

ESTUDI DE L'EXPRESSION GÈNICA DURANT LA DIFERENCIACIÓ DE CÈL·LULES DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y INDUÏDA AMB ÀCID RETINOIC



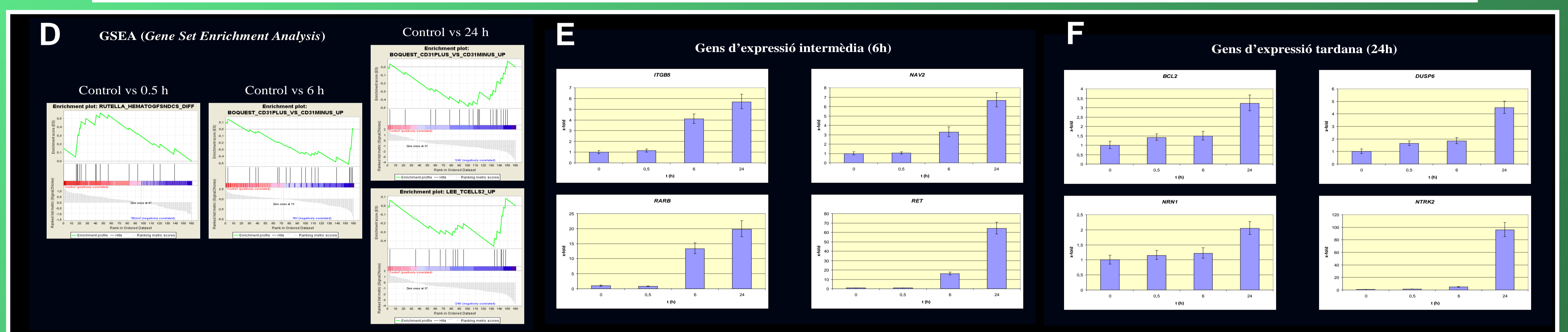
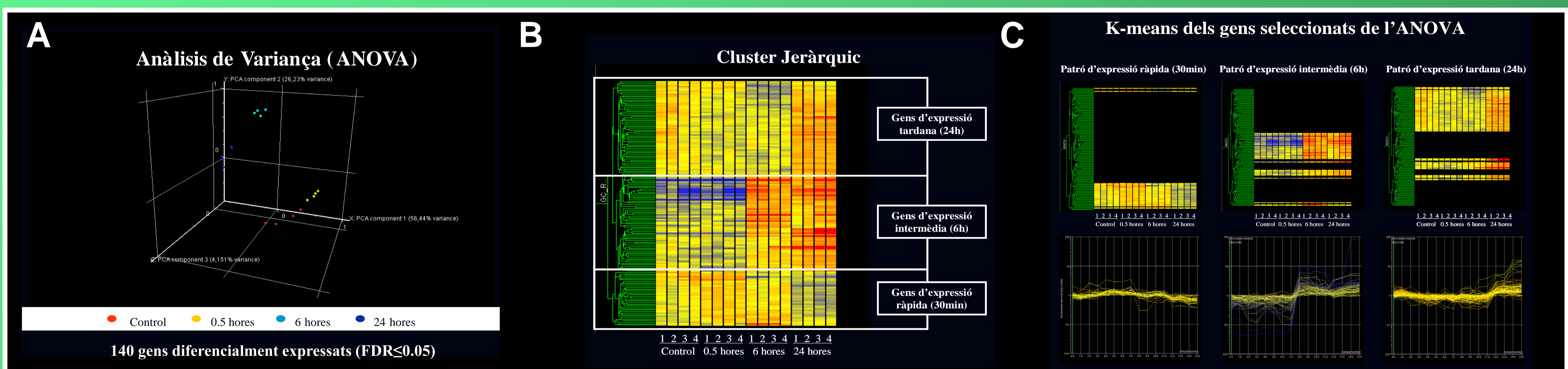
Salvador Meseguer, Núria Ruiz i Domingo Baretino
Unitat de Biologia de l'Acció Hormonal. Departament de Patologia i Teràpia Molecular i Cel·lular.
Institut de Biomedicina de València (CSIC). Jaume Roig, 11. 46410 València (Espanya).

L'Àcid Retinoic (RA) actua com a molècula reguladora en la diferenciació de les cèl·lules SH-SY5Y. En aquest procés de diferenciació induït per RA es posen en marxa no sols mecanismes genòmics clàssics sinó a més a més mecanismes extra-genòmics d'acció ràpida. Concretament s'ha identificat l'activació ràpida de la ruta de senyalització de la PI3K/AKT, una activació que resulta ser necessària per la inducció de la diferenciació neuronal i que té lloc a través de la interacció del Receptor d'Àcid Retinoic (RAR) amb la subunitat reguladora de la PI3K (López-Carballo G. et al., J. Biol. Chem. 277, 25297-25304, 2002; Masià S et al., Mol Endocrinol. 21(10): 2391-402, 2007). La integració d'ambos mecanismes d'acció del RA, genòmics i extra-genòmics suposa un canvi en l'expressió gènica que pot estudiarse mitjançant la tecnologia de microarrays. Durant aquest procés de diferenciació de les cèl·lules SH-SY5Y amb RA, hem identificat 140 gens distribuïts en tres patrons d'expressió gènica clarament definits: gens d'expressió ràpida, intermèdia i tardana. L'anàlisi funcional dels gens de cada patró revelen que: els gens d'expressió ràpida participen especialment en processos de processament de RNA i d'apoptosis, els d'expressió intermèdia estan implicats principalment en processos de desenvolupament, diferenciació i metabolisme del RA, i finalment els gens d'expressió tardana participen fonamentalment en metabolisme, especialment de lípids i en quimiotaxis.

Per tal d'establir possibles punts d'interacció entre l'activació de vies de senyal per RA (accions extra-genòmiques del RA) i l'activació transcripcional regulada pels receptors de RA (accions genòmiques) s'ha estudiat l'efecte dels inhibidors de les principals rutes de senyalització sobre l'expressió gènica. Concretament, en aquest estudi ens ha permès identificar que l'activació de la PI3K/AKT exerceix un efecte inhibitor en l'expressió d'alguns gens d'expressió intermèdia i tardana, entre ells, RARB.

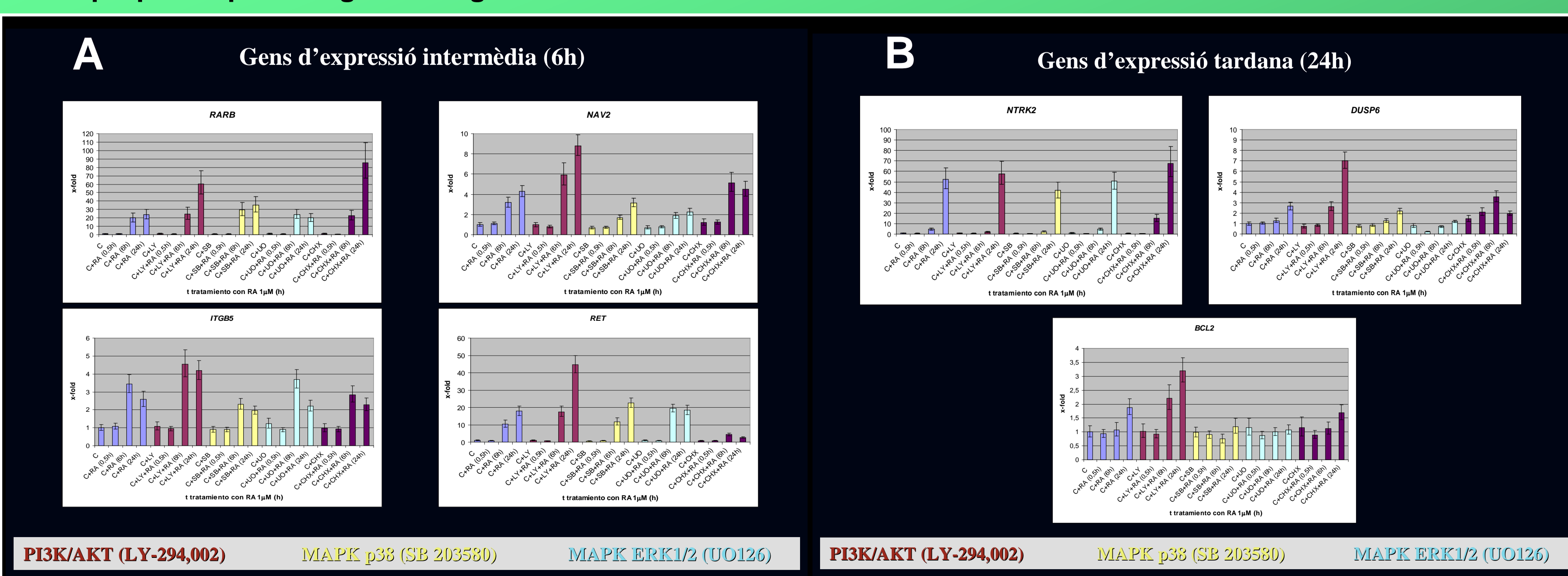
1. Anàlisi dels microarrays amb GeneSpring GX (versió 7.3.1)

Amb l'objectiu de dilucidar els efectes del RA sobre l'expressió gènica, s'analitzaren els nivells d'expressió de 14.500 gens en les cèl·lules de neuroblastoma humà SH-SY5Y tractades amb RA 1µM durant 0.5, 6 i 24 h, utilitzant el model de chip Human Genome U133A 2.0 d'Affymetrix. Les dades obtingudes en la lectura dels microarrays s'analitzaren amb el programa GeneSpring GX en la seva versió 7.3.1. Els primers passos de l'anàlisi es corresponen amb la correcció dels fons, normalització i summarització de les dades. Per això, es va aplicar a les dades l'algoritme GC-RMA (Robust Multi-chip Average, with GC-content background correction) i un posterior pas de normalització per gen, el que va permetre la seva preparació per a la recerca de diferències estadísticament significatives en l'expressió de cada gen al llarg dels diferents temps, mitjançant un anàlisi de variances (ANOVA). La selecció de 140 gens es va fer d'acord amb un valor FDR≤0.05. Per tal de comprovar si la selecció havia estat encertada, es va avaluar el comportament d'aquests gens entre les distintes rèpliques de cada condició de tractament mitjançant un anàlisi de components principals (ACP). En aquest anàlisi es confirmà el comportament similar dels 140 gens entre les quatre rèpliques de cada condició, així com la presència de diferències entre les distintes condicions, especialment entre el control i 0.5 hores, i les 6 i 24 hores (Fig.1A). Posteriorment, es procedí a identificar possibles patrons d'expressió, sotmetent aquest grup de gens a dos tipus de clusters, Jeràrquic i K-means. En l'anàlisi de clustering jeràrquic (Fig.1B), l'arbre ens mostra tres grups de gens clarament diferenciats: gens amb una expressió a les 24 hores de tractament amb RA (gens d'expressió tardana), gens amb una expressió a les 6 hores de tractament (gens d'expressió intermèdia) i gens amb una expressió ràpida, als 30 minuts de tractament (gens d'expressió ràpida). Amb un agrupament per K-means de 3 clusters es va comprovar que els perfils d'expressió dels gens continguts en cadascun dels clusters s'ajustaven bé a un mateix patró d'expressió i aquests es corresponen amb les regions identificades en l'arbre jeràrquic (Fig. 1C). Els gens continguts en cadascun dels patrons foren descrits funcionalment, emprant la base de dades del Gene Ontology, així com l'eina GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). L'anàlisi utilitzant la base de dades del Gene Ontology revela que els gens d'expressió ràpida participen especialment en processos de processament de RNA i d'apoptosis, els d'expressió intermèdia estan implicats principalment en processos de desenvolupament, diferenciació i metabolisme del RA, i finalment els gens d'expressió tardana participen fonamentalment en metabolisme, especialment de lípids i en quimiotaxis. L'eina GSEA ens permeté identificar gens que presenten diferències estadísticament significatives al comparar dos condicions de tractament i que formen part de grups gènics descrits en processos de diferenciació (Fig. 1D). Finalment, es seleccionaren un grup de gens de cada patró i es validaren per RT-PCR a temps real (Fig. 1E i 1F).



2. Estudi de possibles interaccions entre l'activació de vies de senyal per RA (accions extra-genòmiques del RA) i l'activació transcripcional assistida per RAR (accions genòmiques).

En una primera aproximació, es va avaluar l'efecte dels inhibidors de distintes rutes de senyalització (PI3K/AKT (LY-294,002), MAPK p38 (SB 203580) i MAPK ERK1/2 (UO126)) sobre l'expressió regulada pels receptors nuclears del RA d'alguns dels gens utilitzats en la validació. La inhibició de la ruta PI3K/AKT condueix a un augment notable de l'expressió a les 6h i 24h de tractament amb RA per a la majoria dels gens, suggerint que l'activació de la PI3K/AKT participa activament en la regulació negativa d'aquests (Fig.2A i 2B). Aquest efecte inhibitori de l'expressió podria justificar-se per fosforilació d'algun component transcripcional com podria ser el propi receptor o algun corregulador.



L'augment de l'expressió pel tractament amb l'inhibidor de la ruta PI3K/AKT no és resultat d'una estabilització del mRNA, es pot veure en l'estudi de la estabilitat del mRNA RARB utilitzant l'inhibidor de la transcripció (AMD) i la tècnica de RT-PCR a temps real (Fig. 2C)

