

Doi.

Artículo de investigación

Evaluación de los niveles de expresión de REST en líneas celulares de cáncer de pulmón: uso potencial como herramienta de diagnóstico

Evaluation of REST expression levels in lung cancer cell lines: potential use as a diagnostic tool

Avaliação dos níveis de expressão de REST em linhagens celulares de câncer de pulmão: potencial uso como ferramenta diagnóstica.

Carlos Ortuño Pineda^{1*} ID. 0000-0002-1757-1964

Ricardo Martínez Baltazar¹ ID. 0009-0006-5992-5106

Adán Arizmendi Izazaga¹ ID. 0000-0003-4068-3312

Jesús Emmanuel Molina Llamas¹ ID. 0000-0003-1838-827X

Adela Sánchez Ocegueda¹ ID. 0000-0001-9214-0913

Yurely Harrinson Mendoza¹ ID. 0000-0003-2318-7755

Banessa del Rocío Vázquez Berra¹ ID. 0000-0001-5367-3987

Amalia Vences Velázquez¹ ID. 0000-0001-8810-1401

Jesús Valdés Flores² ID. 0000-0003-1787-9229

¹ Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. Av. Lázaro Cárdenas s/n. C.U. Zona Sur. C. P. 39087. Chilpancingo, Gro. México.

² Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

***Autor de correspondencia:** carlos2pineda@hotmail.com

Recibido: 07/01/2015

Revisado: 05/02/2015

Aprobado: 08/04/2015

Publicado. 25/06//2015

Resumen

La agresividad del cáncer de células pequeñas de pulmón [SCLC, *small cell lung cáncer*] se asocia con la habilidad de las células cancerosas para la metástasis. Trabajos previos han demostrado el papel de REST (*RE-1 Silencing Transcription factor*) en la regulación del fenotipo neuronal del SCLC, evidenciando su importancia como blanco potencial en el diagnóstico. El objetivo de este trabajo fue determinar si existe expresión diferencial de REST entre líneas celulares provenientes de diferentes etapas de SCLC, mediante el análisis de proteínas a través de *western blot*. Los resultados mostraron

expresión diferencial de REST canónica en las diferentes líneas celulares, evidenciando disminución de sus niveles, y aparición de tREST (*truncated REST*) en etapas avanzadas del cáncer. Estos estudios constituyen una de las primeras evidencias de REST como potencial biomarcador del SCLC.

Palabras clave: REST, Biomarcador, SCLC, Evaluación, líneas celulares

Abstract

The aggressiveness of small cell lung cancer (SCLC) is associated with the ability of cancer cells to metastasize. Previous studies have demonstrated the role of REST (RE-1 Silencing Transcription factor) in regulating the neuronal phenotype of SCLC, highlighting its importance as a potential diagnostic target. The aim of this study was to determine whether there is differential REST expression among cell lines from different stages of SCLC, using protein analysis via Western blot. The results showed differential expression of canonical REST in the different cell lines, demonstrating decreased levels and the appearance of truncated REST (tREST) in advanced stages of cancer. These studies constitute some of the first evidence of REST as a potential biomarker for SCLC.

Keywords: REST, Biomarker, SCLC, Evaluation, Cell lines

Resumo

A agressividade do câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) está associada à capacidade das células cancerígenas de metastatizar. Estudos anteriores demonstraram o papel do REST (fator de transcrição silenciador RE-1) na regulação do fenótipo neuronal do CPPC, destacando sua importância como um potencial alvo diagnóstico. O objetivo deste estudo foi determinar se há expressão diferencial de REST entre linhagens celulares de diferentes estágios do CPPC, utilizando análise proteica por Western blot. Os resultados mostraram expressão diferencial do REST canônico nas diferentes linhagens celulares, demonstrando níveis reduzidos e o aparecimento de REST truncado (tREST) em estágios avançados do câncer. Esses estudos constituem algumas das primeiras evidências do REST como um potencial biomarcador para CPPC.

Palavras-chave: REST, Biomarcador, CPPC, Avaliação, Linhagens celulares

Como citar el artículo:

Ortuño Pineda, C., Martínez Baltazar, R., Arizmendi Izazaga, A., Molina Llamas, J. E., Sánchez Ocegueda, A. Harrinson Mendoza, Y., Vázquez Berra, B. del R., Vences Velázquez, A. y Valdés Flores, J. (2015). Evaluación de los niveles de expresión de REST en líneas celulares de cáncer de pulmón: uso potencial como herramienta de diagnóstico. *Tlamati*, 6(1), 5-9

Introducción

El cáncer de pulmón (LC *Lung Cancer*) representa el tumor maligno que más muertes ocasiona a nivel mundial. En el 2010, aproximadamente 1.4 millones de personas murieron de cáncer de pulmón (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2010). En México se encuentra dentro de las principales causas de muerte en varones, solo superado por las enfermedades cardíacas (Instituto Mexicano del Seguro Social [IMSS], 2012). El LC se clasifica en dos grandes grupos de acuerdo a sus características histológicas: el SCLC (*Small Cell Lung Cancer*) y el NSCLC (*Non Small Cell Lung Cancer*). El SCLC es el más agresivo por presentar un fenotipo neuroendocrino, ser generalmente asintomático y extremadamente difícil de diagnosticar. Cuando se presentan síntomas, estos pueden confundirse con los de otras enfermedades de las vías respiratorias (Mayoral, M.A., Zenteno, E., Espinosa, B., Martínez, S. y Guevara J., 2004).

REST es un regulador maestro que funciona positivamente durante de la neurogénesis y es esencial en el mantenimiento de la plasticidad neuronal. En tejidos no neuronales REST funciona de manera negativa silenciando genes cuya expresión está restringida al sistema nervioso (Ballas, N, Grunseich C., Lu D. D., Speh J. C. y Mandel G., 2005). Interesantemente, el SCLC presenta características neuroendocrinas típicas, como la presencia de péptidos cuya expresión se restringe de manera natural a ciertas poblaciones

neuronales y que son regulados transcripcionalmente por REST (Schoenherr, C. J. y Anderson, D. J., 2005; Chong, J.A., Tapia-Ramírez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J.J., Zheng, Y., Boutros, M.C., Altshuler, Y.M., Frohman, M.A, Kra-ner, S.D. y Mandel, G, 1995; Ballas, N, Grunseich C., Lu D. D., Speh J. C. y Mandel G., 2005; Coulson, J. M., Edg-son, J. L., Woll, P. J. y Quinn, J. P., 2000).

Nuestro grupo de estudio describió recientemente la degradación de REST vía proteosoma y la presencia de tREST en la línea celular H69 de SCLC (Ortuño-Pineda, C., Galindo-Rosales, J. M., Calderón-Salinas, J. V., Ville-gas-Sepúlveda, N., Saucedo-Cárdenas, O., De Nova-Ocampo, M. y Valdés, J., 2012). Dichos hallazgos han contribuido a entender el perfil neuronal de este tipo de cáncer. Además, varias isoformas de REST han sido relacionadas con diversos tipos de cáncer en los últimos años (Palm, K., Metsis, M. y Timmusk, T., 1999; Fuller, G., Su, X., Price, R., Cohen, Z., Lang, D., Sawaya, R., y Majumder, S., 2005; Westbrook, T. F., Martin, E. S., Schlabach, M. R., Leng, Y., Liang, A. C., Feng, B., Zhao, J. J...., 2005; Lv, H., Pan, G., Zheng, G., Wu, X., Ren, H., Liu, Y. y Wen, J., 2010). En este trabajo caracterizamos los niveles de expresión y la localización celular de las isoformas de REST en líneas celulares de diferentes estadios del SCLC. Nuestros hallazgos son nuevos y aportarán elementos para el mejor entendimiento del fenotipo celular de esta patología, además de que proporciona las bases para la búsqueda de nue-

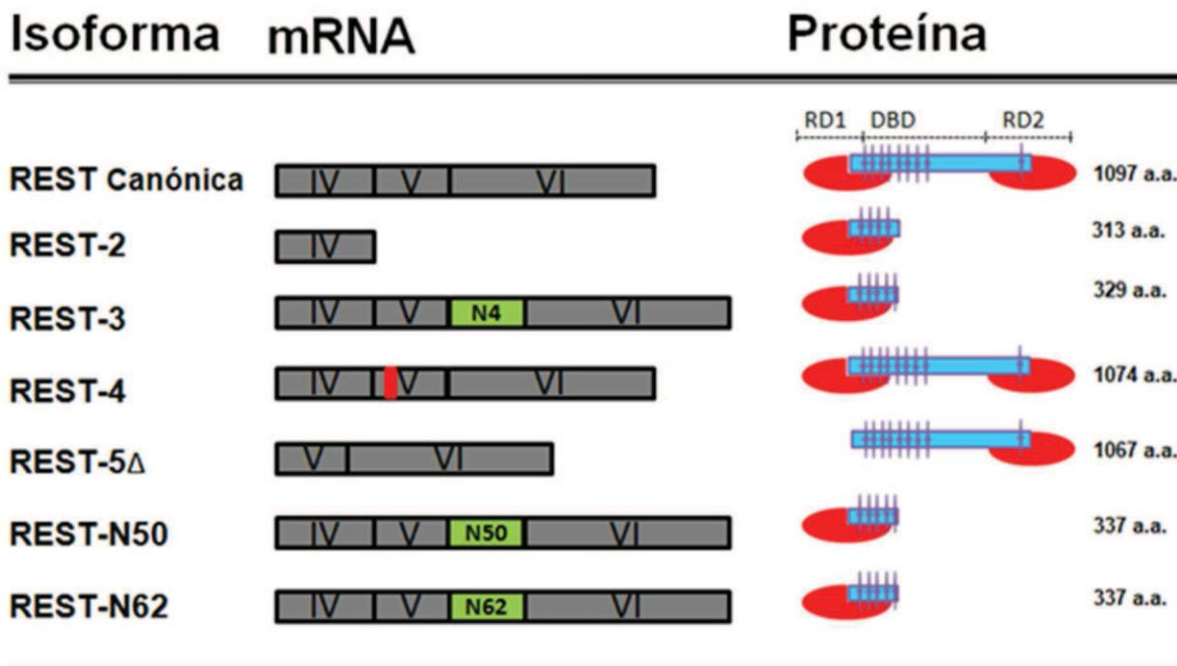


Figura 1. **Isoformas de REST.** La columna de la izquierda muestra el nombre comúnmente usado de cada isoforma de REST. La columna del centro muestra los exones (cajas grises) que constituyen a cada variante del mRNA. En cajas verdes se muestra la inclusión aberrante del exón N, que introduce un codón de paro prematuro en el mRNA. La pequeña caja roja en el exón V de REST-4 indica una mutación. En la columna de la derecha se muestran las isoformas de REST con sus dominios funcionales representativos.

vas moléculas para el diagnóstico oportuno del SCLC.

Materiales y métodos

Cultivos celulares. Se utilizaron las líneas celulares NCI-H1417, NCI-H69 (ATCC®) de SCLC, A549 (ATCC® CCL-185™) de NSCLC y MRC-5 (células de pulmón no cancerosas). Todas fueron cultivadas siguiendo las indicaciones de la ATCC, en placas de 100 mm de diámetro en una estufa a 37 °C, a una atmosfera de presión y una concentración de CO₂ del 5%.

Obtención de extractos proteicos: nucleares y citoplasmáticos. Para las células adherentes, la monocapa celular fue lavada con 3 ml de *Buffer de despegado* (40 mM de Tris HCl pH 7.5, 1 mM de EDTA, 150 mM de NaCl) durante 5 min y posteriormente recuperada con ayuda de *Scraper*. Las células en suspensión fueron recuperadas por centrifugación a 1 500 rpm durante 10 minutos y lavadas con buffer de despegado. Los extractos proteicos de las diferentes fracciones celulares fueron purificados siguiendo el protocolo de Dignam (Dignam, 1990).

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

La concentración de las proteínas fue determinada por el método de Bradford. La mezcla de reacción consistió de 900 µl de reactivo de Bradford (*Biorad Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 1 500-0201*), 95 µl de agua mQ y 5 µl de la muestra proteica o el blanco. La muestra fue cuantificada dentro de un rango no mayor a 15 min, a 590 nm en un espectrofotómetro Beckman DU650.

Inmunoprecipitación. La purificación por inmunoprecipitación se llevó a cabo incubando 100 µg de extractos proteicos (toda la noche a 4 °C y agitación constante) con el complejo perlas-anticuerpo previamente ensamblados en 0.6 ml de PBS en tubos eppendorf de 1.5 ml. Los complejos formados fueron lavados 3 veces con 1 ml de PBS fresco. El ensamblaje de los complejos perlas-anticuerpos se realizó incubando 3 µl de perlas de agarosa y 500 ng de anticuerpo anti-REST en 0.6 ml de PBS durante 2 horas en agitación constante.

Tinción con nitrato de plata. Después de la electroforesis, el gel fue lavado con agua mQ durante 10 min, y tratado para su tinción con nitrato de plata como se describió previamente (Ortuño-Pineda et al., 2012).

Western blot. Después de la separación de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, estas

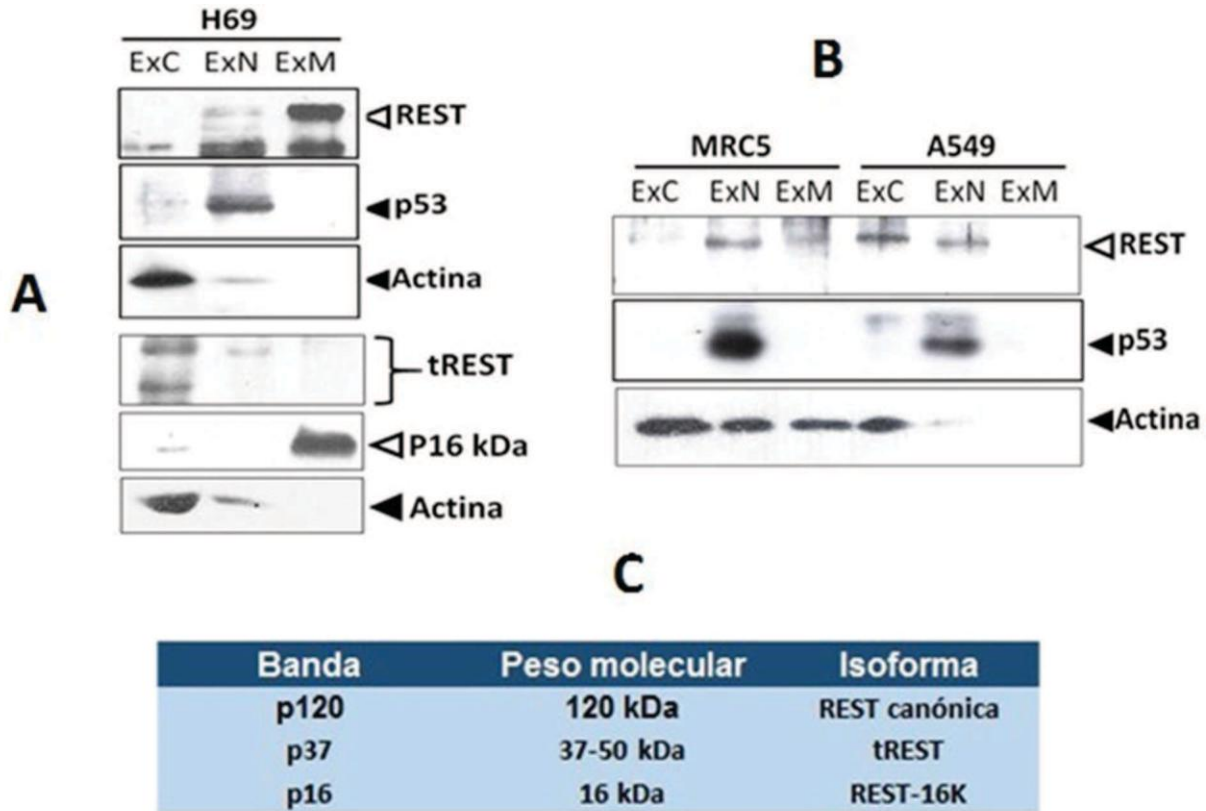


Figura 2.- **Perfiles de expresión y localización de REST en células H69, MRC5 y A549.** Experimentos de *wes- tern blot* usando fracciones nucleares, citoplásmicas y membranales de las diferentes líneas celulares y el anti- cuerpo anti-REST (H-290). **A)** Análisis de las fracciones celulares de la línea H69. **B)** Análisis de las fracciones celulares de las líneas MRC5 y A549. En ambos casos actina y p53 fueron usados como controles citoplásmico y nuclear, respectivamente. Abreviaturas: ExC (extracto citoplásmico), ExN (extracto nuclear), ExM (extracto membranal). **C)** Tabla de las isoformas de REST encontradas en células cancerosas H69.

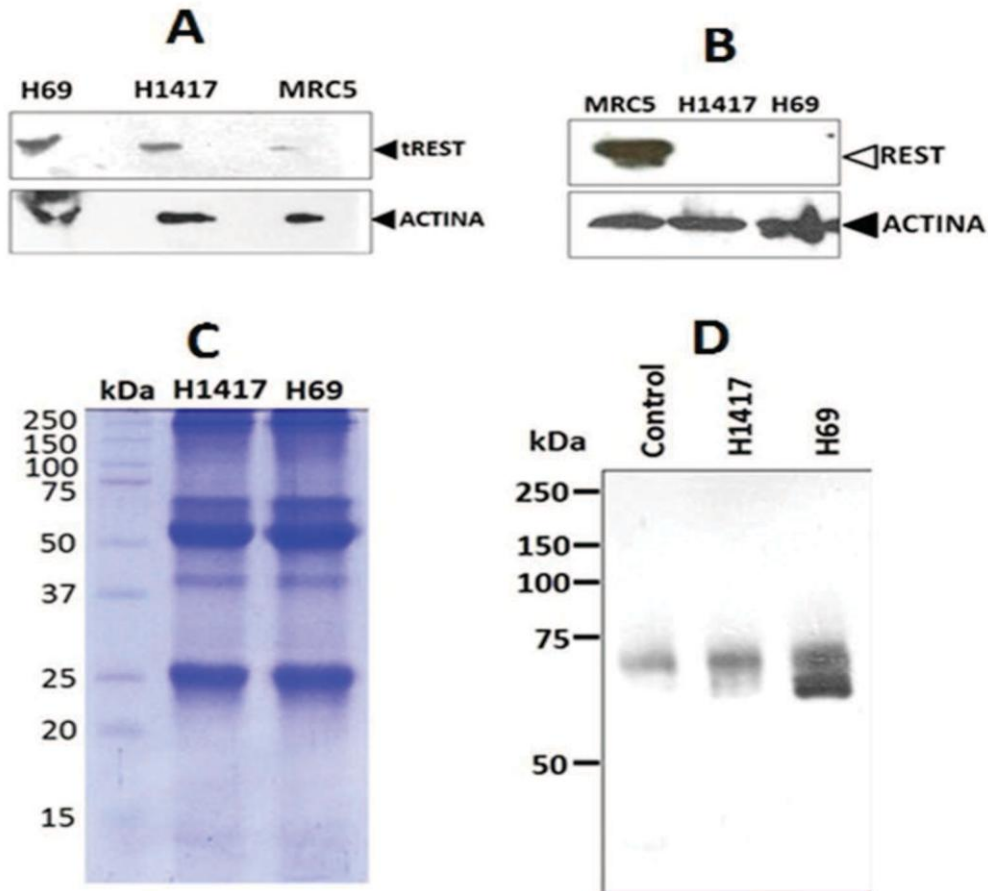


Figura 3. **Expresión diferencial de REST y tREST en líneas celulares de diferentes estadios del cáncer de pulmón.** **A)** *Western blot* para tREST usando las fracciones citoplásmicas de las líneas celulares MRC5, H1417 y H69. **B)** *Western blot* para REST usando extractos totales de las líneas celulares MRC5, H1417 y H69. **C)** Electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) y tinción con azul de Coomasie de los productos de inmunoprecipitación de REST a partir del medio de cultivo de células cancerosas. **D)** *Western blot* de los productos de la inmunoprecipitación de REST a partir del medio de cultivo de las células cancerosas. Como control se usó medio sin células.

fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y probadas con el anticuerpo anti-REST (sc-25398, Santa Cruz Biotechnology). El revelado de la membrana se realizó por quimioluminiscencia usando el kit *Western blotting luminol reagent*.

Resultados

Las células epiteliales normales presentan un perfil de expresión de REST característico, que las distingue de los linajes de progenitores neuronales y de neuronas maduras. Típicamente, las células epiteliales expresan niveles basales de REST para reprimir genes neuronales, mientras que en progenitores neuronales y neuronas maduras, se pierde la expresión de dicha proteína (Ballas et al., 2005). Algunas isoformas truncas de REST son necesarias para la regulación del fenotipo neuronal en neuronas maduras y otras se han detectado en diferentes tipos de cáncer (Palm et al., 1999, Fuller et al., 2005, Westbrook et al., 2005, Lvet et al., 2010, Ortuño-Pineda et al., 2012). La figura 1 muestra las diferentes variantes de RNA y sus correspondientes isoformas de proteínas detectadas en el ser humano (véase figura 1). Para evaluar la expresión de las isoformas de REST en SCLC, así como su localización celular, realizamos fraccionamiento celular y *western blot* de células H69 en confluencia. Como controles se usaron células pulmonares no cancerosas (MRC5) y de carcinoma de células no pequeñas (A549). Los resultados mostraron la presencia de REST, tREST y una potencial isoforma de REST de 16 kDa (REST 16K) en células H69 (véase figura 2a). Adicionalmente, dichos experimentos evidenciaron localización aberrante de todas las isoformas de REST observadas. REST tuvo una localización esencialmente membranal, mientras que tREST y REST K16 fueron detectadas en citoplasma y la fracción membranal, respectivamente (véanse figura 2a y 2c). En las líneas celulares MRC5 y A549 solo la forma canónica de REST fue observada (véase figura 2b). Interesantemente, el análisis de REST y tREST en las líneas celulares correspondientes a etapas tempranas (células H1417) y etapas avanzadas (células H69) del SCLC, mostró una pérdida de la expresión de REST en células cancerosas desde etapas tempranas del cáncer (véanse figura 3a) y un ganancia en la expresión de la isoforma tREST (véase figura 3b). Finalmente, los ensayos de inmunoprecipitación para la búsqueda de isoformas de REST en el medio de cultivo de las diferentes líneas celulares evidenciaron la presencia de tREST como productos de secreción de las células H69 (véanse figuras 3c y 3d).

Discusión y conclusiones

A diferencia de otros trabajos en donde no se ha podido demostrar la presencia de isoformas de REST, nosotros encontramos al menos tres isoformas: REST canónica, tREST y una nueva isoforma de 16 kDa. Si bien es cierto que nuestros resultados deben de confirmarse mediante espectrometría de masas, las isoformas aquí presentadas están en concordancia con las variantes de mensajeros previamente descritas (Ortuño-Pineda et al., 2012). Nuestros hallazgos tienen implicaciones biológicas importantes:

A) Es probable que la pérdida de la función de REST en células H69 que conllevan al fenotipo neuronal se deba no solo a un cambio en la expresión de REST y sus isoformas, sino también a un cambio en su localización celular. Al respecto, Ballas y colaboradores (2005) mostraron que para que ocurra la transición de progenitores neuronales a neuronas maduras, se requiere un cambio en la expresión de REST y sus isoformas (Ballas et al., 2005).

B) Es probable que el cambio en la localización de REST y sus isoformas se deba no solo a la carencia en sus señales de direccionamiento nuclear, sino también a su interacción con otros factores nucleares. La localización citoplásmica de isoformas truncas de REST en otros modelos celulares es debida a la pérdida de las señales de localización nuclear en sus dominios de dedos de zinc (Shimojo, 2006), mientras que la localización citoplásmica de REST canónica solo se ha observado en la enfermedad de Huntington, cuando esta es secuestrada por complejos proteicos (Zucchato, 2007), y

C) La expresión y localización aberrante de REST y sus isoformas constituyen una herramienta de uso potencial en el diagnóstico del SCLC.

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento interno de la UAGro.

Referencias

- 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 neurogenesis. *Cell*, 121(4), 645-57.
- Chong, J.A., Tapia-Ramírez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J.J., Zheng, Y., Boutros, M.C., Altshuler, 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(6), 949-57.
- Coulson, J. M., Edgson, J. L., Woll, P. J. y Quinn, J. P. (2000). A splice variant of the neuron-restrictive silencer factor repressor is expressed in small cell lung cancer: a potential role in derepression of neuroendocrine genes and a useful clinical marker. *Cancer Research*, 60(7), 1840-4.
- Fuller, G., Su, X., Price, R., Cohen, Z., Lang, D., Sawaya, R., y Majumder, S. (2005). Many human medulloblastoma tumors overexpress repressor element-1 silencing transcription (REST)/neuron-restrictive silencer factor, which can be functionally countered by REST-VP16. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4, 343-349.
- Instituto Mexicano del Seguro Social, (Noviembre 20, 2011). *Cancer*. Obtenido de <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer/Pages/index.aspx>
- Lv, H., Pan, G., Zheng, G., Wu, X., Ren, H., Liu, Y. y Wen, J. (2010). Expression and functions of the repressor element 1 (RE-1)-silencing transcription factor (REST) in breast cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110, 968–974.9.
- Mayoral, M.A., Zenteno, E., Espinosa, B., Martínez, S. y Guevara J. (2004).m Perspectiva monográfica del cáncer pulmonar: Un enfoque molecular y la metástasis al cerebro. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(4), 283-92.
- Organización Mundial de la Salud, (Noviembre 20, 2010). *Cancer*. Obtenido de www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/
- Ortuño-Pineda, C., Galindo-Rosales, J. M., Calderón-Salinas, J. V., Villegas-Sepúlveda, N., Saucedo-Cárdenas, O., De Nova-Ocampo, M. y Valdés, J. (2012). Binding of hnRNP H and U2AF65 to respective G-codes and a poly-uridine tract collaborate in the N50-5' splice selection of the REST N exon in H69 cells. *PLoS One*, 7, e40315.
- 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 research. Molecular brain research*. 72, 30–39.13.
- Schoenherr, C. J. y Anderson, D. J. (1995). Silencing is golden: negative regulation in the control of neuronal gene transcription. *Current Opinion in Neurobiology*. 5, 566–571.14.
- Shimojo M. (2006). Characterization of the nuclear targeting signal of REST/NRSF. *Neuroscience Letters*, 298, 161-166.
- Westbrook, T. F., Martin, E. S., Schlabach, M. R., Leng, Y., Liang, A. C., Feng, B., Zhao, J. J., Roberts, T. M., Mandel, G., Hannon, G. J., Depinho, R. A., Chin, L. y Elledge, S. J. (2005). A genetic screen for candidate tumor suppressors identifies REST. *Cell*, 121, 837–848.
- Zuchato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, Cataudella, T., Leavitt, B. R., Timmusk, T., Rigamonti, D. y Cattaneo, E. (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature Genetics*, 35(1), 76- 83.