de manera tal de limitar el número

de neuronas primarias que se formarán; mientras que los genes proneurales, como XASH-3, X-NGNR-1 y neuroD, promueven la neurogénesis primaria (Lee *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996, Zimmerman *et al.*, 1993). Actualmente, se propone que el proceso de inducción neural y la neurogénesis primaria son parte de una misma cascada de eventos. La relación funcional entre estos procesos, estaría mediada por genes antineuralizantes, como Gata1, Msx1 y PV.1, y neuralizantes, como los genes Zic y Sox2, entre otros (Sasai, 1998).

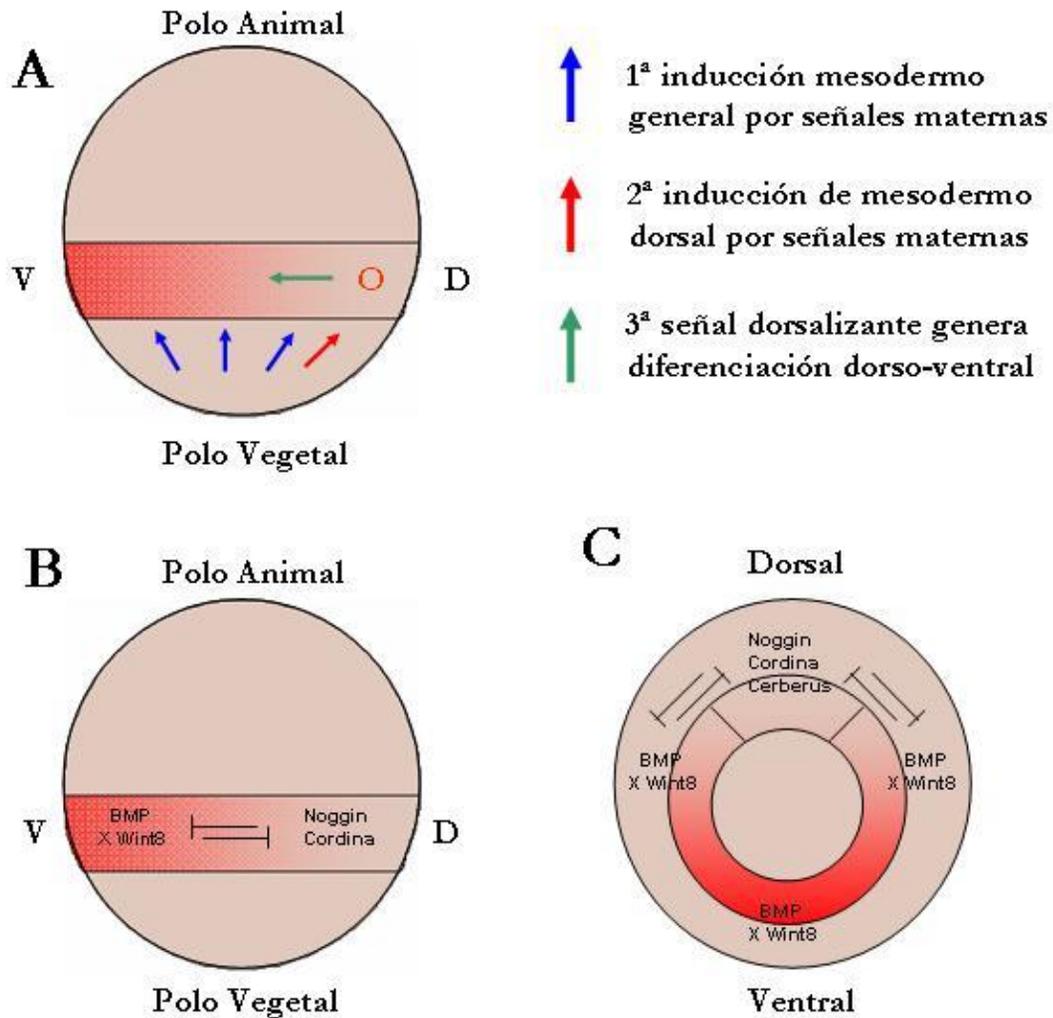


Figura 2. Esquema de la inducción y diferenciación mesodérmica y neuronal en *Xenopus laevis*.

A. Inducción mesodérmica por señales maternas. Vista lateral de un embrión en etapa de blástula. El tejido mesodérmico se muestra en rojo. Las flechas indican el origen y destino de la señales (V: ventral, D: dorsal, O: organizador de Spemann). **B** y **C.** Inducción del mesodermo y diferenciación dorso-ventral del mesoderma. En **B**, se muestra una vista lateral de un embrión en etapa de gástrula, y en **C**, una vista desde el polo vegetativo de una gástrula. Se muestra la ubicación e interacciones de las principales señales (adaptado de Harland y Gerhart, 1997).

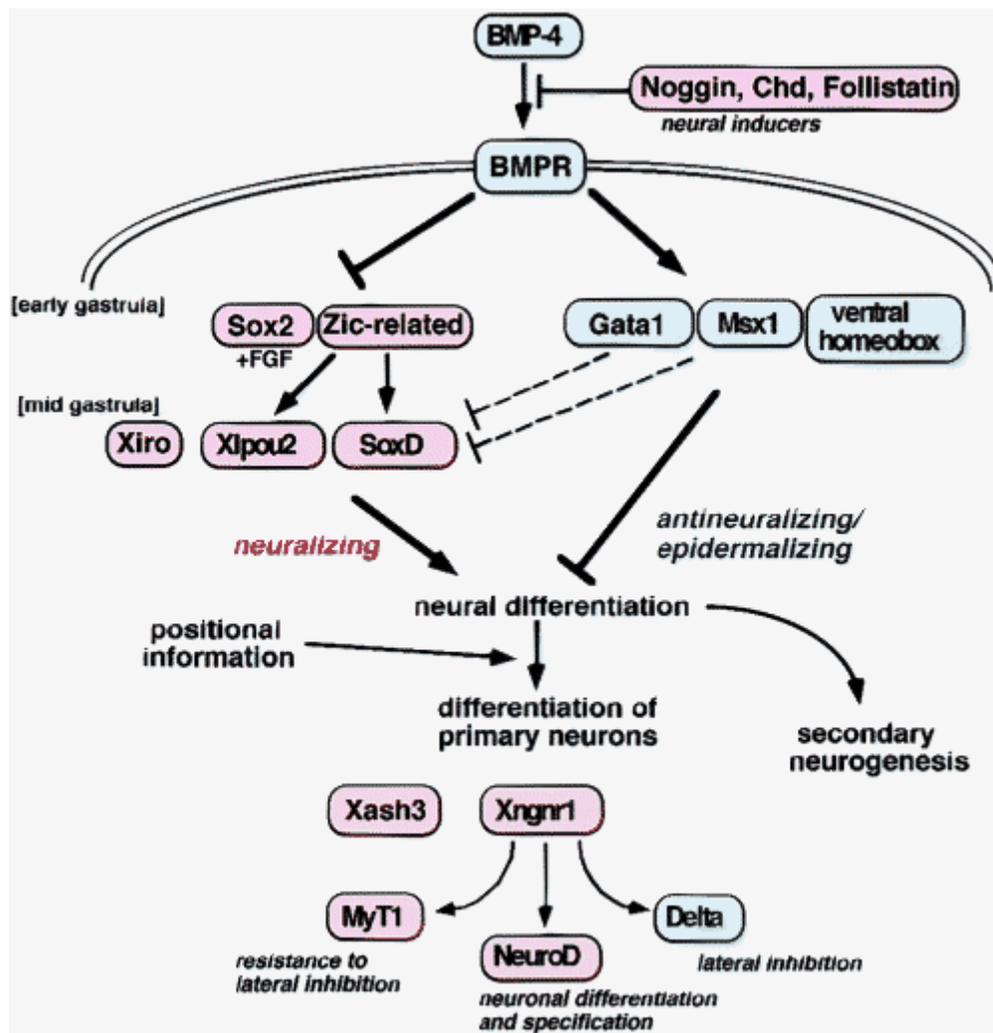


Figura 3. Inducción y diferenciación neuronal.

Esquema de las interacciones entre las señales que participan de la inducción y diferenciación neuronal. Los reguladores positivos de la neurogénesis se muestran en rosado y los negativos en azul (adaptado de Sasai, 1998).

REST/NRSF

El silenciador de la transcripción del elemento represor (REST), también llamado factor silenciador restrictivo neuronal (NRSF), es miembro de la familia de factores transcripcionales Krüppel, el cual fue identificado independientemente por dos grupos a partir de células Hela y reconocido como el primer represor neuronal global y potencialmente uno de los reguladores críticos de la neurogénesis (Chong *et al.*, 1995; Schoenherr y Anderson, 1995). REST/NRSF es una proteína que se une a una secuencia consenso del DNA de 21 pb denominada RE1, la cual está presente en la región regulatoria de un número considerable de genes que son expresados en neuronas postmitóticas, suprimiendo su expresión en líneas celulares no neuronales y neuronales indiferenciadas, por lo que se propone que REST sería un represor endógeno de la diferenciación celular neuronal (Schoenherr y Anderson, 1995; Wilson y Hemmati-Brivanlou, 1997). Se han descrito numerosos genes que contienen secuencias RE1 en sus promotores (Schoenherr *et al.*, 1996). Entre estos genes se encuentran el canal de sodio Nav 1.2 (Chong *et al.*, 1995); receptores de neurotransmisores, como la subunidad I del receptor tipo NMDA de glutamato, el receptor de glicina, la subunidad d del receptor de GABA tipo A, la subunidad GluR2 del receptor tipo AMPA de glutamato (Myers *et al.*, 1998), las subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$ y la isoforma M4 del receptor de acetilcolina (Wood *et al.*, 1996; Mieda *et al.*, 1997); proteínas presinápticas, como sinaptofisina, sinapsina y sinaptotagmina IV; proteínas del citoesqueleto, como neurofilamentos intermedios y $\beta 4$ tubulina (Chen, *et al.*, 1998); proteínas de adhesión celular, como Ng-CAM o L1 y enzimas que participan en la síntesis de neurotransmisores, como dopamina β hidroxilasa y colina acetiltransferasa (Lonnerberg, *et al.*, 1998).

El análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína deducida de la secuencia nucleotídica del gen REST (humano) predice una proteína de 1097 aminoácidos, con ocho motivos de dedos de zinc del tipo C2H2 agrupados entre los aminoácidos 106 y 357; un motivo de dedo de zinc en el extremo carboxilo, entre los aminoácidos 1062 y 1082; y una señal de localización nuclear ubicada 485 aminoácidos antes del codón de término (Chong *et al.*, 1995).

El estudio de la relación estructura-función de REST mostró, que la proteína presenta dos dominios represores con actividad independiente: uno localizado en la región amino terminal (aminoácidos 43 - 83) y el otro en el carboxilo terminal (aminoácidos 989-1097). La actividad de este último dominio, requiere la conservación del noveno motivo de dedo de zinc (Tapia-Ramírez *et al.*, 1997; Thiel *et al.*, 1998). Ambos dominios permiten la interacción de REST con dos correpresores: Sin3 con el dominio represor amino terminal (Huang *et al.*, 1999; Naruse *et al.*, 1999; Grimes *et al.*, 2000; Ballas *et al.*, 2001) y CoREST con el dominio represor carboxilo (Andrés *et al.*, 1999). En tanto que los primeros ocho dedos de zinc, participan en la unión de REST a RE-1 (Chong *et al.*, 1995; Tapia-Ramírez *et al.*, 1997).

En su conjunto, las evidencias experimentales son consistentes con la idea que REST es un factor transcripcional con una función represora, la cual es mediada por su capacidad de reclutar correpresores a la proximidad de los dominios de DNA genómico que contengan RE-1. Así, los correpresores pueden inducir el remodelamiento de la cromatina, lo que ocultaría el acceso a la maquinaria transcripcional a la región del promotor. Este mecanismo general daría cuenta de la inhibición de la transcripción del canal de sodio tipo 1.2 en líneas celulares no neuronales, así como en neuronas no diferenciadas. Por otra parte, existen genes blancos de REST que requieren para su silenciamiento de la

metilación del DNA a través de la interacción de CoREST con MeCP2 y SUV39H1 (Lunyak *et al.*, 2002). Es aparente del análisis de este modelo, que también se requiera para la adecuada expresión genética de activadores de la transcripción neuronal-selectiva.

Recientemente se reportó que pequeños RNAs de doble hebra, que poseían una secuencia RE1, gatillaron la activación de genes neuronales durante la diferenciación de células troncales del hipocampo en adultos, transformando a REST de un represor a un activador de la diferenciación neuronal al interactuar con proteínas activadoras como CBP, BRG1 y BAF170 (Kuwabara *et al.*, 2004).

Se han aislado las unidades transcripcionales humana y murina del gen REST y han sido identificados los determinantes de la transcripción que actúan *in cis* (Kojima *et al.*, 2001). Estos promotores funcionan igualmente en líneas celulares neurales y no neurales.

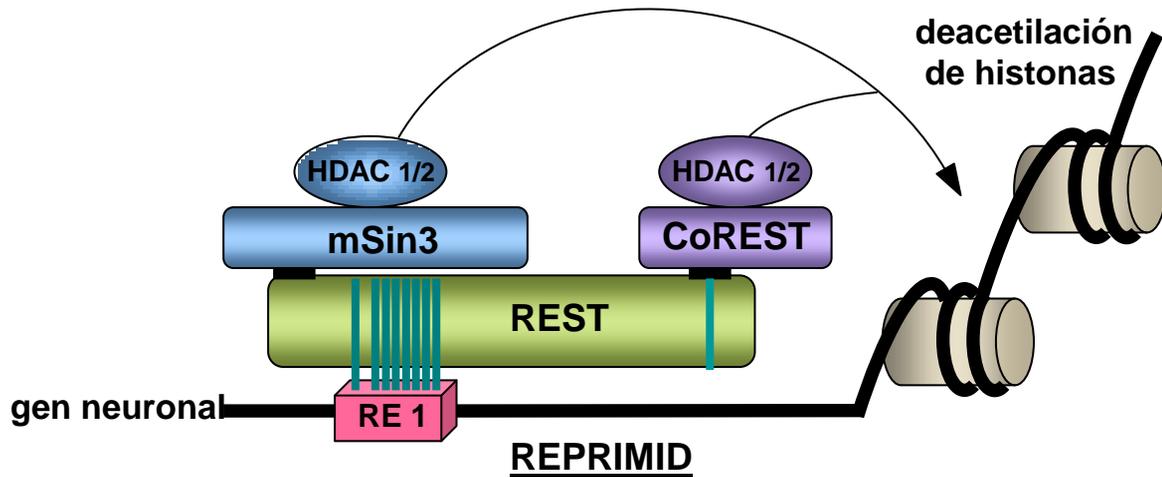


Figura 4. Modelo de represión de genes neuronales mediado por REST.

REST se une directamente a la secuencia RE-1 de genes neuronales interactuando con los correpresores Sin3 y CoREST a través de sus dominios represores amino y carboxilo terminal respectivamente. Éstos reclutarán actividad deacetilasa de histonas reprimiendo la transcripción. Los dedos de zinc de REST se muestran como columnas verticales de color verde oscuro. El noveno dedo de zinc en el extremo carboxilo terminal de REST es requerido para la interacción con CoREST y para la represión (modificado de Ballas *et al.*, 2001).

Variantes del procesamiento alternativo de REST

En rata se han descrito seis variantes de procesamiento alternativo de REST: la proteína descrita de largo completo (nueve dedos de zinc, REST9); una variante con cuatro dedos de zinc (REST1); y cuatro formas con cinco dedos de zinc (REST2, 3, 4 y 5), dos de las cuales parecen ser expresadas sólo en el sistema nervioso (REST4 y 5). Esta organización de procesamiento es conservada en el gen humano y de ratón (Palm *et al.*, 1998; Palm *et al.*, 1999).

El papel funcional y mecanismo de acción de estas variantes, no han sido resueltos aún. Palm *et al.* (1998) no observó formación de complejos entre la secuencia RE-1 del gen del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y aquellas isoformas de REST con cuatro o cinco motivos de dedos de zinc, mientras que Lee *et al.* (2000) describe la unión de REST4 a RE-1 de otro gen (locus colinérgico) con una afinidad 10 a 20 veces menor que REST9. Por último, se ha propuesto que REST4 podría interactuar con REST9 impidiendo su capacidad de unirse a RE-1, mecanismo que podría dar cuenta de antirepresión (Shimojo *et al.*, 1999). También, existe evidencia que sugiere que REST9 podría actuar como activador o reforzador de la expresión de líneas celulares (Yoo *et al.*, 2001, Seth y Majzoub, 2001). Además, parece que el rol funcional de REST y sus variantes de procesamiento alternativo en la regulación de la transcripción es más complejo de lo que se pensó inicialmente, abriendo la posibilidad de una función dependiente del contexto y de la secuencia. Así, se postula la existencia de genes que serían expresados en altos niveles en la medida de que REST y sus corepresores se disocian del sitio RE1, mientras otro grupo de genes como calbindina y BDNF serían expresados en bajos niveles producto de una continua presencia de CoREST y MeCP2 en un sitio de DNA metilado adyacente a RE1 en neuronas. De esta manera, el complejo REST regularía sus genes blanco diferencialmente durante diferentes etapas del desarrollo (Ballas *et al.*, 2005).

Estudios de la función de REST en la regulación de la expresión génica

El papel funcional de REST en la regulación *in vivo* de la expresión de genes que tienen secuencias RE-1 adyacentes, ha sido abordada con dos estrategias: la generación de ratones transgénicos portadores de un gen reportero bajo el control de un promotor que contiene RE-1, y la generación de ratones nulos “knock-out” para la proteína REST. El estudio de la regulación de la expresión del gen L1, una proteína de adhesión celular, en embriones transgénicos que portan el gen reportero lacZ bajo el control del promotor de L1, que contiene una secuencia RE-1, mostró que la expresión del reportero se restringe al sistema nervioso. La delección de RE-1 del transgen, se asocia con una expresión precoz en algunos territorios del sistema nervioso central, así como expresión ectópica en el mesodermo y ectodermo no neural (Kallunki *et al.*, 1997). Los mismos análisis mostraron que en ratones adultos transgénicos la mutación de RE-1 produce el incremento o pérdida de la expresión del gen reportero en regiones discretas del sistema nervioso central (Kallunki *et al.*, 1998). Estudios similares se han llevado a cabo con el promotor del gen que codifica la subunidad $\beta 2$ del receptor nicotínico de acetilcolina (Bessis *et al.*, 1997). Durante el desarrollo embrionario el reportero, bajo el control del promotor silvestre, se expresa en el SNP y parte del SNC. Una mutación puntual en RE-1, que elimina su capacidad de unirse a REST, lleva a la expresión ectópica en la corteza donde el gen no es expresado normalmente, y a una menor expresión en las regiones donde el RE-1 silvestre contenido en el reportero es expresado. Los ratones transgénicos adultos con la secuencia RE-1 silvestre presentan expresión del reportero en subpoblaciones de neuronas hipotalámicas, mientras que los animales con la secuencia mutada presentan expresión en la mayoría de las neuronas del SNC.

En estos estudios no se observó expresión en tejidos no neurales en ratones adultos y en embriones. Por último, el estudio del patrón de expresión de un gen reportero bajo el control del promotor de BDNF (Timmusk *et al.*, 1999), el cual tiene una secuencia RE-1 en el primer intrón, mostró expresión en el hipocampo, cerebro medio, tálamo, timo y pulmón. La mutación de RE-1 llevó a un aumento de 10-100 veces en su expresión en esos tejidos, pero sin expresión ectópica.

La supresión de la función de REST -mediante la generación del ratón nulo para el gen REST- está asociado con la desrepresión de la β -tubulina clase III, específica de neuronas, en miotomas, y con la expresión ectópica en algunos tejidos ectodermales no neurales y mesenquimales. Sin embargo, otros genes que contienen RE-1, como SCG10, sinapsina, calbindina y neurofilamento intermedio no aparecen desreprimidos. En tejido no neural como músculo, no parece cambiar su patrón de expresión normal en ausencia de la proteína REST (Chen *et al.*, 1998). Estos resultados son consistentes con la idea que REST no es el único regulador en el fenotipo neural y que factores específicos del tipo celular contribuyen a su capacidad de regular la expresión de diferentes genes. Esto podría lograrse, proporcionando regulación transcripcional independiente negativa o positiva, o a través de interacciones con la proteína REST. La letalidad embrionaria temprana de ratones nulos de REST (E11.5, con un 100% de penetrancia) excluye este modelo para el análisis de la función de REST, esperándose un futuro desarrollo de “knock-outs” inducibles.

La expresión de una forma dominante negativa de REST, que contiene sólo el dominio de unión a DNA, fue usado para inducir un “knock-out” funcional en somitos de embriones de pollo a través de la infección de constructos retrovirales que codifican la forma creada de REST. Este estudio muestra patrones diferentes de desrepresión de tubulina neuronal, Ng-CAM y SCG10

(Chen *et al.*, 1998). En este modelo, la expresión del dominante negativo causa expresión prematura de genes neurales estructurales blancos de REST en tejidos neurales como SCG10 y N-CAM. La expresión constitutiva de la isoforma murina en neuronas en embriones de pollo se asoció con la represión de algunos genes neurales y defectos en la dirección axonal (Paquette *et al.*, 2000).

La expresión de una forma dominante negativa de REST, en embriones de *Xenopus laevis*, se asocia a la aparente represión de genes neuronales (Armisen *et al.*, 2002), lo que contrasta con lo descrito anteriormente. Sin embargo, este resultado puede ser explicado por la perturbación de procesos del desarrollo neural temprano, previos a la diferenciación neuronal (comunicación personal*).

Patrón de expresión de REST

REST exhibe un patrón de expresión complejo en ratones, los que incluyen transcripción en neuronas inmaduras (en las que decrece subsecuentemente) y una amplia expresión no neuronal (Chong *et al.*, 1995; Schoenherr y Anderson, 1995; Palm *et al.*, 1998). Utilizando como modelo de estudio el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*, se ha establecido en nuestro laboratorio que el mRNA de REST se expresa tempranamente durante la neurogénesis en el ectodermo y en las zonas marginales, tanto dorsales como ventrales de la gástrula, para luego expresarse en las zonas aledañas a la placa neural y en la porción profunda de ésta en el estadio de neurula y, finalmente, restringirse a los somitos del embrión.

El estudio de la expresión de la proteína REST durante la neurogénesis en *Xenopus laevis*, se ha dificultado debido a la falta de anticuerpos en este modelo

*Olguín, Oteiza y Kukuljan.

animal, ya que los existentes (dirigidos algunos contra un segmento conservado de *Xenopus laevis*) no han sido exitosos en el reconocimiento de la proteína. A esto se suma la baja conservación de la estructura primaria de REST entre las diferentes especies, lo que no ha permitido el uso de anticuerpos de origen humano o murino. En la actualidad los estudios de expresión de REST se han restringido casi exclusivamente al estudio del RNA mensajero. De esta manera, no se ha podido establecer directamente la expresión de REST/NRSF en el embrión de *Xenopus laevis* ni su eventual patrón de distribución en tejidos en distintas etapas del desarrollo. La información disponible no es suficiente para entender la regulación fisiológica de la expresión de REST.

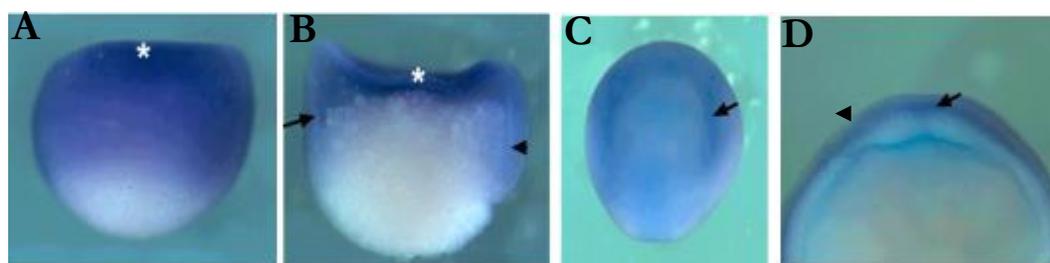


Figura 5. Patrón de expresión del mRNA de REST.

En el estadio de gástrula temprana (estadio 10) el mRNA de REST se expresa en el ectodermo (**A** y **B**, asterisco) y en las zonas marginales dorsal (**B**, punta de flecha) y ventral (**B**, flecha). En estadio de neurula temprana (estadio 14) el mRNA de REST se expresa en forma difusa en el ectodermo, especialmente en el borde anterior de la placa neural (**C**, flecha). En un corte transversal de un embrión en estadio de neurula temprana, se aprecia que el mRNA de REST se expresa con mayor intensidad en la capa profunda del ectodermo (**D**, flecha) en comparación a la capa superficial de éste (punta de flecha).

Objetivos

Objetivo General

Generar anticuerpos policlonales contra REST/NRSF de *Xenopus laevis*.

Objetivos Específicos

- Generar proteínas de fusión con GST y REST de *Xenopus laevis*.
- Inmunizar conejos con la proteína de fusión GST- REST de *Xenopus laevis*.
- Probar la inmunoreactividad del suero contra la proteína recombinante REST en embriones de *Xenopus laevis*.

Materiales y métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Animales

Los animales utilizados en esta memoria de título, fueron mantenidos bajo un protocolo de manejo y cuidados de animales de laboratorio, aprobado por el comité de bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Para las inmunizaciones se utilizó un conejo hembra de 9 meses de edad proveniente del Instituto de Salud Pública, y mantenido en el bioterio del Programa de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina.

Los ejemplares de *Xenopus laevis* utilizados fueron adultos silvestres de ambos sexos. Se alimentaron con Vita Ferret Formula, Sun Seed y se mantuvieron con un ciclo luz-oscuridad de 12 h, en el vivero del departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina.

Materiales y métodos

- **Generación de proteínas de fusión con GST y REST de *Xenopus laevis*.**

Amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Se amplificaron segmentos del cDNA que codifica REST/NRSF de *Xenopus laevis*, usando como templado clones aislados en el laboratorio. El cDNA fue amplificado empleando Taq DNA polimerasa Recombinante (Invitrogen),

usando partidores que fueron diseñados para tener a cada extremo secuencias nucleotídicas reconocidas por dos enzimas de restricción: BamH1 y EcoR1. La tabla 1 muestra la secuencia de los partidores y los productos resultantes.

Tabla 1. Partidores específicos y productos del PCR.

Se señalan los nombres y las secuencias de los partidores específicos, diseñados sobre la secuencia del cDNA que codifica REST/NRSF de *Xenopus laevis*. F, indica partidores directos y R, partidores reversos. Aparecen además, los nombres de los productos del PCR y su tamaño en pares de bases (pb).

Partidor	Secuencia	Producto	pb
pAb1	F1: ATCGGAATTCAGATGGCCACTCAAATGGTCAAC R1: CATGCGGCCGCATCTCCCATTATAAAAATTGTG	AB1	600
pAb2	F2: ATCGGATCCCGCAGTAATTTC AAGAAGCATGTA R2: GGCGAATTCGGCTTTACTCACATGTT CAGATTT	AB2	900
pAb3	F3: ATAGGATCCGATGAAGATGAAGGAATTCATAGT R3: CCGGAATTCAGATAGTATACATTA AACCAAATG	AB3	300

Los fragmentos amplificados codifican los siguientes dominios de la proteína REST de *Xenopus laevis*:

El fragmento AB1 codifica para una región que se ubica entre el extremo amino terminal y el término del dominio de unión a Sin3. Los fragmentos AB2 y AB3 codifican para dos dominios presentes entre el octavo y noveno dedo de zinc.

La figura 6 muestra un esquema con lo señalado anteriormente.

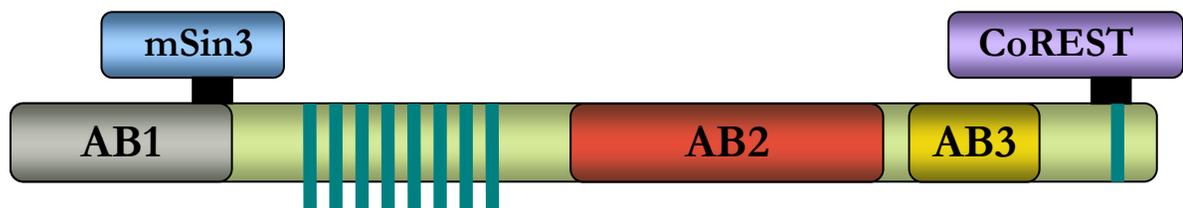


Figura 6. Dominios de la proteína REST codificados por los fragmentos amplificados.

Esquema que representa la proteína REST (verde) y la ubicación de los dominios codificados por los fragmentos AB1 (gris), AB2 (rojo) y AB3 (amarillo). Los dedos de zinc aparecen como columnas verde oscuro. Los correpresores Sin3 y CoREST aparecen en azul y lila respectivamente.

El termociclador (MJ Research) fue programado utilizando los siguientes parámetros: Paso 1: Desnaturación inicial, 94°C, 1 min. Paso 2: Desnaturación, 94°C, 30 s. Paso 3: Hibridación: 58°C, 30 s. Paso 4: Extensión, 72°C, 45 s. Los pasos del 2 al 4 fueron repetidos 30 veces. Paso 5: Extensión final, 72°C, 10 min. Paso 6: 4°C. La temperatura de hibridación (T_m) se determinó para cada pareja de partidores, utilizándose un promedio para las tres, ya que variaban muy poco, con el programa Gene Runner v3.05 (Hastings Software, Inc., USA).

Los productos de PCR fueron fraccionados electroforéticamente en geles de agarosa (Fisher Scientific) al 1%, cargados con tampón de carga 1x y utilizando como estándar de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder Invitrogen (100 ng/ul). Se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (Gibco), en un transiluminador UV (Ausubel, 1998). La fotografía de los geles se realizó con una cámara digital Kodak DC120, operada por medio de un computador personal con el programa 1D Image Analysis Software (Kodak, USA).

Los productos del PCR fueron purificados en columnas de sílica-gel (QIAquick PCR purification Kit, Qiagen, USA), de manera de remover los partidores utilizados y las sales.

Clonamiento, transformación y purificación

Para tener una mayor concentración de los productos de PCR, se clonaron en el vector PGEM-T® (Promega). Este vector presenta la ventaja de permitir una fácil clonación, debido a que viene linearizado y se une al fragmento de interés a través de uniones timina-adenina. Además, es posible identificar los clones recombinantes en la placa de cultivo rápidamente, ya que posee una región que codifica para la enzima β -galactosidasa, de modo que al incorporar la secuencia amplificada impide su expresión. De esta manera, al ser transformados en bacterias, presenta colonias blancas para aquellos vectores que ligaron los insertos exitosamente y colonias azules para los que no los incorporaron.

Para realizar la ligación, se midieron en un espectrofotómetro las concentraciones de los productos del PCR para calcular la cantidad de inserto a ligar en el vector, a través de la siguiente ecuación proporcionada por el fabricante de PGEM-T® (Promega):

$$\frac{\text{ng del vector} \times \text{Kb del inserto}}{\text{Kb del vector}} \times \text{relación inserto : vector} = \text{ng del inserto}$$

En donde, ng del vector = 50 ng/ul y Kb del vector = 3,0 Kb. La relación del inserto : vector que se utilizó fue de 3 : 1 y los Kb de los insertos son 0,9 (AB2) y 0,3 (AB3).

La ligación se realizó con T4 DNA Ligasa (Promega) por toda la noche a 4°C, para obtener el máximo de transformantes.

Para la transformación se tomaron 2 uL de cada tubo, que contenía la reacción de ligación, y se mezclaron cuidadosamente con 50 uL de bacterias JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega). Se dejaron en hielo por 20 min. A continuación, se les dió un golpe térmico por 50 s en un baño de agua a 42°C. Se dejaron en hielo por 2 min. Luego, se les adicionó 950 uL de medio SOC (0,5% extracto de levadura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa) y se incubó por 1,5 h a 37°C con agitación a 150 rpm.

El cultivo se centrifugó a 2.773 x g por 5 min, resuspendiéndose el sedimento en 300 uL. Se sembró en placas LB/ampicilina/IPTG/XGal por toda la noche a 37°C. Luego, se tomaron colonias blancas y se incubaron en medio de cultivo líquido LB/ampicilina por toda la noche a 37°C.

La purificación del vector se realizó través de QI prep Spin Miniprep kit (QIAGEN) el cual, está basado en la lisis alcalina de las células bacteriales seguido por la adsorción del DNA en una membrana de sílica-gel en presencia de altas concentraciones de sal (Vogelstein y Gillespie, 1979). Se digirió el vector para obtener los insertos con las enzimas de restricción EcoR1 y BamH1

(Promega), luego se purificaron los insertos desde un gel de agarosa con el Kit de extracción de gel QIA quick®.

Se procedió a clonar en el segundo vector, PGEX 2T (Promega). Este vector permite la expresión del fragmento clonado como una proteína de fusión con la glutatión S-transferasa (GST), lo que permite su posterior recuperación mediante la incubación con glutatión. Como primer paso, se linearizó el vector con las enzimas de restricción EcoR1 y BamH1 (Promega). Se purificó el vector desde un gel de agarosa con el Kit de extracción de gel QIA quick®.

Posteriormente, se desfosforiló con la enzima fosfatasa alcalina (CIAP, Promega), de manera de remover los grupos fosfato de los terminales 5' del DNA previniendo la recircularización del vector (Sambrook *et al.*, 1989). A continuación, se precipitó con fenol-cloroformo para eliminar las enzimas y las sales.

Se realizó la ligación del vector PGEX 2T con cada inserto por toda la noche usando la enzima T4 DNA ligasa, de la misma manera que con el vector PGEM®-T. Se transformó en bacterias Subcloning Efficiency DH5 α Cells (Gibco), empleando el mismo protocolo antes mencionado para el primer vector. Se realizaron controles transformando bacterias con el vector sin clonar, de manera de inducir posteriormente solamente la proteína GST.

Se obtuvo el vector desde el cultivo líquido de LB/ampicilina usando el QI prep Spin Miniprep kit (QIAGEN). Se comprobó la existencia de cada inserto digiriendo el vector con las enzimas de restricción EcoR1 y BamH1 (Promega). La digestión fue observada en un gel de agarosa al 1%. Los vectores fueron secuenciados en el Centro de Síntesis y Análisis de Biomoléculas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Producción bacteriana de la proteína de fusión GST- REST de *Xenopus laevis*

Cultivo

Se inoculó la bacteria transformada con el vector de expresión PGEX 2T clonado y el control en 150 mL de medio Terrific Broth (1,2% triptona, 2,4% extracto de levadura, 0,4% glicerol, 0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4)/ampicilina y se dejó crecer durante toda la noche a 37°C con agitación. Posteriormente, se agregó 3000 mL del medio y se dejó crecer hasta una $\text{OD}_{600} = 0,8 - 1,0$ en matraces con 500 mL de cultivo cada uno.

Inducción

Se agregó al cultivo IPTG (Applichem) 0,5 mM para inducir la producción de la proteína REST y la proteína GST en el control. Se incubó por 3 h a 37°C. Posteriormente se centrifugó a 3.300 x g por 20 min, el sedimento bacteriano se guardó a -80°C por toda la noche.

Se tomó 1 mL de muestra del cultivo antes de agregar el IPTG (tiempo 0) y 1 mL de muestra después de 1, 2 y 3 h de aplicado. Se centrifugaron a 3.300 x g por 5 min. Se descartó el sobrenadante y a cada sedimento bacteriano se le agregó 20 uL de SDS tampón de muestra, se homogeneizaron y se guardaron a -20°C.

Lisis bacteriana

El sedimento bacteriano se resuspendió en tampón de lisis 1x (50 mM Tris pH 7,8, 0,4 M NaCl, 0,5 mM EDTA, 10% glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol, 0,5 mM PMSF, 10 ug/ leupeptina, 10 ug/mL pepstatina y 10 ug/mL de aprotinina) más lisozima (Sigma) hasta una concentración final de 1 mg/mL. Se dejó reposar

en hielo por 30 min agitando con vortex cada 5 min. Luego, se procedió a centrifugar a $130.600 \times g$ por 50 min a 4°C .

Se tomaron muestras del sedimento bacteriano (100 uL) y del sobrenadante con las proteínas totales (150 uL), guardándose con tampón de muestra 1x a -20°C .

Purificación de la proteína de fusión.

El sobrenadante que contiene las proteínas bacterianas totales se incubó con 3 mL de bolitas de agarosa-glutión en suspensión con agitación a 4°C . Se centrifugaron las bolitas a $2.773 \times g$ y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se lavó 4 veces con tampón de lisis 0.5x para eliminar la proteína libre. Se tomaron muestras de las bolitas unidas a la proteína REST (150 uL) y del sobrenadante luego de los lavados (150 uL).

Elución

Para liberar la proteína REST de las bolitas de agarosa-glutión, se incubaron las bolitas unidas a la proteína con 3 mL de una solución de glutión 50 mM en Tris 50 mM pH 9,6, por 5 min. Luego, se centrifugó a $2.773 \times g$. El sobrenadante que contenía la proteína REST se dializó contra PBS por toda la noche a 4°C .

Todas las muestras se hirvieron por 5 min en un baño de agua. Las proteínas se separaron por medio de electroforesis en geles de acrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% en condiciones desnaturantes. La electroforesis se realizó en el equipo Power-Pac 200, (BioRad) a temperatura ambiente y a 110 V. Se utilizó como estándar de peso molecular High Molecular Weight Standard

Mixture (Sigma). Los geles se tiñeron con Gel Code Blue Stain Reagent (Pierce) por 30 min y se secaron en una estufa con vacío constante por 3h.

Cuantificación

La proteína REST se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando como estándar de proteína albúmina de suero bovino, cuya concentración fluctúa entre 0 ug y 25 ug, a cada muestra se le adicionaron 200 uL de reactivo Bradford (Winkler), completando los 1000 uL con solución de dilución. Se ensayaron 3 diluciones para cada eluido de 2 uL, 5 uL y 8 uL cada uno, y se determinó la concentración de la proteína por absorbancia en el espectrofotómetro. Se utilizó una curva de calibración para determinar la concentración de proteína en cada muestra, para lo que se realizó una regresión simple utilizando el programa Microsoft Office Excel 2000.

Método de fragmentación de tajada de gel húmedo

Como método alternativo a la elución con glutatión de las bolitas de agarosa-glutatión, se utilizó la fragmentación de tajada de gel húmedo (Harlow y Lane, 1988) para obtener la proteína REST a través del corte del gel de acrilamida, su homogeneización e inoculación.

Se procedió a separar electroforéticamente la proteína REST unida a las bolitas de agarosa-glutatión. Para calcular la concentración de la proteína a cargar, se comparó en un gel de acrilamida, teñido con azul de coomasie, la proteína REST con concentraciones conocidas y crecientes de la proteína GST. La proteína GST se cargó en las siguientes concentraciones: 1 ug, 5 ug y 10 ug. De esta manera, al comparar las bandas visualmente se estableció aproximadamente la cantidad de proteína REST que había en los 20 uL que se cargaron. Luego, se realizó la electroforesis de 200 ug de la proteína REST unida

a las bolitas de agarosa-glutación en un gel de acrilamida al 10%, a 110 V y a temperatura ambiente en el equipo SE600 Hoeser Scientific Instruments.

Se cortó la tajada de gel en la zona donde la proteína REST migró, luego se lavó 4 veces por 5 min en agua bidestilada. Se puso sobre un parafilm y se secaron los bordes con papel filtro. Se pasó varias veces el fragmento a través de dos jeringas de vidrio conectadas entre sí hasta homogeneizarlo completamente. Luego, el fragmento se pasó por una aguja de 21G, aspirando y eliminando varias veces. Inmediatamente se le adicionó un volumen equivalente de adyuvante Freund y se inyectó al conejo.

- **Inmunización de conejos con la proteína de fusión GST-REST de *Xenopus laevis*.**

Inoculación y Sangrado

Para las inmunizaciones se utilizó un protocolo de anestesia que consistió en la aplicación de una inyección intramuscular de acepromazina (0,5 - 0,75 mg/Kg) como tranquilizante y ketamina (25 mg/Kg) como anestésico, a un conejo de 5,5 Kg antes de cada sesión de inyección y sangramiento. En la última sesión se inyectó ketamina (25 mg/Kg) como anestésico, se le extrajo la mayor cantidad de sangre posible por punción cardíaca y luego, se sacrificó el animal por una sobredosis letal de anestésico tiopental sódico (50 mg/Kg o según respuesta) endovenoso diluido al 5%.

En la primera sesión se inoculó por vía subcutánea 200 ug de la proteína REST con adyuvante Freund completo. Un mes después, y luego, cada dos semanas hasta el día del sacrificio, se utilizó la mitad de la dosis (100 ug) con adyuvante Freund incompleto. Se obtuvieron muestras de sangre de la vena marginal de la oreja cada vez que se inoculó, las muestras se recolectaron en

tubos sin anticoagulante. Para obtener el suero se dejó que la sangre coagulara a 37°C por 30 min. Luego, el coagulo fue separado usando una pipeta Pasteur y dejado a 4°C por 1 h para conseguir su retracción. Posteriormente se extrajo el suero y se centrifugó a 10.000 x g por 10 min a 4°C para remover el material insoluble remanente. Se alicuotó y se guardó a -80°C. Para efectos prácticos el suero obtenido se le denominó suero antiRESTx.

- **Inmunorreactividad del suero contra REST en embriones de *Xenopus laevis*.**

Para probar la inmunoreactividad del suero antiRESTx en los diferentes estadios embrionarios, se realizó electrotransferencia e inmunohistoquímica.

Obtención de los embriones de *Xenopus laevis*

La ovulación de las ranas hembras fue pre-inducida a través de una inyección de 50 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG) en el saco dorsal linfático. La inducción de la ovulación se realizó después de una semana mediante la inyección de 800 UI de hCG en la misma zona. Luego de 15 h fueron estimuladas manualmente para la recolección de los ovocitos, los que fueron fecundados inmediatamente con un macerado de testículo de anuro macho adulto. La extracción testicular se realizó luego del sacrificio del macho, mediante sección medular, previa anestesia por inmersión en una solución de benzocaína al 0,05%. Los huevos fecundados fueron cubiertos con una solución de MBS 0,1x por 30 min aproximadamente hasta observar la rotación cortical, signo de una fecundación exitosa. Luego, se removió la gelatina que los cubría con una solución de cisteína al 2% pH 8,0 ajustado con NaOH 2 M. A continuación, se lavaron con MBS 0,1x 10 veces y se mantuvieron en el

mismo medio a 23°C. Para la identificación de las etapas del desarrollo embrionario se utilizó la tabla de desarrollo de Nieuwkoop y Faber (1994).

Preparación de los extractos de embriones

En la preparación de los extractos para la electrotransferencia, se utilizaron grupos de 30 embriones de *Xenopus laevis* en estadio 2 (clivaje), 9 (blástula), 10,5 (gástrula), 16 (neurula), 25 y 42 (organogénesis). Se homogeneizó cada estadio en 30 uL de tampón LS (20 mM HEPES pH 9, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF, 1 ug/mL pepstatina, leupeptina y de aprotinina) en hielo, utilizando un homogeneizador de vidrio esmerilado. Se agregó 30 uL de freón para cada tubo y se agitó con vortex. A continuación, se centrifugó a 3.300 x g a 4°C, durante 10 min y se recuperó la fase acuosa. Se adicionó a cada tubo SDS tampón de muestra 1,5x y glicerol en un 20%. Los extractos de cada estadio se guardaron a -80°C.

Electrotransferencia

De los extractos obtenidos en la forma descrita en el punto anterior se cargaron 15 uL de cada estadio por pocillo, lo que corresponde a aproximadamente 7 embriones por estadio. Fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE) durante 90 min a 110 V (equipo Power-Pac 200, BioRad, USA), utilizando el estándar de peso molecular preteñido Kaleidoscope Prestained Standard (BioRad). Como control negativo se utilizó el suero antiRESTx preabsorbido, el cual se obtuvo incubando 300 uL de bolitas de agarosa glutatión unidas a la proteína REST con 300 uL del suero antiRESTx diluido 1:100 en PBS 1x por toda la noche a 4°C. También, se utilizó como control negativo la incubación

sólo con el anticuerpo secundario. En ambos controles se utilizó una mezcla de los extractos antes mencionados.

Las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa con un protocolo de rutina durante 120 min a 110 V. Una vez finalizada la transferencia se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de la membrana con una solución de leche descremada al 10% en P_Tw (PBS 1x, Tween 20 0,05%) durante 2 h. A continuación, se incubó con el suero antiRESTx diluído en diferentes concentraciones; 1:250, 1:500, 1:1000, en solución de bloqueo, a 4°C durante la noche. Se lavó 5 veces con P_Tw durante 5 min y se incubó con un anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson Immuno Research) en una dilución 1:3000 en P_Tw. Después de lavar 5 veces durante 5 min con P_Tw, se reveló la actividad peroxidasa bajo condiciones de emisión de quimioluminiscencia (Supersignal® west Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) y se expuso a películas fotográficas BioMax MS (Kodak) por un período de 1 a 30 min.

Además, el suero antiRESTx fue probado en extractos de embriones inyectados previamente en nuestro laboratorio con un morfolino antisentido de REST de *Xenopus laevis* bajo las mismas condiciones arriba mencionadas. Este morfolino es un oligonucleótido antisentido que actúa específicamente bloqueando el inicio de la traducción de la proteína REST.

Inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica en embriones de *Xenopus laevis* en estadios de blástula, gástrula y neurula, *in toto* y en cortes parafinados de ellos.

Inmunohistoquímica en embriones *in toto*

Se utilizaron grupos de 20 embriones de *Xenopus laevis* en estadios de blástula, gástrula y neurula. Se fijaron en MEMPFA (Mops 0,1 M pH 7,0, EGTA 2 mM, Mg SO₄ 1 mM, Paraformaldehído 4%) por 1 h y se almacenaron en metanol 100% a -20°C. Se blanquearon con solución de blanqueo (1% H₂O₂, 5% formamida y 0,5x SSC) y se expusieron bajo luz fluorescente durante 2 h. Posteriormente, se rehidrataron en lavados de 10 min en:

80% metanol / agua bidestilada, 50% metanol / PBS 1x, 20% metanol / PBS 1x.

A continuación, se transfirieron los embriones a un tubo de vidrio para incubarlos en PBT (PBS 1x, BSA 2 mg/mL, Tritón X-100 0,1%) durante 15 min con rotación continua. Luego, para bloquear los sitios inespecíficos se incubaron por 1h con PBTG (PBT y suero de cabra 10%). Posteriormente, se incubaron toda la noche a 4°C con el suero antiRESTx diluído en PBT en diferentes concentraciones (1:50, 1:100, 1:1000). Como control positivo se incubaron los embriones con anticuerpo anti fosfohistona diluído 1:1000 en PBT y como control negativo se incubaron con el suero antiRESTx preabsorbido y otro sólo con el anticuerpo secundario. Se realizaron 8 lavados de 30 min con PBT y se incubaron los embriones con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplados a peroxidasa de rábano (Jackson Inmuno Research) en una dilución 1:1000 en PBT por toda la noche a 4°C. Se lavaron con PBT y se adicionó 0,5 mL de DAB (1 mg/mL) para luego incubarlos con rotación por 10 min a 4°C. Se inició la inmunomarcación con la adición de 1 uL de una mezcla 1/1 de peróxido de hidrógeno 30% y PBT. Luego de 10 min se detuvo la reacción

removiendo el DAB y reemplazándolo por PBT. Se deshidrataron los embriones con dos cambios de metanol 100%.

Los embriones fueron montados en una placa con gel de agarosa y fotografiados con una cámara digital Nikon Coolpix 5000, Japón acoplada a una lupa Nikon SMZ1000, Japón. Luego fueron almacenados en metanol 100%.

Inclusión de los embriones en parafina

Para la inmunohistoquímica de los cortes de embriones, se utilizaron 30 embriones fijados y almacenados en metanol 100% en estadio de blástula, gástrula y neurula. Se pusieron en xilol 100% por 10 min a temperatura ambiente. Se traspasaron a un nuevo xilol 100% y se repitió el paso anterior. A continuación, se impregnaron en parafina por 10 min a 58-60°C, se repitió el paso por 20 y 40 min en diferentes pocillos con parafina. Luego, se incluyeron en parafina filtrada y se dejaron a temperatura ambiente para la solidificación. Los embriones incluidos en parafina fueron cortados con micrótopo obteniendo cortes de 10 μ m, los que se dispusieron sobre portaobjetos silanizados. Para silanizar los portaobjetos, primero se limpiaron con una solución de alcohol absoluto y se secó con papel absorbente el exceso. Luego, se cargaron en canastos para portaobjetos y se sumergieron en etanol 100%. A continuación, se enjuagaron en acetona pura por 5 min. Se sumergieron en una solución de silano al 2% en acetona pura durante 3 min. Se repitió el enjuague con acetona por 30 s y se secaron utilizando aire caliente. A continuación, se dejaron a 60°C por 1 h, para luego ser guardados en cajas cerradas libres de polvo.

Inmunohistoquímica de los cortes

Los cortes se desparafinaron mediante el paso por xilol 100% por 5 min, proceso que se repitió tres veces. A continuación, se rehidrataron pasándolos dos veces por una batería de etanoles 100%, luego por etanol 70% y para finalizar en agua destilada por 3 min a temperatura ambiente. Se secaron cuidadosamente los bordes de los cortes y se demarcaron con un lápiz hidrófobo. Se realizaron 3 lavados en PBS 1x pH 7,4 a temperatura ambiente durante 5 min. Se bloquearon las uniones inespecíficas reemplazando el PBT por PBTG y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Luego, los portaobjetos se secaron con toalla absorbente teniendo cuidado de no tocar el corte. Se incubaron con el suero antiRESTx diluido 1:100 y 1:1000 en PBT en cámara húmeda por toda la noche a 4°C. Se realizaron controles positivos con el anticuerpo anti fosfohistona diluido 1:1000 en PBT y como controles negativos se incubaron con el suero antiRESTx preabsorbido y otro grupo sólo con el anticuerpo secundario.

Se lavaron con PBT 5 veces por 5 min, luego se secaron con toalla absorbente. A continuación, un grupo (250 cortes) se incubó con el anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson Inmuno Research) y otro grupo (250 cortes) se incubó con el anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a rodamina (Jackson Inmuno Research) para realizar inmunofluorescencia, ambos se usaron en una dilución 1:1000 en PBT y se incubaron en cámara húmeda por toda la noche a 4°C y en oscuridad para los con inmunofluorescencia. Se lavaron 6 veces con PBT durante 5 min. Para el grupo al cual se le realizó la reacción con peroxidasa, se adicionó DAB (1 mg/mL) y se incubaron por 10 min a 4°C. Se inició la inmunomarcación con la adición de 1 uL de una mezcla 1/1 de peróxido de hidrógeno 30% y PBT. Luego de 10 min se detuvo la reacción lavando los portaobjetos con PBT. Todos los

cortes se montaron en glicerina al 70%, se observaron y fueron fotografiados en el microscopio Nikon Eclipse E400 acoplado a una cámara digital Nikon Coolpix 5000, Japón.

Resultados y Discusión

- **Generación de proteínas de fusión con GST y REST de *Xenopus laevis*.**

Para generar anticuerpos contra REST de *Xenopus laevis* se aprovecharon las ventajas del empleo de las proteínas de fusión. Éstas se forman al transcribirse y traducirse la región que codifica para una proteína celular estable, en este caso GST, fusionada en marco de lectura a la región que codifica para la proteína de interés, en este caso REST *Xenopus laevis*. De esta manera, se evita su degradación, produciendo un mayor nivel de expresión y facilita su posterior purificación.

La primera parte de este trabajo se abocó a generar proteínas de fusión con GST y la proteína REST de *Xenopus laevis*.

Amplificación de los fragmentos a partir del cDNA de *Xenopus laevis*

Sobre cDNA que codifica REST/NRSF de *Xenopus laevis*, se logró amplificar mediante PCR los siguientes fragmentos:

Utilizando los partidores pAb3F y pAb3R, se amplificó un fragmento de aproximadamente 300 pb. Este fragmento, denominado AB3, codifica para una región de la proteína REST que se encuentra entre el 8° y 9° dedo de zinc. De la misma manera, utilizando los partidores pAb2F y pAb2R, se amplificó un

fragmento de 900 pb. Este fragmento, llamado AB2, codifica para un dominio también presente entre el octavo y noveno dedo de zinc. Se comprobó mediante un gel de agarosa al 1% que ambos fragmentos presentan tamaños que corresponden con los esperados (Fig. 7).

Por último, empleando los partidores pAb1F y pAb1R no fue posible amplificar el fragmento AB1, el cual codificaba para una región ubicada entre el extremo amino terminal y el término del dominio de unión a Sin3. Se cambiaron las condiciones en las que se realizó el PCR; como establecer una temperatura de hibridación (T_m) más óptima y cambiar la concentración de $MgCl_2$. Además, se realizaron reacciones con partidores intercambiados, por si existía la posibilidad de que uno de los partidores (pAb1F y pAb1R) fallara. En ninguno de los casos hubo amplificación. Por esta razón, se decidió continuar con los otros fragmentos y desistir en la utilización de este último.

Es importante destacar que el dominio de unión a DNA de la proteína REST de otras especies, se ha utilizado para generar una variedad de anticuerpos. Éstos no han sido de utilidad en la detección de la proteína endógena mediante técnicas de localización tisular como inmunohistoquímica. Por esta razón, este dominio no fue considerado para este estudio.

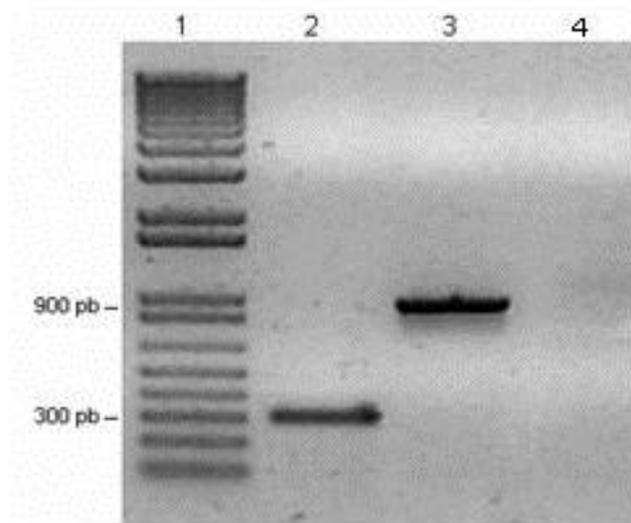


Figura 7. Productos amplificados por PCR.

Gel de agarosa al 1% con estándar de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder Invitrogen (500 ng) en el carril 1.

Se aprecian los productos amplificados por PCR; AB3 de 300 pb (carril 2) y AB2 de 900 pb (carril 3) luego de cargar 2 uL de reacción por carril. Como control negativo se realizó la reacción de PCR sin templado (carril 4). Se empleó para las reacciones Taq DNA polimerasa Recombinante Invitrogen y partidores que se detallan en la tabla 1 (ver materiales y métodos). La fotografía de los geles se realizó con una cámara digital Kodak DC120, operada por medio de un computador personal con el programa 1D Image Analysis Software (Kodak, USA).

Clonación de los fragmentos amplificados en los vectores

Los fragmentos amplificados AB2 y AB3 fueron clonados independientemente, en el vector PGEM-T®. Este vector fue escogido por su facilidad de clonamiento, ya que presenta la ventaja de venir linearizado, además de poseer selección de colonias por color.

Se digirió el vector PGEM-T® clonado con cada fragmento con las enzimas de restricción EcoR1 y BamH1 Promega, para comprobar el éxito de la ligación y la posterior recuperación de los fragmentos. En los geles de agarosa fue posible visualizar una banda de ~3000 pb que corresponde al vector PGEM-T® linearizado. Abajo de cada vector cortado aparecen las bandas que corresponden a los fragmentos AB2 y AB3 clonados, de 900 y 300 pb respectivamente (Fig. 8).

La segunda etapa, consistió en recuperar los fragmentos purificados desde un gel de agarosa con el Kit de extracción de gel QIA quick®, para ser clonados en el vector de expresión PGEX 2T. Este vector permite la expresión del fragmento clonado como una proteína de fusión con la glutatión S-transferasa (GST), lo que permite su posterior recuperación mediante la incubación con glutatión.

Para comprobar que la clonación de los fragmentos AB2 y AB3 había sido exitosa, se digirió el vector PGEX 2T con las enzimas de restricción EcoR1 y BamH1. Se pudo apreciar en los geles de agarosa una banda de ~5000 pb que corresponde al vector PGEX 2T linearizado. Bajo ellos se encontró los fragmentos de 900 y 300 pb, que corresponden a los fragmentos AB2 y AB3 respectivamente clonados exitosamente (Fig. 9).

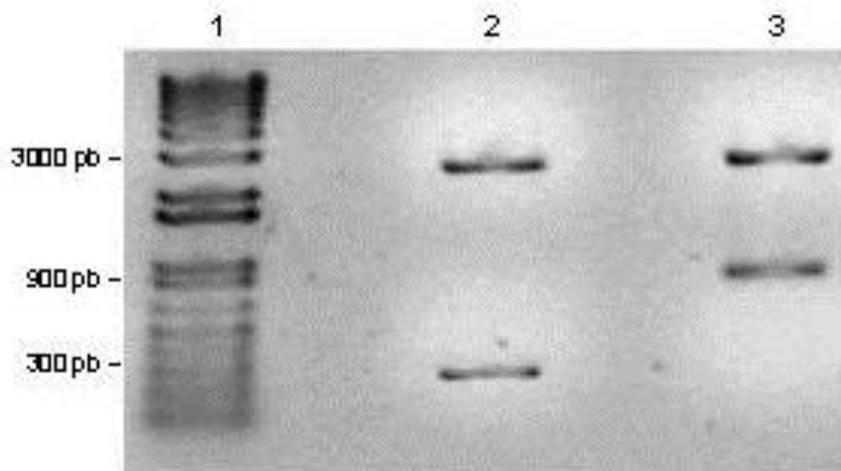


Figura 8. Digestión del vector PGEM-T clonado con los fragmentos AB2 y AB3.

Gel de agarosa al 1% en donde se aprecia el resultado de la digestión del vector PGEM-T® clonado con las enzimas de restricción EcoR1 y BamH1, Promega. En el carril 1 aparece el estándar de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder Invitrogen (500 ng). En el carril 2 se muestra al vector PGEM-T® de ~3000 pb linearizado y el fragmento cortado que corresponde a AB3 de 300 pb. El vector linearizado y el fragmento AB2 cortado de 900 pb aparece en el carril 3.

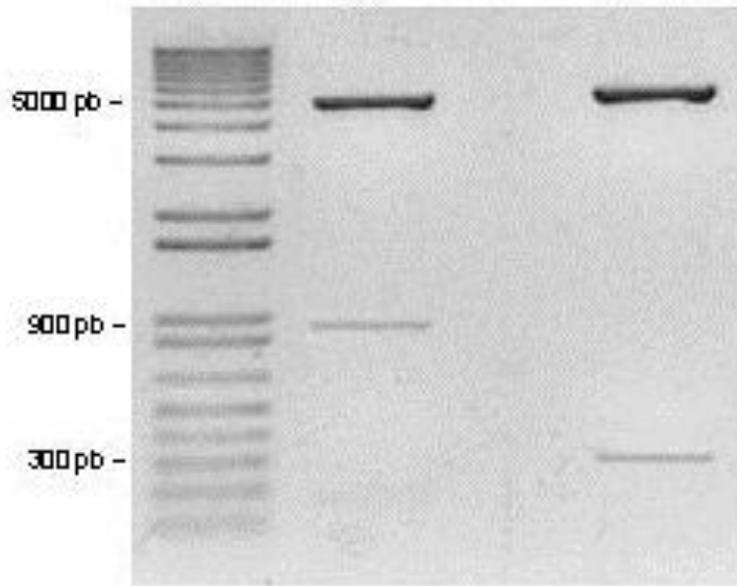


Figura 9. Digestión del vector de expresión PGEX 2T clonado con los fragmentos AB2 y AB3.

Gel de agarosa al 1% que muestra los productos de la digestión del vector clonado PGEX 2T con las enzimas de restricción EcoR1 y BamH1, Promega. El estándar de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder Invitrogen (500 ng) se muestra en el carril 1. El vector PGEX 2T de aproximadamente ~4900 pb se aprecia linearizado sobre el inserto de 900 pb que corresponde a AB2 luego de la digestión (carril 2). En el carril 3 se encuentra el vector PGEX 2T linearizado y el fragmento de 300 pb que corresponde a AB3.

Producción de la proteína AB2 y AB3

Inducción

Los vectores de expresión PGEX 2T clonados con los fragmentos AB2 y AB3 independientemente, y transformados en bacterias Subcloning Efficiency DH5 α Cells Gibco, fueron inducidos con IPTG para producir las proteínas AB2 y AB3 fusionadas a GST.

La recuperación de la proteína AB2 fue en reducida cantidad, visualizándose en el gel de acrilamida una delgada banda de ~56 KDa que corresponde al tamaño de la proteína AB2 unida a GST (Fig. 10A), en comparación con la recuperación control de la proteína GST que presentó una gran banda de ~26 KDa (Fig. 10B). El hecho de que haya existido poca recuperación de la proteína podría deberse a que la proteína AB2 no era muy estable en el tiempo, ya que generaba un bandeo de degradación proteica bastante marcado aún en presencia de inhibidores de proteasas.

En el caso de la proteína AB3, no se pudo obtener su inducción. Se aumentaron las concentraciones de IPTG a 1 mM y se aumentaron los tiempos de incubación a 18 h, bajando la temperatura de incubación a 30°C, pero de ninguna manera la inducción pudo ser visualizada en el gel de acrilamida (Fig. 11).

Al obtener el resultado de la secuenciación de los vectores clonados se pudo apreciar que la secuencia nucleotídica del fragmento AB2 correspondía a la secuencia original. En cambio, el fragmento AB3 presentaba cambios importantes en su secuencia nucleotídica original. Ésto, sumado a la falla en la inducción de la proteína, nos hizo desistir de su utilización siguiendo los procedimientos futuros sólo con la proteína AB2.

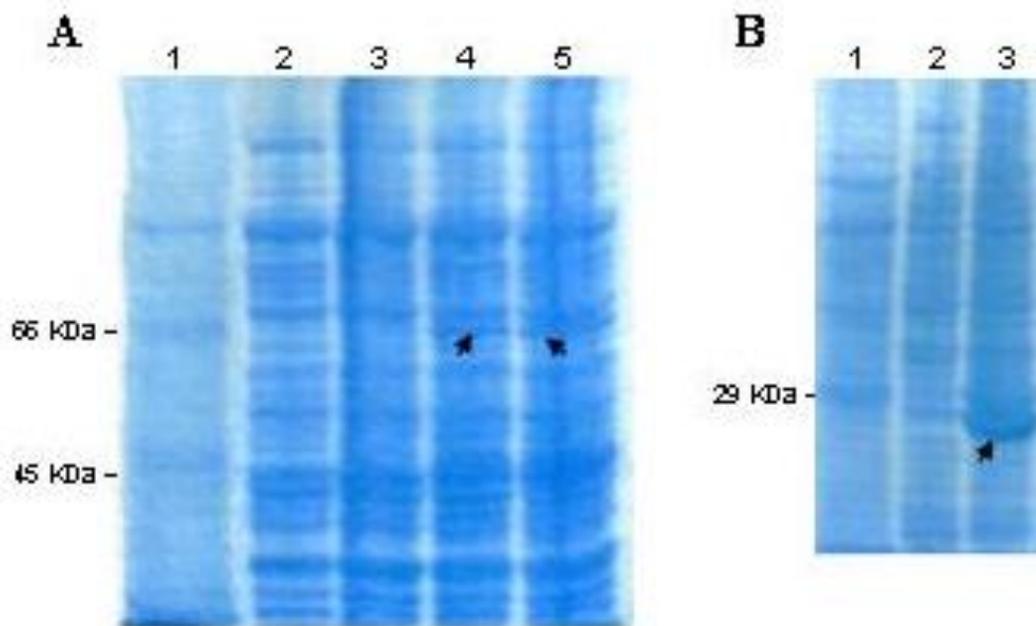


Figura 10. Inducción de la proteína AB2 y GST.

Geles de acrilamida al 10% que muestran la inducción y recuperación de la proteína AB2 y la proteína control GST luego de agregar IPTG 0,5 mM al medio de cultivo. **A.** El carril 1 muestra el estándar de peso molecular High Molecular Weight Standard Mixture Sigma. La proteína AB2 antes de inducir (tiempo cero) se encuentra en el carril 2. Después de 1, 2 y 3 h de agregar el IPTG (carriles 3, 4 y 5 respectivamente), se aprecia un reducido aumento de la banda de ~56 KDa que corresponde a la recuperación de la proteína AB2 inducida (flechas).

B. En el carril 1 se encuentra el estándar de peso molecular High Molecular Weight Standard Mixture Sigma. Se aprecia la inducción control de la proteína GST en tiempo cero (carril 2) y a las 3 h de agregar el IPTG (carril 3) se ve la aparición de una gran banda de ~26 KDa que corresponde a la recuperación de GST inducido (flecha).

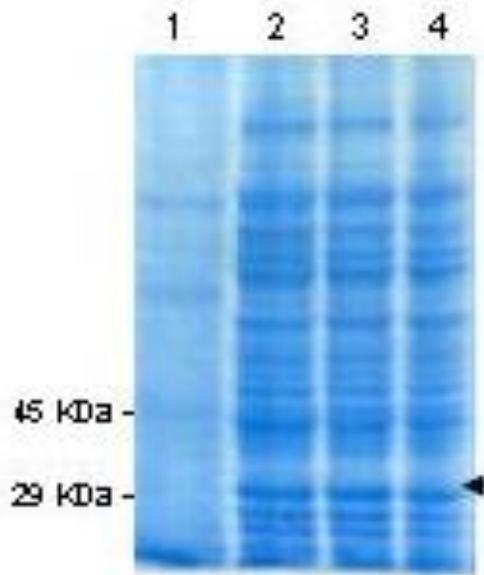


Figura 11. Inducción de la proteína AB3.

Gel de acrilamida al 10% que muestra que la proteína AB3 no se induce luego de agregar el IPTG. El carril 1 muestra el estándar de peso molecular High Molecular Weight Standard Mixture Sigma. La proteína AB3 en tiempo cero se aprecia en el carril 2. Después de 2 y 3 h de inducción (carril 3 y 4 respectivamente) no se evidencia aumento de la banda de $\sim 33,6$ KDa que correspondería a la proteína AB3 (punta de flecha).

Incubación y Elución

Luego de la inducción se lisaron las bacterias y el sobrenadante que contenía las proteínas totales se incubó con las bolitas de agarosa-glutación. De esta manera, la proteína AB2 fusionada a GST quedó unida a estas bolitas. Después de varios lavados para retirar la proteína libre, la proteína AB2 unida a las bolitas de agarosa-glutación se incubó con glutación para ser eluída.

La elución de la proteína AB2 no se consiguió, permaneciendo unida a las bolitas de agarosa-glutación (Fig. 12). El eluído no contenía proteínas al ser cuantificado por el método de Bradford. Se desconoce la razón por la cual no se liberaron, posiblemente generaron interacciones más fuertes que la afinidad de las bolitas por el glutación.

Esta situación, imposibilita la obtención de la proteína pura para ser inyectada en las inmunizaciones. Por esta razón, se escogió el método de fragmentación de la tajada de gel húmedo para obtener la proteína a inyectar.

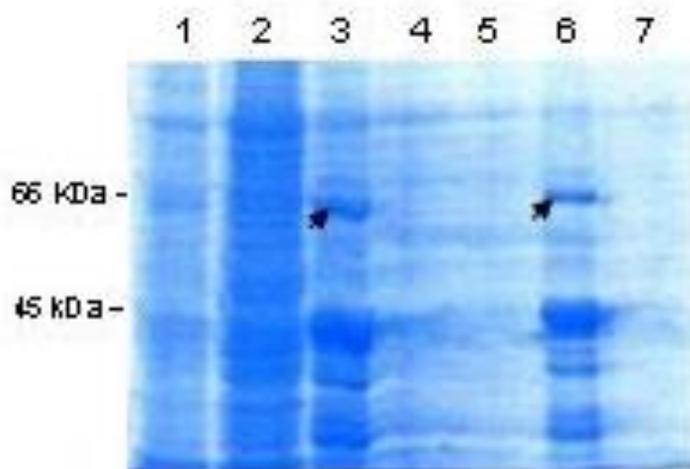


Figura 12. Elución de la proteína AB2.

Gel de acrilamida al 10%. El carril 1 muestra el estándar de peso molecular High Molecular Weight Standard Mixture Sigma. En el carril 2 se encuentran las proteínas totales bacterianas luego de ser lisadas. En el carril 3 se aprecia la proteína AB2 unida a las bolitas de agarosa-glutación luego de la incubación. Luego de lavar las bolitas, se muestra que en los últimos dos lavados ya no queda proteína libre en el sobrenadante (carril 4 y 5). Al incubar las bolitas unidas a la proteína AB2 con glutación se aprecia que no existe elución de la proteína y que permanece unida a las bolitas (carril 6). El eluido aparece sin la proteína AB2 (carril 7).

Método de fragmentación de tajada de gel húmedo

Se utilizó el método de fragmentación de tajada de gel húmedo (Harlow y Lane, 1988) para obtener la proteína REST que posteriormente se inyectó.

Para calcular la concentración de la proteína a cargar, se comparó en un gel de acrilamida la proteína REST unida a las bolitas de agarosa-glutación con concentraciones conocidas y crecientes de la proteína GST (1 ug, 5 ug y 10ug). De esta manera, al comparar las bandas visualmente se estableció que la cantidad de proteína REST que había en los 20 uL que se cargaron era de aproximadamente 5 ug.

Se sometió a electroforesis 800 uL de la proteína unida a las bolitas de agarosa-glutación, que corresponde aproximadamente a 200 ug de la proteína REST. Luego, se cortó la banda de ~56 KDa del gel de acrilamida que corresponde a la proteína AB2 de REST. Se homogeneizó y se mezcló con adyuvante para ser inyectada al animal.

La cantidad mínima de proteína que se recomienda como dosis a inyectar en la inmunización de conejos es de 10 ug por inyección, siendo 100 ug la dosis usada comúnmente (Harlow y Lane, 1988). Por esta razón, el cálculo aproximado de la cantidad de proteína REST resulta válido y supera ampliamente las dosis mínimas recomendadas para inducir una respuesta inmune óptima en el animal.

- **Inmunización de conejos con la proteína de fusión GST-REST de *Xenopus laevis*.**

En cada inmunización se utilizó un protocolo de anestesia aprobado por el comité de bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (ver materiales y métodos).

Se inyectó en la primera oportunidad 200 ug de la proteína con adyuvante Freund completo subcutáneamente, en varios puntos de la línea media dorsal del animal. En las sesiones posteriores, se inoculó 100 ug de la proteína fresca con adyuvante Freund incompleto. Se sangró al animal a partir de la segunda inmunización, obteniendo de la vena marginal de la oreja un volumen promedio de 6,5 mL por sesión. Posteriormente, al sacrificio se obtuvo 15 mL por punción intracardiaca. La tabla 2 muestra el calendario de las inmunizaciones y sangrado. El suero se alicuotó y se guardó congelado.

El hecho de contar sólo con la proteína unida a las bolitas de agarosa-glutatinación incide directamente en los objetivos de esta memoria de título, debido a que no se cuenta con la proteína libre para purificar el anticuerpo REST del suero generado. Por esta razón, los procedimientos que vienen a continuación se limitaron a la utilización del suero en las técnicas de electrotransferencia e inmunohistoquímica. Para fines prácticos, el suero contra la proteína recombinante REST de *Xenopus laevis* se denominó antiRESTx.

Tabla 2. Calendario de inmunizaciones y sangrado.

Se muestran los días en los cuales se inmunizó y sangró al animal, además del tipo de adyuvante utilizado. Se señala la cantidad inyectada de proteína en cada sesión y la cantidad de sangre extraída en los sangrados.

Inmunizaciones	Adyuvante	Dosis	Sangrado
Día 1	Freund completo	200ug	7 mL
Día 26	Freund incompleto	100ug	7 mL
Día 43	Freund incompleto	100ug	7 mL
Día 50	Freund incompleto	100ug	7 mL
Día 68	Freund incompleto	100ug	7 mL
Día 125	-	-	15 mL

- **Inmunoreactividad del suero antiRESTx**

La segunda parte de este trabajo, consistió en probar el suero antiRESTx, mediante electrotransferencia e inmunohistoquímica en embriones de *Xenopus laevis* en diferentes estadios del desarrollo.

Electrotransferencia

Se utilizaron grupos de 30 embriones en estadio 2 (clivaje), 9 (blástula), 10,5 (gástrula), 16 (neurula), 25 y 42 (organogénesis). Se homogeneizaron y se cargaron un total de 7 embriones aproximadamente por estadio. Se sometieron a electroforesis y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Luego se incubaron con el suero antiRESTx en una dilución de 1:250.

El suero fue inmunoreactivo a una proteína de ~200 KDa que corresponde al tamaño de la proteína REST de *Xenopus laevis* predicha a partir de la secuencia del cDNA. La banda inmunoreactiva alcanza su mayor intensidad (+++) en los estadios de blástula (estadio 9) y gástrula (estadio 10,5), para luego ir atenuándose (++) en el estadio de neurula (estadio 16) e ir paulatinamente decayendo en intensidad (+) en la organogénesis (estadios 25 y 42) (Fig. 13A). Los controles realizados con el suero antiRESTx preabsorbido (ver material y métodos) y con el anticuerpo secundario, no presentaron inmunoreactividad (0) (Fig. 13B).

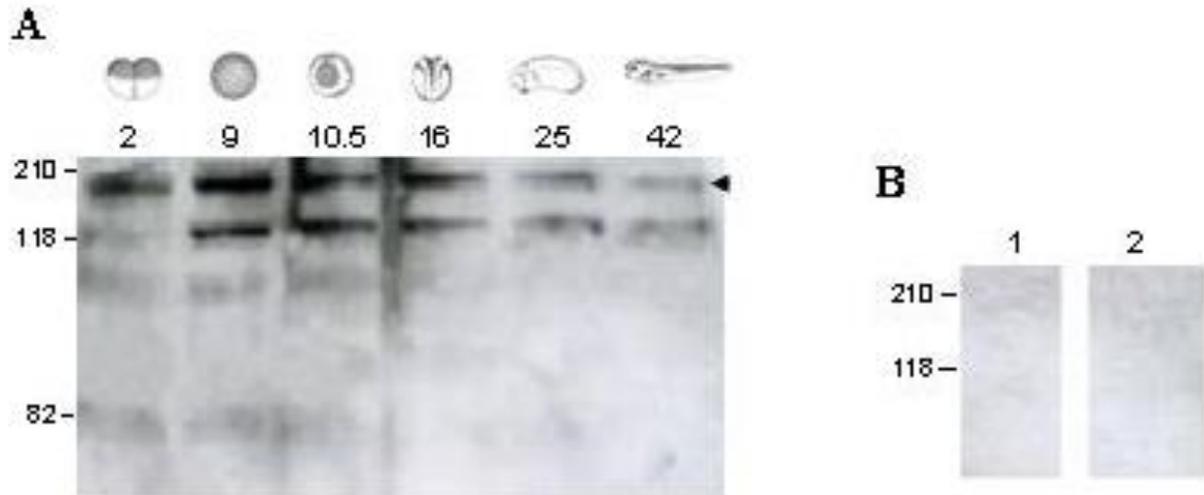


Figura 13. Electrotransferencia del suero antiRESTx en extractos de embriones de *Xenopus laevis*.

A. Gel de acrilamida al 8% que muestra la electrotransferencia del suero antiRESTx usado en una dilución 1:250 en extractos de embriones de *Xenopus laevis*. En la parte superior de la fotografía se muestran esquemáticamente las etapas del desarrollo de los embriones usados para preparar los extractos (ver materiales y métodos). A la izquierda del gel se muestra la ubicación aproximada de los marcadores de tamaño molecular (Kaleidoscope Prestained Standard BioRad). La banda de ~200 KDa que correspondería a la proteína REST aparece marcada con una punta de flecha.

B. Geles de acrilamida con los controles negativos. Se utilizó para la incubación el suero antiRESTx preabsorbido (carril 1) y sólo el anticuerpo secundario (carril 2). A la izquierda de los geles se muestra la ubicación aproximada de los marcadores de tamaño molecular (Kaleidoscope Prestained Standard BioRad).

Electrotransferencia de embriones inyectados con el morfolino

A continuación, se realizó electrotransferencia de extractos de embriones inyectados previamente en nuestro laboratorio con un morfolino antisentido de REST de *Xenopus laevis*. Este morfolino es un oligonucleótido antisentido que actúa específicamente bloqueando el inicio de la traducción de la proteína REST.

El suero antiRESTx no presenta inmunoreacción (0) frente a las proteínas de los embriones inyectados con el morfolino. El control con extractos de embriones no inyectados, presenta una banda inmunoreactiva de ~200 KDa, que correspondería a la proteína REST (Fig. 14).

Estos resultados son compatibles con la idea de que el suero antiRESTx reconoce la proteína REST endógena de *Xenopus laevis*.

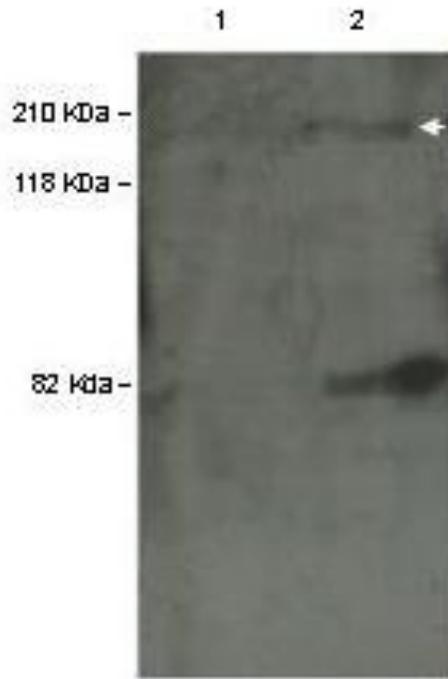


Figura 14. Electrotransferencia del suero antiRESTx en extractos de embriones inyectados con el morfolino anti REST.

Gel de acrilamida al 8%. A la izquierda del gel se muestra la ubicación aproximada de los marcadores de tamaño molecular (Kaleidoscope Prestained Standard BioRad). Los extractos de embriones inyectados con el morfolino antisentido e incubados con el suero antiRESTx en una dilución 1:250 aparecen en el carril 1. En el carril 2 se aprecia la inmunoreactividad del suero antiRESTx frente a la proteína REST presente en embriones no inyectados generando una banda de ~200 KDa (flecha).

Inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica en embriones de *Xenopus laevis in toto* y en cortes parafinados de ellos en diferentes estadios del desarrollo.

Se utilizaron grupos de 20 embriones de *Xenopus laevis* en estadios de blástula, gástrula y neurula. Fueron fijados, blanqueados y luego incubados con el suero antiRESTx diluido 1:50, 1:100 y 1:1000.

Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplados a peroxidasa de rábano (Jackson Inmuno Research). Al observar los embriones al microscopio se apreció que no había inmunomarcación en ninguno de los estadios (Fig. 15B). Tampoco había inmunomarcación en los controles negativos realizados con el suero antiRESTx preabsorbido (Fig.15A) y con el anticuerpo secundario. El control positivo, en el cual se utilizó el anticuerpo anti fosfohistona, funcionó adecuadamente presentando una inmunomarcación homogénea en el embrión en todos los estadios analizados.

Para realizar la inmunohistoquímica en los cortes de embriones, se incluyeron en parafina 10 embriones por cada estadio, realizándose 20 cortes de 10 μm a cada uno. A continuación, se dividieron en dos grupos: el primero para realizar inmunofluorescencia y el segundo para la inmunohistoquímica con peroxidasa. En ambos casos no se observó inmunomarcación en los embriones en ningún estadio (Fig. 15D y 15F) al igual que los controles negativos. Los controles positivos con anti fosfohistona funcionaron correctamente presentando inmunomarcación en ambas técnicas (Fig. 15C y 15E). La razón por la cual el suero antiRESTx no reconoció la proteína REST podría explicarse por el hecho que no estaban expuestos los epítomos específicos para los cuales se habían generado los anticuerpos. Ésto es posible debido a que se desconocía la conformación cuaternaria de la proteína REST y por lo tanto, los sitios que se

escogieron para generar los anticuerpos no se sabía si estaban expuestos en la proteína. La electrotransferencia tuvo éxito debido a que se hizo en condiciones desnaturantes, por lo que la proteína presentaba accesible todos sus epítomos. Por otra parte, se sabe que los anticuerpos poseen características que los hacen más útiles y eficientes en algunas técnicas en comparación a otras, ésto también podría explicar el hecho que este suero no hubiese funcionado en la inmunohistoquímica.

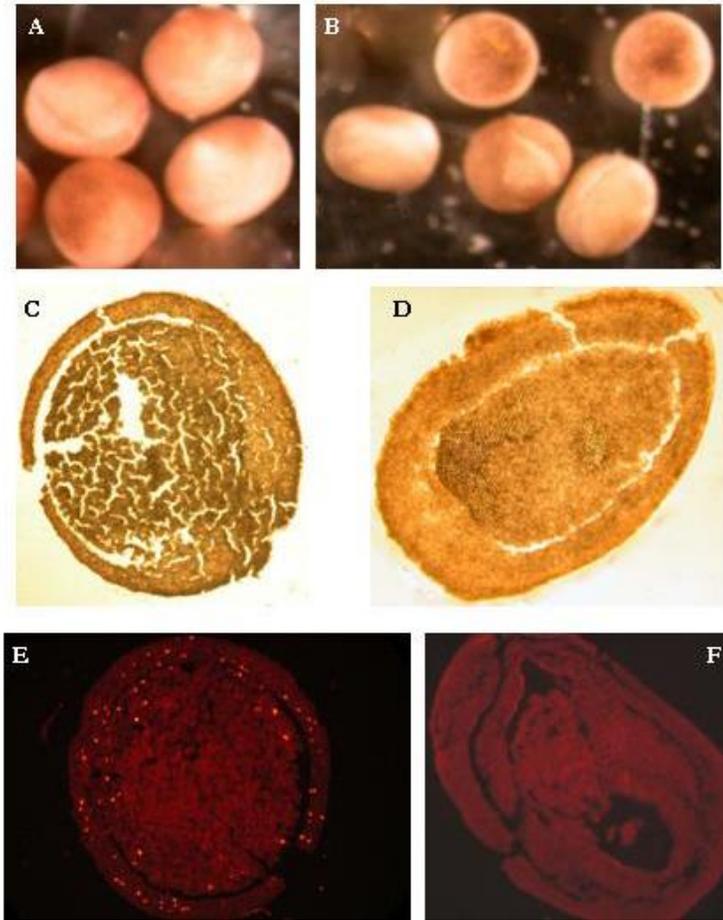


Fig. 15. Inmunohistoquímica en embriones de *Xenopus laevis*.

Inmunohistoquímica de embriones de *Xenopus laevis* *in toto* y cortes parafinados con el suero antiRESTx en los cuales no se obtuvo inmunomarcación. **A.** Inmunohistoquímica en embriones control usando el suero antiRESTx preabsorbido y en **B**, en embriones en estadios de blástula y neurula usando el suero antiRESTx 1:1000. **C.** Inmunohistoquímica con peroxidasa en corte de embrión control con el anticuerpo antifosfohistona y en **D**, en estadio de gástrula incubado con el suero antiRESTx en una dilución 1:1000. **E.** Inmunofluorescencia en corte de embrión control incubado con anti fosfohistona y en **F**, el corte fue incubado con el suero antiRESTx en una dilución 1:1000.

Conclusiones

Las conclusiones que pueden establecerse de esta memoria de título son las siguientes:

- Se generaron proteínas de fusión con GST y dos regiones específicas de la proteína REST de *Xenopus laevis*: AB2 y AB3, ubicadas en dominios presentes entre el octavo y noveno dedo de zinc.
- Se inmunizó a un conejo con la proteína de fusión GST- REST (AB2) de *Xenopus laevis*.
- Se generó un suero con anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante AB2 de REST de *Xenopus laevis*.
- En la electrotransferencia de extractos de embriones en los estadios de clivaje, blástula, gástrula, neurula y organogénesis, el suero fue inmunoreactivo a una proteína de ~200 KDa que corresponde al tamaño de la proteína REST de *Xenopus laevis*. Mediante el mismo estudio en embriones inyectados con un morfolino antisentido de REST, es posible concluir que el suero reconoce la proteína REST endógena de *Xenopus laevis*.
- La inmunohistoquímica de embriones de *Xenopus laevis* en estadios de blástula, gástrula y neurula y cortes parafinados de ellos permite concluir que, el suero no es de utilidad en el reconocimiento de la proteína REST endógena mediante esta técnica, por lo que no permite describir un patrón de expresión de la proteína REST en *Xenopus laevis* en estos estadios.

Bibliografía

1. **ANDRES, M. E.; BURGER, C.; PERAL-RUBIO, M. J.; BATTAGLIOLI, E.; ANDERSON, M. E.; GRIMES, J.; DALLMAN, J.; BALLAS, N. Y MANDEL, G. (1999).** CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 9873-9878.
2. **ARMISEN, R.; FUENTES, R.; OLGUIN, P.; CABREJOS, M. E. Y KUKULJAN, M. (2002).** Repressor element-1 silencing transcription/neuron-restrictive silencer factory is required for neural sodium channel expression during development of *Xenopus*. J. Neurosci. 22: 8347-8351.
3. **AUSUBEL, F. M. (1998).** Currents protocols in molecuale biology. CD edition. John Wiley & Sons, New York.
4. **BALLAS, N.; BATTAGLIOLI, E.; ATOUF, F.; ANDRES, M. E.; CHENOWETH, J.; ANDERSON, M. E.; BURGER, C.; MONIWA, M.; DAVIE, J. R.; BOWERS, W. J.; FEDEROFF, H. J.; ROSE, D.W.; ROSENFELD, M. G.; BREHM, P. Y MANDEL G. (2001).** Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. Neuron 31: 353-365.
5. **BALLAS, N.; GRUNSEICH, C.; LU, D. D.; SPEH, J. C. Y MANDEL, G. (2005).** REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogénesis. Cell 121: 1-13.
6. **BRADFORD, M. (1976).** A rapid and sensitive meted for the quantification microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.

7. **BESSIS, A.; CHAMPTIAUX, N.; CHATELIN, L. Y CHANGEUX, J. P. (1997).** The neuron-restrictive silencer element: a dual enhancer/silencer crucial for patterned expression of a nicotinic receptor gene in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 5906-5911.
8. **CANNATELLA, D. Y DE SA, R. (1993).** *Xenopus* as a model organism. *Syst. Biol.* 42 (4): 476-507.
9. **CHEN, Z. F.; PAQUETTE, A. J. Y ANDERSON, D. J. (1998).** NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nat. Genet.* 20: 136-142.
10. **CHITNIS, A.; HENRIQUE, D.; LEWIS, J.; ISH-HOROWICZ, D. Y KINTNER, C. (1995).** Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Nature* 375: 761-766.
11. **CHONG, J. A.; TAPIA-RAMIREZ, J.; KIM, S.; TOLEDO-ARAL, J. J.; ZHENG, Y.; BOUTROS, M. C.; ALTSHULLER, Y. M.; FROHMAN, M. A.; KRANER, S. D. Y MANDEL, G. (1995).** REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* 80: 949-957.
12. **DAWID, L. Y SARGENT, T. (1998).** *Xenopus laevis* in developmental and molecular biology. *Science* 240: 1443-1448.
13. **GILBERT, S. F. (2000).** *Developmental Biology*, Sixth ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
14. **GRIMES, J. A.; NIELSEN, S. J.; BATTAGLIOLI, E.; MISKA, E. A.; SPEH, J. C.; BERRY, D. L.; ATOUF, F.; HOLDENER, B. C.; MANDEL, G. Y KOUZARIDES, T. (2000).** The co-repressor mSin3A is a functional component of the REST-CoREST repressor complex. *J. Biol. Chem.* 275: 9461-9467.

15. **HARLAND, R. Y GERHART, J. (1997).** Formation and function of Spemann's organizer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 611-667.
16. **HARLOW, E. Y LANE, D. (1988).** Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, USA. v.1.
17. **HARTENSTEIN, V. (1989).** Early neurogenesis in *Xenopus*: the spatio-temporal pattern of proliferation and cell lineages in the embryonic spinal cord. *Neuron* 3: 399-411.
18. **HUAN, Y.; MYERS, S. J. Y DINGLEDINE, R. (1999).** Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nat. Neurosci.* 2: 867-872.
19. **KALLUNKI, P.; EDELMAN, G. M. Y JONES, F. S. (1997).** Tissue-specific expression of the L1 cell adhesion molecule is modulated by the neural restrictive silencer element. *J. Cell Biol.* 138: 1343-1354.
20. **KALLUNKI, P.; EDELMAN, G. M. Y JONES, F. S. (1998).** The neural restrictive silencer element can act as both a repressor and enhancer of L1 cell adhesion molecule gene expression during postnatal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 3233-3238.
21. **KOJIMA, T.; MURAI, K.; NARUSE, Y.; TAKAHASHI, N. Y MORI, N. (2001).** Cell-type non-selective transcription of mouse and human genes encoding neural-restrictive silencer factor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 90:174-186.
22. **KUWABARA, T.; HSIEH, J.; NAKASHIMA, K.; TAIRA, K. Y GAGE, F. (2004).** A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell.* 116: 779-793.
23. **LEE, J. E.; HOLLENBERG, S. M.; SNIDER, L.; TURNER, D. L.; LIPNICK, N. Y WEINTRAUB, H. (1995).** Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268: 836-844.

24. LEE, J. H.; SHIMOJO, M.; CHAI, Y. G. Y HERSH, L. B. (2000). Studies on the interaction of REST4 with the cholinergic repressor element-1/neuron restrictive silencer element. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 80: 88-98.
25. LIU, Z .Y PATIÑO, R. (1993). High-affinity binding of progesterone to the plasma membrane of *Xenopus* oocytes: characteristics of binding and hormonal and developmental control. *Biol. Reprod.* 49: 980-988.
26. LONNERBERG, P. ; SCHOENHERR, C. J.; ANDERSON, D. J. Y IBANEZ, C. F. (1996). Cell Type-specific regulation of choline acetyltransferase gene expression. *J. Biol. Chem.* 271: 33358–33365.
27. LUNYAK, V.; BURGESS, R.; PREFONTAINE, G.; NELSON, C.; SZE, S.; CHENOWETH, J.; SHWARTZ, P.; PEVZNER, P.; GLASS, C.; MANDEL, G. Y ROSENFELD, M. (2002). Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neural genes. *Science* 298: 1747-1752.
28. MA, Q.; KINTNER, C. Y ANDERSON, D. J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87: 43-52.
29. MIEDA, M.; HAGA, T.; SAFFEN, D. W. (1997). Expression of the rat m4 muscarinic acetylcholine receptor gene is regulated by the neuron-restrictive silencer element/repressor element 1. *J. Biol. Chem.* 272: 5854-5860.
30. MYERS, S. J.; PETERS, J.; HUANG, Y.; COMER, M. B.; BARTHEL, F. Y DINGLELINE, R. (1998). Transcriptional regulation of the GluR2 gene: neural - specific expression, multiple promoters, and regulatory elements. *J. Neurosci.* 18: 6723–6739.
31. NARUSE, Y.; AOKI, T.; KOJIMA, T. Y MORI, N. (1999). Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 13691-13696.

- 32. NIEUWKOOP, P. D. Y FABER, J. (1994).** Normal tables for *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing Inc, New York. ISBN 0-8153-1896-0
- 33. PALM, K.; BELLUARDO, N.; METSIS, M. Y TIMMUSK, T. (1998).** Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *J. Neurosci.* 18: 1280-1296.
- 34. PALM, K.; METSIS, M. Y TIMMUSK, T. (1999).** Neuron-specific splicing of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR is frequent in neuroblastomas and conserved in human, mouse and rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 72: 30-39.
- 35. PANIAGUA, R.; FRAILE, B. Y SAEZ, F. J. (1990).** Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians. *Histol. Histopath.* 5: 365-378.
- 36. PAQUETTE, A. J.; PEREZ, S. E. Y ANDERSON, D. J. (2000).** Constitutive expression of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF)/REST in differentiating neurons disrupts neuronal gene expression and causes axon pathfinding errors in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 12318-12323.
- 37. SADLER, S.E. Y MALLER, J. L. (1981).** Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes: Action on the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 256 (12): 6368-6373.
- 38. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. Y MANIATIS, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- 39. SASAI, Y. (1998).** Identifying the missing links: genes that connect neural induction and primary neurogenesis in vertebrate embryos. *Neuron* 21: 455-458.
- 40. SCHOENHERR, C. J. Y ANDERSON, D. J. (1995).** The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* 267: 1360-1363.

41. **SCHOENHERR, C. J.; PAQUETTE, A. J. Y ANDERSON, D. J. (1996).** Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 9881-9886.
42. **SETH, K. A. Y MAJZOUB, J. A. (2001).** Repressor Element Silencing Transcription Factor/Neuron-restrictive Silencing Factor (REST/NRSF) can act as an enhancer as well as a repressor of corticotropin-releasing hormone gene transcription. *J. Biol. Chem.* 276: 13917-13923.
43. **SHIMOJO, M.; PAQUETTE, A. J.; ANDERSON, D. J. Y HERSH, L. B. (1999).** Protein kinase A regulates cholinergic gene expression in PC12 cells: REST4 silences the silencing activity of neuron-restrictive silencer factor/REST. *Mol. Cell Biol.* 19: 6788-6795.
44. **TAPIA-RAMIREZ, J.; EGGEN, B. J.; PERAL-RUBIO, M. J.; TOLEDO-ARAL, J. J. Y MANDEL, G. (1997).** A single zinc finger motif in the silencing factor REST represses the neural-specific type II sodium channel promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 1177-1182.
45. **THIEL, G.; LIETZ, M. Y CRAMER, M. (1998).** Biological activity and modular structure of RE-1-silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes. *J. Biol. Chem.* 273: 26891-26899.
46. **TIMMUSK, T.; PALM, K.; LENDAHL, U. Y METSIS, M. (1999).** Brain-derived neurotrophic factor expression in vivo is under the control of neuron-restrictive silencer element. *J. Biol. Chem.* 274: 1078-1084.
47. **VOGELSTEIN, B. Y GILLESPIE, D. (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. acad. Sci. U.S.A.* 76: 615-619.
48. **YOO, J.; JEONG, M. J.; LEE, S. S.; LEE, K. I.; KWON, B. M.; KIM, D. S.; PARK, Y. M. Y HAN, M. Y. (2001).** The neuron restrictive silencer factor can act as an activator for dynamin I gene promoter activity in neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 928-932.

49. WEINSTEIN, D. C. Y HEMMATI-BRIVANLOU, A. (1999). Neural induction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 411-433.
50. WHITTIER, J. M.; CREWS, D. (1987). Seasonal reproduction: Patterns and control. En: "Hormone and reproduction in fishes, amphibians and reptiles". D.O. Norris y R.E. Jones (eds.). New York, Plenum Press. 385-409.
51. WILSON, P. A. Y HEMMATI-BRIVANLOU, A. (1997). Vertebrate neural induction: inducers, inhibitors, and a new synthesis. *Neuron* 18: 699-710.
52. WOOD, I. C.; ROOPRA, A. Y BUCKLEY, N. J. (1996). Neural specific expression of the $\alpha 4$ muscarinic acetylcholine receptor gene is mediated by a RE1/NRSE-type silencing element. *J. Biol. Chem.* 271: 14221-14225.
53. ZIMMERMAN, K.; SHIH, J.; BARS, J.; COLLAZO, A. Y ANDERSON, D. J. (1993). XASH-3, a novel *Xenopus* achaete-scute homolog, provides an early marker of planar neural induction and position along the mediolateral axis of the neural plate. *Development* 119: 221-232.

Anexo

Materiales y soluciones

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- Taq DNA polimerasa Recombinante (Invitrogen).
- Programa Gene Runner v3.05 (Hastings Software, Inc., USA).
- Termociclador MJ Research.

Visualización de productos del PCR y digestiones.

- Agarosa (Fisher Scientific).
- Bromuro de etidio (Gibco BRL).
- Estándar de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).
- Transiluminador UV.
- Programa 1D Image Analysis Software (Kodak, USA).
- Cámara digital Kodak DC120.

Clonamiento.

- Vector PGEM-T® (Promega).
- Vector PGEX 2T (Promega).
- Enzimas de restricción EcoR1 y BamH1 (Promega).
- QIAquick PCR purification Kit, Qiagen, USA.
- QI prep Spin Miniprep kit (Qiagen).

Bacterias competentes.

- Bacterias competentes de alta eficiencia JM109 (Promega).
- Bacterias competentes con eficiencia en subclonamiento DH5 α (Gibco BRL).

Producción de la proteína.

- SOC: 0,5% extracto de levadura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa.
- Placas LB/ampicilina/IPTG/X-Gal.
- Terrific Broth: 1,2% triptona, 2,4% extracto de levadura, 0,4% glicerol, 0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄.
- Lisozima (Sigma).
- IPTG (Applichem).

Soluciones para la preparación de extractos de embriones.

- Tampón LS: 20 mM HEPES pH 9, 2 mM MgCl₂ 0,5 mM PMSF, 1 ug/mL pepstatina, leupeptina y de aprotinina.
- Homogeneizador de vidrio esmerilado.
- SDS tampón de muestra: 7 mL Tris-Cl/SDS 4x pH 6,8, 3 mL de glicerol (30% final), 1 g de SDS (10% final), 0,93 grs de DTT (0,6 M final), 1,2 grs de azul de bromofenol.

Electrotransferencia

- Película Fotográfica BioMax (Eastman Kodak Company, USA).
- Sistema de detección quimioluminiscente ECL (Amersham Pharmacia Biotech, USA)

- Estándar de peso molecular preteñido Kaleidoscope (BioRad).

Reactivos para la obtención y mantención de embriones

- Cisteína (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (Chorulon, Intervet, Boxmeer, Holanda)
- MBS 10x (Modified Barth`s Saline): NaCl 880 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 10 mM, HEPES 50 mM pH 7,8, 25 mM NaHCO₃, pH 7,8 ajustado con NaOH 5M.
- MBS 1x: CaCl₂ 0,7 mM

Fijación de embriones.

- MEMPFA: MOPS 0,1 M pH 7,0, EGTA 2 mM, MgSO₄ 1 mM, Paraformaldehído 4%.
- PBS 1x: Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 1,7 mM, NaCl 200 mM, pH 7,4.
- Metanol (Merck, Darmstadt, Alemania).
- 3-D rotador model 4630-1, Lab-Line Instruments.

Fotografías de embriones.

- Cámara digital Nikon Coolpix 5000, Japón.
- Software Adobe Photoshop 7.0.