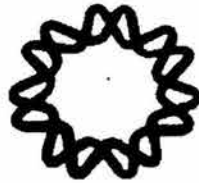


00591



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



ESTUDIO DE LA BIOSINTESIS DE LA TRH EN ETAPA DE
DIFERENCIACION TERMINAL EN CULTIVOS
PRIMARIOS DE HIPOTALAMO
FETAL DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

MAGDALENA GUERRA CRESPO

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: MAGDALENA GUERRA OLIVERO.

FECHA: FEBRERO 26/09

FIRMA: 

Trabajo realizado en el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular bajo la dirección de la Dra. Leonor Pérez Martínez.

Director de Tesis

Dra. Leonor Pérez Martínez

Comité Tutorial

Dra. Leonor Pérez Martínez
Dr. Jean-Louis Charli
Dr. Luis Covarrubias Robles
Dr. Alejandro García Carrancá
Dr. Gustavo Pedraza Alva
Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar

Jurado de Examen

Presidente	Dra. Hilda María Lomeli Buyoli.
Secretario	Dra. Leonor Pérez Martínez.
Vocal	Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo.
Vocal	Dr. Julio Morán Andrade.
Vocal	Dr. Félix Recillas Targa.
Suplente	Dr. Ernesto Méndez Salinas.
Suplente	Dr. Fernando Esquivel Guadarrama.

INDICE

Indice general	1
Indice de figuras	3
Indice de tablas	5
Abreviaturas	6
Resumen	8
Abstract	10
Organización de la tesis	11
Capítulo I. Introducción	12
1. Desarrollo del Sistema Nervioso.....	13
2. Origen del hipotálamo	14
3. La TRH y su función	18
3.1 Estructura del gen de la TRH.....	18
3.2 Biosíntesis de la TRH.....	19
3.3 Funciones generales de la TRH	21
3.4 Papel de la TRH en el control del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.....	22
A) El hipotálamo	22
B) La hipófisis	23
C) El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides y su regulación.....	24
4. Factores extracelulares y su participación en la diferenciación neuronal.....	24
4.1 Papel de las neurotrofinas en la diferenciación del fenotipo TRHérgico en el hipotálamo.....	25
4.1.1 Estructura de las neurotrofinas y sus receptores	25
4.1.2 Señalización mediada por neurotrofinas.....	31
4.1.3 Las neurotrofinas en el desarrollo del sistema nervioso	34
4.1.4 Diferenciación del fenotipo TRHérgico en el hipotálamo y su relación con neurotrofinas... 35	
Justificación y planteamiento del problema	38
Objetivos	40
Referencias	41
Resultados (capítulos 2, 3, 5 y apéndice)	48
Capítulo 2. BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture	48
Resumen	49
Introducción.....	49
Materiales y métodos.....	50
Resultados	53
Discusión	57

Agradecimientos	59
Referencias	59
Capítulo 3. Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons	61
Resumen	62
Introducción	62
Materiales y métodos	63
Resultados	66
Discusión	70
Agradecimientos	74
Referencias	74
Capítulo 4. Los arreglos de ADN y la exploración génica del cerebro	76
Introducción	77
Contenido	79
Agradecimientos	86
Referencias	86
Esquemas	88
Capítulo 5. Caracterización del transcriptoma de las neuronas TRHérgicas del hipotálamo fetal mediante el uso de microarreglos de ADN	94
Introducción	95
Materiales y métodos	97
Resultados	108
Discusión	115
Referencias	124
Capítulo 6. Conclusiones	128
Discusión general	129
Conclusiones generales	134
Perspectivas	135
Referencias	137
Apéndice. Extracellular matrix proteins increase the expression of pro-TRH and pro-protein convertase PC1 in fetal hypothalamic neurons in vitro	138
Resumen	139
Introducción	139
Materiales y métodos	140
Resultados	141
Discusión	144
Agradecimientos	145
Referencias	145

INDICE DE FIGURAS

CAPITULO 1. Introducción

Figura 1. Eje hipotálamo-adenohipofisiario	15
Figura 2. Cronología del desarrollo del NPV en la rata y diferenciación de neuronas	18
Figura 3. Esquema del promotor génico de la TRH de rata	20
Figura 4. Estructura del monómero de NGF de ratón representada en diagrama de listón	27
Figura 5. Estructura tridimensional del heterodímero BDNF/NT-4 y los homodímeros de NT-3 y NT-4	27
Figura 6. Unión específica de las neurotrofinas a sus receptores	28
Figura 7. Estructura de los receptores Trk	29
Figura 8. Modelo tridimensional del complejo NGF-TrkA-p75	30
Figura 9. Representación esquemática de las vías de señalización de las neurotrofinas	33

CAPITULO 2. Artículo: BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture

Fig. 1. TrkB and TrkC mRNAs and/or proteins are expressed in fetal hypothalamus and primary cultures of hypothalamic cells; neurotrophin treatment increases the amount of Trk proteins in culture	51
Fig. 2. BDNF, but not NT-3, increases TRH mRNA levels in primary cultures of hypothalamic cells	52
Fig. 3. TRH mRNA levels in primary cultures of hypothalamic cells increase with the cell density or with addition of homologous conditioned medium	53
Fig. 4. Treatments of primary cultures of hypothalamic cells with an inhibitor of Trk signalling or with an anti-BDNF antibody decrease TRH mRNA levels	54
Fig. 5. Detection by ISH of TRH and TrkB mRNA-expressing cells in hypothalamic cultures	55
Fig. 6. TRH mRNA levels are lower in TrkB ⁻ hypothalamic cells in primary cultures and addition of BDNF increases TRH mRNA levels specifically in TrkB ⁺ cells	56

CAPITULO 3. Artículo: Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons

Fig. 1. Analysis by fluorescence microscopy of transfection efficiencies of pQBI 25 with various transfection reagents	68
Fig. 2. Phase-contrast and fluorescence microscopy of cells transfected with PEI and pQBI 25	69
Fig. 3. FACS analysis, either before or after sorting, of cells transfected with pQBI 25 using PEI or Lipofectamine 2000	70
Fig. 4. Luciferase activities in hypothalamic cells and NIH 3T3 fibroblasts transfected with PEI and pNASS-rTRH-Luc, pcDNA3-CMV-Luc or pNASS-Luc	71
Fig. 5. Detection by ISH of TRH mRNA expressing cells in hypothalamic cultures and in sorted cells	72
Fig. 6. Microscopic analysis of cells transfected with pQBI 25-TRH and PEI	72
Fig. 7. FACS analysis, either previously or after sorting, of cells transfected with pQBI 25-TRH and PEI or Lipofectamine 2000	73

CAPITULO 4. Artículo: Los arreglos de ADN y la exploración de la expresión génica del cerebro.

Fig. 1. Estructura del ADN	88
Fig. 2. Manufactura de microarreglos de ADN complementario	89
Fig. 3. Manufactura de microarreglos de oligonucleótidos ("GeneChips")	90
Fig. 4. Generación del blanco, hibridación y análisis de microarreglos de ADN.....	91
Fig. 5. Procedimiento para la purificación de neuronas expresando la TRH a partir de cultivos de hipotálamo fetal de rata	93

CAPITULO 5. Artículo: Caracterización del transcriptoma de las neuronas TRHérgicas del hipotálamo fetal mediante el uso de microarreglos de ADN.

Figura 1. Protocolo para la purificación de neuronas expresando la TRH a partir de cultivos de hipotálamo fetal de rata	98
Figura 2. RT-PCR de G3PDH, Tau y GFAP realizado a partir del ARN de células purificadas por FACSsort y controles sin purificar.....	109
Figura 3. Análisis por FACS antes o después de la citometría preparativa por FACSVantage de células transfectadas	111
Figura 4. RT-PCR de neurofilamento H, colágena tipo III alpha 1, gene regulado positivamente por la 1,25-hidroxivitamina D3, KLF4, TRH y GFP realizado a partir del ARN de células purificadas por FACSVantage y controles sin purificar	114

APENDICE 1. Artículo: Extracellular matrix proteins increase the expression of pro-TRH and pro-protein convertase PC1 in fetal hypothalamic neurons *in vitro*.

Fig. 1. Hypothalamic pro-TRH and NSE levels increased during late fetal development.....	141
Fig. 2. Survival of hypothalamic cells decreased over time in culture	141
Fig. 3. Laminin or fibronectin did not change survival of hypothalamic cells in culture.....	141
Fig. 4. ECM molecules modified morphological development of hypothalamic neurons.....	142
Fig. 5. ECM molecules increased NSE levels in primary cultures of hypothalamic cells.....	142
Fig. 6. ECM molecules increased pro-TRH levels in primary cultures of hypothalamic cells.....	143
Fig. 7. Laminin or fibronectin did not change pro-TRH mRNA levels in primary cultures of hypothalamic cells.....	143

INDICE DE TABLAS

CAPITULO 1. Introducción

Tabla 1. Subdivisiones hipotalámicas	16
Tabla 2. Efectos extrahipofisarios de la hormona liberadora de tirotrópina	22

CAPITULO 2. Artículo: BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture.

Table 1. Various neurotrophic factors including BDNF enhance the percentage of viable cells in primary cultures of hypothalamic cells.....	53
Table 2. BDNF does not change the numbers of TRH, TrkB+ and double labelled cells in primary cultures of hypothalamic cells maintained for 4 DIV	54

CAPITULO 3. Artículo: Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons

Table 1. Amounts of pQBI 25 and lipids tested to transfect adherent cells.....	64
Table 2. Effect of pQBI 25 amount on PEI-mediated gene transfer efficiency as determined by fluorescence microscopy	67
Table 3. Effect of various methods on pQBI 25 transfection efficiency as determined by FACS	67

CAPITULO 5. Artículo: Caracterización del transcriptoma de las neuronas TRHérgicas del hipotálamo fetal mediante el uso de microarreglos de ADN.

Tabla 1. Relación de transcritos con diferencias significativas en los microarreglos provenientes de células purificadas (PF+), comparado con los microarreglos de células de cultivos primarios transfectadas y pasadas por FACS sin selección de las fluorescentes (PF±) (n=2).....	112
---	-----

APENDICE 1. Artículo: Extracellular matrix proteins increase the expression of pro-TRH and pro-protein convertase PC1 in fetal hypothalamic neurons *in vitro*.

Table 1. Effects of laminin and fibronectin preparations from two commercial sources on pro-TRH or NSE levels were similar	143
--	-----

ABREVIATURAS

A	asa
aa	aminoácido (s)
Akt	proteína serina-treonina cinasa
AP1	factor transcripcional
ARNm	ácido ribonucléico mensajero
ATF	factor activador de la transcripción 3
BDNF	factor neurotrófico derivado de cerebro
CRE	elemento de respuesta a AMPc
CREB	proteína que se une al elemento de respuesta a AMPc
d	dominio
DAG	diacilglicerol
DIV	días <i>in vitro</i>
E	día de desarrollo embrionario
EM	eminencia media
ERVd	elemento de respuesta a la vitamina D3
FACS	citometría de flujo
Gab1	proteína adaptadora de la vía PI3K
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GFP	proteína verde fluorescente
GnRH	hormona liberadora de gonadotropinas
Grb2	proteína adaptadora de unión a receptor de factor de crecimiento
G3PDH	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HHT	eje hipotálamo-hipófisis-tiroides
HL	hormona luteinizante
IP3	inositol 1,4,5 trifosfato
ISH	hibridación <i>in situ</i>
JNK	cinasa amino-terminal de Jun
KLF4	factor 4 similar a kruppel
MAPK	proteína cinasa activada por mitógenos
MEK	cinasa de MAPK
NGF	factor de crecimiento nervioso
NPV	núcleo paraventricular del hipotálamo
NPY	neuropéptido Y
NSE	enolasa
NT	neurotrofina
P	día de desarrollo postnatal
PF+	células purificadas
PF±	células de cultivos primarios transfectadas y pasadas por FACS sin selección de las fluorescentes
PIP2	fosfatidil inositol bifosfato
PI3K	fosfatidil inositol 3-cinasa
PDK	cinasa dependiente de fosfoinosítidos
PKC	proteína cinasa C
PLC- γ	fosfolipasa C- γ

PRL	prolactina
p75	receptor de neurotrofinas p75
RVD	receptor de la vitamina D3
RT-PCR	transcripción reversa-reacción de polimerización en cadena
Shc	proteína con homología a Src
SN	sistema nervioso
SNC	sistema nervioso central
Sos	proteína intercambiadora de nucleótidos
SP1	factor transcripcional
TIEG	gen inducido tempranamente por TGF β
TGF β	factor de crecimiento tumoral beta
TK	tirosina cinasa
TNF	factor de necrosis tumoral
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetato (éster de forbol)
TRH	hormona liberadora de tirotropina
TRHérgicas	neuronas que secretan la hormona liberadora de tirotropina (TRH)
Trk	receptor tirosina cinasa
TSH	hormona tirotropina

RESUMEN

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es un péptido que participa en la comunicación parácrina y endócrina en el cerebro. Las neuronas TRHérgicas del hipotálamo regulan múltiples funciones, incluyendo el sistema autónomo y la hipófisis. El establecimiento de un fenotipo neuronal específico está sujeto a regulación por influencias extracelulares e intracelulares. Dentro de las extracelulares, numerosos estudios han determinado que las neurotrofinas y componentes de la matriz extracelular favorecen la expresión de ciertos neuropéptidos en distintos tipos neuronales del sistema nervioso central. Sin embargo, se sabe muy poco sobre su participación en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo TRHérgico en las neuronas hipotalámicas. Por lo que el objetivo del presente estudio fue identificar mecanismos que inician la expresión de la TRH en neuronas hipotalámicas post-mitóticas. Para ello este trabajo se abordó desde dos enfoques diferentes: a) determinar la participación de factores extracelulares (neurotrofinas y proteínas de la matriz extracelular) y b) caracterizar el perfil génico de las células TRHérgicas, utilizando arreglos de ADN.

Las neurotrofinas pertenecen al grupo de proteínas de la familia del factor de crecimiento nervioso (NGF) involucrado en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso en vertebrados. En los mamíferos existen cuatro miembros de esta familia: NGF, factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3) y neurotrofina 4 (NT-4). Sus acciones son mediadas principalmente por su unión a receptores de la familia tirosina cinasa (Trk).

Estudios previos han mostrado la expresión en el núcleo paraventricular (NPV) hipotalámico, del ARNm de TrkB (receptor de BDNF) al día embrionario 16 (E16), justo antes de la aparición del ARNm de TRH (E18). Así mismo, se ha reportado la co-localización de los ARNm's de TrkB y de BDNF en una población de neuronas TRHérgicas en el NPV en ratas adultas. Estos antecedentes nos llevaron a proponer que el BDNF pudiera estar involucrado en el establecimiento del fenotipo TRHérgico de las neuronas hipotalámicas.

En primera instancia investigamos la expresión *in vivo* y en cultivos primarios hipotalámicos, de TrkB y TrkC, receptores de BDNF y NT-3, respectivamente. Ensayos de RT-PCR mostraron que el ARNm de ambos receptores se expresa *in vivo* en etapa fetal, así como durante todo el período de cultivo. La expresión de las proteínas catalíticas *in vitro* se confirmó por ensayos de "western blot".

Mediante ensayos de RT-PCR determinamos que el BDNF y no NT-3, incrementó los niveles del ARNm de TRH en función del tiempo de exposición del cultivo a la neurotrofina. El mayor efecto se observó cuando el BDNF estuvo presente durante todo el tiempo de cultivo. Además, se determinó por hibridación *in situ* que este incremento se lleva a cabo únicamente en las neuronas TRHérgicas que expresan el receptor TrkB. Estos resultados sugieren que temprano en el desarrollo, el BDNF sea uno de los factores que participan en la determinación fenotípica de las neuronas TRHérgicas. Probablemente, la vía de señalización activada por el BDNF regula la transactivación del gen de la TRH.

Este trabajo también mostró que otro factor importante en el establecimiento del fenotipo TRHérgico es la matriz extracelular. Utilizando cultivo primarios hipotalámicos demostramos que ciertas proteínas de la matriz extracelular como laminina, fibronectina y tenascina, regulan la expresión del péptido pro-TRH. Estos datos junto con los obtenidos con el BDNF indican que el establecimiento de un fenotipo neuronal es el resultado de una

regulación específica a diferentes niveles incluyendo la síntesis del ARNm y la expresión de la proteína.

La segunda parte del proyecto de tesis, aborda la caracterización del transcriptoma de las células TRHérgicas como otra estrategia para determinar algunos de los mecanismos que inician la expresión de la TRH en las neuronas post-mitóticas de hipotálamo fetal de rata.

Con este fin empleamos microarreglos de ADN debido a su capacidad para determinar la expresión de miles de genes simultáneamente. Sin embargo, debido a que las células TRHérgicas son una población minoritaria en el hipotálamo (2 % de las células en cultivo expresan el ARNm de TRH), requerimos aislarlas de la población total. Por lo que cultivos primarios (17 días de gestación) se transfectaron con un plásmido que contiene el promotor de TRH fusionado a la proteína verde fluorescente utilizando polietilenimina. En general se obtuvo alrededor del 12% de eficiencia de transfección de las células TRHérgicas. Las células fluorescentes (TRHérgicas) se purificaron por citometría de flujo (FACS) logrando una pureza de 94 %. Este enriquecimiento se confirmó por RT-PCR e hibridación *in situ*. El ARN total, extraído de células TRHérgicas purificadas, se utilizó para generar un blanco de ARNc para hibridar con microarreglos de oligonucleótidos (U-34A, Affymetrix). Se comparó la expresión de genes en células purificadas con respecto a los presentes en cultivos heterogéneos (sin purificar). Los transcritos de mayor incremento fueron corroborados por RT-PCR.

El análisis por microarreglos indicó que 21 transcritos se expresan específicamente en las células TRHérgicas. Además, indican que la población purificada fue enriquecida en un marcador neuronal (neurofilamento H) y que en ella disminuyó un marcador glial (colágena tipo III, alpha 1).

De manera interesante, el microarreglo mostró la expresión de un transcrito llamado: gen regulado positivamente por la 1,25-dihidroxitamina D3. Se ha reportado que la administración de la vitamina D3 incrementa en un 50 % los niveles del péptido de la TRH en el hipotálamo de ratas adultas. Esto sugiere, que la vitamina D puede tener una participación directa sobre la expresión de TRH y es factible que dicho gen participe en el complejo de expresión transcripcional probablemente como un coregulador.

El análisis por microarreglo indicó también la inducción en la expresión de manera significativa de 3 factores transcripcionales que han sido relacionados directamente en mediar eventos de diferenciación celular: factor-4 similar a kruppel KLF4, el factor activador de la transcripción 3 (ATF3) y el gen inducido tempranamente por TGF β (TIEG). Proponemos que los transcritos identificados pueden regular la expresión de la TRH directamente sobre el promotor de TRH o vía indirecta mediada por la activación de otras proteínas en la célula TRHérgica que a su vez regulan la expresión de la hormona.

Este estudio sugiere por primera vez elementos del transcriptoma TRHérgico en el etapa de diferenciación terminal con la aplicación de la tecnología de microarreglos, y describe una metodología que permite enriquecer una población neuronal minoritaria.

ABSTRACT

Neuronal differentiation is a complex event regulated by extracellular and intracellular signals. Among the extracellular signals, neurotrophins and extracellular matrix proteins promote the expression of a number of neuropeptides within the CNS. However, their specific role during the establishment and maintenance of the TRHergic phenotype is unknown. The present study was aimed to identify signals regulating TRH expression in primary cultures of rat fetal hypothalamic cells. The role of neurotrophins on TRH mRNA expression was determined. We used the advantages of microarray analyses to characterize the TRHergic phenotype.

Although the receptors for BDNF and NT-3 were detected *in vivo* and in hypothalamic primary cultures only BDNF was able to up-regulate TRH mRNA expression. Interestingly, the BDNF mediated induction was observed only in TRHergic cells expressing TrkB, indicative of a direct effect.

For the gene expression profile study we purified by FACS the TRHergic cells from primary hypothalamic cell cultures transfected with an expression vector that encodes the GFP under the control of the rat TRH promoter. Here we describe detailed conditions that allowed a significant improvement of transfection efficiency. This opens the possibility to use transfection of mammalian CNS post-mitotic neurons for purification of specific neuronal subtypes. Purified TRHergic cells were used to generate a cRNA to hybridize microarrays (U34A arrays, Affymetrix, Santa Clara). Microarray data analysis demonstrated a number of genes up regulated in the TRHergic cells that have been associated with neuronal differentiation, including transcription factors. These data describe for the first time, the gene expression profile of the TRHergic cells and provide novel insights into the molecular mechanisms that may be involved in the regulation of TRH expression.

ORGANIZACION DE LA TESIS

La tesis está dividida en dos partes principales: Los resultados de la acción de las neurotrofinas y el uso de microarreglos para la determinación del transcriptoma TRHérgico. La información está descrita en 5 capítulos y un apéndice. El capítulo 1 consiste de una introducción enfocada a las generalidades de la TRH y las neurotrofinas. También incluye la justificación, así como los objetivos generales y específicos. Dentro de ésta tesis se han incluido 4 artículos que se han escrito en el transcurso del trabajo doctoral. El primero de ellos comprende el capítulo 2 y es referente a la acción del BDNF como regulador de la expresión del ARNm de TRH. El capítulo 3 contiene el artículo relacionado a la estrategia experimental que condujo a la transfección y purificación de las células TRHérgicas, trabajo que constituye parcialmente la segunda parte del proyecto. El capítulo 4 es un artículo de revisión de microarreglos de ADN. Fue incluido en la tesis con el propósito de dar una introducción general al capítulo 5 y se encuentra actualmente en prensa en la revista Ciencia de la Academia Mexicana de Ciencias. En el capítulo 5 se describen los resultados generados con el uso de los microarreglos en las células TRHérgicas purificadas y que actualmente se encuentra en escritura para su publicación. Finalmente, está incluido en el apéndice de esta tesis, un artículo sobre el papel de las proteínas de la matriz extracelular en la regulación de la biosíntesis de la TRH. Este está incluido ya que es parte del proyecto encaminado a determinar los mecanismos que participan en el establecimiento del fenotipo TRHérgico.

Capítulo 1
Introducción

INTRODUCCION

1. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO (SN).

Aunque las influencias genéticas y epigenéticas dan lugar a la gran diversidad celular, existen etapas durante el desarrollo del SN comunes a todos los vertebrados. La información genética de una sola célula fertilizada (cigoto) da lugar a billones de neuronas en el SN. En el inicio de la embriogénesis la división mitótica del cigoto da por resultado la formación de células hijas llamadas blastómeros (Revisado en Siegel et al, 1989). Cuando se han formado entre 12 y 16 blastómeros, al grupo de células se le llama *mórula* (macizo celular). Al formarse en ella una cavidad, se da origen al *blastocisto* formado por una masa de células internas que se diferencian para la formación del ectodermo y endodermo. Durante la implantación del blastocisto, ocurre la diferenciación de la masa celular interna que da por resultado la formación de una placa gruesa, denominada *disco embrionario*. En el paso siguiente, denominado gastrulación aparece en el ectodermo en sentido caudal, la *banda primitiva* formada por células que al migrar por el nudo primitivo originan el mesodermo entre las dos capas preexistentes. Estas 3 capas germinativas dan lugar a los diferentes órganos y tejidos. Posteriormente, el mesodermo induce a la región neural del ectodermo, la placa neural, a desarrollar el tubo neural. Este proceso inductivo, involucra un complejo evento morfogénico llamado neurulación que consiste en movimientos migratorios y adquisición de diferentes formas por las células de la placa neural. Esto conduce a que los márgenes de la placa se eleven en la línea media dorsal para dar una forma de surco o ranura, que se va cerrando conforme los bordes de la placa neural se acercan entre ellos, finalmente, cuando estos hacen contacto se forma el llamado tubo neural. Durante este proceso, algunas células ubicadas en el margen de la placa migran en la superficie del ectodermo en dirección dorsal de lo que será el tubo para conformar la cresta neural que por proliferación da origen al sistema nervioso periférico. Por su parte, las células de la pared central del tubo se dividen para formar el sistema nervioso central (SNC) (Revisado en Siegel et al, 1989).

Eventos de proliferación del tubo neural conducen a la formación de 3 vesículas cerebrales primarias: el prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo. Conforme progresa el

desarrollo, se forman 5 vesículas cerebrales secundarias al dividirse el prosencéfalo en 2 vesículas: telencéfalo y diencefalo, mientras que el romboencéfalo se divide en metencéfalo (puente y cerebelo), y mielencéfalo (médula espinal). El mesencéfalo únicamente aumenta su volumen (Sanes et al, 2000). Es a partir del diencefalo que se genera el hipotálamo por proliferación de neuroblastos en la zona intermedia de las paredes diencefálicas del tercer ventrículo, de donde migran en un gradiente latero-medial (del exterior hacia el interior) para formar los distintos núcleos que lo conforman (Altman y Bayer, 1978a).

2. ORIGEN DEL HIPOTALAMO.

El hipotálamo se localiza en la parte ventral del diencefalo. Su porción caudal es adyacente a los núcleos mamilares, mientras que la rostral limita con el quiasma óptico y el área preóptica (Schmidt-Nielsen, 1986). Su ubicación anatómica le confiere un sitio privilegiado para permitir integrar las señales del sistema nervioso con su estructura vecina, la hipófisis, a través de la eminencia media (EM) (**Fig. 1**).

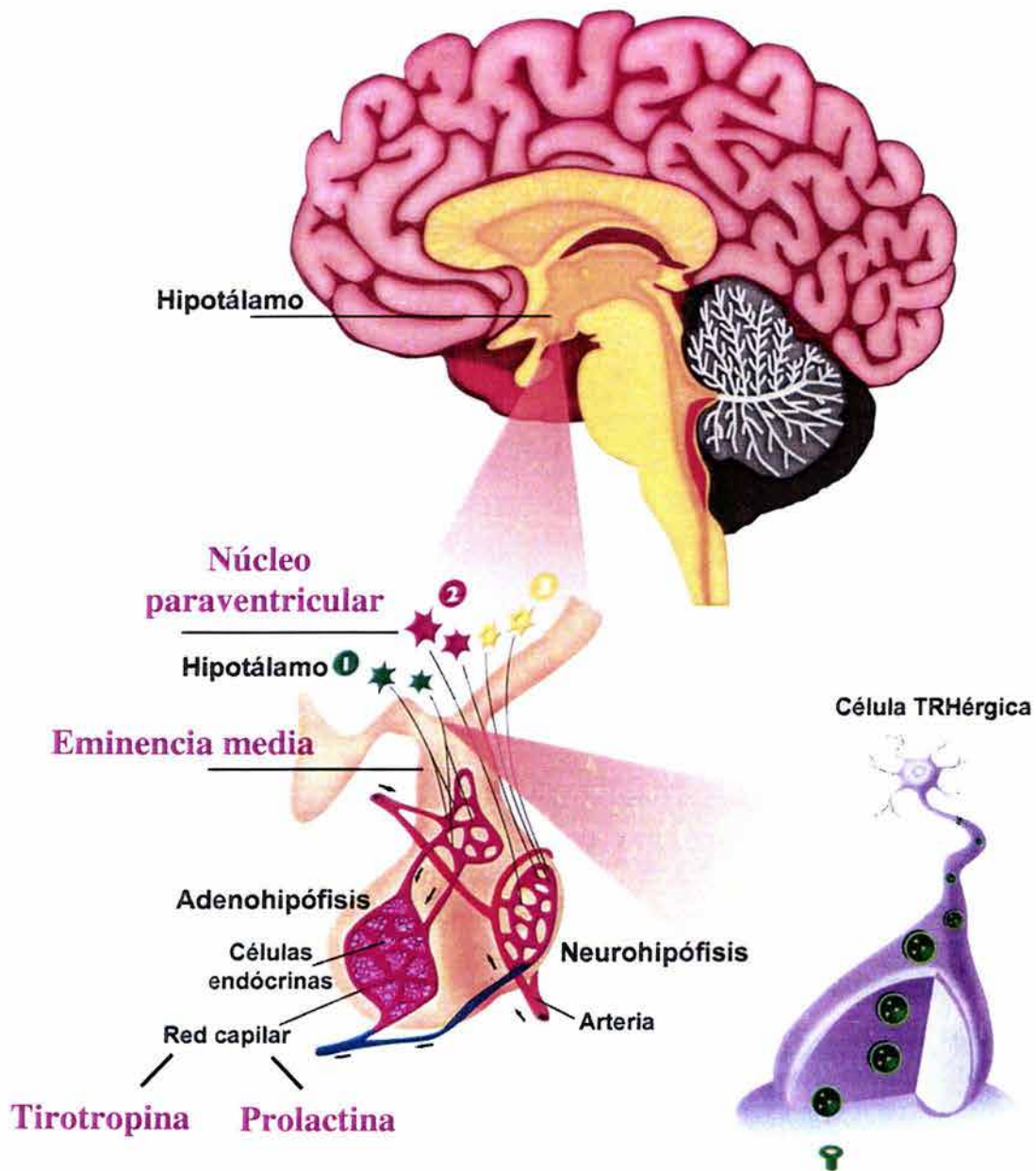


Figura 1. Eje hipotálamo-adenohipofisiario. El hipotálamo forma parte del sistema nervioso central y se localiza en la base del cerebro. Está compuesto por varios grupos de células llamados núcleos. Las neuronas del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, sintetizan la TRH y lo liberan de las terminales en la eminencia media del hipotálamo; la TRH es transportado hacia la adenohipófisis a través del sistema portal-hipofisiario donde regula la síntesis y liberación de las hormonas tirotrópina y prolactina.

El hipotálamo se subdivide en 4 zonas o grupos nucleares de acuerdo a los tipos celulares que los componen y que se extienden en orden rostro-caudal como: área preóptica, anterior o supraóptica, tuberal y mamilar (**Tabla 1**) (Card et al, 1999).

<i>SUBDIVISION HIPOTALAMICA</i>	<i>NUCLEOS</i>
Preóptica	Organo vascular de la lámina terminal Núcleo preótico mediano Núcleo periventricular preóptico Núcleo periventricular anteroventral Núcleo preótico medial Area preótica lateral
Anterior	Núcleo supraquiásmatico Núcleo periventricular anterior Núcleo hipotalámico anterior Núcleo paraventricular Zona subparaventricular Núcleo supraóptico Area retroquiasmática Area hipotalámica lateral
Tuberal	Núcleo periventricular intermedio Núcleo arcuato Núcleo ventromedial Núcleo dorsomedial Area hipotalámica lateral Núcleo premamilar ventral
Mamilar	Núcleo periventricular posterior Núcleo hipotalámico posterior Núcleo premamilar dorsal Núcleo mamilar Núcleo supramamilar Núcleo tuberomamilar Area preótica lateral

Tabla 1. Subdivisiones hipotalámicas. Tomado de Card et al, 1999.

Cada núcleo hipotalámico se origina durante diferentes tiempos en el desarrollo, en un período que va del día embrionario 12 (E12) al E19 en la rata. Las diferentes áreas que conforman el hipotálamo han sido clasificadas en 4 grupos con base al período de tiempo de su formación que sigue el orden de las células más tempranas a las más tardías en su aparición; estimación que es obtenida mediante el marcaje con timidina tritiada inyectada en ratas gestantes (Altman y Bayer, 1978b). La aparición del NPV se ubica en la clase 2 que corresponde al grupo del E13 al E15 del desarrollo fetal, con un nivel máximo de origen de sus neuronas al E14 (Altman y Bayer, 1978b). Este período coincide con la generación de las neuronas que sintetizan a la hormona liberadora de tirotrópina (TRHérgicas) de este mismo núcleo (Markakis y Swanson, 1997). Mediante ensayos de hibridación *in situ* (ISH), es posible detectar el ARNm de TRH en el NPV a partir del E16 (Burgunder y Taylor, 1989) y análisis de inmunohistoquímica demuestra la presencia del pro-TRH a partir del E17 (Okamura et al, 1991). A partir de este momento, los niveles de la TRH se elevan gradualmente hasta alcanzar el máximo el séptimo día postnatal (Pérez-Martínez, L, resultados no publicados). El surgimiento de las neuronas TRHérgicas en otros núcleos del hipotálamo se inicia en el E12 y se mantiene hasta el E16 (Markakis y Swanson, 1997) (**Fig. 2**).

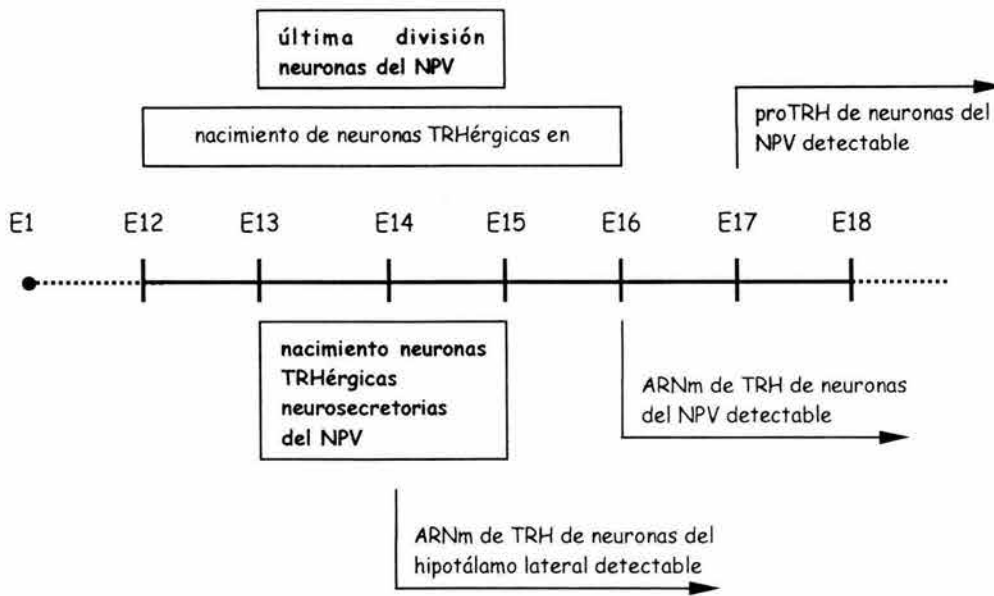


Figura 2. Cronología del desarrollo del NPV en la rata y diferenciación de neuronas TRHérgicas del mismo. Tomado de González-Sánchez, 2001.

3. LA TRH Y SU FUNCION.

Los neuropéptidos son moléculas pequeñas que participan dentro del sistema nervioso como mensajeros químicos. Los sitios con la mayor concentración de neuropéptidos son el hipotálamo (principalmente el área preóptica y la eminencia media) y la glándula pituitaria o hipófisis (Strand, 1999).

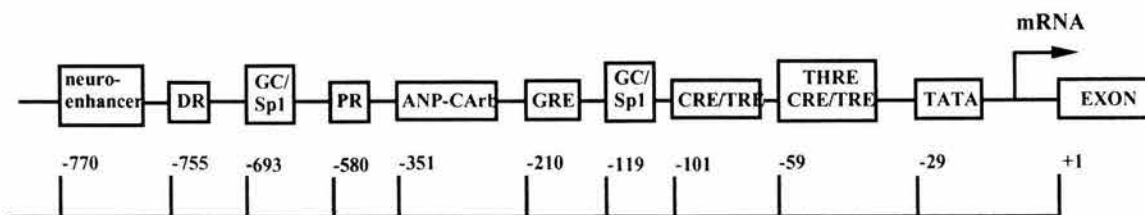
3.1 Estructura del gen de TRH.

La TRH es un tripéptido de estructura, pGluHisProNH₂ (piroglutamil-histidil-prolinamida), sintetizado en diferentes regiones del SNC. Aunque la TRH fue la primera hormona hipotalámica en ser aislada y caracterizada estructuralmente hacia 1969 (Boler et al, 1969; Burgus et al, 1969), su estudio dentro del SNC a lo largo del tiempo ha sido complejo por expresarse en un número muy restringido de células dentro de núcleos celulares muy específicos. Por esta razón, si bien uno de los sistemas mejor conocidos en los que participa la TRH es el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT), la regulación de su biosíntesis aún se desconoce en gran medida.

3.2 Biosíntesis de la TRH.

Análisis de “southern blot” indican que solamente existe un gen de la TRH en el genoma de la rata y el humano (Lee et al, 1988). En la rata, la unidad transcripcional de este tripéptido consiste de 2.6 kb y consta de 3 exones interrumpidos por 2 intrones. La región 5' no traducida del ARNm es codificada por el exón 1; mientras que el péptido señal y la mayor parte del amino terminal es codificada por el exón 2. La mayoría del pro-TRH traducido (las cinco copias de la TRH, el resto del amino terminal, el carboxilo terminal) y la región 3' no traducida del ARNm es codificada por el exón 3 (Lee et al, 1988; Yamada et al, 1990).

Balkan en 1998 (Balkan et al, 1998) reportó que la secuencia que va de -776 a +84 de la región promotora del gen de la TRH es capaz de conferir una expresión tejido específica en ratones transgénicos, es decir, se observa expresión del gen reportero luciferasa únicamente en zonas donde normalmente se localiza la TRH. Los elementos de regulación se muestran en la **figura 3**.



TATA (-29 pb): Esta caja dirige la actividad del promotor basal (Lee et al, 1988).

GC (-119 y -238 pb): Regiones ricas en G y C, que dirigen la actividad del promotor basal y que representan elementos de respuesta al factor transcripcional SP1 (SP1RE). Ambos se han localizado en elementos de respuesta al Factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la región promotora de TRH en ratón (Ren et al, 1998).

GC (-693): Elemento de respuesta a SP1 (Maue et al, 1990).

CRE Y THRE (-59 y -101 pb): Elementos de respuesta para la proteína de unión a AMP cíclico (CREB) y al factor transcripcional AP1 que se activa por TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetato, éster de forbol) (Lee et al, 1989, Jackson et al, 1990).

THRE (-59 pb): Además de unir a CREB y AP1, esta caja es un elemento de respuesta a hormonas tiroideas (HT) (Jackson et al, 1990).

SIMILAR A THRE (-142 pb): Probable región de unión a hormonas tiroideas con poca homología al consenso THRE (-59) (Lee et al, 1988).

GRE (-210 y -284 pb): Elementos de respuesta al receptor de glucocorticoides (Lee et al, 1996; Evans, 1988).

ANPCARt (-351 pb): Elemento similar al presente en el gen del péptido natriurético atrial y que confiere la expresión de TRH específica en el tejido cardíaco (Argentin et al, 1994).

PR y DR (-580 y -755 pb): Secuencias repetidas de función desconocida (Maue et al, 1990).

NEURO-ENHANCER (-770 pb): Secuencia con homología a un enhancer neuronal (Maue et al 1990).

Figura. 3. Esquema del promotor génico de TRH de rata. La numeración en pares de bases (pb) indica la posición del elemento regulador en relación al inicio de la transcripción (+1). Adaptado de Pérez-Martínez et al, 1999.

El gen de TRH, genera un precursor de alto peso molecular (prepro-TRH) que es procesado postraduccionalmente por proteólisis para producir péptidos activos pequeños, con un mecanismo similar al de muchos otros neuropéptidos. La secuencia del precursor prepro-TRH obtenida a partir del cerebro de rata codifica para un polipéptido de 255 aminoácidos (aa) de 26 kD. Esta prohormona consiste de 5 secuencias repetidas de TRH, Gln-His-Pro-Gli flanqueadas por pares de residuos de aa básicos (Lechan et al., 1986a). La maduración del neuropéptido se produce por cortes endoproteolíticos de enzimas de procesamiento a nivel de los residuos dibásicos que flanquean las secuencias peptídicas generándose el péptido Gln-His-Pro-Gli (Nillni et al, 1995, Schaner et al, 1997). Posteriormente, la glutamina N-terminal

es ciclada para formar ácido piroglutámico por la enzima piroglutaminil ciclasa (Fisher y Spiess, 1987) y la glicina C-terminal es utilizada por la enzima peptidil glicina α -amidante monooxigenasa para amidar a la prolina (Eipper et al, 1985).

Se producen de esta manera 5 moléculas de TRH y 7 péptidos crípticos cuya función se encuentra actualmente en estudio, pero de uno de ellos, el Ps4, se sabe que puede funcionar sinérgicamente con la TRH para promover la secreción hormonal a partir de la pituitaria (Ladram et al, 1994).

3.3 Funciones generales de la TRH.

Además de su localización en el NPV hipotalámico, la TRH tiene una amplia distribución en otros núcleos de esta estructura que no proyectan a la eminencia media (EM) y por lo tanto no están involucradas en el eje HHT (Lechan y Tony, 1992). Así mismo, se expresa en diferentes regiones extrahipotalámicas: las relacionadas al sistema límbico (corteza, amígdala, núcleo acumbens, bulbo olfatorio), el septum, el tallo encefálico y la médula espinal (Lechan et al, 1986b). Se tiene poco conocimiento sobre su función en esas áreas, pero en general los estudios realizados lo señalan como un **neuromodulador** (modifica las condiciones de neurotransmisión clásica). Se ha determinado que la TRH potencia la acción excitatoria de acetilcolina sobre neuronas corticales cerebelares (Yarbrough, 1976) y produce incrementos en el recambio de norepinefrina en el hipotálamo, corteza, mesencéfalo y médula oblonga (Keller, 1974).

También se ha descrito para esta hormona un efecto **neurotransmisor** al producir por sí misma (sin la intervención de otra molécula coadyuvante) cambios de potencial de membrana postsinápticos. Se ha observado que la TRH tiene la actividad de inhibir la excitabilidad de neuronas corticales y del núcleo ventromedial hipotalámico (Renaud et al, 1975), mientras que efectúa una acción excitatoria sobre motoneuronas espinales (Nicoll, 1977).

Este neuropéptido es sintetizado además en diferentes tejidos fuera del SNC: el tracto gastrointestinal, el páncreas, el corazón, los tejidos reproductores (placenta, ovario, testículos, vesículas seminales y próstata) (Lechan, 1993), pero su función en estas áreas no se conoce. Algunas de las funciones de la TRH están resumidas en la **tabla** siguiente:

Efectos autonómicos de la TRH administrada en el SNC

Incrementa la presión arterial y la tasa respiratoria
Tiene efectos cardiovasculares: Incrementa el flujo sanguíneo en la tiroides, corteza adrenal y tracto gastrointestinal
Incrementa la actividad motora gastrointestinal
Estimula el volumen gástrico

Efecto neuromodulador

Incrementa el potencial de acción muscular
Excita débilmente las neuronas motoras
Incrementa el recambio de dopamina, norepinefrina y acetilcolina
Potencia los efectos de serotonina

Efectos sobre funciones hipotálamicas

Tiene efecto termoregulador, produce hipertermia en conejo y ratón
Disminuye el consumo de agua y alimentos

Efectos neurotróficos (in vitro)

Estimula el crecimiento axonal de neuronas motoras
Estimula la mielinización
Incrementa la actividad de acetiltransferasa

Efectos neurotróficos después de daño cerebral

Incrementa la sobrevivencia después de un daño hemorrágico
Mejora la recuperación del daño de la médula espinal

Tabla 2. Efectos extrahipofisarios de la hormona liberadora de tirotropina. Tomado de Strand, 1991.

3.4 Papel de la TRH en el control del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

A) El hipotálamo

El hipotálamo es el principal centro autónomo del cerebro y como tal, tiene una función importante en el control del sistema nervioso simpático y parasimpático.

Al hipotálamo llegan señales internas y externas a través de distintas y amplias redes neurales. La información **sensorial** (ej. señales auditivas, olfatorias, ópticas) llega a través de los pares craneales hasta el encéfalo cuyos grupos celulares inervan entonces diferentes núcleos hipotalámicos. Los estímulos **emocionales** son mediados por el circuito corticolímbico, que conduce la información a diferentes regiones del cerebro, vía el núcleo del lecho del stria terminalis, la amígdala, el área preóptica, la corteza prefrontal y el hipocampo; mientras que estímulos **intrínsecos** (ej. temperatura corporal o presión sanguínea) son

mediados por agentes humorales (hormonas, citocinas, glucosa) que actúan directamente sobre células neurosecretorias o vía interneuronas. La respuesta que se genera consiste en la liberación o secreción de diferentes péptidos (factor liberador de corticotropina, arginina, vasopresina), que participan en el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Walker et al, 2001). De lo anterior, se percibe que la relevancia de la estructura hipotalámica radica, en que en ella convergen de manera física y funcional el sistema nervioso y el endócrino (Schmidt-Nielsen, 1986); permitiendo que todas las señales mencionadas se combinen en la conservación de la homeostasis, fenómeno que describe el estado general de organismos superiores y su entorno, el cual incluye cambios en el medio ambiente tanto físico como social.

B) La hipófisis

Esta estructura situada en la base del cráneo se encuentra unida por un tallo al hipotálamo (**Fig. 1**), y está constituida por dos lóbulos: anterior y posterior; el anterior o **adenohipófisis** no pertenece al cerebro y se origina durante la embriogénesis como una glándula. La función endócrina del lóbulo anterior es regulada por uno de los 2 sistemas neurosecretorios del hipotálamo (el vascular), conocido como **neurosecretorio-parvocelular o paraventricular-tuberoinfundibular**, formado por las neuronas de los núcleos paraventricular, arcuato y periventricular que envían sus axones a la EM en donde los péptidos son secretados al sistema porta para llegar finalmente a la adenohipófisis. Las hormonas liberadas en esta vía incluyen: el factor liberador de corticotropina, somatostatina, encefalina, dopamina, neurotensina (Silverman y Zimmerman, 1983) y TRH (Lechan y Jacson, 1982).

El lóbulo posterior o **neurohipófisis** es controlado por las neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico y paraventricular hipotalámico, por lo que es llamado sistema **hipotálamo-neurohipofiseal** (Bargmann y Scharrer, 1951) (**Fig. 1**). Estudios neurofisiológicos e inmunohistoquímicos han confirmado que en estos núcleos se localizan las neuronas que secretan los octapéptidos oxitocina y vasopresina, que son liberados en la corriente sanguínea en respuesta a estímulos como la lactancia en el caso de la oxitocina o el balance hídrico corporal regulado por la vasopresina.

C) El eje hipotálamo-adenohipófisis-tiroides y su regulación

La TRH regula la síntesis y secreción de las hormonas tirotropina (TSH) y prolactina (PRL) a partir de la adenohipófisis en todas las especies de mamíferos (Morley, 1981; Jackson, 1983). Esta función denominada hipofisiotrófica, es únicamente llevada a cabo por la TRH sintetizada en la región parvocelular del núcleo paraventricular hipotalámico; de donde el péptido es transportado a lo largo del axón de estas neuronas hasta la EM, estructura en la que es liberado de la terminal nerviosa bajo la influencia de potenciales de acción, en respuesta a un estímulo fisiológico determinado (**Fig. 1**). En la EM se localiza el sistema porta hipofisiario, que se comunica directamente con la adenohipófisis en donde estimula la síntesis y liberación no solamente de la hormona TSH, sino también PRL, al unirse a su receptor de membrana específico presente en el tirotrópo o lactótrópo respectivamente (**Fig. 1**).

La TSH sintetizada en el tirotrópo, es entonces secretada a la circulación y al alcanzar a su órgano blanco, la glándula tiroides, regula la liberación de las hormonas tiroideas triiodotironina (T3) y tiroxina (T4). Estas hormonas una vez que circulan en el torrente sanguíneo ejercen un control retroalimentador negativo sobre la secreción de TRH en el hipotálamo (Dyess et al, 1988) y sobre la liberación de TSH en la adenohipófisis, manteniendo así la regulación del eje HHT (Padmanabhan et al, 1981). Además de lo anterior, las hormonas tiroideas participan en la regulación de la transcripción de varios genes en diversos procesos fisiológicos como crecimiento, desarrollo, reproducción, metabolismo y comportamiento (una buena revisión de este tema puede leerse en Dumont y Lamy, 1980). Por su parte, la hormona prolactina estimula la producción y liberación de leche en la glándula mamaria (Leong et al, 1983).

4. FACTORES EXTRACELULARES Y SU PARTICIPACION EN LA DIFERENCIACION NEURONAL.

En la regulación de diferentes procesos celulares intervienen no solamente moléculas solubles como factores de crecimiento (neurotrofinas u hormonas) sino también factores de adhesión presentes en la matriz extracelular. Estos últimos se caracterizaron inicialmente como proteínas que dan el soporte estructural de la membrana en casi cualquier tejido animal

(Colognato y Yurchenco, 2000). Dentro de la matriz extracelular, existe un grupo de glicoproteínas: la laminina, fibronectina y tenascina a las que se les ha relacionado con llevar a cabo diferentes funciones en el desarrollo del sistema nervioso o en su mantenimiento en el adulto. Entre estas actividades se encuentra el favorecer la sobrevivencia (Jessell, 1988) y el movimiento neuronal (Liesi, 1990), el crecimiento de neuritas (Masuda-Nakagawa y Wiedemann, 1992), así como guiar el crecimiento de los axones (Pires et al, 1999). Específicamente, la laminina que es la glicoproteína más abundante de la matriz (Colognato y Yurchenco, 2000), promueve la unión neuronal y crecimiento de neuritas en neuronas hipotalámicas en cultivo (Faivre-Bauman et al, 1984). Por su parte, la tenascina regula los niveles del ARNm del neuropéptido Y en el sistema límbico. (Fukamauchi et al,1998), así como la actividad y ARNm de la tirosina hidroxilasa en neuronas dopaminérgicas de la corteza frontal, estriado e hipocampo (Fukamauchi et al,1997).

4.1 Papel de las neurotrofinas en la diferenciación del fenotipo TRHérgico en el hipotálamo.

4.1.1 Estructura de las neurotrofinas y sus receptores.

El otro grupo de moléculas importantes en procesos de diferenciación neuronal son las neurotrofinas. Estas representan una familia de proteínas pequeñas (~12 kDa) que existen como homodímeros asociados fuertemente de manera no covalente (Radziejewski et al, 1992). Hasta ahora, en cordados, han sido aisladas 6 neurotrofinas: Factor de crecimiento nervioso (NGF) (Levi Montalcini et al, 1968), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Leibrock et al, 1989), neurotrofina-3 (NT-3) (Hohn et al, 1990; Maisonpierre et al, 1990; Rosenthal et al, 1990), neurotrofina-4, también llamada NT-5 (NT-4/5) (Hallböök et al, 1991; Berkemeier et al, 1991; Ip et al, 1992), neurotrofina-6 (NT-6) (Götz et al, 1994) y la neurotrofina 7 (NT-7) (Lai et al, 1998; Nilsson et al, 1998). En mamíferos se han identificado sólo los primeros 4 miembros de esta familia.

Comparaciones de las secuencias de aminoácidos de las neurotrofinas, muestran que comparten aproximadamente el 50 % de identidad. Actualmente, no existe una estructura cristalográfica del homodímero de BDNF, se han obtenido solamente cristales en la forma de

heterodímero con la NT-3 (Robinson et al, 1995) o la NT-4 (Robinson et al, 1999). Sin embargo, su comparación con los homodímeros de NGF (McDonald et al, 1991), NT-3 (Robinson et al, 1995) y NT-4 (Robinson et al, 1999), demuestra que el tipo de plegamiento es común en toda ésta familia de neurotrofinas. Dada la gran similaridad estructural observada en éste grupo, se describen a continuación las características de NGF el cual se ha estudiado más ampliamente.

La estructura de NGF determinada por cristalografía de rayos X (McDonald et al, 1991), revela un monómero alargado con la parte central de la molécula formada por 2 pares de cadenas β antiparalelas. Presenta 3 asas cortas (A1, A2 y A4) en el extremo por el que interacciona con su receptor correspondiente en la membrana plasmática (opuesto a la región carboxilo y amino terminal); residuos variables localizados en el asa 2 y 4 contribuyen a la especificidad observada entre los miembros de la familia de NGF. En ese mismo extremo se encuentran también 4 cadenas β pequeñas antiparalelas. El extremo opuesto contiene un motivo de “nudos” de cisteína (formado por 3 puentes disulfuro) que estabilizan el plegamiento y aseguran la conformación de la molécula. La región amino y carboxilo también se ubican en este extremo de la proteína. En la forma biológicamente activa, dos monómeros son arreglados de una manera paralela a lo largo de las cadenas β plegadas centrales para formar un homodímero, y son los residuos hidrofóbicos de estas 4 cadenas (altamente conservados en la familia), los responsables para la mayoría de las interacciones que estabilizan el dímero (**Figs. 4 y 5**).

Figura 4. Estructura del monómero de NGF de ratón representada en diagrama de listón (número de acceso en la base de datos de proteínas, "protein data bank": 1BFT). La representación muestra las diferentes regiones β -plegadas (A-D) y las asas (A1-4) que componen la proteína, así como los extremos amino y carboxilo localizados en el extremo opuesto por el que se une a su receptor (la membrana quedaría ubicada hacia abajo del esquema). Los residuos de "nudos" de cisteína se observan en amarillo. Tomado de Wiesmann y Vos, 2001.

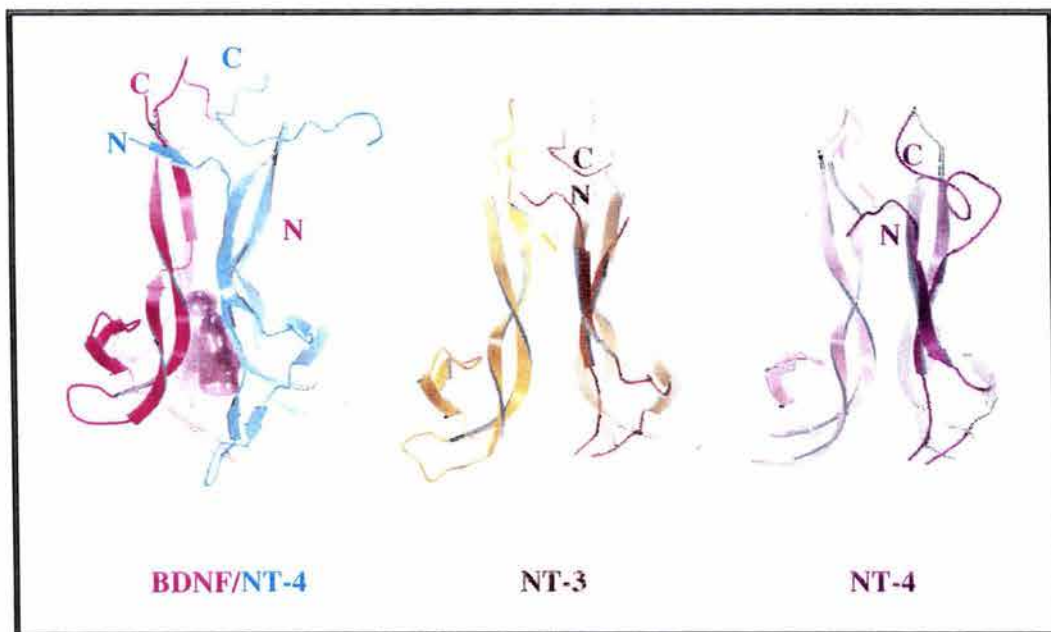
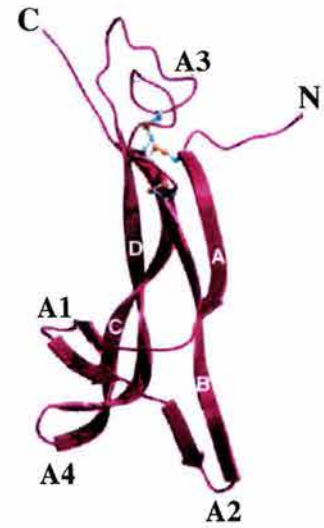


Figura 5. Estructura tridimensional del heterodímero BDNF/NT-4 y los homodímeros de NT-3 y NT-4. Al heterodímero BDNF/NT-4 no se le conoce hasta ahora ninguna importancia biológica; el modelo representa la cavidad en la interfase (color púrpura). La membrana estaría ubicada en la parte inferior de las estructuras. Tomado de Robinson et al, 1999.

La función biológica de las neurotrofinas es mediada por 2 tipos de receptores celulares de superficie: los del tipo tirosina cinasa (Trk) y el receptor p75. Si bien el NGF fue descubierto en 1968 por Levi Montalcini al observar que una sustancia derivada de un sarcoma estimulaba la sobrevivencia de neuronas ganglionares de la raíz dorsal (Levi Montalcini et al, 1968), no fue sino hasta casi 20 años después que Zanca y colaboradores (Martin-Zanca et al, 1986), identificaron al receptor TrkA en un tejido obtenido de una biopsia de carcinoma de colon humano, para 4 años después determinarse que tal receptor transducía una señal inducida por NGF (Kaplan et al, 1991).

Los receptores Trk son activados por la unión del ligando que induce su dimerización, resultando en autofosforilación de los residuos de tirosinas intracelulares y la activación de la vía de transducción (Kaplan y Stephens, 1994). Existen 3 tipos de receptores Trk que se unen a sus ligandos con alta afinidad (rango picomolar) y de manera específica: TrkA es receptor para NGF, NT-6 y NT-7; TrkB es receptor para BDNF y NT-4/5; y TrkC es receptor para NT-3 (Fig. 6).

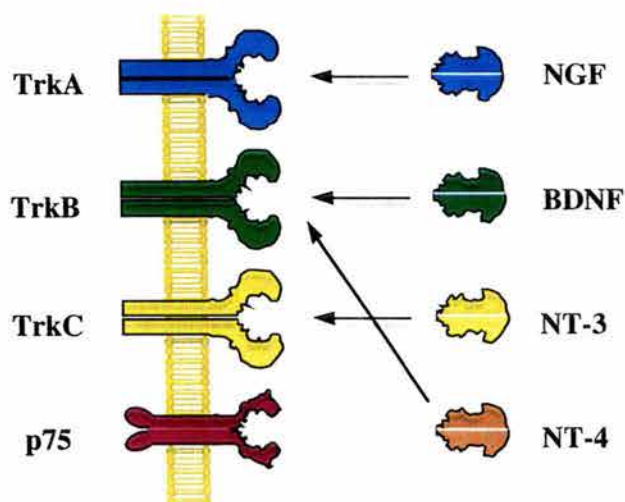


Figura 6. Unión específica de las neurotrofinas a sus receptores. NGF es reconocido por TrkA, mientras que BDNF y NT-4 son ligandos de TrkB y NT-3 de TrkC. Todos los miembros de la familia del NGF son reconocidas con similar afinidad por el receptor p75. Adaptado de Ibáñez, 1998.

En general, la estructura de los receptores Trk consiste de un dominio extracelular (residuos de aa 32-429 en TrkB) para el reconocimiento del ligando, un solo dominio transmembranal (aa 430-453 para TrkB) y una cola citoplásmica carboxi-terminal que

contiene el dominio catalítico (residuos 543-806 para TrkB) (Klein 1989). El dominio extracelular es la región más divergente en los diferentes receptores Trk's a nivel de secuencia (50-55%) (Klein et al, 1989). Esta región contiene una combinación de dominios de adhesión celular formado por 3 motivos continuos ricos en leucina (dominio 2) flanqueados por dos grupos de cisteína (dominios 1 y 3) en su amino terminal y 2 dominios como inmunoglobulina (el 4 y 5) en la región proximal a la membrana, de los cuales, el segundo dominio (5) es el sitio de unión al ligando (Urfer et al, 1998). La variabilidad a nivel de aa en el dominio 5 de cada receptor, generan la especificidad por el ligando (Figs. 7 y 8). El dominio citoplásmico incluye los residuos de tirosina cinasa responsables de iniciar la cascada de señalización activada en respuesta a la unión del ligando y es altamente homólogo (~88 %) entre los receptores Trk (Klein et al, 1989).

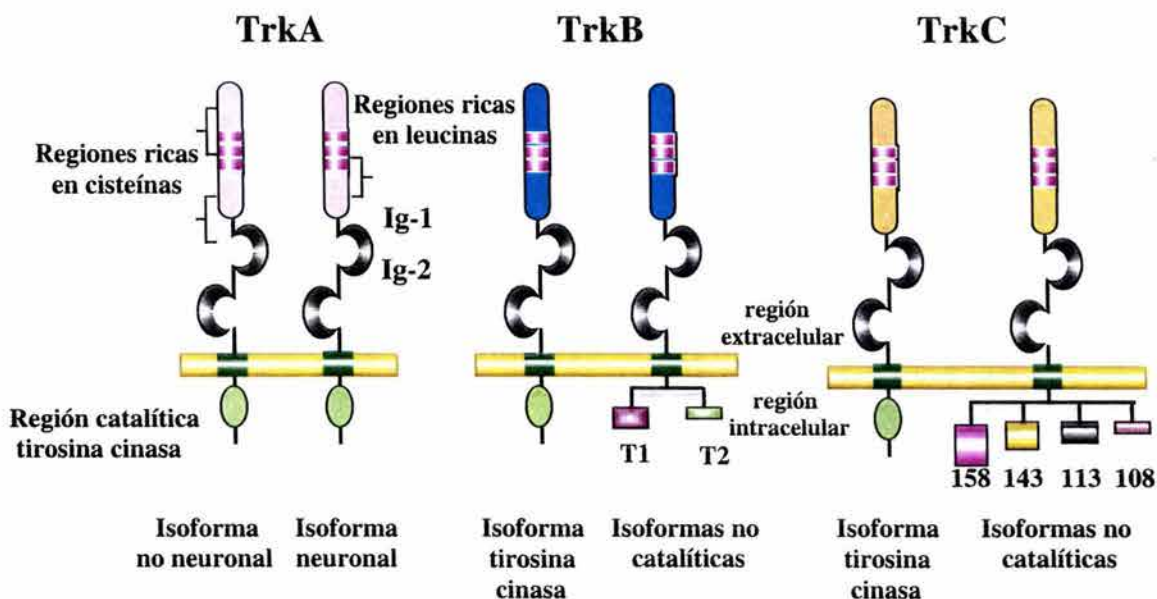


Figura 7. Estructura de los receptores Trk. El gene TrkA codifica dos isoformas, de las cuales la neuronal posee seis residuos extra localizados muy cerca de la región transmembranal (mostrados en el rectángulo). Del receptor TrkB existen tres isoformas, una catalítica (TrkB⁺) y dos no catalíticas (TrkB.T1 y TrkB.T2). El gene TrkC codifica para ocho isoformas del receptor, de las cuales cuatro son catalíticas (varían en el número de aminoácidos presentes en la región TK) y cuatro son receptores truncados. Los números bajo las formas no catalíticas del receptor TrkC indican el número de residuos presentes en la región citoplásmica de cada uno. Adaptado de Barbacid, 1995.

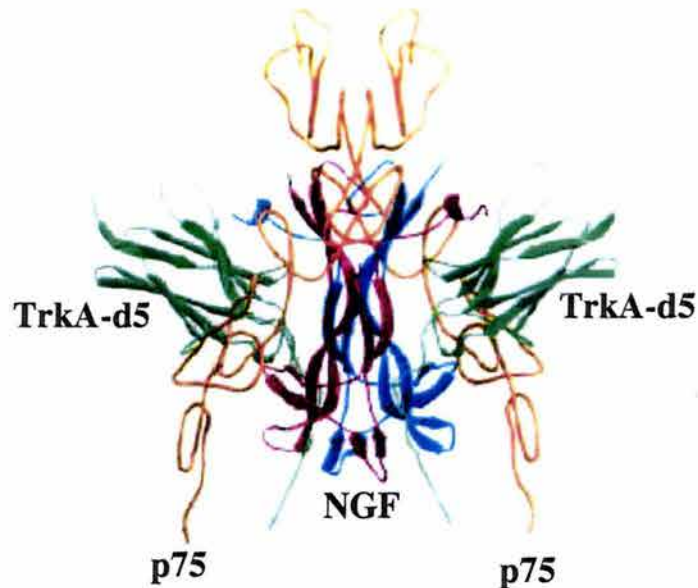


Figura 8. Modelo tridimensional del complejo NGF-TrkA-p75. NGF (homodímero rojo y azul) se muestra unido al dominio 5 (d5) de TrkA (color verde) y a p75 (color amarillo). La membrana se encontraría en la parte inferior del complejo. Tomado de Robinson et al, 1999.

Eventos de procesamiento diferencial en los genes que codifican para estos receptores tirosina cinasa, generan proteínas con deleciones en los receptores TrkB y C (Klein et al, 1990; Middlemas et al, 1991) o inserciones en el caso de TrkC (Lamballe et al, 1993; Valenzuela et al, 1993; Tsoulfas et al, 1993) en el dominio citoplásmico de tirosina cinasa. Estas variantes contienen sin embargo, los mismos dominios extracelulares y transmembranales que los receptores “funcionales”. Para TrkB se han detectado hasta el momento 2 isoformas (TrkB.T1 y TrkB.T2) y 4 para TrkC (**Fig. 7**). Para el receptor TrkA, no se han descrito variantes generadas por procesamiento alternativo (“splicing”) en el dominio cinasa. En el caso de los Trk truncados, se ha observado que pueden funcionar como inhibidores dominantes negativos de los receptores TrkB no truncados cuando estos se coexpresan con la isoforma TrkB.T1 o T2 en las mismas células. El efecto inhibitor se produce al formarse heterodímeros entre las formas catalíticas y truncadas, en sustitución a la homodimerización clásica de los receptores catalíticos, tal dimerización, es incapaz de transducir la señal mediada por BDNF (Ninkina et al, 1996; Eide et al, 1996). Se ha determinado que pueden funcionar también como receptores que secuestran BDNF, ya que las células no-neuronales vecinas a las que producen BDNF, restringen su difusión por internalización (Biffo et al, 1995; Alderson et al, 2000). La expresión de una forma truncada

del receptor TrkC promueve la diferenciación neuronal de células de la cresta neural, pero únicamente en presencia de p75 (Hapner et al, 1998). Por su parte, en un estudio sobre la importancia funcional de las inserciones en estos receptores, se determinó que TrkCI14 permite la sobrevivencia de fibroblastos durante un tiempo corto de cultivo (7 días) (Lamballe et al, 1993).

El receptor de baja afinidad p75, pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y es capaz de unirse a todas las neurotrofinas con afinidad nanomolar, por eso es llamado receptor de baja afinidad. p75 es una glicoproteína transmembranal que no posee un dominio tirosina cinasa y que consiste de una sola cadena peptídica formada de un dominio extracelular alargado con 4 regiones ricas en cisteína (asas) que determinan el sitio de unión de las neurotrofinas, un corto segmento transmembranal rico en serina y treonina y un corto dominio citoplásmico en la región carboxi-terminal. La principal característica de este dominio es su similitud con otros receptores que inducen muerte celular como TNF, Fas y p55 (Meakin y Shooter, 1992). El dominio citoplásmico consiste de 6 α -hélices arregladas en un dominio globular en el que 2 juegos de 3 α -hélices se arreglan de manera perpendicular (Huang et al, 1996).

4.1.2 Señalización mediada por neurotrofinas.

La activación de los receptores Trk cinasa inicia una cascada de señalización específica en el tiempo y en el tipo celular que participa en diferentes respuestas celulares como proliferación, sobrevivencia, apoptosis y diferenciación (Kaplan y Miller, 2000). Sin embargo, desde un punto de vista genético, el sistema receptor ligando usado para generar estos diversos fenómenos es simple. En vertebrados superiores, este deriva de sólo 4 genes codificando ligandos (NGF, BDNF, NT-3 y NT-4), y otro juego de 4 genes codificando sus receptores (TrkA, B, C y p75). Hasta ahora, son 3 vías de señalización, las identificadas como responsables para mediar la respuesta por neurotrofinas a través de estos receptores: A) Vía Fosfatidil inositol 3-cinasa/Serina-Treonina-cinasa (PI-3K/Akt), B) Vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MEK/MAPK) y C) Vía Fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1) (Patapoutian y Reichardt, 2001) (**Fig. 9**). La respuesta celular inicia una vez fosforilados 3 residuos de tirosina del receptor, lo que resulta en la activación de su dominio cinasa, mientras que la fosforilación de otros 7 residuos, señala un punto de anclaje para distintas proteínas

adaptadoras que facilitan la activación de diferentes enzimas. Entre estas, la proteína Ras (GTPasa), es un regulador clave que dirige las señales dentro de las dos primeras vías mencionadas. La señalización por Ras/PI-3/Akt es considerada como la más importante para permitir la supervivencia neuronal; en ella, Ras activa directamente o unida a la proteína adaptadora Gab1, a PI-3K, que es entonces translocada a la membrana para catalizar la transferencia de fosfatos a los fosfoinosítidos de la membrana; lípidos que una vez fosforilados activan a la proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK) responsable de activar a la cinasa Akt cuya función es suprimir apoptosis al fosforilar y por lo tanto inhibir proteínas apoptóticas en muchos sistemas, las cuales incluyen Bad, procaspasa 9 y Forkhead. Por su parte, la señalización por Ras/MEK/MAPK, inicia por la unión de diferentes proteínas al receptor; entre estas se encuentran la tirosina cinasa Shc (proteína con homología a Src), la cual activa a Ras a través de la proteína adaptadora Grb2 (proteína adaptadora de unión al receptor de factor de crecimiento) y Sos (proteína intercambiadora de nucleótidos), para inducir la cascada de fosforilación de las cinasas Raf, MEK y MAP que conduce a la diferenciación, supervivencia y plasticidad sináptica al estimular la actividad o expresión de proteínas antiapoptóticas, que incluyen Bcl-2 y el factor de transcripción CREB (proteína que se une al elemento de respuesta a AMPc). El mecanismo de activación de PLC- γ 1 ya ampliamente conocido, es diferente a los descritos anteriormente, ya que en este caso, la cinasa Trk activa directamente a la PLC- γ 1, la cual hidroliza fosfatidilinosítidos (PIP2, fosfatidil inositol bifosfato) que generan diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) que a su vez induce la liberación de Ca^{+2} de pozas intracelulares, incrementando por lo tanto los niveles de Ca^{+2} citoplásmico y con ello activando vías controladas por este segundo mensajero, sin embargo, a esta vía se le ha relacionado mayormente con rearrreglos del citoesqueleto (**Fig. 9**).

Aunque se ha reportado que el receptor p75 es capaz de estimular mecanismos de muerte celular en distintos tipos neuronales y líneas celulares (Rabizadeh et al, 1993; Bamji et al, 1998), sus vías de señalización han resultado realmente controversiales, ya que su función está sumamente relacionada e incluso modificada por la activación de los receptores Trk. p75 puede en algunos casos desencadenar apoptosis en el contexto de neuronas que no expresan el receptor Trk, esto al permitir la activación de la cascada de JNK (cinasa amino-terminal de Jun)-p53-Bax (Aloyz et al, 1998). Por otra parte, promueve supervivencia neuronal en la

presencia de TrkA, induciendo la transcripción de genes específicos vía el factor nuclear NF- κ B (Kaplan y Miller 2000). La supervivencia y la muerte celular mediada por Trk's-p75/Neurotrofinas, son procesos que dependen de la proporción de receptores presentes en la célula y de la persistencia de los eventos de señalización. Así, el papel de p75 durante el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados podría ser fundamental, al ser característica de esta etapa la muerte celular programada para el establecimiento de las conexiones celulares apropiadas.

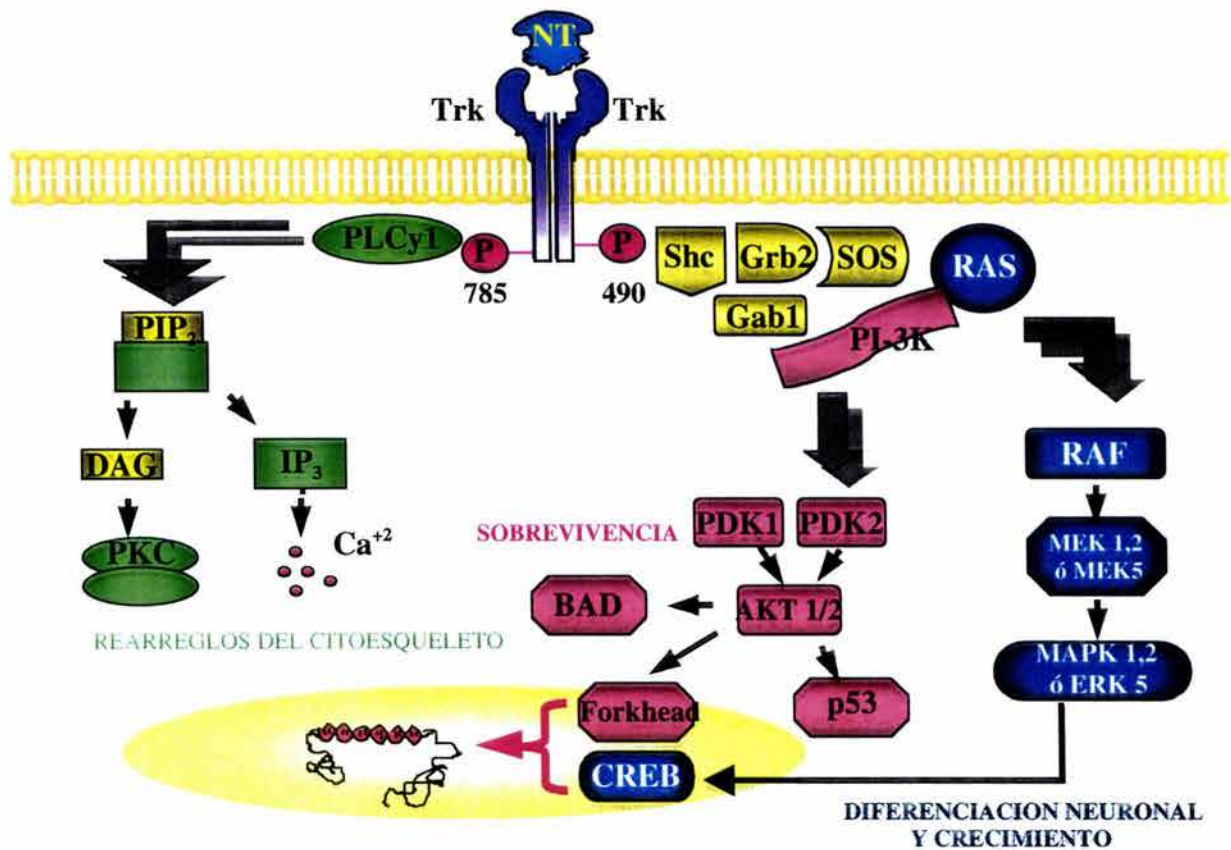


Figura 9. Representación esquemática de las vías de señalización de las neurotrofinas. Son tres los principales mecanismos por los que las neurotrofinas transducen su efecto al interior de la célula: A) Vía Fosfatidil inositol 3-cinasa/Serina-Treonina-cinasa (PI-3K/Akt), B) Vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MEK/MAPK) y C) Vía Fosfolipasa C- γ 1 (PLC- γ 1). Adaptado de Patapoutian and Reichardt, 2001.

4.1.3 Las neurotrofinas en el desarrollo del sistema nervioso.

La secuencia de eventos específicos que conducen a la formación del sistema nervioso, incluyen: proliferación de precursores, diferenciación, sobrevivencia de diferentes tipos celulares y el establecimiento de las conexiones sinápticas apropiadas. En estos procesos, se requiere la acción coordinada de factores intrínsecos y extrínsecos. Entre estos últimos, las hormonas y factores de crecimiento regulan eventos cruciales. Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento específicos para el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados. Durante el desarrollo, regulan la proliferación, sobrevivencia, y diferenciación neuronal, además de regular la orientación quimiotrópica (direccionamiento axonal con base a una señal química) (Tucker et al, 2001). En contraste, en el sistema nervioso maduro tienen una función más restringida en relación a que regulan la sobrevivencia pero de poblaciones neuronales más específicas; en esta etapa, también están involucradas en procesos de plasticidad neuronal (Thoenen, 1995; McAllister et al; 1999).

Tanto las neurotrofinas como sus receptores son expresados en etapas tempranas del desarrollo del cerebro fetal y en etapas adultas. Estudios por “northern blot” demuestran que la expresión inicial de NGF, BDNF y NT-3 es al día 11 del desarrollo embrionario de rata, a partir de este momento su expresión se incrementa de manera importante, alcanzando niveles similares y máximos en el adulto. De manera interesante, el ARNm de BDNF y NT-3 muestran patrones recíprocos de expresión: NT-3 es más abundante en regiones inmaduras del SNC, en las que se están llevando a cabo eventos de proliferación y migración celular, dicha expresión, disminuye conforme progresa la maduración, mientras que se observa el caso inverso para BDNF. Los niveles de expresión de NGF se mantienen constantes a través del desarrollo (Maisonpierre et al, 1990).

Aunque en rata no ha sido determinado el inicio de la expresión de los receptores de neurotrofinas, se ha descrito en embriones de ratón utilizando ensayos de ISH. El ARNm de TrkA se expresa desde el E9.5 en los ganglios sensoriales craneales y de la raíz dorsal (Martin-Zanca et al, 1990). La expresión del ARNm de TrkB determinada por “northern blot” e ISH es a partir del E9.5 en el neuroepitelio y la cresta neural, tejidos que en etapas posteriores darán origen al sistema nervioso (Klein et al, 1990b T). El ARNm de TrkC es detectable por ISH en el neuroectodermo desde el E8.5, hecho que coincide con la formación

del tubo neural (Tesarrollo et al, 1993). La expresión de p75 en etapa embrionaria se observa por primera vez en células indiferenciadas derivadas de la cresta neural en el E9.5 (Chalazonitis et al, 1998).

Estudios previos en neuronas periféricas sugieren que la síntesis de neurotransmisores y neuropéptidos, puede ser regulada por factores proteicos difusibles como neurotrofinas sintetizadas por diferentes tipos celulares como neuronas, células gliales y hematopoyéticas (Patterson y Nawa, 1993). Como ejemplo está el NGF que controla la expresión de la sustancia P en cultivos de neuronas sensoriales (Lindsay y Harmar, 1989). Estas observaciones han dado la posibilidad de que factores proteicos difusibles pudieran a su vez controlar la expresión de neurotransmisores y neuropéptidos en el sistema nervioso central. Se ha demostrado que *in vitro*, las neurotrofinas ejercen efectos de diferenciación en el SNC de un modo comparable a *in vivo*. *In vitro* el BDNF eleva los niveles de neuropéptido Y y somatostatina en neuronas neocorticales GABAérgicas fetales en paralelo con un aumento en los niveles de su correspondiente ARNm (Nawa et al, 1993). *In vivo*, mediante la administración intraventricular de BDNF a ratas neonatos, Carnahan y Nawa demostraron que esta neurotrofina incrementa el nivel de neuropéptido Y, en paralelo con un aumento en los niveles de su ARNm en la neocorteza anterior (Nawa et al, 1994). El análisis de ratones deficientes de BDNF (*Bdnf*^{-/-}) indica que los niveles de NPY en corteza e hipocampo son inferiores al ratón tipo silvestre (Snider, 1994). En neuronas hipocampales en etapa postnatal, el BDNF y la NT-4 son capaces de incrementar los niveles de NPY, pero no del péptido de somatostatina (Marty y Onténiente, 1999). La administración de NGF y no de la NT-3 reestablece la síntesis del ARNm de vasopresina y del péptido vasoactivo intestinal en el núcleo supraquiasmático hipotalámico de ratas adultas cuyos niveles de ambos ARNm's se encontraban disminuídos al ser sometidas a tratamiento crónico de alcohol (Paula-Barbosa et al, 2003).

4.1.4 Diferenciación del fenotipo TRHérgico en el hipotálamo y su relación con neurotrofinas.

El proceso de diferenciación da origen a diversos tipos o **fenotipos neuronales** con características propias como la morfología celular, patrones de conexión con otras células, su capacidad de respuesta a señales específicas en una localización anatómica particular y la

síntesis de un neuropéptido específico; siendo esta última característica la que muchos utilizan para definir o especificar un tipo celular. **A nivel molecular, un fenotipo está definido por los ARNm y finalmente las proteínas que lo constituyen.**

Los fenotipos neuronales son determinados en el proceso intrincado de la embriogénesis por la expresión de genes específicos regulados por señales intercelulares difusibles (factores de crecimiento y neurotrofinas) o no difusibles (interacción con otras células).

Estudios recientes han mostrado la participación de neurotrofinas en la ontogenia peptidérgica en el hipotálamo. El BDNF incrementa los niveles del ARNm (Rage et al, 1999) y del péptido de somatostatina en cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata, mientras que la NT-3 y NGF no producen ningún efecto (Loudes et al, 2000). El estímulo de BDNF es específico sobre las interneuronas del núcleo arcuato y el núcleo periventricular (Loudes et al, 2000).

La información de la expresión de neurotrofinas en el hipotálamo en etapa embrionaria es sumamente escasa, lo que se conoce hasta ahora se ha descrito en rata adulta. En las células de la región parvocelular del NPV, se ha detectado la expresión del ARNm de BDNF (Friedman et al, 1991), así como su colocalización con el ARNm de TRH en una población de neuronas TRHérgicas del NPV de rata adulta (Smith et al, 1995). También se ha demostrado que el ARNm del receptor funcional de BDNF, el TrkB catalítico, se expresa en la región parvocelular del NPV de rata adulta y en menor proporción el TrkB no catalítico (Smith et al, 1995). Además, las neuronas TRHérgicas de esta región, incrementan transitoriamente el nivel del ARNm de BDNF en respuesta a estrés por inmovilización, lo que no ocurre en otras áreas que no se encuentran involucradas en el eje que regula la respuesta a estrés (hipotálamo-hipófisis-médula adrenal) (Smith et al, 1995). Contrario al BDNF, el ARNm de NT-3 no ha sido detectado en el NPV de la rata adulta (Ernfors et al, 1990, Miranda et al, 1993), pero sí el ARNm de su receptor, TrkC (Merlio et al, 1992). La expresión del ARNm que codifica para NGF y TrkA ha sido observada en escasas células del NPV en ratones de 9 y 10 días de edad postnatal (Miranda et al, 1993), así como en varias regiones hipotálamicas de rata adulta (Korsching et al, 1985; Ojeda et al, 1991). Por su parte, el ARNm de p75, se ha descrito en el NPV de rata adulta (Miranda, 1993).

Estudios *in vitro* han determinado la expresión del ARNm de BDNF y NT-3 así como las proteínas en cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata (Loudes et al, 1999; Petit et al, 2002). Del mismo modo la expresión de NGF ha sido reportada en cultivos hipotalámicos fetales de rata (González, 1990).

Estudios de inmunocitoquímica han permitido demostrar que los receptores TrkB y TrkC están presentes en cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata (Rage et al, 1999), así como p75 (Berg-von der Emde et al, 1995).

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para estudiar los mecanismos que regulan la biosíntesis de la hormona TRH *in vitro*, en el presente trabajo se estudiaron principalmente los niveles de expresión del ARNm del neuropéptido desde dos enfoques diferentes.

A) Participación de las neurotrofinas en la diferenciación del fenotipo TRHérgico. Los antecedentes sugieren la participación de las neurotrofinas en el establecimiento de ciertos fenotipos peptidérgicos. La distribución espacial y temporal de BDNF y TRH, así como su colocalización en la región parvocelular del NPV sugiere la posibilidad de que esta neurotrofina tenga una función local parácrina o autócrina en el hipotálamo en el adulto. Del mismo modo, existe la posibilidad de que un evento similar ocurra en la etapa del desarrollo embrionario y por lo tanto una probable participación en la diferenciación terminal de las células TRHérgicas. Por lo anterior, nuestros estudios están encaminados a investigar si el BDNF u otras neurotrofinas y sus receptores se expresan en los cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata, así como determinar si ejercen efecto en la expresión de la TRH.

B) Caracterización fenotípica de las células TRHérgicas. Aunque algunas de las funciones de la TRH son bien conocidas, los mecanismos que inician su biosíntesis y expresión aún se desconocen. La elucidación de tales mecanismos de regulación, es posible efectuarla parcialmente a través de la identificación de transcritos que se expresen en las neuronas TRHérgicas post-mitóticas del hipotálamo fetal de rata. Los microarreglos de ADN ofrecen la posibilidad de realizar un análisis a nivel genómico, debido a su capacidad para determinar la expresión de miles de genes simultáneamente. Por ello representan una herramienta potencial para identificar el transcriptoma de una población específica. Debido a que la células TRHérgicas son una población minoritaria en el hipotálamo (2 % de las células expresan el ARNm de TRH), decidimos aislarlas de la población total, con la idea en primer instancia de caracterizar su fenotipo hasta ahora desconocido.

La caracterización génica de la células TRHérgicas permitirá a corto plazo conocer los transcritos que se expresan bajo un estado celular basal, lo que tendrá un importante impacto en el estudio de los mecanismos que regulan la expresión de esta hormona. A largo plazo está

información ayudará a determinar el papel de TRH en diferentes paradigmas como lactancia o estrés.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de diferentes factores tróficos específicamente del BDNF sobre la diferenciación terminal del fenotipo TRHérgico en neuronas hipotalámicas en cultivo, así como realizar la caracterización fenotípica de este tipo neuronal.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el papel de factores extracelulares (neurotrofinas o proteínas de la matriz extracelular) en la regulación de la expresión de TRH (ARNm y péptido) en cultivos primarios de hipotálamo fetal.
2. Determinar si los efectos de las neurotrofinas son directos o indirectos sobre la diferenciación del fenotipo TRHérgico.
3. Caracterización fenotípica de las células TRHérgicas por medio de microarreglos.
 - 3.1 Desarrollar un método que permita aislar a las neuronas TRHérgicas fetales de la población heterógena del cultivo primario hipotalámico en condiciones viables y con alteración mínima para su posterior caracterización fenotípica.
 - 3.1.1 Estandarización de las condiciones de transfección que permita la detección de las células TRHérgicas.
 - 3.1.2. Optimización del sistema de citometría de flujo (FACS) para el aislamiento de neuronas TRHérgicas.
 - 3.1.3. Análisis del transcriptoma de las células TRHérgicas por microarreglos de ADN.

REFERENCIAS

- Alderson RF, Curtis R, Alterman AL, Lindsay RM, DiStefano PS (2000). Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro. *Brain Res.* **871**:210-22
- Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD, Toma JG, Atwal J, Kaplan DR, Miller FD (1998). p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol.* **143**:1691-703
- Altman J, Bayer SA (1978a). Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J Comp Neurol.* **182**:945-972
- Altman J, Bayer SA (1978b). Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J Comp Neurol.* **182**:973-994
- Argentin S, Ardati A, Tremblay S, Lihmann I, Robitaille L, Drouin J, Nemer M (1994). Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells. *Mol Cell Biol.* **14**:777-90
- Balkan W, Tavianini MA, Gkonos PJ, Roos BA (1998). Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology.* **139**: 252-259
- Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, Causing CG, Miller FD (1998). The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol.* **140**:911-23
- Barbacid M (1995). Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann NY Acad Sci.* **766**:442-458
- Bargmann W, Scharrer E (1951). The site of origin of the hormones of the posterior pituitary. *Am Scient.* **39**: 255-259
- Berg-von der Emde K, Dess WL, Hiney JK, Hill DF, Dissen GA, Costa ME, Moholt-Sibeber M y Ojeda SR (1995). Neurotrophins and the neuroendocrine brain: different neurotrophins sustain anatomically and functionally segregated subsets of hypothalamic dopaminergic neurons. *J Neurosci.* **15**:4223-4237
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron.* **7**:857-66
- Biffo S, Offenhauser N, Carter BD, Barde YA (1995). Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development.* **121**:2461-70
- Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY, Schally AV (1969). The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyro-glutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem. Biophys Res.* **37**:705-710
- Burgunder JM, Taylor T (1989). Ontogeny of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the rat diencephalon. *Neuroendocrinology.* **49**:631-640
- Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Vale W, Guillemin R (1969). Derives polypeptidiques de synthèses doues d'activite hypophysiotropic TRF. *C R Acad Sci (Paris)* **269**:1870-1873
- Card JP, Swanson LW, Moore RY (1999). The hypothalamus: an overview of regulatory systems. En Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ, (Eds): *Fundamental Neuroscience.* Academic Press, San Diego, pp 897-908
- Chalazonitis A, Rothman TP, Chen J, Gershon MD (1998). Age-dependent differences in the effects of GDNF and NT-3 on the development of neurons and glia from neural crest-derived precursors immunoselected from the fetal rat gut: expression of GFRalpha-1 in vitro and in vivo. *Dev Biol.* **204**:385-406
- Colognato H, Yurchenco PD (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* **218**:213-34

- Dumont JE, Lamy F (1980). The regulation of thyroid cell metabolism, function growth and differentiation. In: De Visscher M (ed) The thyroid gland. Raven Press, New York, pp 153-167
- Dyess EM, Segerson TP, Liposits Z, Paull WK, Kaplan MM, Wu P, Jackson IM, Lechan RM (1988). Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. **123**:2291-7
- Eide FF, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY, Reichardt LF (1996). Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci*. **16**:3123-9
- Eipper BA, Myers AC, Mains RE (1985). Peptidyl-glycine alpha-amidation activity in tissues and serum of the adult rat. *Endocrinology*. **116**:2497-504
- Ernfors P, Ibanez CF, Ebendal T, Olson L, Persson H (1990). Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**:5454-8
- Evans RM (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. **240**:889-95
- Faivre-Bauman A, Puymirat J, Loudes C, Barret A, Tixier-Vidal A (1984). Laminin promotes attachment and neurite elongation of fetal hypothalamic neurons grown in serum-free medium. *Neurosci Lett*. **44**:83-9
- Fisher WH, Spiess J (1987). Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. **84**:3628-3632
- Friedman WJ, Olson L, Persson H (1991). Cells that express brain derived neurotrophic factor RNA in the developing postnatal rat brain. *Eur J Neurosci*. **3**:688-697
- Fukamauchi F, Mataga N, Wang YJ, Sato S, Yoshiki A, Kusakabe M (1997). Tyrosine hydroxylase activity and its mRNA level in dopaminergic neurons of tenascin gene knockout mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. **231**:356-9
- Fukamauchi F, Aihara O, Kusakabe M (1998). Reduced mRNA expression of neuropeptide Y in the limbic system of tenascin gene disrupted mouse brain. *Neuropeptides*. **32**:265-8
- González-Sánchez JA (2001). Expresión del ARNm que codifica al receptor de neurotrofinas TrkB^{TK+} en el núcleo paraventricular de hipotálamo de rata durante el desarrollo y su relación con la expresión del ARNm de la hormona liberadora de tirotrópina. Tesis de Maestría, UNAM
- Gonzalez D, Dees WL, Hiney JK, Ojeda SR, Saneto RP (1990). Expression of beta-nerve growth factor in cultured cells derived from the hypothalamus and cerebral cortex. *Brain Res*. **511**:249-58
- Götz R, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharl, Thoenen H (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*. **372**:266-269
- Hallbook F, Ibanez CF, Persson H (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron*. **6**:845-58
- Hapner SJ, Boeshore KL, Large TH, Lefcort F (1998). Neural differentiation promoted by truncated trkC receptors in collaboration with p75(NTR). *Dev Biol*. **201**:90-100
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*. **344**:339-41
- Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW (1996). NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*. **384**:638-41
- Ibáñez CF (1998). Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci*. **21**:438-444
- Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L, Le Beau MM, Espinosa R 3rd, Squinto SP, et al. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution,

- and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**:3060-4
- Jackson MD (1983). Thyrotropin-releasing hormone (TRH): distribution in mammalian species and its functional significance. En thyrotropin-releasing hormone. *Raven Press, New York*. pp 3-14
- Jackson, IMD, Lechan RM, and Lee SL (1990). *Frontiers neuroendocrinol.* **13**: 267
- Jessell TM (1988). Adhesion molecules and the hierarchy of neural development. *Neuron*. **1**:3-13
- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF (1991). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*. **252**:554-8
- Kaplan DR, Stephens RM (1994). Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J Neurobiol.* **25**:1404-17
- Kaplan DR, Miller FD (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* **10**:381-391
- Keller HH, Bartholini G, Pletscher A (1974). Enhancement of cerebral noradrenaline turnover by thyrotropin-releasing hormone. *Nature*. **248**:528-9
- Klein R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M (1989). trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.* **8**:3701-9
- Klein R, Conway D, Parada LF, Barbacid M (1990). The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell*. **61**:647-56
- Klein R, Martín-Zanca D, Barbacid M, Parada LF (1990b). Expression of the tyrosine kinase receptor gene trkB is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development*. **109**:845-850
- Korsching S, Auburger G, Heumann R, Scott J, Thoenen H (1985). Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *EMBO J.* **4**:1389-93
- Ladram A, Bulant M, Delfour A, Montagne JJ, Vaudry H, Nicolas P (1994). Modulation of the biological activity of thyrotropin-releasing hormone by alternate processing of pro-TRH. *Biochimie*. **76**:320-8
- Lai K-O, Fu W-Y, Ip FCF, Ip NY (1998). Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci.* **11**:64-76
- Lamballe F, Tapley P, Barbacid M (1993). tkC encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities. *EMBO J.* **12**:3083-94
- Lechan RM, Jackson IM (1982). Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. **111**:55-65
- Lechan RM, Wu P, Jackson IMD, Wolf H, Cooperman S, Mandel G y Goodman RH (1986a). Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science*. **231**:159-161
- Lechan RM, Wu P, Jackson IMD (1986b). Immunolocalization of the thyrotropin releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology*. **119**:120-1216
- Lechan RM y Toni R (1992). Thyrotropin-releasing hormone neural systems in the central nervous system. En Nemeroff CB (ed): *Neuroendocrinology*. CRC Press, Boca Raton, pp 279-330
- Lechan RM (1993). *Thyroid Today*. 16:1-11
- Lee SL, Stewart K, Goodman RH (1988). Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem*. **263**:16604-16609
- Lee SL, Sevarino K, Roos BA, Goodman RH (1989). Characterization and expression of the gene-encoding rat thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Ann NY Acad Sci*. **553**:14-28
- Lee GC, Yang IM, Kim BJ, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Kim YS, Choi YK (1996). Identification of glucocorticoid response element of the rat TRH gene. *Korean J Intern Med*. **11**:138-44

- Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*. **341**:149-52
- Leong DA, Frawley LS, Neill JD (1983). Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Annu Rev Physiol*. **45**:109-27
- Levi-Montalcini R, Caramia F, Luse SA, Angeletti PU (1968). In vitro effects of the nerve growth factor on the fine structure of the sensory nerve cells. *Brain Res*. **8**:347-62
- Liesi P (1990). Extracellular matrix and neuronal movement. *Experientia*. **46**:900-7
- Lindsay RM, Harmar AJ (1989). Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature*. **337**:362-4
- Loudes C, Petit F, Kordon C, Faivre-Bauman A (1999). Distinct populations of hypothalamic dopaminergic neurons exhibit differential responses to brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT3). *Eur J Neurosci*. **11**:617-624
- Loudes C, Petit F, Kordon C, Faivre-Bauman A (2000). Brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 enhances differentiation of somatostatin neurons in hypothalamic cultures. *Neuroendocrinology*. **72**:144-153
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*. **5**:501-509
- Markakis EA, Swanson LW (1997). Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvocellular neuroendocrine system. *Brain Res Rev*. **24**:255-291
- Martin-Zanca D, Mitra G, Long LK, Barbacid M (1986). Molecular characterization of the human *trk* oncogene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **51 Pt 2**:983-92
- Martin-Zanca D, Barbacid M, Parada LF (1990). Expression of the *trk* proto-oncogene is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development. *Genes Dev*. **4**:683-694
- Marty S, Onténiente B (1999). BDNF and NT-4 differentiate two pathways in the modulation of neuropeptide protein levels in postnatal hippocampal interneurons. *European Journal of Neuroscience*. **11**:1647-1656
- Masuda-Nakagawa LM, Wiedemann C (1992). The role of matrix molecules in regeneration of leech CNS. *J Neurobiol*. **23**:551-67
- Maue RA, Kraner SD, Goodman RH, Mandel G (1990). Neuron-specific expression of the rat brain type II sodium channel gene is directed by upstream regulatory elements. *Neuron*. **4**:223-31
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. **22**:295-318
- McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL (1991). New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature*. **354**:411-4
- Meakin SO, Shooter EM (1992). The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci*. **15**:323-31
- Merlio J-P, Ernfors P, Jaber M, Persson H (1992). Molecular cloning of rat *trkC* and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the *trk* family in the rat central nervous system. *Neuroscience*. **51**:513-532
- Middlemas DS, Lindberg RA, Hunter T (1991). *trkB*, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol*. **11**:143-53
- Miranda RC, Sohrabji F, Toran-Allerand CD (1993). Neuronal colocalization of mRNAs for neurotrophins and their receptors in the developing central nervous system suggests a potential for autocrine interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**:6439-43
- Morley JE (1981). Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. *Endocr Rev*. **2**:396-436

- Nawa H, Bessho Y, Carnahan J, Nakanishi S, Mizuno K (1993). Regulation of neuropeptide expression in cultured cerebral cortical neurons by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem.* **60**:772-775
- Nawa H, Pellemounter MA, Carnahan J (1994). Intraventricular administration of BDNF increases neuropeptide expression in newborn rat brain. *J Neurosci.* **14**:3751-3765
- Nicoll RA (1977). Excitatory action of TRH on spinal motoneurons. *Nature.* **265**:242-243
- Nillni EA, Friedman TC, Todd RB, Birch NP, Loh YP, Jackson IM (1995). Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinant PC1. *J Neurochem.* **65**:2462-72
- Nilsson A-S, Fainzilber M, Falck P, Ibáñez CF (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett.* **424**:285-290
- Ninkina N, Adu J, Fischer A, Pinon LG, Buchman VL, Davies AM (1996). Expression and function of TrkB variants in developing sensory neurons. *EMBO J.* **15**:6385-93
- Ojeda SR, Hill DF, Katz KH (1991). The genes encoding nerve growth factor and its receptor are expressed in the developing female rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res.* **9**:47-55
- Okamura Y, Kawano H, Daikoku S (1991). Spatial-temporal appearance of developing immunoreactive TRH neurons in the neuroepithelial wall of the diencephalon. *Dev Brain Res.* **63**:21-31
- Padmanabhan V, Kesner JS, Convey EM (1981). Effects of triiodothyronine and thyroxine on thyrotropin and prolactin secretion from bovine pituitary cells in vitro. *Endocrinology.* **108**:226-31
- Patapoutian A, Reichardt LF (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* **11**:272-280
- Patterson PH, Nawa H (1993). Neuronal differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity. *Cell.* **72** Suppl:123-37
- Paula-Barbosa MM, Pereira PA, Cadete-Leite A, Dulce Madeira M (2003). NGF and NT-3 exert differential effects on the expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus of rats withdrawn from ethanol treatment. *Brain Res.* **983**:64-73
- Perez-Martinez L, Uribe RM, Sanchez E, Carreon-Rodriguez A, Chavez L, Zacarias M, Joseph-Bravo P, Charli JL (1999). Regulation of TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of rodent hypothalamus. *Current Topics in Neurochemistry.* **2**:79-88
- Petit F, Huicq S, Gardette R, Epelbaum J, Loudes C, Kordon C, Faivre-Bauman A (2002). The neurotrophins NT3 and BDNF induce selective specification of neuropeptide coexpression and neuronal connectivity in arcuate and periventricular hypothalamic neurons in vitro. *Neuroendocrinology.* **75**:55-69
- Pires Neto MA, Braga-de-Souza S, Lent R (1999). Extracellular matrix molecules play diverse roles in the growth and guidance of central nervous system axons. *Braz J Med Biol Res.* **32**:633-8
- Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science.* **261**:345-8
- Radziejewski C, Robinson RC, DiStefano PS, Taylor JW. (1992). Dimeric structure and conformational stability of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Biochemistry.* **31**:4431-6
- Rage F, Riteau B, Alonso G, Tapia-Arancibia L (1999). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 enhance somatostatin gene expression through a likely direct effect on hypothalamic somatostatin neurons. *Endocrinology.* **140**:909-916
- Ren Y, Satoh T, Yamada M, Hashimoto K, Konaka S, Iwasaki T, Mori M (1998). Stimulation of the preprothyrotropin-releasing hormone gene by epidermal growth factor. *Endocrinology.* **139**:195-203
- Renaud LP, Martin JB, Brazeau P (1975). Depressant action of TRH, LH-RH and somatostatin on activity of central neurons. *Nature.* **255**:233-235

- Robinson RC, Radziejewski C, Stuart DI, Jones EY (1995). Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry*. **34**:4139-4146
- Robinson RC, Radziejewski C, Spraggon G, Greenwald J, Kostura MR, Burtnick LD, Stuart DI, Choe S, Jones EY (1999). The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. *Protein Sci*. **8**:2589-2597
- Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Lewis M, Shih A, Laramée GR, Nikolics K, Winslow JW (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron*. **4**:767-73
- Sanes DH, Reh TA, Harris WA (2000). Induction. En *Development of the nervous system*. Academic Press, San Diego, pp 1-35
- Schaner P, Todd RB, Seidah NG, Nillni EA (1997). Processing of prothyrotropin-releasing hormone by the family of prohormone convertases. *J Biol Chem*. **272**:19958-68
- Schmidt-Nielsen K (1986). Hormonal Control. En *Animal Physiology*. Cambridge University Press, New York, pp 497-505
- Siegel G., Agranoff B. W., Albers R.W., Molinoff P.B (1989). Development of the nervous system. En *Basic Neurochemistry*. Raven Press New York, pp 479-506
- Silverman AJ, Zimmerman EA (1983). Magnocellular neurosecretory system. *Annu Rev Neurosci*. **6**:357-80
- Smith MA, Makino S, Kim SY, Kvetnansky R (1995). Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. **136**:3743-3750
- Snider WD (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell*. **77**:627-638
- Strand FL (1999). Hypophysiotrophic neuropeptides y The neuroendocrine system and the transport of neuropeptides. En *neuropeptides: Regulators of Physiological Processes*. The MIT Press. 77-97 y 179-227
- Tessarollo L, Tsoulfas P, Martín-Zanca D, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Parada LF (1993). *trkC*, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues. *Development*. **118**:463-475
- Thoenen H (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. **270**:593-8
- Tsoulfas P, Soppet D, Escandon E, Tessarollo L, Mendoza-Ramirez JL, Rosenthal A, Nikolics K, Parada LF (1993). The rat *trkC* locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC12 cells. *Neuron*. **10**:975-90
- Tucker KL, Meyer M, Barde YA (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci*. **4**:29-37
- Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Hongo J-A, Zhao W, Presta LG (1998). High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. *J Biol Chem*. **10**:5829-5840
- Valenzuela DM, Maisonpierre PC, Glass DJ, Rojas E, Nunez L, Kong Y, Gies DR, Stitt TN, Ip NY, Yancopoulos GD (1993). Alternative forms of rat TrkC with different functional capabilities. *Neuron*. **10**:963-74
- Walker CD, Anand KJS, Plotsky PM (2001). Development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the stress response. En *Handbook of physiology - Coping with the environment: neural and endocrine mechanisms*. OXFORD University Press, pp 237-258
- Wiesmann C, de Vos AM (2001). Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci*. **58**:748-59
- Yamada M, Radovick S, Wondisford R, Nakayama Y, Weingraub BD y Wilber JF (1990). Cloning structure of human genomic ADN and hipothalamic ADNc encoding human prepro thyrotropin-releasing-hormone. *Mol Endocrinol*. **4**:551-556

Yarbrough GG (1976). TRH potentiates
excitatory actions of acetylcholine on cerebral

cortical neurones. *Nature*. **263**:523-524

Capítulo 2

**BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB⁺
hypothalamic neurons in primary culture**

BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB⁺ hypothalamic neurons in primary culture

Magdalena Guerra-Crespo,¹ Raimundo Ubieta,² Patricia Joseph-Bravo,¹ Jean-Louis Charli,¹ Leonor Pérez-Martínez¹

¹Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Cuernavaca, Mor., 62271, México

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, A.P. 6162, La Habana, Cuba

Keywords: neuropeptide, neurotrophin-3, rat, tyrosine kinase receptor

Abstract

Known effects of neurotrophins in the developing central nervous system include induction or regulation of peptide expression. Hypothalamic postmitotic thyrotropin-releasing hormone (TRH)-producing neurons may require neurotrophins for survival and/or differentiation. This issue was investigated using primary cell cultures derived from 17-day-old fetal rat hypothalamus seeded in serum-free medium and analysed up to 4 days *in vitro* culture. Neurotrophin receptor (TrkB and TrkC) mRNA expression was detected by RT-PCR in fetal hypothalamus and throughout the culture period. Western blots confirmed the expression of the full-length proteins *in vitro*. Semi-quantitative RT-PCR showed that the addition of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) increases TRH mRNA levels while the addition of neurotrophin-3 does not. TRH cell content was not modified. Studies on the effect of cell density or homologous conditioned medium demonstrated that endogenous factors probably contribute to determine TRH mRNA levels. One of these factors was BDNF because basal TRH mRNA levels were reduced by the addition of a Trk inhibitor or anti-BDNF. TrkB mRNA was expressed in 27% of cells and TRH mRNA in 2% of cells. The number of TRH⁺ cells was not affected by BDNF treatment. Forty-eight per cent of TRH neurons contained TrkB mRNA; these neurons had higher amounts of TRH mRNA than TrkB⁻ neurons. Only TrkB⁺ cells responded to BDNF by increasing their TRH mRNA levels suggesting that BDNF may directly affect TRH biosynthesis. In conclusion, fetal hypothalamic TRH neurons are probably heterogeneous in regard to the neurotrophic factors enhancing peptide and mRNA levels. BDNF enhances TRH mRNA levels in a population of TrkB⁺ fetal hypothalamic TRHergic neurons in primary culture. However, additional influences may be necessary for the establishment of peptide phenotype in the TrkB⁺ neurons.

Introduction

External clues for the development of central nervous system neurons include electrical activity, extracellular matrix composition and neurotrophic factors. Neurotrophins are a multifunctional family of neurotrophic factors. One their many functions is enhancement of the neuronal differentiation of the peptide phenotype (Carnahan & Nawa, 1995; Barnea *et al.*, 1995; Wirth *et al.*, 1998). However, the specific neurotrophins that hypothalamic peptidergic neurons may require for survival and/or differentiation are poorly known (Rage *et al.*, 1999; Kusano *et al.*, 1999; Loudes *et al.*, 2000).

Neurotrophins and their tyrosine kinase (Trk) receptors are detected during early fetal brain development (Timmusk *et al.*, 1993; Escandón *et al.*, 1994; Ohira *et al.*, 1999). In the rat fetal hypothalamus, TrkC mRNA is homogeneously distributed on the fifteenth day of gestation, changing to a more heterogeneous pattern after birth (Hassink *et al.*, 1999). Primary cultures of hypothalamic cells express TrkB and TrkC proteins (Rage *et al.*, 1999). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF; Loudes *et al.*, 1999), neurotrophin-3 (NT-3) mRNA and protein (Loudes *et al.*, 1999) as well as very low levels of nerve growth factor mRNA (Korsching *et al.*, 1985; González *et al.*, 1990) are present in fetal hypothalamus.

Various neuronal populations synthesize the tripeptide thyrotropin-releasing hormone (pGlu-his-proNH₂, TRH) in hypothalamus. TRH mRNA, pro-TRH and TRH levels are developmentally regulated *in vivo*. In the rat diencephalon, cells expressing TRH mRNA are first detected in lateral hypothalamus at fetal day 14, in ventromedial nucleus at day 15, in paraventricular nucleus at day 16 and in preoptic area at day 17. In these nuclei, the levels of TRH mRNA and the number of TRH neurons increase during the pre- and postnatal periods (Covarrubias *et al.*, 1988; Burgunder & Taylor, 1989; Pérez-Martínez *et al.*, 2001).

There are high levels of BDNF mRNA and protein in the adult rat hypothalamus (Nawa *et al.*, 1993; Katoh-Semba *et al.*, 1997) and TrkB mRNAs are present in most cells of all nuclei (Merlio *et al.*, 1992). Double *in situ* hybridization (ISH) studies revealed that many TRH neurons contain the full-length TrkB mRNA (Uribe, R., M., Ubieta, R., Joseph-Bravo, P., and Charli, J.-L., unpublished results). Some TRH cells transiently express BDNF mRNA during an immobilization stress (Smith *et al.*, 1995). A paracrine or autocrine function of BDNF on TRH neurons may thus operate in adult TRH paraventricular nucleus neurons.

The effects of neurotrophins on TRH mRNA levels were studied in primary cultures of rat hypothalamic cells containing fetal postmitotic neurons. We showed previously that diffusible factors of hypothalamic origin (including glia) may contribute to the development of TRH expression in primary cultures of hypothalamic neurons (Charli

Correspondence: Leonor Pérez-Martínez, as above.
E-mail: leonor@ibt.unam.mx

Received 24 October 2000, revised 30 April 2001, accepted 4 June 2001

et al., 1995). Hypothalamic cells were grown in a serum-free medium to identify the influences that may directly regulate neuronal activities. We focused on the early steps of postmitotic development, when TRH neurons initiate TRH mRNA synthesis *in vivo* or *in vitro* (Burgunder & Taylor, 1989; Guerra-Crespo, M., Ubieta, R., Joseph-Bravo, P., Charli, J.-L. and Pérez-Martínez, L. unpublished results). Our results show that endogenous or exogenous BDNF increases TRH mRNA levels in a population of TrkB⁺ neurons. Most of these results have been presented in abstract form (Guerra-Crespo *et al.*, 1999).

Materials and methods

Primary cultures

Primary cultures were established from Wistar rat fetal day 17 hypothalamus essentially as described (Niquet *et al.* 2000). Animals were treated according to the 'Guidelines for the use of animals in neuroscience research' of the Society for Neuroscience (USA). Pregnant females were anaesthetized with pentobarbital (33 mg/kg b.w.), the embryos removed individually, and the hypothalamus was excised under a stereoscopic microscope and placed in Hank's solution. After embryo removal, pregnant females were killed under anaesthesia. Tissues were enzymatically dissociated with trypsin (Sigma, Missouri, USA). Viability, monitored by trypan blue exclusion, was $91 \pm 3\%$ with an average yield of $2.7 \pm 0.5 \times 10^6$ cells per hypothalamus [mean \pm standard error of the mean (SEM) from 30 cultures]. Cells were plated on dishes coated with 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ poly D-lysine (Sigma) for RT-PCR, radioimmunoassay (RIA), protein content, determination of cell survival, immunoblot analyses and preparation of conditioned medium. For ISH analyses, dishes were coated with poly D-lysine plus laminin (Sigma; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Except where indicated, cells were seeded at a density of 75000 cells cm^2 . Cells were seeded in 16 mm multi-well plates (Costar, Massachusetts, USA) for RT-PCR, cell survival and immunoblot assays; two-well Laboratory-Tek culture chamber slides (Nunc, Illinois, USA) for ISH studies, and on 60 mm plastic Petri dishes (Costar) for RIA determinations. Cultures were maintained at 37 °C in a water-saturated, 7% CO₂/93% air atmosphere in 0.5 mL (or 7 mL for the 60 mm Petri dishes) of serum-free medium made of Neurobasal supplemented with B27 (Gibco-BRL, Maryland, USA) and 3×10^{-9} M 17 β -oestradiol (Sigma). For the RIA studies, ascorbic acid (Sigma; 50 μM) was added at 2 days *in vitro* (DIV). Cells were analysed at 4 DIV.

Cells were stimulated with 50 ng/mL BDNF or NT-3 (Promega; California, USA). In most cases, neurotrophins were added at 0 DIV and maintained throughout the culture. In some experiments, neurotrophins were either added at 0 DIV and the medium changed at 1 DIV, or added at 2 or 3 DIV and the cells maintained until 4 DIV. Except where indicated, the tyrosine kinase inhibitor K-252a [(8R, 9S, 11S)-(-)-9-hydroxy-9-methoxycarbonyl-8-methyl-2,3,9,10-tetrahydro-8,11-epoxy-1H,8H,11H-2,7b,11a-triazadibenzo[a,g] cycloocta [cde] trinden-1-one]; (Calbiochem, California, USA), the affinity-purified rabbit polyclonal anti-BDNF antibody (Santa Cruz Biotechnology; California, USA) and a control antibody (rabbit anti-mouse IgG, Miles-Yeda Ltd, Israel) were added at 0 DIV. The BDNF antibody does not cross-react with NGF, NT-3 or neurotrophin-4.

Homologous conditioned medium was prepared from hypothalamic cells cultured on 16 mm multi-well plates as described above at densities in the range of 75–600 $\times 10^3$ cells per dish. At 4 DIV, the cell supernatant was collected, centrifuged at low speed to eliminate cell debris and frozen at -20 °C until required. One volume of

conditioned medium was mixed with 1 volume of fresh medium before use.

Reverse transcription of RNA

RNA was prepared by the acid guanidinium thiocyanate method (Chomczynski & Sacchi, 1987). The amount of RNA was quantified according to absorbance values at 260 nm (DU 650 spectrophotometer; Beckman, California, USA) and only samples with a 260 : 280 ratio more than 1.6 were used. First strand cDNA was synthesized from 1 μg of heat-denatured total RNA by incubating at 37 °C for 2 h with 500 ng oligo (dT)₁₅ (Boehringer-Mannheim, Germany) as a primer, 1 \times first strand buffer (Gibco-BRL; in mM: Tris-HCl, 50, pH 8.3; MgCl₂, 3; KCl, 75), dithiothreitol, 10 mM; deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 200 μM and Moloney murine leukaemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Gibco-BRL), 100 U in a total volume of 30 μL .

TRH mRNA semiquantification

TRH mRNA levels were determined by semiquantitative RT-PCR using a robo cycler gradient 40 (Stratagene, California, USA) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) cDNA as an internal control as described (Pérez-Martínez *et al.*, 1998) except for the following modifications: 12 μL RT reaction product was used as DNA template for the PCR and DNA was amplified for 35 cycles with a final extension of 25 min at 72 °C. This protocol detects changes in TRH mRNA levels in primary cultures of hypothalamic cells which are similar to those obtained by Northern blot analyses (Pérez-Martínez *et al.*, 1998).

TrkB and TrkC mRNAs detection

cDNAs were detected by PCR using specific primers which allowed the amplification of both the full-length and truncated forms of the TrkB or TrkC mRNA. For TrkB, we used the oligonucleotides described by Zaheer *et al.* (1995), sense strand, 5'-AATGAAACAAGCCACACACAGGGC-3' and antisense strand, 5'-TGGAGTGTACTCCATTGGAGAT-3' to generate a 750 bp product [mouse TrkB cDNA clone described by Klein *et al.* (1989)]. For TrkC, the following pair of oligonucleotides was used: sense strand, 5'-TTGCCAGCCAAGTGTAGTTTC-3'; antisense strand, 5'-GTTCTGCTCCAGTCTCAATTCCC-3' to generate a 466 bp product [rat TrkC cDNA clone described by Merlio *et al.* (1992)].

The PCR reaction was prepared using 18 μL of cDNA in a standard 50 μL PCR reaction containing the following components, for TrkB, PCR buffer (in mM: Tris-HCl, 10, pH 8.3; KCl, 50; MgCl₂, 1.5), dNTPs, 200 μM ; Taq-DNA polymerase (Boehringer-Mannheim), 2.5 U and oligonucleotides, 0.26 μM ; for TrkC, the same components were used except that MgCl₂ concentration was 2 mM and oligonucleotides were added at 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The amplification conditions used for TrkC consisted of a denaturation step at 94 °C for 4 min followed by 35 cycles of: 94 °C for 1 min; 58 °C for 1 min; and 72 °C for 2 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. The same conditions were used for TrkB with the exception that the annealing temperature was 60 °C. A 20 μL sample of each amplification reaction was size-fractionated on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The amount of DNA was quantified by computerized densitometric scanning of the images using a Fluor-S MultiImager scanner and the Multi-Analyst program (Bio-Rad, California, USA). The relationship between the amount of PCR products and the number of amplification cycles (30, 35 and 40 cycles for TrkB and 30, 35 and 42 cycles for TrkC) was linear (data not shown). Control amplifications lacking reverse transcription

reaction product confirmed that PCR products were not amplified from genomic DNA contamination.

Slides preparation for ISH

At 4 DIV, Laboratory Tek slides were washed with phosphate-saline buffer (PBS), fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma) in PBS for 15 min, rinsed in PBS and treated with 0.25% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine (Sigma), $4 \times$ SSC (SSC, in M: NaCl, 0.3 and Na citrate, 0.03 M), pH 8.0 for 10 min. After dehydration in increasing concentrations of ethanol slides were delipidated in chloroform for 10 min, rinsed in 95% ethanol, air dried and stored at -70°C until use.

ISH with ^{35}S -labelled TRH cRNA

ISH was performed as previously reported (Sánchez *et al.*, 1997) with slight modifications. Transcripts encoding the TRH sequence were labelled with 2×10^6 c.p.m. ^{35}S - α -UTP (1250 Ci/mmol; Amersham, England); specific activity was $2\text{--}3 \times 10^8$ c.p.m./ μg . Hybridization was carried out by applying 40 μL of hybridization buffer containing $2 \times$ SSC, 50% formamide (Gibco-BRL), 10% dextran sulphate (Pharmacia Biotech Inc; New Jersey, USA), $1 \times$ Denhart's, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ yeast transfer RNA (Sigma), 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ denatured salmon sperm DNA (Sigma), 50 mM dithiothreitol (Sigma), 1% sodium dodecyl sulphate (Bio-Rad) and heat-denatured ^{35}S -labelled TRH cRNA probe. Incubation was at 52°C for 12 h. The sections were washed for 2×15 min with $1 \times$ SSC at room temperature, 5 min and 20 min with $2 \times$ SSC, 50% formamide (Aldrich; Missouri, USA) at 52°C , 2×5 min with $2 \times$ SSC at room temperature, 30 min with RNase A (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Boehringer-Mannheim) in $2 \times$ SSC and 1 mM EDTA pH 8.0 at 37°C , 2×3 min with $2 \times$ SSC at room temperature and 15 min with $2 \times$ SSC, 50% formamide at 52°C . After dehydration in graded alcohol, slides were air dried, coated with autoradiographic emulsion (Amersham), exposed for 1 month at 4°C

and silver grains developed with Kodak D19 solution. Cells were counterstained with Nissl stain and analysed under bright field light microscopy.

ISH with digoxigenin-labelled TrkB cRNA

The digoxigenin-labelled antisense cRNA probe was generated by *in vitro* transcription using the linearized plasmid [pFRK16, containing a 483-bp fragment from mouse TrkB cDNA, a gift from Dr R. Klein (Klein *et al.*, 1989)] together with digoxigenin-11-UTP and T7 RNA polymerase (Boehringer-Mannheim). The insert corresponds to a portion of the extracellular domain (1181–1663 bp), which is specific for TrkB, and detects various isoforms of TrkB RNA (Klein *et al.*, 1989). For hybridization, 250 ng of digoxigenin UTP-labelled TrkB cRNA transcripts were added in 40 μL of hybridization buffer (without dithiothreitol). Slides were hybridized as for ^{35}S -TRH cRNA. Following hybridization, slides were rinsed 4×5 min in $2 \times$ SSC and treated for 30 min at 37°C with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A (Boehringer-Mannheim) in $2 \times$ SSC and 1 mM EDTA. Slides were further washed in SSC solutions and preincubated in blocking buffer containing $2 \times$ SSC, 0.05% Triton X-100 and 2% bovine serum albumin (Sigma) for 6 h at room temperature followed by incubation with anti-digoxigenin-alkaline phosphatase (Boehringer-Mannheim) 1:50 in buffer A (in mM: Tris-HCl, 100, pH 7.5; NaCl, 150; Triton X-100, 0.3% and bovine serum albumin, 0.1%) for 48 h at 4°C . Slides were washed in buffer A for 1 min and incubated 1 h at room temperature in 0.02% 3,3-diaminobenzidine (Sigma) and 0.05% hydrogen peroxide in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5. The staining reaction was stopped by placing the slides in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 with 300 mM ammonium acetate. Slides were washed in water and dehydrated in ethanol. To avoid loss of the relatively weak signal, slides were analysed under bright field light microscopy without counter-staining.

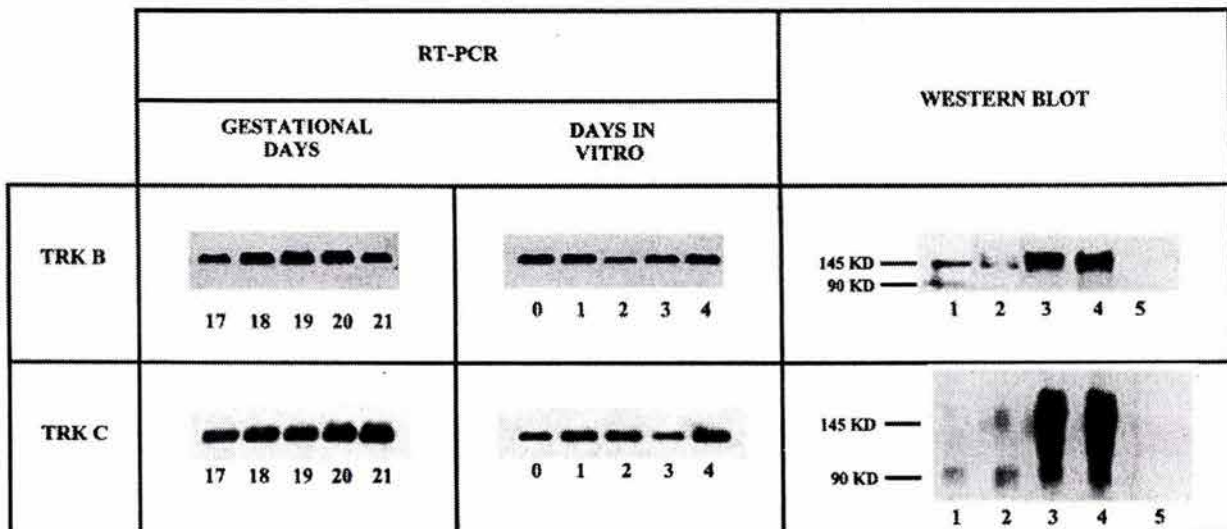


FIG. 1. TrkB and TrkC mRNAs and/or proteins are expressed in fetal hypothalamus and primary cultures of hypothalamic cells; neurotrophin treatment increases the amount of Trk proteins in culture. Left and centre panels: fetal hypothalamic or primary cultures of hypothalamic cells [from 0 (8 h after plating) through 4 DIV] were analysed. Data are scans of RT-PCR products separated by electrophoresis and stained with ethidium bromide. Each lane is representative of three independent determinations. Right panel, TrkB: lane 1, fetal hypothalamus (gestational day 17); lane 2, hypothalamic cells at 4 DIV; lane 3, hypothalamic cells treated with BDNF from 2–4 DIV; lane 4, hypothalamic cells treated with BDNF from 0 to 4 DIV; lane 5, NIH 3T3 fibroblast cell extracts. TrkC: lane 1, adult cerebellum; lane 2, hypothalamic cells at 4 DIV; lanes 3–4, hypothalamic cells treated with NT-3 from 2–4 DIV; lane 5, NIH 3T3 fibroblast cell extracts. Each lane is representative of two or three independent determinations.

Double label ISH

Double label ISH was performed as previously reported (Sánchez *et al.*, 1997); 250 ng of digoxigenin-labelled TrkB and 2×10^6 c.p.m. 35 S-labelled TRH cRNA probes were added in 40 μ L of hybridization buffer. Slides were hybridized, washed and processed as described for digoxigenin-TrkB single label ISH followed by autoradiography to detect the 35 S-labelled TRH cRNA; they were analysed under bright field light microscopy.

Sense cRNA probes were used as specificity controls of the single and double label ISH.

Cell counts

To measure cell viability at 1 and 4 DIV, cells were washed with PBS and incubated for 3 min with trypan blue. The percentage of viable cells per dish was analysed in 10 randomly chosen areas at $40 \times$ magnification; the average was considered as one observation.

For the ISH experiments, the percentage of positive cells was calculated by analysing, 40 randomly chosen areas in each dish at $100 \times$ magnification. The total number of cells counted per dish ranged from 1300 to 1500; the resulting value was considered as one observation. TRH cells were counted as positive when at least eight silver grains were detected on the cell soma; mean grain values for the sense probe were approximately one grain per cell. TrkB cells were considered positive when the intensity of the brown precipitate was higher than that observed with cells labelled with the sense probe.

Immunoprecipitation and Western blot

Cells were lysed in 200 μ L of lysis buffer (in mM: HEPES, 25; Triton X-100, 0.5%; $MgCl_2$, 1.5; NaCl, 150; EDTA, 0.2, pH 8.0; dithiothreitol, 1 M; phenylmethyl-sulphonyl fluoride, 1; leupeptin, 1 μ g/mL; antipain, 5 μ g/ μ L; aprotinin, 10 μ g/ μ L; NaF, 10; orthovanadate, 200; β -glycerophosphate, 10 – inhibitors from Sigma) and incubated for 30 min at 4 $^{\circ}C$. Extracts were centrifuged for 10 min at 13000 r.p.m. (10 000 g) at 4 $^{\circ}C$ and the supernatants were either immunoprecipitated (for TrkC, 50 μ g protein determined with the Bradford assay) or subjected to SDS-PAGE for Western blot analysis (for TrkB, 20 μ g protein).

Immunoprecipitations were performed overnight at 4 $^{\circ}C$ with 1 μ g/mL of anti-TrkC antibodies (Santa Cruz Biotech). Immune complexes were collected by incubating with protein A-Sepharose (Sigma) for 1 h at 4 $^{\circ}C$, washing twice with (in mM): NaCl, 140; Tris, 50 mM, pH 7.8; EDTA, 5; Triton X-100, 1%; once with NaCl, 140; Tris, 50, pH 7.8 and EDTA, 5 mM and once with water at room temperature.

Total cell extracts, or immunoprecipitates, were resolved by SDS-PAGE (8% polyacrylamide; 100 V) and transferred to nitrocellulose membranes at room temperature for 1 h. The membranes were blocked for 1 h at room temperature with 5% (w/v) dry skimmed milk (Carnation) in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 (TBS-T) and washed 3×5 min with TBS-T. Membranes were incubated overnight at 4 $^{\circ}C$ with the primary antibody [rabbit anti-TrkB (Santa Cruz Biotech), 1 : 400 or rabbit anti-TrkC 1 : 100]

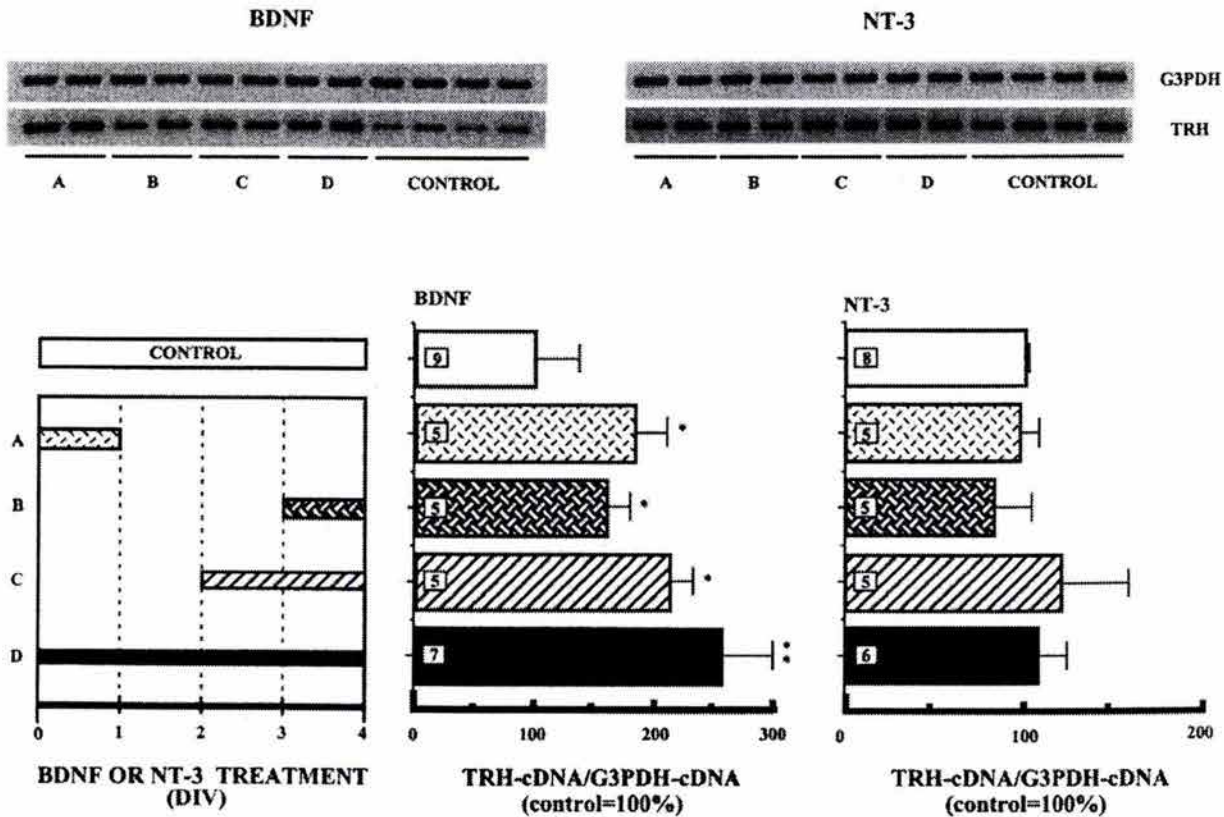


FIG. 2. BDNF, but not NT-3, increases TRH mRNA levels in primary cultures of hypothalamic cells. Cells were treated with BDNF or NT-3 for the time indicated in the left part of the lower panel. The upper panel shows scans of RT-PCR products separated by electrophoresis and stained with ethidium bromide. Data plotted in the central and right lower panels are the ratio of TRH cDNA over G3PDH cDNA signals, in percentage of control values (mean \pm SEM; number of independent determinations are included inside bars). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared to control.

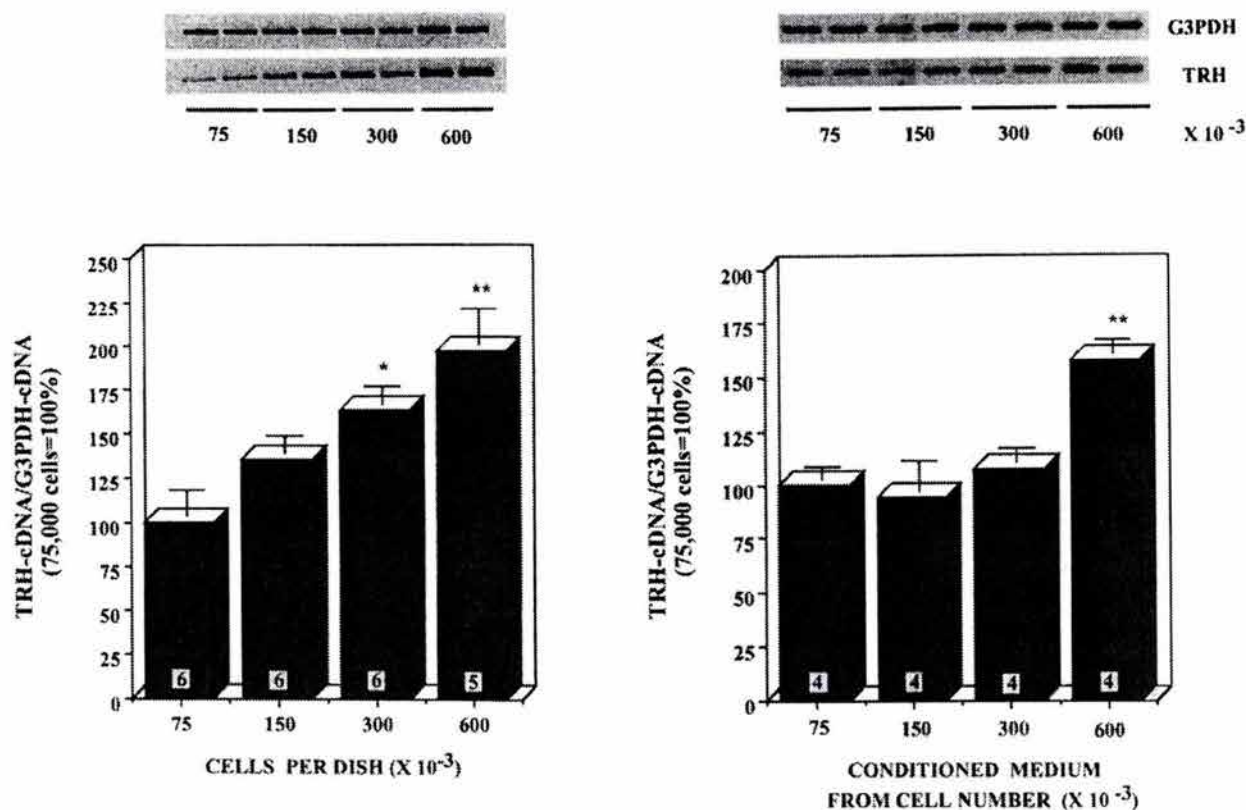


FIG. 3. TRH mRNA levels in primary cultures of hypothalamic cells increase with the cell density or with addition of homologous conditioned medium. Left panel, cells were cultured for 4 DIV. Right panel, cells were seeded in medium containing 50% conditioned medium and 50% fresh medium. The upper panels show representative photographs of the PCR products stained with ethidium bromide (two independent culture dishes for each density). Data plotted in the lower panels are the ratio of TRH cDNA over G3PDH cDNA signals, in percentage of the values at the lower density (mean \pm SEM; number of independent determinations are included inside bars). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared to the lower density.

in TBS-T-5% milk and washed 3×5 min with TBS-T at room temperature. The secondary antibody (donkey anti-rabbit coupled to horseradish peroxidase; Amersham) was diluted 1 : 7000 and incubated with the membranes for 2 h at room temperature. Blots were washed as above. Proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence system (Amersham).

RIA of TRH and protein determination

At 4 DIV, cells were rinsed with PBS and scraped at 4 °C with 2 mL of 1 N acetic acid-50% methanol; the suspension was stored overnight at -20 °C, centrifuged at $2000 \times g$, and the supernatant evaporated. A previously characterized antibody (R2) (Joseph-Bravo *et al.*, 1979) was used for radioimmunoassay (Charli *et al.*, 1995). The sensitivity of the assay (90% B/B₀) was 10 pg. Proteins present in the acid-methanol precipitate were hydrolysed overnight with 500 μ L of 1 N NaOH (Charli *et al.*, 1995) and quantified according to Lowry *et al.* (1951).

Statistical analysis

Data from various independent experiments, each performed in duplicate or triplicate, were pooled. Statistical analyses were performed by ANOVA followed by least-significant-difference multiple comparison test, considering significance for P -values < 0.05 .

TABLE 1. Various neurotrophic factors including BDNF enhance the percentage of viable cells in primary cultures of hypothalamic cells

	Cell viability	
	1 DIV	4 DIV
Control	100 \pm 2.25	100 \pm 3.19
BDNF	100 \pm 1.72	107 \pm 1.72 *
NT-3	101 \pm 1.35	104 \pm 4.85
NGF	98.2 \pm 0.13	106 \pm 3.23*
bFGF	97.9 \pm 0.20	110 \pm 2.65*
EGF	97.8 \pm 1.03	112 \pm 1.87**

Primary cultures of hypothalamic cells were maintained for 4 DIV with or without a neurotrophic factor, each at 50 ng/mL. Percentage of viable cells was determined at 1 and 4 DIV. Data are the mean \pm SEM ($n = 6$) in percentage of the control values at 1 or 4 DIV. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to control.

Results

TrkB and *TrkC* expression in fetal hypothalamus in vivo or in vitro

In agreement with a previous report (Niquet *et al.* 2000), primary cultures consisted mainly of neurons with only a small percentage of

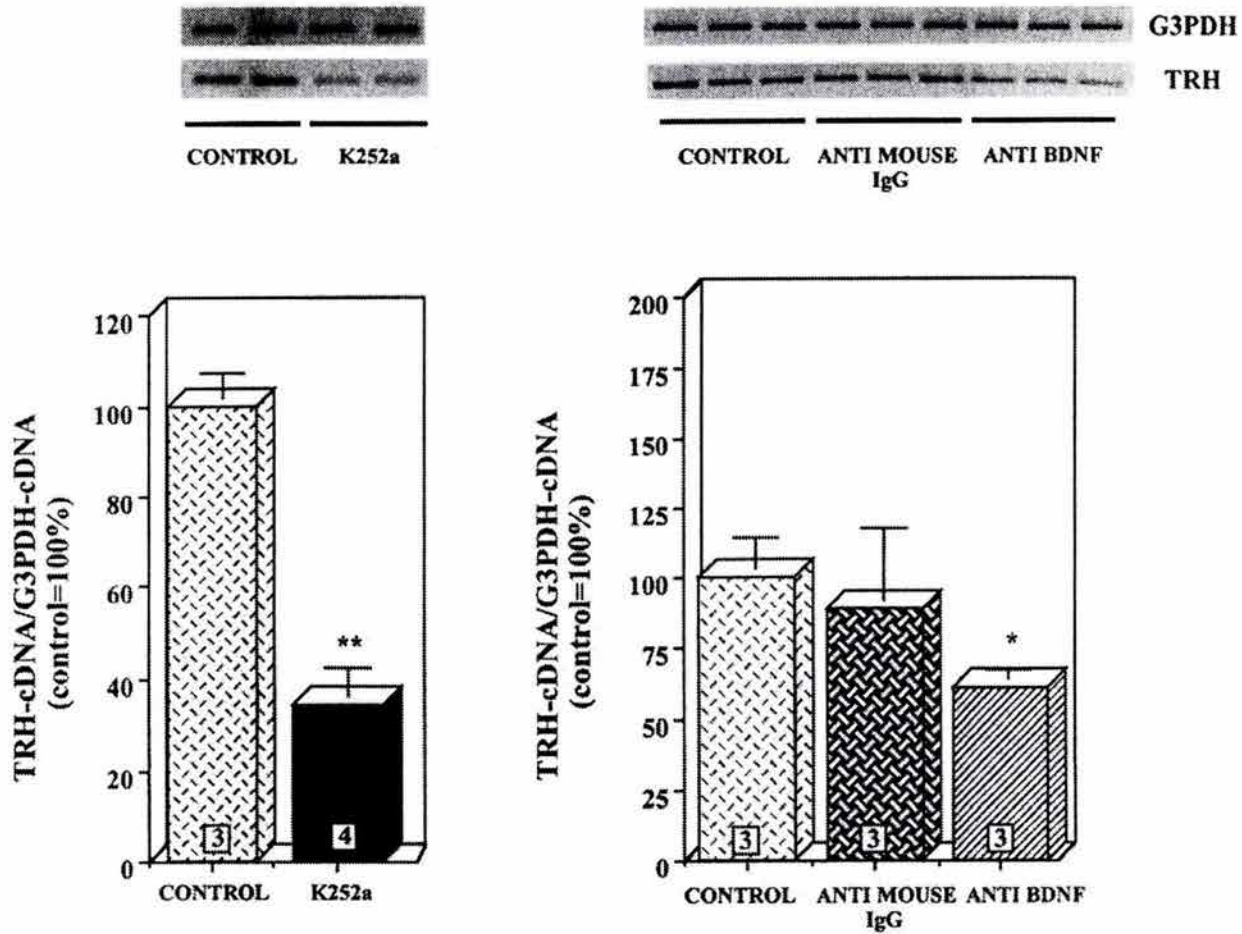


Fig. 4. Treatments of primary cultures of hypothalamic cells with an inhibitor of Trk signalling or with an anti-BDNF antibody decrease TRH mRNA levels. Cells plated at a density of 300×10^3 cells per cm^2 were treated with $0.1 \mu\text{M}$ K-252a or with $2 \mu\text{g/mL}$ anti-BDNF or an irrelevant antibody and maintained for 4 DIV. The upper panels show representative photographs of the PCR products stained with ethidium bromide (two or three independent culture dishes for each treatment). Data plotted in the lower panels are the ratio of TRH cDNA over G3PDH cDNA signals, in percentage of control values (mean \pm SEM; number of independent determinations are included inside bars). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared to control.

cells corresponding to glial fibrillary acidic protein positive cells. The number of cells with neurites, and the size of neurites, increased between 1 and 4 DIV. TRH mRNA expression was low but detectable by RT-PCR from 1 DIV onwards (data not shown).

Since the biological effects of neurotrophins are mediated by the Trk family of receptor tyrosine kinases, we studied the expression of the neurotrophin receptors TrkB and TrkC *in vivo* and in untreated primary hypothalamic cell cultures. Both receptor mRNAs were detected *in vivo*, from fetal day (F)17 to F21, by RT-PCR (Fig. 1, left panel). There was no evidence for a significant change in the amount of total RNA, or TrkB or TrkC mRNAs during this period (mean amount of total RNA, 14–16 μg per hypothalamus; mean TrkB and TrkC mRNA levels, 60–79 and 35–44 arbitrary units from a densitometric analysis of RT-PCR products amplified from 1 μg total RNA). Western blot analysis detected the full-length TrkB protein and low amounts of the truncated form in fetal hypothalamus (F17) (Fig. 1, right panel, lane 1); however, we could not detect any TrkC protein form (Western blot analyses, not shown), in spite of their detection in a positive control, the adult cerebellum (Fig. 1, right

TABLE 2. BDNF does not change the numbers of TRH, TrkB⁺ and double labelled cells in primary cultures of hypothalamic cells maintained for 4 DIV

	Control	BDNF
Cells counted	1433 \pm 56	1452 \pm 26
TrkB ⁺ cells	388 \pm 41	421 \pm 27
TRH ⁺ cells	29 \pm 3	31 \pm 3
TrkB ⁺ /TRH ⁺ cells	15 \pm 4	16 \pm 4

Primary cultures of fetal hypothalamic cells plated on Laboratory-Tek culture chamber slides were treated with or without 50 ng/mL BDNF until 4 DIV. TRH and TrkB⁺ cells were detected by ISH. Data are the number of cells detected in 1.25 mm^2 (mean \pm SEM; $n = 9$).

panel, lane 1). TrkC levels in the fetal hypothalamus may be lower than the limit of detection of our method.

RT-PCR assays indicated that both receptor mRNAs are also expressed throughout the culture (Fig. 1, central panel). Total RNA and TrkB or TrkC mRNA levels appeared constant from 0 to 4 DIV

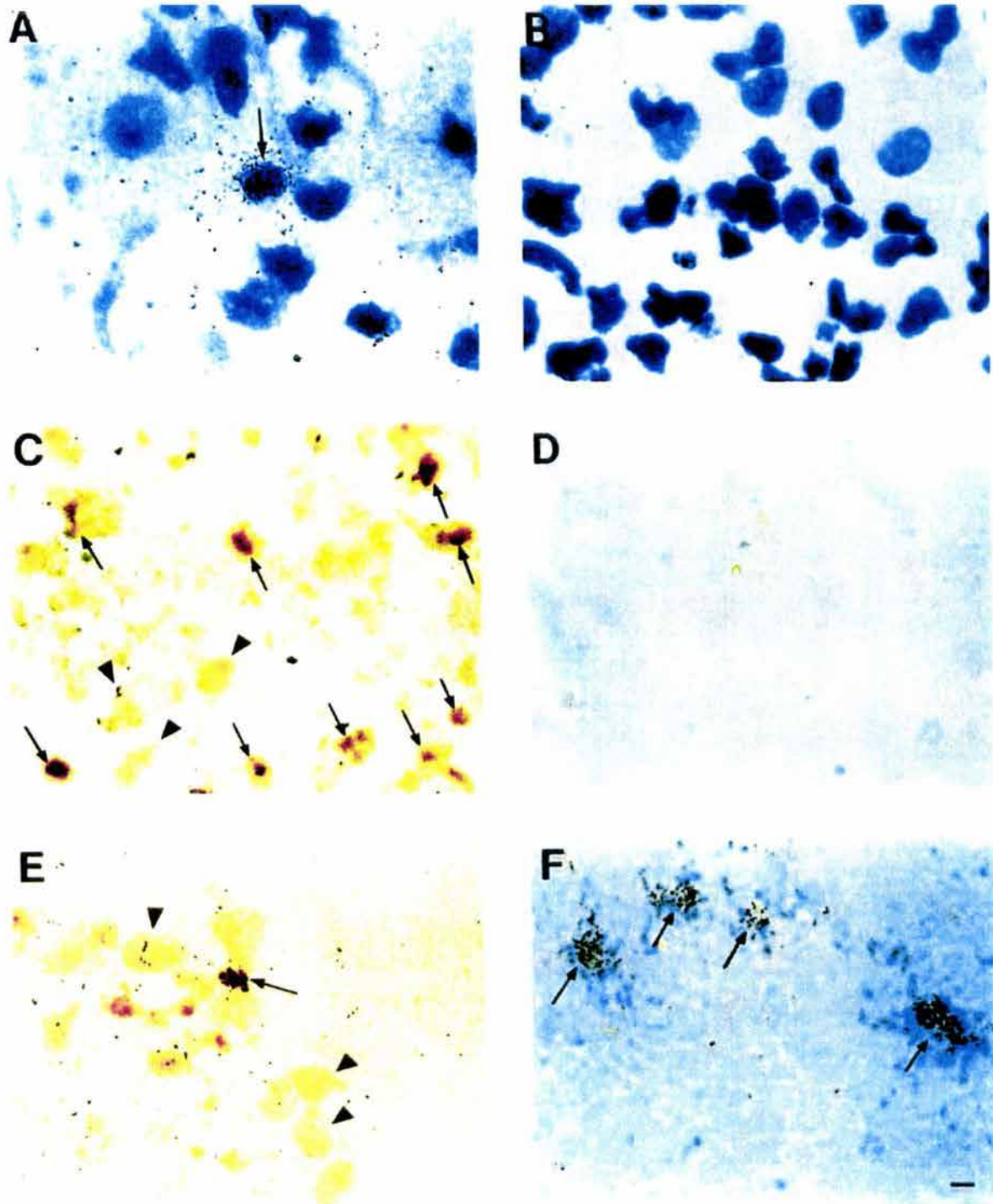


FIG. 5. Detection by ISH of TRH and TrkB mRNA-expressing cells in hypothalamic cultures. Cells plated on Laboratory-Tek culture chamber slides were maintained for 4 DIV and then processed for ISH. Slides were hybridized with a ^{35}S -labelled TRH cRNA (A), a digoxigenin-labelled TrkB cRNA (C), both (E and F) or the sense TRH (B) and TrkB (D) cRNA probes. Photographs of bright field images. In panels A and B, cells were counterstained with Nissl stain. TRH positive cells are identified by the accumulation of black silver grains; TrkB positive cells, by their brown colour. Arrows indicate TRH (A and F) or TrkB (C) or double positive (E) cells. Arrowheads indicate TrkB negative cells. Scale bar, 5 μm .

in control cultures (mean amount of total RNA, 3.5–5.5 µg per dish; mean TrkB and TrkC mRNA levels, 48–66 and 22–29 arbitrary units from a densitometric analysis of RT-PCR products amplified from 1 µg total RNA). The full-length proteins were detected at 4 DIV by western blotting. The immunoreactivity of TrkB was due to the full-length form (Fig. 1, right panel, lane 2) while TrkC immunoreactivity resulted from both the full-length and truncated forms (Fig. 1, right panel, lane 2). As expected, TrkB or TrkC were not detected in NIH 3T3 fibroblasts (Fig. 1, right panel, lane 5). Addition of 50 ng/mL BDNF or NT-3 to hypothalamic cells at 0 or 2 DIV strongly

enhanced the levels of the full-length forms of TrkB or TrkC proteins, respectively, at 4 DIV (Fig. 1, right panel, lanes 3 and 4).

BDNF enhances TRH mRNA levels in vitro

Since the full-length BDNF and NT-3 receptors were expressed *in vitro*, neurotrophins effect on TRH mRNA levels were investigated at near maximal concentration (50 ng/mL) using a relatively low cell density (1.5×10^5 cells per plate, i.e. 75 000 cells/cm²). BDNF and NT-3 treatments were carried out for different periods and TRH mRNA levels were detected by semiquantitative RT-PCR using

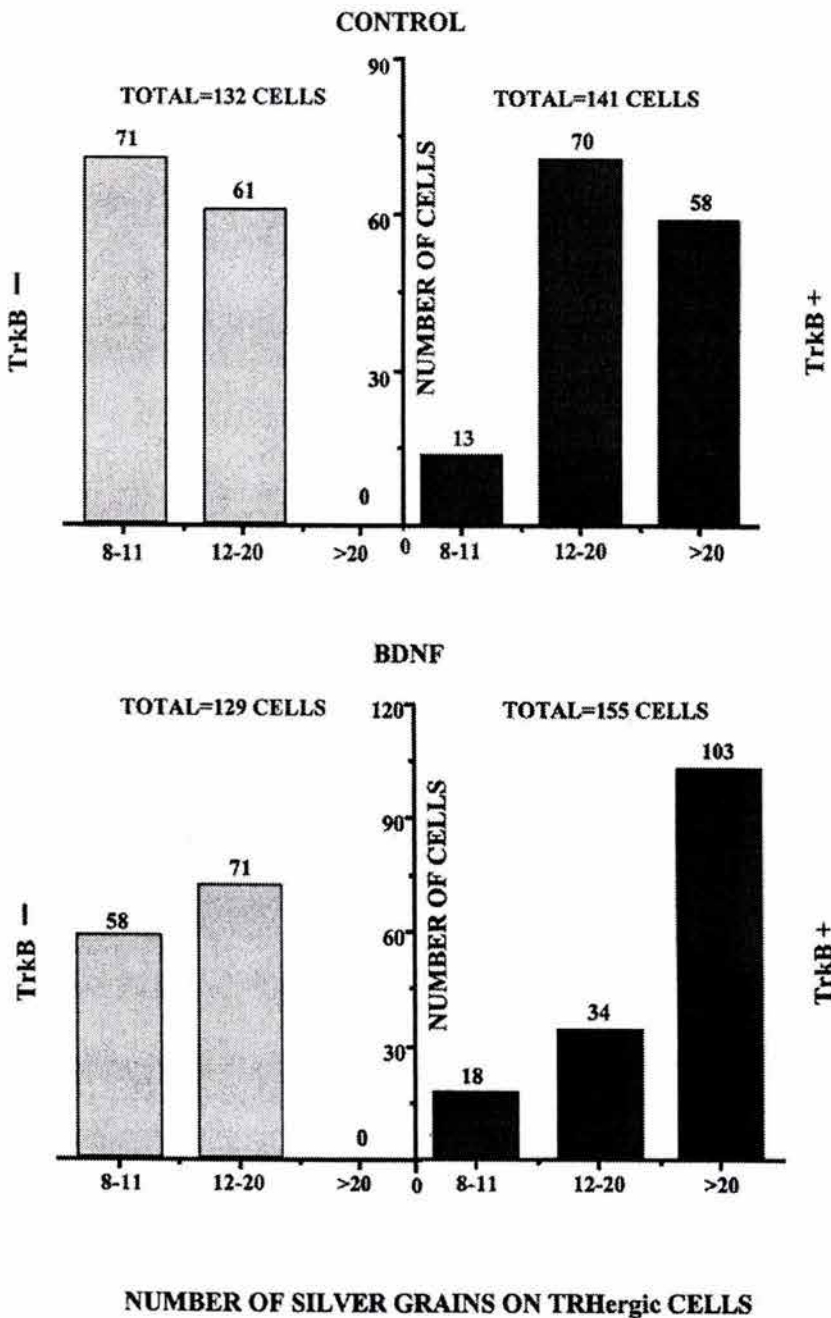


FIG. 6. TRH mRNA levels are lower in TrkB⁻ hypothalamic cells in primary cultures and addition of BDNF increases TRH mRNA levels specifically in TrkB⁺ cells. Cells plated on Laboratory-Tek culture chamber slides were treated with or without BDNF until 4 DIV. Data are the sum of TRH neurons detected in nine dishes. The upper panels show the frequency distribution in control conditions for TrkB⁺ and TrkB⁻ TRH cells; the lower panels show the frequency distribution in BDNF treated cultures for TrkB⁺ and TrkB⁻ TRH cells.

G3PDH mRNA as an internal control. The addition of neurotrophin had no significant effect on cell morphology. For each experimental protocol, TRH mRNA levels were detected at 4 DIV. BDNF or NT-3 treatments did not modify total RNA yield per dish (mean, 2.8–4.4 µg) or G3PDH mRNA levels per µg RNA (mean, 100–121%, controls = 100%). BDNF increased TRH mRNA levels in proportion to the time of cell exposure, with the highest effect observed when BDNF was maintained throughout the culture. NT-3 had no effect (Fig. 2). These results show that addition of exogenous BDNF enhances TRH mRNA levels in primary cultures of hypothalamic cells.

To determine whether BDNF (or NT-3) had an impact on cellular TRH (or protein) levels, the basic protocol was slightly modified because TRH levels are very low during the first days of *in vitro* primary culture of hypothalamic cells (Faivre-Bauman *et al.*, 1980; Loudes *et al.*, 1983; Guerra-Crespo, M., Ubieta, R., Joseph-Bravo, P., Charli, J.-L. and Pérez-Martínez, L. unpublished results), and because available RIAs have a relatively poor sensitivity. We seeded cells in 60 mm Petri dishes at low density (75 000 cells/cm²). At 2 DIV, 50 µM ascorbic acid was added to increase peptidyl glycol α-amidating monooxygenase activity due to the ability of this cofactor to enhance TRH levels in primary cultures of hypothalamus by promoting the conversion of TRH-gly to TRH (Faivre-Bauman *et al.*, 1988). Ascorbic acid had no effect on cell viability at 4 DIV (not shown). Three independent experiments were performed, with each experimental group in quadruplicate. Addition of 50 ng/mL BDNF or NT-3 at seeding did not change either the amount of cellular protein [control, 150 ± 10; BDNF, 142 ± 16; NT-3, 131 ± 19; mean µg protein per dish ± SEM (*n* = 12)] or TRH, detected at 4 DIV [control, 34 ± 18; BDNF, 28 ± 12; NT-3, 35 ± 13; mean pg of TRH per dish ± SEM (*n* = 12)]. Variability of TRH values was high, at least in part because of the low sensitivity of the RIA; however, there was no trend suggesting an effect of BDNF on TRH cell content.

BDNF effects on TRH mRNA levels were detected at relatively low cell densities (75 × 10³ cells/cm²) but not at a high one (300 × 10³ cells/cm²; not shown). TRH mRNA levels increased with enhanced cell density (Fig. 3, left panel) and addition of conditioned medium from hypothalamic cultures partially reproduced this effect (Fig. 3, right panel), suggesting that an endogenous diffusible long-range factor can up-regulate TRH mRNA levels. Because BDNF is expressed by fetal hypothalamic neurons *in vitro* (Loudes *et al.*, 1999), we subsequently addressed the role of endogenous BDNF. Results in Fig. 4 (left panel) show that TRH mRNA levels are reduced by the addition, at seeding, of 0.1 µM K-252a, a specific Trk inhibitor; a slightly lower effect (45% inhibition) was obtained if K-252a was added at 2 DIV (not shown). When high density (6 × 10⁵ cells per plate) cultures were incubated with an antibody against BDNF, at a concentration (2 µg/mL) which partially inhibited the effect of exogenous BDNF (not shown), basal TRH mRNA levels decreased. No change was observed if an irrelevant antibody was used at the same concentration (Fig. 4, right panel), nor were levels of G3PDH mRNA per µg total RNA modified (not shown). A lower dose of BDNF antibody (0.2 µg/mL), that blocks BDNF effects on the TH phenotype (Loudes *et al.*, 1999), had no effect on TRH mRNA levels, possibly due to high levels of secreted BDNF in the culture medium. Because the antibody is specific for BDNF, these results demonstrate that endogenous BDNF substantially contributes to the establishment of TRH mRNA levels in primary cultures.

BDNF enhances TRH mRNA levels in the TrkB⁺ cells

TRH mRNA up-regulation by BDNF could be due to higher expression per cell and/or, to increased TRH cell number. Neurotrophic factors effects on cell number were therefore investigated. In control cultures, percentage of viable cells diminished with time in culture. Compared with values at 1 DIV, the percentage of viable cells at 4 DIV decreased linearly with lower cell densities [75 ± 15% at 600 × 10³, 52 ± 4.7 at 300 × 10³, 49 ± 9.2 at 150 × 10³, 34 ± 9.1 at 75 × 10³ and 29 ± 7.6% at 37.5 × 10³ cells per dish; mean ± SEM (*n* = 6–9)]. Various neurotrophic factors (basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, nerve growth factor and BDNF, 50 ng/mL), added to low density cultures (75 × 10³ cells/cm²) at the time of seeding, slightly increased the percentage of viable hypothalamic cells at 4 DIV. NT-3 had no effect (Table 1). Effects of neurotrophic factors were very similar at 100 ng/mL (not shown). At a higher density (150 × 10³ cells/cm²), most effects were lost (not shown), suggesting that endogenous factors (mimicking exogenous trophic factor actions) regulate *in vitro* cell number.

TRH cell number was determined by ISH. Slides were coated with laminin to facilitate the attachment of cells onto glass slides. At this relatively low density, laminin coating reduced cell loss and increased both the number of cells with neurites and the size of neurites (not shown). In this experimental condition there was no significant effect of BDNF on total cell number (Table 2) but laminin coating did not modify the effect of BDNF on TRH mRNA levels [control, 100 ± 40%; BDNF treated group for 4 DIV, 265 ± 25% (*n* = 3)]. At 4 DIV, a small percentage of cells (2%) expressed TRH mRNA (Table 2 and Fig. 5A) and 27% of the hypothalamic cells contained TrkB mRNA (Fig. 5C and Table 2). TRH and TrkB⁺ cell numbers per dish were not changed by BDNF treatment (Table 2). The TRH expressing cells were classified into three categories: cells expressing low levels of TRH mRNA (8–11 grains, category A), cells expressing medium levels (12–20 grains; category B) and cells expressing high levels (more than 20 grains; category C). In control conditions, 31% of cells were in category A, 48% in B and 21% in C; in BDNF treated cultures, 27% of cells were in category A, 37% in B and 36% in C (not shown). No signal was observed when the sense cRNAs were used as probes (Fig. 5B and D).

Double ISH was performed to determine whether TRH neurons express TrkB mRNA. Only 48% of TRH neurons contained the TrkB mRNA; this number was not increased by BDNF treatment (Fig. 5E and F and Table 2). In order to determine in which TRH neurons BDNF increased TRH mRNA, semiquantitative double ISH was performed on untreated and BDNF treated cultures. TrkB⁺ cells expressed low levels of TRH mRNA in basal conditions (cells in category C were not detectable) and this frequency distribution was not altered with BDNF treatment. On the contrary, TrkB⁺ cells expressed high levels of TRH mRNA (many cells corresponded to category C); in cells treated with BDNF, the frequency distribution was shifted, with 66% of cells in category C (Fig. 6). These results show that BDNF increased TRH mRNA levels only in TrkB positive neurons.

Discussion

Various studies have demonstrated that neurotrophins enhance peptide expression early during pre- and postnatal development. BDNF, for example, increases neuropeptide Y and somatostatin peptide as well as mRNA levels in primary cultures of fetal cerebral

hemisphere cells (Nawa *et al.*, 1993) and, somatostatin biosynthesis in fetal hypothalamic cells (Rage *et al.*, 1999; Loudes *et al.*, 2000). Infusion of BDNF in newborn rat brain increases neuropeptide Y, substance P and somatostatin peptide and mRNA levels in various brain regions (Nawa *et al.*, 1994). Expression of neuropeptide Y is reduced in BDNF knock-out mice, supporting a role for BDNF in peptide expression *in vivo* (Jones *et al.*, 1994).

The purpose of this study was to determine whether neurotrophins regulate TRH biosynthesis in fetal hypothalamic neurons and, if this was the case, whether all TRH neurons respond to the neurotrophin. The main conclusion is that exposure of fetal hypothalamic cells to BDNF enhances TRH mRNA levels while NT-3 is inactive. TRH neurons can be divided into TrkB⁺ and TrkB⁻ populations. The enhancement is not due to augmented neuronal survival but to an increased amount of TRH mRNA per TrkB⁺ cell. However, increased TRH mRNA levels do not lead to enhanced TRH cell content.

We showed previously that glial cells produce soluble factors which increase cellular levels of TRH *in vitro* (Charli *et al.*, 1995). We therefore investigated the effect of neurotrophins in a medium that should reduce glial proliferation but sustain hypothalamic neurons. We used a serum-free medium (Neurobasal-B27) in which fetal hypothalamic neurons express pro-TRH during initial DIVs (Niquet *et al.*, 2000) and TRH levels at 12 DIV do not differ from those in serum-supplemented media (Lezama, L., Pérez-Martínez, L., Joseph-Bravo, P. and Charli, J.-L., unpublished results). In agreement with studies in other central nervous system regions (Brewer *et al.*, 1993), we detected low levels of cells with glial morphology. Neuron-like cells grew neurites with a similar size to those observed in serum-supplemented media; however, the number and size of dendrites were not quantified. The percentage of neurons which were TRH neurons at 4 DIV was similar to that found in serum-supplemented cultures grown at high density (Pérez-Martínez, L., Charli, J.-L. and Joseph-Bravo, P., unpublished results). Therefore, with the conditions used, it appears that TRH neurons differentiate as described for hypothalamic TRH neurons grown *in vitro* in standard conditions (serum-supplemented), in spite of the relatively simplified environment.

TrkB and TrkC receptors were detected in cultures, in agreement with a recent report (Rage *et al.*, 1999). A substantial part of these receptors were full-length forms, potentially functional receptors. Their biological activity was not directly confirmed, although it is probable that the TrkB was biologically active in culture. Indirect evidence includes the reduction of basal TRH mRNA levels by treating cells with an inhibitor of the tyrosine kinase activity of the Trk receptors and the fact that BDNF increased TRH mRNA levels only in TrkB⁺ cells. On the other hand, prolonged neurotrophin treatment increased the level of full-length TrkB. In primary culture of embryonic neurons, chronic BDNF treatment either down-regulates (Frank *et al.*, 1996; Knusel *et al.*, 1997) or up-regulates (Ninkina *et al.*, 1996) TrkB levels. This variation may be related to a regional or developmental specificity.

We did not detect changes in TRH neuron number upon addition of BDNF. A recent publication showed that BDNF does not promote the survival of fetal hypothalamic somatostatin neurons maintained in primary culture but enhances somatostatin biosynthesis (Rage *et al.*, 1999). This agrees with reports showing that the survival of many embryonic central nervous system neurons is independent of neurotrophins (Silos-Santiago *et al.*, 1997). On the contrary, BDNF supports the survival of fetal dopaminergic neurons from the zona incerta (Berg-von der Emde *et al.*, 1995) and, of postnatal magnocellular vasopressin and oxytocin neurons (Kusano *et al.*, 1999), suggesting BDNF has different roles in specific hypothalamic

cell types. However, BDNF may exert an effect on TRH or somatostatin neuronal survival during other developmental intervals.

TRH mRNA was detected using RT-PCR because TRH mRNA amounts were very low due to the small number of plated cells. The method is not quantitative but can detect small variations in TRH mRNA levels with reasonable precision (Pérez-Martínez *et al.*, 1998). TRH mRNA levels were shown to be increased after BDNF addition. Independent ISH experiments confirmed this effect. For RT-PCR and ISH studies, cells were grown on different supports where cell survival differed, with lower values on the support used for RT-PCR. BDNF effect was however, observed in both conditions, so it may not be influenced by cell death.

BDNF acts through the activation of either TrkB or TrkC. The results suggest that BDNF action was mediated by TrkB receptors: NT-3, a ligand of TrkC receptors was inactive and TRH mRNA enhancement was detected only in TrkB⁺ neurons. Our results suggest a direct *in vitro* effect of BDNF on TRH neurons through the activation of the full-length TrkB receptor. Similarly, it was recently concluded that BDNF and NT-3 enhance somatostatin biosynthesis by a direct effect on hypothalamic somatostatin neurons *in vitro* (Rage *et al.*, 1999).

Maximal effect of BDNF on TRH mRNA levels is obtained with the longest period of exposure, suggesting a cumulative effect. Furthermore, treatment with BDNF from 0–1 DIV was sufficient to produce an effect at 4 DIV. These results may be explained, in part, by BDNF induction of full length TrkB in TRH neurons initially expressing low levels of TrkB. The existence of such an autocrine or paracrine loop should be confirmed with more precise tools but would be consistent with the autocrine actions of BDNF in various experimental systems (Davies & Wright, 1995).

TRH cell content was not enhanced by BDNF, in spite of its effect on TRH mRNA levels. We have recently shown that, while TRH mRNA levels per dish increase rapidly and steadily (five-fold) during the first week *in vitro* in primary cultures of fetal hypothalamic cells in serum-supplemented medium at high density, TRH cell content is stable and low (Pérez-Martínez *et al.*, 2001) and it is only during the second week that TRH levels increase substantially (Favre-Bauman *et al.*, 1980; Loudes *et al.*, 1983; Pérez-Martínez *et al.*, 2001). Therefore, a lag of several days separates an increase in TRH mRNA levels from that of TRH accumulation, even in optimized conditions for TRH expression. Cell content of peptide is the result of its biosynthesis and release. Increased TRH release may have compensated for the increased biosynthesis. During the first week *in vitro*, TRH neurons in primary culture have an immature secretory system. The ability to secrete TRH in response to a depolarization with high KCl is delayed and the spontaneous release of TRH in the culture medium is high compared to the cell content, either in serum-free or serum-supplemented cultures (Loudes *et al.*, 1983; Lewis *et al.*, 1987). BDNF may also have a direct impact on TRH secretion. Unfortunately, it was not possible to analyse the amount of TRH released in the medium because the low cell density precluded the detection of medium TRH. Alternatively, biosynthesis of peptides is a multistep process and BDNF may up-regulate TRH mRNA levels but not a translational or posttranslational step which limits TRH accumulation; this step may be influenced by other factors. Independent experiments in serum-free media demonstrated that culture of fetal hypothalamic cells on extracellular matrix proteins enhance pro-TRH but not TRH mRNA levels at 2 DIV; this was probably due to an effect on the rate of translation of TRH mRNA (Niquet *et al.*, 2000). We attribute these results to the sequential character of the establishment of peptide phenotype in neurons, where each step (transcription, translation, processing, packaging and

secretory activity) could be submitted to independent controls. In this context, we suggest that BDNF is necessary but not sufficient to enhance TRH phenotype in the TrkB⁺ hypothalamic cells.

TrkB is extensively distributed in adult hypothalamic nuclei (Merlio *et al.*, 1992), including TRH neurons of the paraventricular nucleus (Uribe, R.M., Ubieta, R., Joseph-Bravo, P. and Charli, J.-L. unpublished results). It was, therefore, anticipated that there would be extensive expression in TRH neurons. However, our results demonstrate that two similarly-sized populations of hypothalamic TRH neurons (TrkB⁺ and TrkB⁻) are detected *in vitro*. It is unlikely that we incorrectly classified low TrkB-expressing cells as TrkB⁻ cells as the number of TrkB⁺ cells was not changed by BDNF addition, a treatment which substantially enhanced the level of TrkB. We can also dismiss the possibility that TrkB⁻ cells detected *in vitro* are due to a modification of the cell phenotype during cell culture since TrkB mRNA levels did not change during the culture period. This confirms recently published results on somatostatin biosynthesis which suggested that hypothalamic neurons expressing a specific peptide require distinct neurotrophic factors to induce their biochemical differentiation (Loudes *et al.* 2000). However, a definitive conclusion awaits *in vivo* analysis. The nature of TRH cells bearing TrkB receptors in the fetal hypothalamus is unknown. Preliminary studies suggest that neurons of the paraventricular nucleus express the full-length form of TrkB mRNA at postnatal day 1 (Gonzalez, J.A., Joseph-Bravo, P., Charli, J.-L. and Uribe, R.M., unpublished results), making fetal neurons of the paraventricular nucleus a potential target of BDNF.

The mature form of BDNF is present in primary cultures of hypothalamic cells (Loudes *et al.*, 1999). Since anti-BDNF reduces TRH mRNA levels and there is no evidence that BDNF is a survival factor for TRH neurons, it is tempting to speculate that the TrkB⁺ population of TRH neurons is substantially dependent on BDNF for *in vitro* TRH mRNA expression. Consistent with this hypothesis, TrkB⁺ neurons expressed higher levels of TRH mRNA in control cultures than TrkB⁻, presumably because of the effect of endogenous BDNF. Loudes *et al.* (1999) showed that incubation with anti-BDNF prevents morphological differentiation in primary culture of dopaminergic neurons from the periventricular nucleus of the hypothalamus. Various populations of hypothalamic neurons thus seem dependent on BDNF for an effective postmitotic differentiation *in vitro*; this is consistent with the differentiation properties of the neurotrophins which include specific effects on the early development of peptide phenotype in central nervous system neurons. The presence of neurotrophin-4 in fetal hypothalamus has not been reported; however, we cannot exclude a role for neurotrophin-4 in the control of fetal TRH mRNA levels since low levels of neurotrophin-4 mRNA are present in adult hypothalamus (Timmusk *et al.*, 1993).

Expression of BDNF may therefore contribute to the early enhancement of hypothalamic TRH mRNA levels observed *in vivo*. Adult mice with only one functional BDNF allele have normal thyroid hormone levels (Kernie *et al.* 2000); however, specific information on the impact of BDNF (or TrkB) reduction on fetal or neonatal hypothalamic TRH neurons development *in vivo* is lacking. Therefore, the relevance of our results to the *in vivo* situation will have to be assessed directly in the mutant mice.

In conclusion, we have shown that fetal hypothalamic TRH neurons are probably heterogeneous in regard to the local influences enhancing peptide mRNA, some being dependent on BDNF, while others are independent of both BDNF and NT-3. BDNF enhances TRH mRNA levels in a population of fetal hypothalamic TRH neurons in primary culture expressing TrkB. This population may depend strongly on BDNF for TRH mRNA expression. However,

BDNF action may be necessary but insufficient to establish the TRH phenotype in these neurons.

Acknowledgements

The authors thank F. Romero, E. Sánchez and M. Villa for technical assistance, P. Gaytán for oligonucleotide synthesis and E. Mata and S. González for providing the animals used in this study. This work was supported in part by CONACYT (México-Cuba and 25386-N) and DGAPA-UNAM (IN216496 and IN223599).

Abbreviations

BDNF, brain-derived neurotrophic factor; DIV, day *in vitro*; G3PDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; ISH, *in situ* hybridization; K-252a (8R, 9S, 11S)-(-)-9-hydroxy-9-methoxycarbonyl-8-methyl-2,3,9,10-tetrahydro-8,11-epoxy-1H,8H,11H-2,7b,11a-triazadibenzo[a,g] cycloocta [cde] trinden-1-one; NT-3, neurotrophin 3; PBS, phosphate buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcription; SEM, standard error of the mean; SSC, 0.3 M NaCl, 0.03 M Na citrate; TBS-T, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20; TRH, thyrotropin releasing hormone; Trk, tyrosine kinase.

References

- Barnea, A., Cho, G., Lu, G. & Mathis, M. (1995) Brain-derived neurotrophic factor induces functional expression and phenotypic differentiation of cultured fetal neuropeptide Y-producing neurons. *J. Neurosci. Res.*, **42**, 638–647.
- Berg-von der Emde, K., Dees, W.L., Hiney, J.K., Hill, D.F., Dissen, G.A., Costa, M.A., Moholt-Siebert, M. & Ojeda, S.R. (1995) Neurotrophins and the neuroendocrine brain: different neurotrophins sustain anatomically and functionally segregated subsets of hypothalamic dopaminergic neurons. *J. Neurosci.*, **15**, 4223–4237.
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K. & Price, P.J. (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasalTM, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.*, **35**, 576–576.
- Burgunder, J.M. & Taylor, T. (1989) Ontogeny of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the rat diencephalon. *Neuroendocrinology*, **49**, 631–640.
- Carnahan, J. & Nawa, H. (1995) Regulation of neuropeptide expression in the brain by neurotrophins. Potential role *in vivo*. *Mol. Neurobiol.*, **10**, 135–149.
- Charli, J.L., Cruz, C., Redondo, J.L., Guerra, C. & Joseph-Bravo, P. (1995) Homologous conditioned medium enhances expression of TRH in hypothalamic neurons in primary culture. *Dev. Brain Res.*, **89**, 155–160.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159.
- Covarrubias, L., Uribe, R.M., Méndez, M., Charli, J.L. & Joseph-Bravo, P. (1988) Neuronal TRH synthesis: Developmental and circadian TRH mRNA levels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **151**, 615–622.
- Davies, A.M. & Wright, E.M. (1995) Neurotrophin autocrine loops. *Current Biol.*, **5**, 723–726.
- Escandón, E., Soppet, D., Rosenthal, A., Mendoza-Ramírez, J.L., Szönyi, E., Burton, L.E., Henderson, C.E., Parada, L. & Nikolics, K. (1994) Regulation of neurotrophin receptor expression during embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.*, **14**, 2054–2068.
- Faivre-Bauman, A., Loudes, C., Barret, A., Patte, C. & Tixier-Vidal, A. (1988) Ontogenesis of peptidylglycyl alpha-amidation activity in the mouse hypothalamus *in vivo* and in serum-free medium cultures. Relation with thyroliberin (TRH) accumulation and release *in vitro*. *Brain Res.*, **468**, 261–267.
- Faivre-Bauman, A., Nemeskeri, A., Tougard, C. & Tixier-Vidal, A. (1980) Immunological evidence for thyroliberin (TRH) neurons in primary cultures of fetal mouse brain cells. Ontogenic aspects. *Brain Res.*, **185**, 289–304.
- Frank, L., Lindsay, R.M., Ventimiglia, R. & Rudge, J.S. (1996) BDNF-mediated down-regulation of TrkB receptor protein and mRNA in cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 1220–1230.
- González, D., Dees, W.L., Hiney, J.K., Ojeda, S.R. & Saneto, R.P. (1990)

- Expression of beta-nerve growth factor in cultured cells derived from the hypothalamus and cerebral cortex. *Brain Res.*, **19**, 249–258.
- Guerra-Crespo, M., Joseph-Bravo, P., Charli, J.L. & Pérez-Martínez, L. (1999) BDNF increases TRH mRNA in hypothalamic TrkB⁺ neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **25**, 1017.
- Hassink, G.C., Van-Esseveldt, K.E., Dijkhuizen, P.A., Verhaagen, J. & Boer, G.J. (1999) Ontogeny of neurotrophin receptor TrkC expression in the rat forebrain and anterior hypothalamus with emphasis on the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, **92**, 705–712.
- Jones, K.R., Farinas, I., Backus, C. & Reichardt, L.F. (1994) Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*, **76**, 989–999.
- Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., Palacios, J.M. & Kordon, C. (1979) Effect of neurotransmitters on the *in vitro* release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*, **104**, 801–806.
- Kato-Semba, R., Takeuchi, I.K., Semba, R. & Kato, K. (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J. Neurochem.*, **69**, 34–42.
- Kernie, S.G., Liebl, D.J. & Parada, L.F. (2000) BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J.*, **19**, 1290–1300.
- Klein, R., Parada, L.F., Coulier, F. & Barbacid, M. (1989) TrkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.*, **8**, 3701–3709.
- Knusel, B., Gao, H., Okazaki, T., Yoshida, T., Mori, N., Hefti, F. & Kaplan, D.R. (1997) Ligand-induced down-regulation of Trk messenger RNA, protein and tyrosine phosphorylation in rat cortical neurons. *Neuroscience*, **78**, 851–862.
- Korsching, S., Auburger, G., Heumann, R., Scott, J. & Thoenen, H. (1985) Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *EMBO J.*, **4**, 1389–1393.
- Kusano, K., House, S.B. & Gainer, H. (1999) Effects of osmotic pressure and brain-derived neurotrophic factor on the survival of postnatal hypothalamic oxytocinergic and vasopressinergic neurons in dissociated cell culture. *J. Neuroendocrinol.*, **11**, 145–152.
- Lewis, M.D., Foord, S.M. & Scanlon, M.F. (1987) The role of calcium and calmodulin in mediating release of thyrotropin-releasing hormone by cultured hypothalamic cells. *J. Endocrinol.*, **115**, 255–262.
- Loudes, C., Faivre-Bauman, A., Barret, A., Grouselle, D., Puymirat, J. & Tixier-Vidal, A. (1983) Release of immunoreactive TRH in serum-free cultures of mouse hypothalamic cells. *Dev. Brain Res.*, **9**, 231–234.
- Loudes, C., Petit, F., Kordon, C. & Faivre-Bauman, A. (1999) Distinct populations of hypothalamic dopaminergic neurons exhibit differential responses to brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3). *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 617–624.
- Loudes, C., Petit, F., Kordon, C. & Faivre-Bauman, A. (2000) Brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 enhances differentiation of somatostatin neurons in hypothalamic cultures. *Neuroendocrinology*, **72**, 144–153.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Merlio, J.P., Ernforms, P., Jaber, M. & Persson, H. (1992) Molecular cloning of rat TrkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience*, **51**, 513–532.
- Nawa, H., Bessho, Y., Carnahan, J., Nakanishi, S. & Mizuno, K. (1993) Regulation of neuropeptide expression in cultured cerebral cortical neurons by brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurochem.*, **60**, 772–775.
- Nawa, H., Pellemounter, M.A. & Carnahan, J. (1994) Intraventricular administration of BDNF increases neuropeptide expression in newborn rat brain. *J. Neurosci.*, **15**, 4223–4237.
- Ninkina, N., Adu, J., Fisher, A., Pinon, L.G., Buchman, V.L. & Davies, A.M. (1996) Expression and function of TrkB variants in developing sensory neurons. *EMBO J.*, **15**, 6385–6393.
- Niquet, J., Pérez-Martínez, L., Guerra, M., Grouselle, D., Joseph-Bravo, P. & Charli, J.L. (2000) Extracellular matrix proteins increase the early expression of pro-TRH and pro-protein convertase PC1 in fetal hypothalamic neurons *in vitro*. *Dev. Brain Res.*, **120**, 49–56.
- Ohira, K., Shimizu, K. & Hayashi, M. (1999) Change of expression of full-length and truncated TrkB in the developing monkey central nervous system. *Dev. Brain Res.*, **112**, 21–29.
- Pérez-Martínez, L., Carreón-Rodríguez, A., González-Alzati, M.E., Morales, C., Charli, J.L. & Joseph-Bravo, P. (1998) Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cultures: interactions with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology*, **68**, 345–354.
- Pérez-Martínez, L., Charli, J.L. & Joseph-Bravo, P. (2001) Development of pro-TRH gene expression in primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Dev. Brain Res.*, in press.
- Rage, F., Riteau, B., Alonso, G. & Tapia-Arancibia, L. (1999) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 enhance somatostatin gene expression through a likely direct effect on hypothalamic somatostatin neurons. *Endocrinology*, **140**, 909–916.
- Sánchez, E., Charli, J.L., Morales, C., Corkidi, G., Seidah, N., Joseph-Bravo, P. & Uribe, R.M. (1997) Expression of the proprotein convertases PC1 and PC2 mRNAs in TRH neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus. *Brain Res.*, **761**, 77–86.
- Silos-Santiago, I., Fagan, A.M., Garber, M., Fritsch, B. & Barbacid, M. (1997) Severe sensory deficits but normal CNS development in newborn mice lacking TrkB and TrkC tyrosine protein kinase receptors. *Eur. J. Neurosci.*, **9**, 2045–2056.
- Smith, M.A., Makino, S., Kim, S.Y. & Kvetnansky, R. (1995) Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, **136**, 3743–3750.
- Timmusk, T., Belluardo, N., Metsis, M. & Persson, H. (1993) Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. *Eur. J. Neurosci.*, **5**, 605–613.
- Wirth, M.J., Obst, K. & Wahle, P. (1998) NT-4/5 and LIF, but not NT-3 and BDNF, promote NPY mRNA expression in cortical neurons in the absence of spontaneous bioelectrical activity. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 1457–1464.
- Zaheer, A., Zhong, W. & Lim, R. (1995) Expression of mRNAs of multiple growth factors and receptors by neuronal cell lines: detection with RT-PCR. *Neurochem. Res.*, **20**, 1457–1463.

Capítulo 3

Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons

Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons

Magdalena Guerra-Crespo^a, Jean-Louis Charli^a, Víctor Hugo Rosales-García^b,
Gustavo Pedraza-Alva^{a,1}, Leonor Pérez-Martínez^{a,*}

^a Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Cuernavaca, Mor. 62210, Mexico

^b Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, D.F., 07300, Mexico

Received 5 November 2002; received in revised form 10 March 2003; accepted 29 April 2003

Abstract

Analysis of gene regulatory sequences in primary cultures of neurons has been hampered by inefficient transfection of post-mitotic neurons with reporter plasmids. We describe detailed conditions that allowed a significant improvement of transfection efficiency in primary cultures of serum-supplemented rat fetal hypothalamic cells. Transfected cells expressed the green fluorescent protein (GFP) under the control of the strong but non-cell-specific cytomegalo virus (CMV) promoter or under the thyrotropin-releasing hormone (TRH) promoter, to direct expression only in TRH neurons. Using the CMV promoter-GFP plasmid, we tested several commercially available transfection reagents; the best results were obtained with polyethylenimine (PEI) and Lipofectamine 2000. We optimized the transfection procedure with PEI because it rendered more reproducible results. Transfection with PEI was optimal when cells were transfected at a cellular density of 2.9×10^6 cells in 35-mm dishes, with 10 μ g of DNA, a PEI/DNA ratio of 8.8 and PEI pH of 6.9. Using these conditions, we were able to detect GFP positive neurons after transfecting the TRH promoter-GFP plasmid. GFP positive cells were successfully purified by FACS. This opens the possibility to use transfection of mammalian CNS post-mitotic neurons for new applications including the purification of specific neuronal subtypes.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: TRH; Hypothalamus; Primary culture; Transfection; Polyethylenimine; Lipofectamine 2000; FACS

1. Introduction

Among the various cell culture methods of central nervous system tissue, the dissociated cell culture technique allows the analysis of the morphological differentiation of neurons and glial cells. These morphological events can be correlated with functional studies including the measurement of cell-type specific gene expression, in cell cultures infected with viruses or transfected with plasmids that express reporter activities. Multiple techniques have been tested for the transfer of foreign DNA into mammalian primary

cultures of central nervous system (CNS) post-mitotic neurons.

Viral infections provide the highest efficiencies, but are more difficult to perform routinely, compared to plasmid transfections; furthermore, to reach expression of reporter genes in specific post-mitotic populations is relatively complex (Simonato et al., 2000; Glover et al., 2002). Plasmid-mediated transfection of postmitotic neurons grown in vitro is less efficient: 0.1–7% with the calcium phosphate–DNA co-precipitation method (Meichsner et al., 1993; Xia et al., 1996; Tabuchi et al., 1998; Watanabe et al., 1999); 2% with electroporation (Li et al., 1997); 1–2% with particle bombardment-mediated gene transfer (Jiao et al., 1993).

More reproducible results are obtained with other methods of plasmid transfection in post-mitotic neurons, in particular with cationic lipid reagents. Among liposomal reagents, a monocationic lipid, *N*-[1-(2,3-

* Corresponding author. Tel.: +52-7-773-170-805; fax: +52-5-556-227-622.

E-mail address: leonor@ibt.unam.mx (L. Pérez-Martínez).

¹ Present address: Department of Medicine, Given Medical Building, University of Vermont, Burlington, VT 05405, USA.

dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methyl-sulfate (DOTAP), has an efficiency of 0.5–3% (Kaech et al., 1996); Lipofectin is a very poor transfectant (0.02–0.5%) (Liu and Storm, 1991; Yang et al., 1994; Li et al., 1997). Poly-cationic lipids are generally more efficient. A double transfection with Tfx-50 allows a 3–4% transfection efficiency (Hurley et al., 2001). Transfectam yields 1–5% efficiency (Cole et al., 1995); transfection with dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamyl spermine (DPPEs) gives higher values (14–32%) (Sola et al., 1997). Recently, it was shown that while Lipofectamine and Lipofectamine Plus transfection efficiencies are <3%, Lipofectamine 2000 produces higher values (25–27%) in rat E18 cortical or hippocampal cultures (Ohki et al., 2001). Among other reagents, an efficiency of 2.4% is obtained with Eugene 6 (Wiesenhofer and Humpel, 2000). A cationic polymer, polyethylenimine (PEI), allows transfection of adult retinal cells including neurons but transfection efficiency was not quantified (Horbinski et al., 2001); this polymer is non-toxic at effective concentrations and does not modify electrophysiological properties of primary neurons (Lambert et al., 1996). In conclusion, except for DPPEs and Lipofectamine 2000, the maximum efficiency reported for transfection of plasmids is low. Furthermore, most studies have expressed reporter proteins under the control of constitutive, strong promoters (viral in general) and cell-specific, weaker promoters have not been extensively investigated. Finally, compatibility of the method with FACS analysis or purification of CNS cells has seldom been reported.

Primary cultures of fetal hypothalamic cells are a fruitful model to elucidate the molecular mechanisms that regulate thyrotropin releasing hormone (TRH) biosynthesis. In serum-supplemented media, fetal rodent hypothalamic cells can be grown *in vitro* for weeks; cultures develop a basal carpet of glial and ependymal cells overlaid by neuron-like cells which establish fully differentiated synapses around 10 days *in vitro* (DIV) (Benda et al., 1975). After 1 week, growing neurons exhibit marked signs of advanced differentiation and secretory activity (Tixier-Vidal et al., 1978). Cells display action potentials and spontaneous electrical activity (Legendre et al., 1988). Cells rapidly accumulate TRH mRNA (Pérez-Martínez et al., 2001) and TRH mRNA levels are regulated by multiple influences (Pérez-Martínez et al., 1998).

The purpose of this study was to compare the efficiency of various methods of plasmid transfection in primary cultures of rat fetal hypothalamic cells. Two plasmids were used, one which encodes the green fluorescent protein (GFP) in any cell type and one designed to express GFP in the TRHergic sub-population of neurons. Since transfection of adherent cells with PEI gave one of the best efficiency and reproducibility, we optimized transfection conditions with this agent.

2. Methods

2.1. Cell cultures

Hypothalamic tissue was dissected and dissociated from Wistar rats' embryos at 17th day of gestation as previously described (Pérez-Martínez et al., 2001; Joseph-Bravo et al., 2002). Briefly, pregnant females were anesthetized with pentobarbital, the embryos were removed one by one, the brains were taken out and the hypothalami excised under a stereoscopic microscope and placed in Hank's solution. Hypothalami were dispersed enzymatically with trypsin and DNase and then mechanically by passages through a Pasteur pipette in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 0.25% glucose, 2 mM glutamine, 3.3 mg/ml insulin, 1% vitamin solution and 1% antibiotics-antimycotic (S-DMEM). The cell suspension was centrifuged and the pellet resuspended in S-DMEM. Cell culture dishes and Lab-Tek slides were pre-coated with poly-D-lysine. Two well Lab-Tek culture chamber slides were additionally coated with laminin (10 µg/ml in phosphate-buffered saline; PBS; mM: KCl: 2.68; KH₂PO₄: 1.44; NaCl: 138.89; Na₂HPO₄: 8.06). Except where indicated, 2.9×10^6 cells were plated on 35-mm dishes in a final volume of 2 ml of S-DMEM. For *in situ* hybridization histochemistry (ISH), 1.4×10^6 cells were plated on Lab-Tek culture chamber slides. Cultures were maintained in a REVO incubator at 37 °C in humidified air/7% CO₂. A few experiments were performed in serum-free medium (Neurobasal-B27) according to Guerra-Crespo et al. (2001). NIH 3T3 cells were grown in 2 ml S-DMEM in 35 mm dishes in a humidified incubator set at 37 °C and 5% CO₂.

2.2. Plasmids

We constructed an expression vector (pQBI 25-TRH) that encodes the red shifted green fluorescent protein (GFP; *Aequoria victoria*) under the control of the rat TRH promoter (–776/+84). This region contains sufficient elements to target *in vivo* expression of the rat TRH gene according to the known tissue-regional patterns (Balkan et al., 1998). The TRH promoter (–776/+84) was removed with EcoRI and BamHI restriction enzymes from the plasmid pNASS-rTRH-Luc (a gift of Dr Balkan) and filled in with Klenow (Boehringer Mannheim, Germany). This fragment was subsequently blunt-end cloned into the BglII and SacII sites in the pQBI 25 vector (Quantum, Quebec, Canada) after removing, with the same enzymes, the cytomegalovirus (CMV) promoter located upstream of the GFP protein in the pQBI 25 vector. A promoter-less luciferase plasmid (pNASS-Luc) was also kindly donated by Dr Balkan. pcDNA3-CMV-Luc was a gift from Dr García

Carrancá. Plasmid DNA was purified by maxiprep column chromatography (Qiagen, EUA), suspended in H₂O and stored at –20 °C.

2.3. Transfection protocols

Hypothalamic cells were generally transfected at DIV 1 (24 h after seeding) in 35 mm dishes. NIH 3T3 cells at 60–70% confluence. Results were analyzed 48 h after transfection unless stated otherwise.

(a) For transfection of adherent cells, medium was removed carefully, cells were rinsed with 1 ml of serum-free S-DMEM (sf-DMEM) and 1 ml transfection mixture added. In each case, various doses of DNA and/or DNA/transfection reagent ratios were tested.

Transfection using PEI was performed essentially as described (Boussif et al., 1995). In general, 8 mg of branched PEI (600–1000 kDa; Fluka) solution (50% in water) was diluted in 10 ml of water, pH adjusted to 6.9 with 0.2 N HCl and solution filtered (Millipore, 0.22 µm). Transfection efficiency was reproducible if care was taken to use freshly prepared PEI. On the contrary, if PEI aliquots were kept at room temperature (RT) for more than 1 week, cell death was observed as soon as 30 min after contact with PEI (not shown). PEI (30 µl) and plasmid DNA (10 µg) were separately diluted to adjust NaCl to 150 mM in a final volume of 50 µl, vortexed and incubated for 10 min at RT; subsequently, the polymer solution was added to the DNA, vortex-mixed, incubated for 10 min at RT followed by the addition of 900 µl of sf-DMEM. This transfection solution (1 ml) was added to the primary culture and maintained up to 2 h.

For some samples, a glycerol shock was performed just after transfection: transfection mixture was removed, cells washed once with 1 ml sf-DMEM, 1 ml 15% glycerol in sf-DMEM (warmed to 37 °C) was then added and maintained for 3 min before a final wash with S-DMEM. Other samples were transfected in the presence of 100 µM chloroquine added either in 1 ml of sf-DMEM 1 h prior to transfection, in the transfection solution or for 1 h in 1 ml sf-DMEM after removal of transfection solution. To test the effect of the synthetic decapeptide, NH₂-pro-lys-lys-lys-arg-lys-val-glu-asp-pro-tyr-cys (Research Genetics, Huntsville, AL), derived from SV40 large T antigen nuclear localization signal (NLS) (Goldfarb et al., 1986), it was mixed in H₂O with the plasmid DNA and incubated at RT for 30 min, ionic strength adjusted and the rest of the protocol followed as described above. The following molar excesses of peptide were tested: 5, 10, 20, 50, 100, 165, 300, 400, 600, 800, 1000, 1500. To assess the electrostatic union between DNA and peptide, aliquots of the complex were taken before mixing with PEI and analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel in Tris-borate-EDTA buffer.

Transfections with Fugene 6 (Roche), Transfectam (Promega), Lipofectamine and Lipofectamine 2000 (Gibco BRL) were performed according to the manufacturers' recommendations, except that for Lipofectamine 2000, we limited the transfection time to 5 h, since viability decreased substantially otherwise. Lipids were added to DNA, vortex-mixed, incubated at RT and added to the cells in 1 ml sf-DMEM. The amounts of pQBI 25 and lipids tested are presented in Table 1.

Transfection with diethyl-aminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran) was performed as described (Rupprecht and Coleman, 1991). DEAE-Dextran (Sigma, St. Louis, MO) was added at a final concentration of 40 µg/ml to 1 ml of sf-DMEM containing 10 µg of plasmid DNA, vortexed and incubated at RT for 5 min prior to addition to cells. Transfection time was 1 h.

For each of these transfection protocols on adherent cells, transfection mixture was removed at an appropriate time-point, cells were washed with sf-DMEM and 2 ml S-DMEM added.

(b) For transfection of suspended cells, at DIV 1 cells were rinsed with PBS, treated with 500 µl 0.05% trypsin (porcine pancreatic; GIBCO-BRL) in PBS EDTA (0.53 mM) at 37 °C for 5 min. S-DMEM (1 ml) was added to stop the reaction, cells were recovered by centrifugation

Table 1
Amounts of pQBI 25 and lipids tested to transfect adherent cells

Lipid amount	DNA concentration (µg)
<i>Fugene 6</i>	
3 µl	1, 2, 3
6 µl	0.5, 1
9 µl	1
<i>Lipofectamine</i>	
18 µg	1, 3
24 µg	5
40 µg	10
50 µg	15
<i>Lipofectamine 2000</i>	
10 µg	10
20 µg	10
40 µg	10
50 µg	15
60 µg	10
<i>Transfectam</i>	
4 µM	1
8 µM	1, 2
16 µM	2
20 µM	5
40 µM	5

Hypothalamic cells (2×10^6) were plated on poly-D-lysine pre-coated 35-mm dishes in 2 ml of S-DMEM. Transfection with various lipids was performed at the first DIV according to the manufacturers' recommendations using the plasmid pQBI 25. At DIV 3, cells were harvested and transfection efficiency evaluated by fluorescence microscopy. Data shown in Fig. 1 are from those conditions giving the best efficiency for each transfectant.

at $450 \times g$ for 3 min at RT and resuspended at a density of 2 or 4×10^6 cells/ml in sf-DMEM (for protocols A, B or C, D respectively). (A) For transfection by electroporation, cells (1 ml) were transferred to a 1 ml 0.4 cm electrode gap electroporation cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and 10 μ g DNA added. Content was mixed softly and incubated for 5 min at RT previous to a current pulse of 950 μ F, 270 V in a Gene Pulser II (Bio-Rad). Cells were then incubated for 10 min at RT, plated and 1 ml of DMEM –20% FBS added. (B) For transfection with PEI, 30 μ l of the PEI/DNA (10 μ g) mixture, prepared as previously described, was added to 1 ml of cell suspension. Cells were incubated for 2 h at 37 °C before 1 ml DMEM supplemented with 20% of FBS was added. Cells were finally plated in 35 mm dishes. (C) For transfection by electroporation and with PEI, 5, 10 or 15 μ g plasmid DNA and PEI were initially incubated in 500 μ l sf-DMEM at RT for 5 min, added to 500 μ l of cell suspension, mixed gently, transferred to an electroporation cell and treated as described in (A). (D) For transfection by electroporation and with DEAE-Dextran, DEAE-Dextran was added at a final concentration of 40 μ g/ml to 500 μ l of sf-DMEM containing 10 μ g of plasmid DNA, tube vortexed and incubated at RT for 5 min. Transfection mix was then added to 500 μ l of cell suspension, mixed gently, transferred to an electroporation cell and treated as described in (A).

Cultures exposed to the transfection mix in absence of DNA were defined as mock transfected.

2.4. Cell morphology and cell viability

Cell morphology was analyzed by phase contrast microscopy. Except where indicated, cell viability was determined at DIV 3 (48 h post transfection) by exclusion of Trypan blue; for this purpose, cells were rinsed with PBS and incubated for 3 min at room temperature with Trypan blue (0.04%). The percentage of viable cells per dish was determined in ten randomly chosen areas observed at $40 \times$ magnification, the resulting value taken as one determination.

2.5. Fluorescence microscopy

GFP fluorescence was detected with a Nikon inverted epifluorescence microscope equipped with a UV source (12 V, 100 watts) and a filter for FITC (B-2E). Ten microscopic fields randomly chosen were examined (at $40 \times$) to estimate the number of fluorescent cells per dish. Except where indicated, efficiency of transfection was determined by dividing this number by the number of cells detected by phase contrast microscopy; the resulting value corresponded to one determination.

For neuron staining, cells were fixed for 30 min at room temperature with 4% paraformaldehyde/4% su-

crose (Litman et al., 1993). After two washes with PBS for 10 min each, cells were incubated for 2 h at room temperature with blocking buffer (DMEM 5% FBS, 0.1% glycine, 0.1% lysine and 0.2% Triton X-100) (Jaworski et al., 1999). Anti Neurofilament-M (145 kDa) antibody (Chemicon International Inc; Temecula, CA) diluted 1:200 in blocking buffer was added and incubated overnight at 4 °C. After three washes with PBS for 10 min each, cells were incubated for 1 h at room temperature with Alexa 568 goat anti-rabbit IgG conjugate (Molecular Probes, Eugene, OR) diluted 1:100 in blocking buffer without Triton X-100. Samples were then washed three times with PBS and fluorescence observed as described above using a filter for rhodamine (G-2E/C).

For 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) staining, 48 h after transfection, cells were washed two times with PBS and stained with 20 μ g/ml DAPI (Molecular Probes) in PBS for 10 min at 37 °C. After three washes with PBS for 2 min each, 2 ml S-DMEM were added and the fluorescence detected as described above and a filter for DAPI (UV-2E).

Digital images were acquired using a CCD camera (CoolSNAP) and photomicrographs were prepared using Adobe Photoshop.

2.6. FACS analyses

In some experiments, the efficiency of transfection, viability and morphology were determined by analytical FACS. After transfection (48 h), cells were rinsed with PBS and incubated with 1% trypsin in 500–1000 μ l PBS EDTA (0.53 mM) at 37 °C for 5 min; reaction was stopped by adding an equal volume of S-DMEM. Cells were recovered by centrifugation at $450 \times g$ for 3 min at RT, washed with PBS-0.1% FBS, recovered by centrifugation and resuspended in 500 μ l PBS-0.1% FBS. Flow cytometry was performed on either FACS Sort or FACS Vantage, both equipped with a beam argon ion laser with a power output of 15 or 300 mW, respectively; and an excitation wavelength of 488 nm (Becton Dickinson, San Jose, CA). All data acquisition and analyses were performed using Cell Quest software (Becton Dickinson). To estimate transfection efficiency, a FL1 histogram was generated (FL1, 530/30 nm short pass filter, detects green signal) and positive cells were defined as those cells in the region M1. The percentage of cells in M1 from the mock-transfected cells was subtracted from the percentage of plasmid-transfected cells in M1.

Cell viability was also determined in some experiments with propidium iodide (PI) (Sigma) as reported (Boldyrev et al., 1999). PI (10 μ g/ml) was added to cells treated as described above 2 min before FACS analysis. PI fluorescence was detected with the FL-2 emission channel (585/42 nm band pass filter). The percentage of

dead cells was determined as the percentage PI⁺ cells in a FL1 versus FL2 plot after subtracting the percentage of PI⁺ cells from mock-transfected cells.

In experiments with pQBI 25-TRH, GFP fluorescence was low, making counting of positive cells imprecise. Therefore, to distinguish between real signal and noise, some experiments were analyzed using FACS Vantage, which is more sensible than FACSsort, allowing us to detect cells with low levels of GFP expression.

2.7. FACS sorting and analysis of purified cells

For FACS sorting, 5×10^6 cells were seeded in 4 ml S-DMEM in 60 mm dishes; transfection efficiency was as for 35 mm dishes (not shown). Depending on the experimental purpose, one to ten dishes were used with similar sorting results (not shown). At DIV 3, cells were trypsinized as described above. A total of 10^7 cells/ml resuspended in PBS-0.1% FBS were sorted using the exclusion method and a high sorting speed (60 μ l per min) since single cell or recovery methods gave poorer recoveries or enrichments (not shown). This was true whether pQBI 25 or pQBI 25-TRH was transfected. Cells were purified using the settings described in Section 2.6 and analyzed by FACS, as described in Section 2.6.

In some experiments, purified cells were plated at low density in Lab-tek slides pre-coated with poly-D-lysine and laminin and maintained in S-DMEM for 8 h; viability was reassessed as described in Section 2.6 before seeding.

2.8. Luciferase determination

Luciferase activity was determined 48 h after transfection following the method of Zingg et al. (1991); light was integrated over 30 s on a Monolight 2010 luminometer (Analytical Luminescence Laboratory, San Diego, CA). Protein concentration was determined in the lysate by the Bradford assay (Biorad) (Bradford, 1976). Data were expressed as relative light units (RLU)/s \times μ g protein.

2.9. Single label ISH

At DIV 3 or 8 h after FACS sorting, cells (\approx 5000) maintained on Lab-Tek slides in S-DMEM were washed with PBS* (100 mM PO₄, 0.9% NaCl pH 7.4), frozen on dry ice and stored at -70 °C until use. Pro-TRH mRNA expressing cells were detected by ISH using a ³⁵S-labeled antisense mRNA probe as described (Guerra-Crespo et al., 2001). Following hybridization and washings, slides were coated with LM-1 autoradiographic emulsion (Amersham), air dried and exposed for 30 days at 4 °C. Silver grains were developed (3 min in Kodak D19 developer) and slides counter-stained with

Nissl (Sigma). Cells labeled with the antisense probe were taken as positive when the number of grains was at least 2-fold higher than for cells hybridized with the sense probe. The percentage of positive cells was calculated by analyzing over 500 cells per dish, taken from ten areas randomly chosen from each slide; the resulting value was considered as one observation.

2.10. Data presentation

In general, data (mean \pm S.E.M.) correspond to at least two independent experiments, each performed on one to three dishes.

3. Results

3.1. Comparison of various plasmid-mediated transfection protocols using pQBI 25

Efficiency of transfection was determined in 2×10^6 cells per 35 mm dish using various pQBI 25 amounts and several DNA/transfection reagent ratios. With adherent cells, no transfected cells were observed with DEAE-Dextran (not shown). Maximum efficiency values for three different lipid formulations, Transfectam, Fugene 6 and Lipofectamine, ranged from 2.3 to 5.4% (Fig. 1). A higher transfection efficiency of adherent cells, 10.5% (Fig. 1) was obtained with PEI (PEI nitrogen/DNA phosphate molar ratio = 10; 10 μ g DNA; pH of PEI: 6.8). The maximum transfection efficiency was obtained with a batch of Lipofectamine 2000 (14.4%, Fig. 1). Low transfection efficiencies were obtained in suspended cells whether transfected with PEI (4.5%) or electroporated (3.5%; Fig. 1) or electroporated and treated with DEAE-Dextran (6.5%). Electroporation in the presence of PEI resulted in transfection levels similar to the levels obtained with adherent cells (10.3%; Fig. 1). Decreasing or increasing the amount of plasmid transfected (maintaining the PEI nitrogen/DNA phosphate molar ratio) either reduced or did not improve (respectively) the efficiency of transfection with PEI, either on adherent cells or combined with electroporation (Table 2).

Analysis of transfected cells by FACS confirmed that maximum efficiency was obtained using PEI or Lipofectamine 2000 for gene delivery on adherent cells compared to electroporation with PEI. However, values obtained with Lipofectamine 2000 had a large variance (Table 3) due to inter-batch variability (mean values for each batch: 17.2, 7.32 and 12.9%).

At DIV 3, 99% of cells were viable compared to an untransfected control, when transfection was performed with Lipofectamine, Fugene 6 or Transfectam (a similar pattern was observed with Lipofectamine 2000 but data were not quantified). Viability was slightly affected

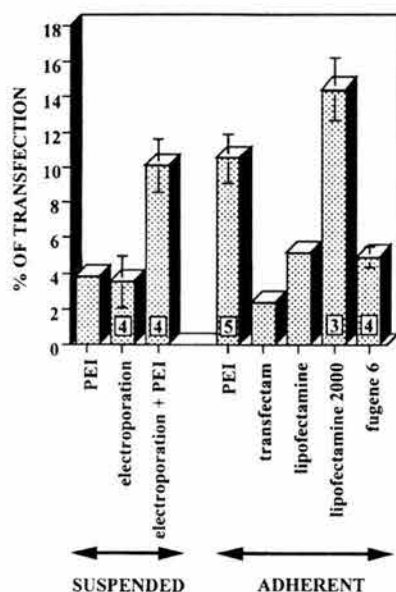


Fig. 1. Analysis by fluorescence microscopy of transfection efficiencies of pQBI 25 with various transfection reagents. Hypothalamic cells were plated at 2.0×10^6 cells per 35-mm dish and maintained for 1 DIV until transfection, as described in Section 2. Conditions for adherent cells are those giving the maximum efficiency: Lipofectamine: 24 and 5 μ g DNA; Fugene 6: 3 μ l and 1 μ g DNA; Transfectam: 16 μ M, 2 μ g DNA; PEI: PEI nitrogen/DNA phosphate molar ratio = 10, pH = 6.8, 10 μ g DNA; Lipofectamine 2000: 20 μ g and 10 μ g DNA. Conditions for suspended cells: see Section 2. At DIV 3, transfection efficiency was measured by fluorescence microscopy. Each value is the mean \pm S.E.M. (number of independent determinations inside columns).

(90%) in adherent cells transfected with PEI; the lowest cell viability (83%) was observed when PEI was added during electroporation.

Transfection with PEI altered the morphology of cells (cell surface appeared rough) within the first 24 h, but morphology recovered to a normal pattern afterwards; at DIV 3, i.e. 48 h post-transfection, cells with long

Table 2
Effect of pQBI 25 amount on PEI-mediated gene transfer efficiency as determined by fluorescence microscopy

DNA amount (μ g)	Transfection efficiency (%)	
	Adherent cells	Electroporated cells
5	5.17	5.27
10	10.5 \pm 1.4 (5)	10.1 \pm 1.5 (4)
15	10.7 (2)	10.4 \pm 1.3 (3)

Hypothalamic cells (2×10^6) were plated on poly-D-lysine pre-coated 35-mm dishes in 2 ml of S-DMEM. Transfection was performed at the first DIV (PEI nitrogen/DNA phosphate molar ratio = 10; PEI pH: 6.8) using the plasmid pQBI 25. At DIV 3 transfection efficiency was measured by microscopy. Each value is the mean \pm S.E.M. (number of independent determinations in parentheses).

Table 3
Effect of various methods on pQBI 25 transfection efficiency as determined by FACS

Transfection method	Transfection efficiency (%)
Lipofectamine 2000	11.7 \pm 3.8 (9)
Electroporation with PEI	8.3 (2)
PEI (on adherent cells)	14.3 \pm 0.5 (4)

2×10^6 hypothalamic cells were plated on poly-D-lysine pre-coated 35-mm dishes in 2 ml of S-DMEM. Transfection was performed at the first DIV. PEI nitrogen/DNA phosphate molar ratio was 10, PEI pH: 6.8. For Lipofectamine 2000, transfection was with 20 μ g reagent and 10 μ g plasmid. At DIV 3, transfection efficiency was measured by FACS. Each value is the mean \pm S.E.M. (number of independent determinations in parenthesis).

neurites (similar to those seen in control dishes) were observed (Fig. 2A,C,E). In contrast with Lipofectamine, cell morphology was permanently altered, cells looking deteriorated as previously described (Watanabe et al., 1999). A normal morphology was observed with Transfectam, electroporation, Lipofectamine 2000, Fugene 6 and DEAE-Dextran (not shown). Granularity of cells was not modified by PEI (with or without electroporation) or Lipofectamine 2000, but was increased by Lipofectamine (not shown). With most methods, fluorescent cells had both a glial and neuronal morphology (in transfection with PEI, at least 50% of cells were neurofilament-M positive—not shown), fluorescence was detected in both soma and extensions (not shown except for PEI on adherent cells: Fig. 2B, D, F). This was not determined with Lipofectamine since cell morphology was altered.

3.2. Optimization of transfection with PEI using pQBI 25

The highest transfection efficiency was obtained with one of the three batches of Lipofectamine 2000; however, since this result was not reproducible between batches, we continued the optimization of PEI-mediated gene transfer. Transfection with PEI was initially performed using conditions previously optimized for transfecting 3T3 and HepG2 cell lines (Boussif et al., 1995). Since transfection efficiency with cationic polymers may vary depending on cell type and culture conditions, additional protocols were tested to improve the initial results.

A glycerol shock after the transfection, to increase endosomal release of DNA, reduced the efficiency to 7.7% ($n = 2$), probably because of decreased viability (not shown).

Transfection efficiency was higher when performed at DIV 1 (12.3%) than at DIV 5 (9.8%), although it was also significant during the third week in vitro (not shown). If transfection was performed at DIV 1, GFP expression was still detectable at least up to DIV 7, but the percentage of fluorescent cells (24 h: 10%; 48 h:

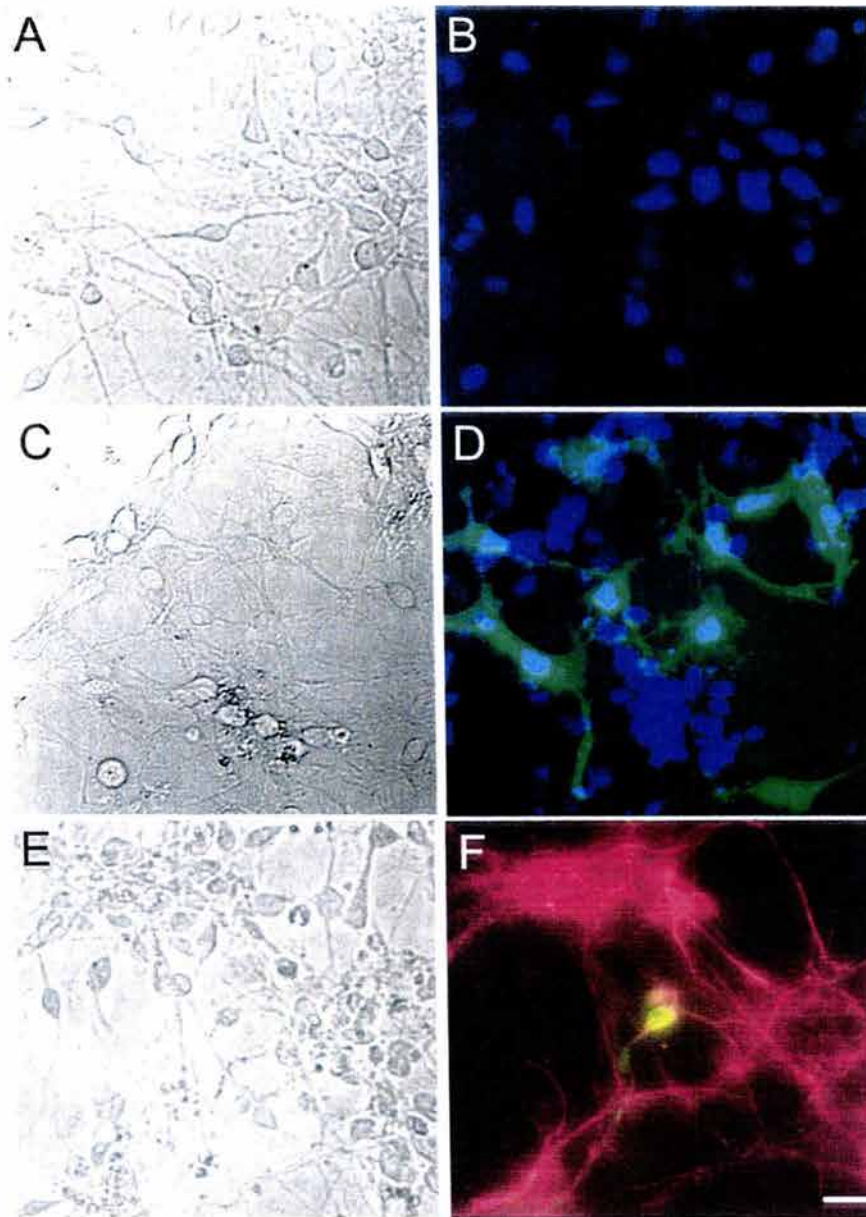


Fig. 2. Phase-contrast and fluorescence microscopy of cells transfected with PEI and pQBI 25. Hypothalamic cells were plated at 2.9×10^6 cells per 35-mm dish and maintained for 1 DIV until transfection with PEI (PEI nitrogen/DNA phosphate molar ratio = 8.8, pH = 6.9, 10 μg DNA) on adherent cells. Microphotographs were taken at DIV 3. Panels A and B: mock transfection; panels C–F: transfected cells. A, C and E: phase contrast; B, D and F: fluorescence microscopy. Green: GFP, blue: DAPI and red: neurofilament-M. Panel F: shows a neuron (yellow) transfected with pQBI 25 and stained with neurofilament-M (FITC-rhodamine merged images). Original magnification: $40 \times$. Scale bar = 40 μm .

11.7%; 96 h: 8.2%; 144 h: 7.6%) and the fluorescence intensity (not shown) decreased.

The previously described results were obtained with a cell density of 2×10^6 cells per 35 mm dish. Increasing the cell density enhanced slightly transfection efficiency with PEI from 10% at 1.8×10^6 cells to 11.5–12.3% at 2, 2.6 or 2.9×10^6 cells (not shown and Fig. 3A, B). Cell

survival (48 h post-transfection) was better if transfection was performed at higher densities: 82% at 1.8×10^6 , 84% at 2×10^6 , 89% at 2.6×10^6 and 92% at 2.9×10^6 cells; morphology improved also (not shown). Therefore, subsequent experiments were performed at the highest density. In contrast, with Lipofectamine 2000 transfection efficiency decreased substantially [(from

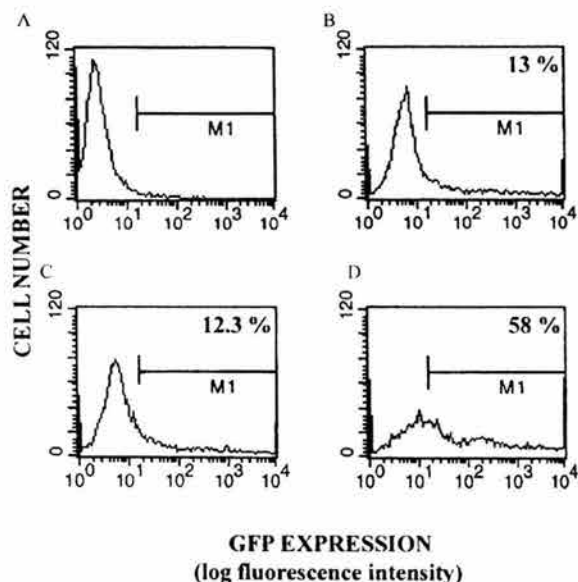


Fig. 3. FACS analysis, either before or after sorting, of cells transfected with pQBI 25 using PEI or Lipofectamine 2000. Hypothalamic cells were plated at 2.9×10^6 cells per 35-mm dish and maintained for 1 DIV until transfection, as described in Section 2. At DIV 1, cells were either transfected with PEI (PEI nitrogen/DNA phosphate molar ratio = 8.8, pH = 6.9, 10 μ g DNA), without plasmid (control, panel A) or with pQBI 25 (panels B and D); alternatively they were transfected with pQBI 25 and Lipofectamine 2000 (Lipofectamine 2000 = 20 μ g, DNA = 10 μ g) (panel C). At DIV 3, cells were analyzed by FACS (panels A–C) or sorted and analyzed by FACS (panel D). Data (an average of two independent experiments) are presented as FL1 histograms. M1, defined region for GFP⁺ cells.

17.2 to 12.3% (Fig. 3C) using the same batch of Lipofectamine 2000] if cell density was increased from 2×10^6 to 2.9×10^6 cells per 35 mm dish.

The optimum PEI nitrogen/DNA phosphate molar ratio, unknown in mammalian CNS cells, was determined. There was a direct correlation between the PEI transfection efficiency and PEI/DNA ratio increasing from 3.4% at 4.4 to 4.8% at 5.5, 5.5% at 6.6, 9% at 7.7, 11.7% at 8.8 and 10% at 10. At a ratio of 8.8, the transfection efficiency (12.1 ± 0.24 ; mean \pm S.E.M., $n = 6$) was more reproducible than at a ratio of 10 (10.5 ± 1.4 , $n = 5$) and toxicity was lower (not shown).

Condensation of DNA with polycations depends on ions concentrations and pH (Boussif et al., 1995). Efficiency was not affected when the pH of the PEI solution was between 6.5 and 7.0: with pH increasing by tenth of units, values fluctuated between 11.5 and 12%. However, a pH of 6.9 gave the best cell morphology (at DIV 3) (not shown); this pH was therefore subsequently used.

A possible source of low efficiency is the degradation of plasmid DNA in the lysosomal compartment; chloroquine has been used to improve plasmid transfection efficiency (Midoux et al., 1993). The addition of

chloroquine did not improve the efficiency: addition 1 h before (8%), during (12%) or 1 h after (11.5%) the transfection compared to 11.3% without chloroquine.

Non-covalent complexes of DNA with a peptide including an NLS increase DNA import into nuclei (Collas and Alestrom, 1996). We tested the effect of creating a complex between DNA and a caryophilic peptide containing a NLS on transfection efficiency. The peptide used contains the NLS from the large T antigen of SV40 and enhances plasmid transfection efficiency in various cell lines (Zanta et al., 1999). At low DNA concentrations (200 ng or 1 μ g) per dish, addition of 10- to 100-fold molar excess of caryophilic peptide did not yield any detectable transfection. At 10 μ g DNA per dish, the addition of a 5–400 molar excess of peptide did not change transfection efficiency (values between 11.3 and 12%); on the contrary a slight decrease (values between 10 and 10.6%) was observed with the largest ratios (from 600- to 1500-fold). Failure to improve transfection efficiency was not due to inadequate electrostatic interaction between peptide and DNA, since the electrophoretic migration of the DNA was increasingly retarded with enhancing peptide concentrations (not shown). At 24 μ g DNA per dish, addition of 190- or 1900-fold excess peptide did not yield transfection.

With these optimized conditions (cell density, PEI/DNA ratio, pH of PEI), cell viability was very high: $99 \pm 0.4\%$ ($n = 4$) as determined by PI staining and FACS analysis; cells transfected with pQBI 25 using PEI can be enriched from 13 to 58% by cell sorting followed by FACS analysis (Fig. 3B, D).

Serum-free medium has been used extensively to transfect different neuronal cell types. Therefore, adherent hypothalamic cells cultured in Neurobasal/B27 medium were transfected with PEI or Lipofectamine 2000. A relatively good but smaller efficiency [PEI: 9.38% ($n = 2$); Lipofectamine 2000: 6.70% ($n = 2$)] and cell viability (not shown) was observed when compared with cultures grown in S-DMEM.

3.3. Specificity of GFP expression from pQBI 25-TRH in cells transfected with PEI and efficiency of transfection in neurons

To study the control of TRH gene expression, Balkan et al. (1998) generated transgenic mouse lines that express the luciferase reporter gene under the control of various fragments of the TRH promoter. Of the 5' flanking region, 776 bp plus the first 84 bp from exon 1 of the TRH gene conferred tissue specificity to luciferase expression in vivo. We used this region (plasmids pNASS-rTRH-Luc and pQBI 25-TRH) to transfect hypothalamic neurons. The tissue-specificity of the TRH promoter in vitro was determined by several

means. Except where indicated, transfections were performed with PEI in the optimized conditions.

Transfection of pNASS-rTRH-Luc with PEI was performed in hypothalamic cells at DIV 1 and in fibroblasts at 60–70% confluency. The specific activity of luciferase was determined 2 days later; it was barely detectable in fibroblasts but higher in hypothalamic cells. In hypothalamic cells, pNASS-rTRH-Luc values were higher than those obtained by transfecting a promoter-less construct containing luciferase (pNASS-Luc), but much lower than when luciferase expression was driven by the CMV promoter (pcDNA3-CMV-Luc) (Fig. 4).

To determine the percentage of TRH⁺ cells in culture, an ISH experiment (using a probe directed against TRH mRNA) was performed at DIV 3 in cultures transfected with PEI and pQBI 25-TRH, to directly compare the percentages of cells expressing TRH mRNA or GFP (see below). $2.06 \pm 0.46\%$ ($n = 3$) of cells were TRH mRNA positive (Fig. 5A, B).

When pQBI 25-TRH was transfected using PEI, GFP positive cells were few ($0.32 \pm 0.21\%$, $n = 9$) as determined by microscopy, with a lower fluorescence intensity than pQBI 25 transfected cells and were positive for the neuron-specific marker, neurofilament-M (Fig. 6). Analysis of GFP positive neurons using the FACS Vantage revealed similar efficiency values ($0.4 \pm 0.04\%$, $n = 4$) (Fig. 7A, B). Granularity and size were comparable to those of mock transfected cells (not shown). Signal intensity decreased faster (undetectable at DIV 5) than that observed with pQBI 25. Cell viability at DIV

3, determined by PI staining and FACS analysis, was high: $99 \pm 0.3\%$ ($n = 4$).

Some of the alternatives tested to improve transfection efficiency with the pQBI 25 plasmid were also tested with the pQBI 25-TRH plasmid: with 24 μg plasmid and a 190-fold excess of caryophilic peptide, resulted in no GFP⁺ cells. At 10 μg DNA per dish, either a relatively small (5, 10, 50, 100) or a 165-, 300- or 400-fold excess of peptide did not significantly change efficiency (not shown). Transfection with Lipofectamine 2000 (20 μg Lipofectamine 2000 and 10 μg plasmid) resulted in similar or lower efficiencies than with PEI: FACS Vantage value at 2×10^6 cells per 35 mm dish: 0.56%; at 2.9×10^6 cells: $0.25 \pm 0.06\%$ ($n = 3$) (Fig. 7C).

pQBI 25-TRH transfected cells were sorted as described in Section 2. GFP positive cells were enriched at least 60-fold (Fig. 7A, B, D). Sorting of fluorescent cells by FACS led to enrichment of TRH and other neuron specific mRNAs and to a decrease of a glial specific mRNA (detection by RT-PCR; not shown). Furthermore, the percentage of TRH mRNA positive neurons detected by ISH after purification (Fig. 5C, D) was increased 15-fold ($30 \pm 0.7\%$, $n = 3$). In control dishes, cells transfected with pQBI 25 were sorted and analyzed for TRH mRNA by ISH (Fig. 5E); $0.45 \pm 0.3\%$ ($n = 3$) of cells were TRH mRNA positive, as expected if no enrichment occurred. PI staining demonstrated that $95 \pm 0.7\%$ ($n = 3$) of cells enriched by FACS were viable.

These data support that when pQBI 25-TRH is transfected, GFP is specifically expressed in TRH neurons. These results allowed us to obtain an estimation of transfection efficiency in TRH neurons with PEI by comparing the percentage of GFP positive cells ($0.32\text{--}0.4\%$) to that of TRH mRNA positive cells (2%). Efficiency of transfection of TRH neurons was estimated to be 16–20%.

We also made a preliminary analysis of the efficiency of transfection of pQBI 25-TRH in serum-free medium. With PEI: 0.26% ($n = 2$); with Lipofectamine 2000, 0.17% ($n = 2$). This confirmed that in the specific conditions tested transfection in serum-free medium is less efficient than in serum-supplemented cultures.

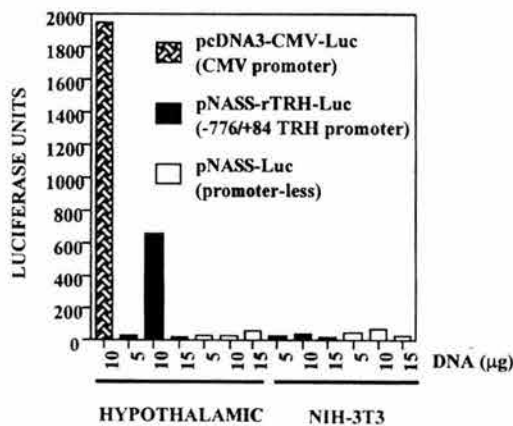


Fig. 4. Luciferase activities in hypothalamic cells and NIH 3T3 fibroblasts transfected with PEI and pNASS-rTRH-Luc, pcDNA3-CMV-Luc or pNASS-Luc. Hypothalamic cells were plated at 2.0×10^6 cells per 35 mm dish and maintained for 1 DIV or NIH 3T3 cells were grown at 60–70% confluency until transfection with PEI (PEI nitrogen/DNA phosphate molar ratio = 10; PEI pH = 6.8, 10 μg DNA). Transfection efficiency in fibroblasts ($10.3 \pm 0.5\%$, $n = 3$, analysis by microscopy) was similar to that detected in neurons. Luciferase activity is expressed as relative light units (RLU)/30 s \times μg protein.

4. Discussion

We have demonstrated that transfection of adherent mammalian CNS cells with PEI or Lipofectamine 2000 increases transfection efficiency compared to various widely used methods. We have optimized the conditions of transfection with PEI; they allow a substantial and reproducible efficiency of transfection of post-mitotic neurons. Furthermore, these conditions were compatible with the purification of neurons by FACS and the viability of the purified neurons.

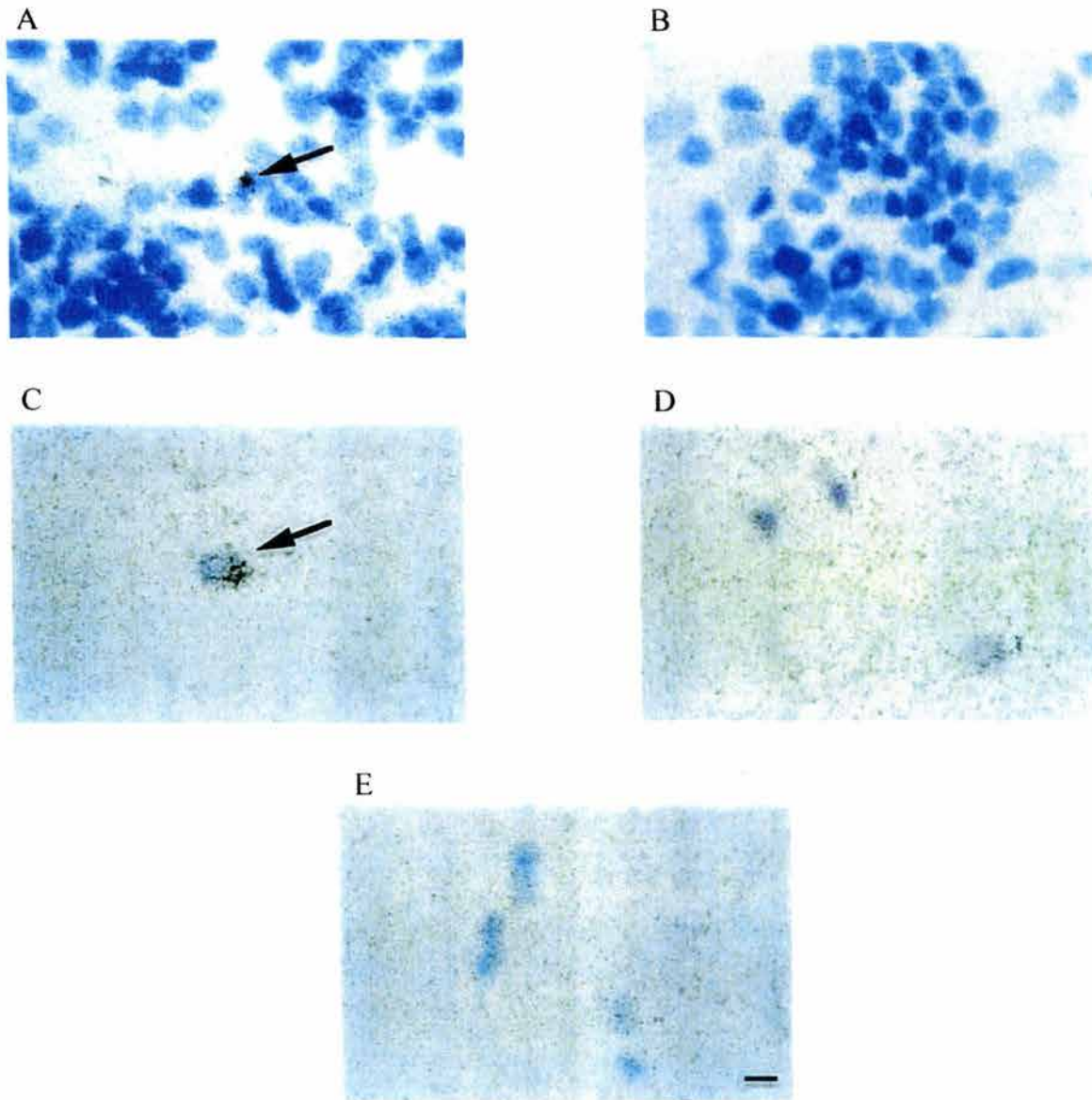


Fig. 5. Detection by ISH of TRH mRNA expressing cells in hypothalamic cultures and in sorted cells. Panels A and B: 1.4×10^6 hypothalamic cells plated on Lab-Tek culture chamber slides were maintained for 1 DIV, transfected with pQBI 25-TRH and processed for ISH at DIV 3. Panels C and D: 5×10^6 hypothalamic cells plated on 60 mm dishes were maintained for 1 DIV and transfected with pQBI 25-TRH; GFP⁺ cells were sorted at DIV 3 and plated on Lab-Tek culture slides. Panel E: 5×10^6 cells plated on 60 mm dishes were maintained for 1 DIV, transfected with pQBI 25, sorted at DIV 3 and purified GFP⁺ cells plated on Lab-Tek culture slides. Slides were hybridized with ³⁵S-labeled TRH (A, C, E) or sense TRH (B, D) cRNA probes. Cells were counterstained with the Nissl stain. Photographs of bright field images. TRH positive cells are identified by the accumulation of black silver grains. Arrows indicate TRH positive cells. Original magnification: $100 \times$. Scale bar = 20 μ m.

Results of transfection with most methods were, in general, quantitatively similar to those previously reported including with Lipofectamine 2000, for which a relatively high transfection efficiency had been reported for mammalian CNS neurons in serum free medium (Ohki et al., 2001). However, under our transfection conditions, a lack of reproducibility in the transfection

efficiency with Lipofectamine 2000 was observed; this inconsistency was clearly associated with the particular Lipofectamine 2000 batch used. The reason for this is unknown, but it is not related to shelf time since we did not find a correlation between shelf time and efficiency. Furthermore, the substantial dependency on cell density makes it less generally applicable than PEI. Finally PEI

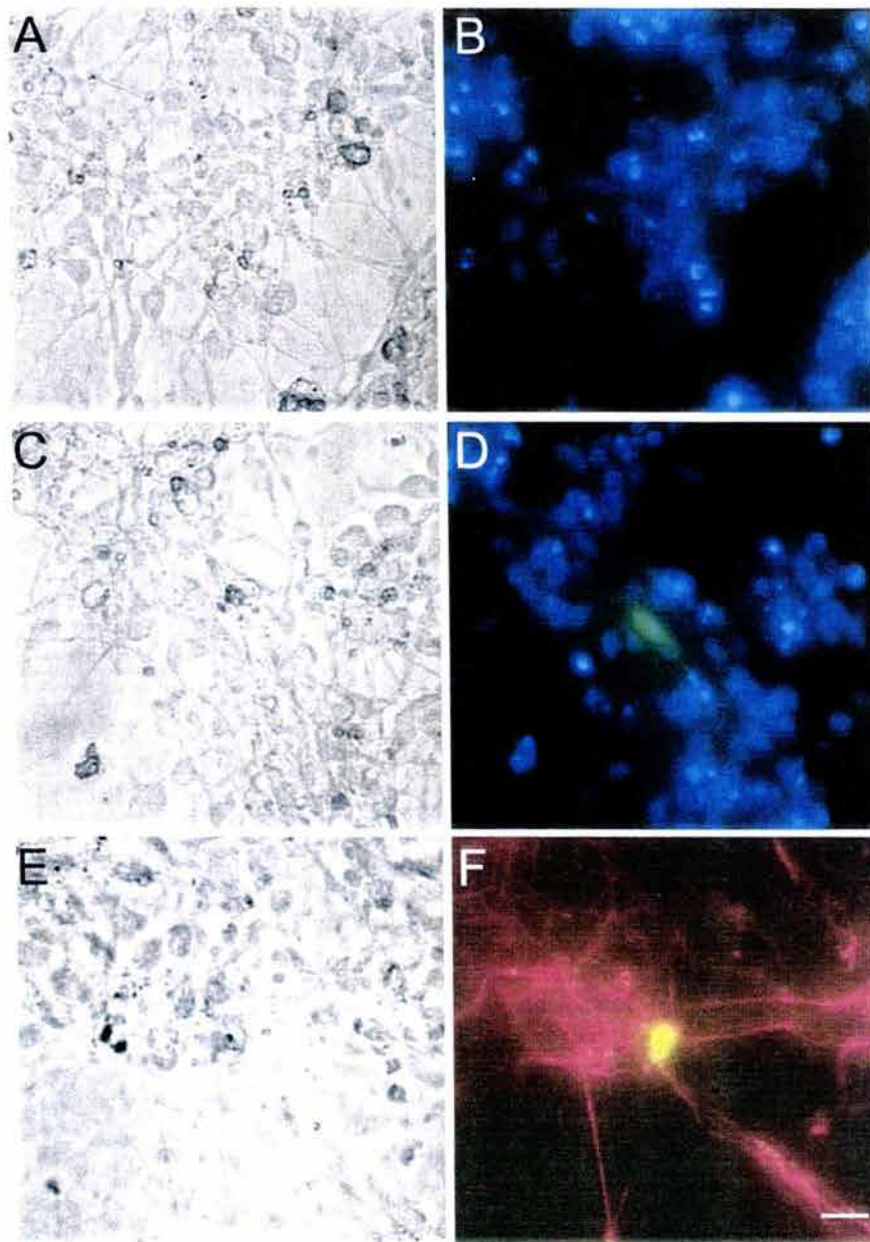


Fig. 6. Microscopic analysis of cells transfected with pQBI 25-TRH and PEI. Hypothalamic cells were plated at 2.9×10^6 cells per 35-mm dish cultured for 1 DIV and transfected with PEI (PEI nitrogen/DNA phosphate molar ratio = 8.8, pH = 6.9, 10 μ g DNA) on adherent cells. Microphotographs were taken at DIV 3. Panels A and B: mock transfection; panels C–F: transfected cells. A, C and E: phase contrast; B, D and F: fluorescence microscopy. Green: GFP, blue: DAPI and red: neurofilament-M. Panel F: shows a neuron (yellow) transfected with pQBI 25-TRH and stained with neurofilament-M (FITC-rhodamine merged images). Original magnification: $40 \times$. Scale bar = 40 μ m.

is much less expensive than Lipofectamine 2000. On the other hand, one report suggests that chick embryonic neurons can be transfected efficiently with Transfectam (Lezoualc'h et al., 1992) but we did not observe it in mammalian neurons, as previously shown by others

(Cole et al., 1995), in agreement with data showing that transfection efficiency is highly dependent on cell type.

This is the first report quantifying the *in vitro* transfection efficiency with PEI in mammalian CNS neurons. Previous reports had shown that various other

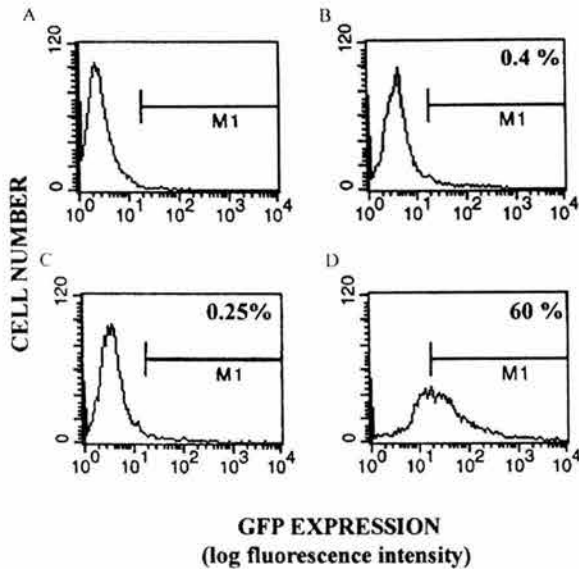


Fig. 7. FACS analysis, either previously or after sorting, of cells transfected with pQBI 25-TRH and PEI or Lipofectamine 2000. Hypothalamic cells were plated at 2.9×10^6 cells per 35-mm dish and maintained for 1 DIV until transfection, as described in Section 2. At DIV 1, cells were either transfected without plasmid (panel A) or with pQBI 25-TRH and PEI (PEI nitrogen/DNA phosphate molar ratio = 8.8, pH = 6.9, 10 μ g DNA) (panels B and D) or pQBI 25-TRH and Lipofectamine 2000 (Lipofectamine 2000 = 20 μ g, DNA = 10 μ g) (panel C). At DIV 3, cells were analyzed by FACS (panels A–C) or sorted and analyzed by FACS (panel D). Data (an average of three independent experiments) are presented as FLI histograms. M1 = defined region for GFP⁺ cells.

types of neurons are transfectable, with an efficiency slightly lower than the one we obtained. For example, transfection in rat sympathetic ganglion neurons gives a maximum transfection efficiency of 9% (Horbinski et al., 2001).

The method was reproducible and generated results of high quality if various parameters (cell density, PEI/DNA ratio, PEI pH) were optimum. A slightly reduced cell viability was however observed, outside of the optimum range, as reported for rat sympathetic ganglion neurons (Horbinski et al., 2001). Other minor drawbacks are an initial delay in neurite outgrowth and an increased difficulty to resuspend the transfected cells (may be because the polymer created a dense network on the cell surface). Using lower molecular weight PEI may reduce this problem. However, PEI did not interfere with various long-term aspects related to the differentiation of these cells. At DIV 3, neurite outgrowth was identical in control and transfected cells; TRH mRNA levels were normal (Guerra et al., unpublished data); TRH transcription at DIV 14 was increased in response to cyclic AMP, TPA or dexamethasone (Pérez-Martínez et al., unpublished data), as expected from studies on regulation of TRH mRNA levels (Uribe

et al., 1995; Pérez-Martínez et al., 1998). Our data also show that 2% of cells transfected with PEI and pQBI 25-TRH were TRH mRNA positive. This value is similar to that obtained at DIV 4 or DIV 14 in primary cultures of fetal hypothalamic cells (Guerra-Crespo et al., 2001; Joseph-Bravo et al., 2002) suggesting that transfection with PEI did not decrease the percentage of TRH neurons. Finally, in PEI transfected cultures, we observed that after 48 h the percentage of GFP⁺ cells drops with time in culture; it is unlikely that this is due to toxicity since no change in cell morphology was observed after fluorescence disappeared. Most probably, this drop is due to a transitory expression of GFP, as expected for a transient transfection assay (Yang et al., 1994; Sola et al., 1997; Horbinski et al., 2001).

We cannot exclude that the relatively high transfection efficiency values we obtained with PEI were dependent on particular conditions of the study, conditions that were not systematically analyzed, namely the initial culture in serum-supplemented medium, since 2.5% serum addition during transfection has a very positive effect on transfection of rat sympathetic neurons with PEI (Horbinski et al., 2001). Initial data suggest that transfection of serum-free cultures is slightly less efficient; however, better data may be obtained with a specific optimization.

The success of PEI as a transfection reagent for CNS mammalian neurons probably lies in various of its properties including the delivery of the complex with DNA through an endocytotic pathway, the facilitation of transport into nucleus, the relative independence of cell division and the reduced interference on transgene expression in nucleus (Pollard et al., 1998; Kichler et al., 2001). The optimum PEI/DNA ratio was very similar to that found in other cells, particularly in rat sympathetic ganglion neurons (Horbinski et al., 2001), suggesting common mechanisms.

Lack of effect with chloroquine or glycerol is consistent with previous data suggesting that the polymer buffered efficiently the endosomal pH, inducing a massive proton entry followed by passive Cl⁻ entry inducing increased osmotic pressure and endosomal disruption leading to the escape of DNA from endosomes (Kichler et al., 1999). Interestingly, electroporation and PEI effects on non-adherent cells tended to be more than additive. This may also be explained by pH buffering of lysosomes (Boussif et al., 1995), limiting DNases action or by the function of PEI as a carrier for DNA during electroporation (Chu et al., 1987).

Addition of a caryophilic peptide did not improve efficiency of transfection, even at low DNA concentrations, in contrast to Zanta et al. (1999), which showed that amount of DNA required for a defined percent of transfection of HeLa cells with PEI is shifted from μ g to ng. These results are consistent with data showing that PEI is a better promoter of plasmid entry from cytosol

into nucleus than other transfectants (Pollard et al., 1998). Inhibition of transfection efficiency at high caryophilic peptide concentration may have been due to saturation of nuclear transport (Gorlich and Mattaj, 1996).

We have obtained data suggesting that transfection with PEI maintained the cell specific character of the TRH promoter. This conclusion stems from indirect lines of evidence that suggested that most cells expressing GFP under the control of the TRH promoter are TRH expressing cells, in particular that purification of GFP⁺ cells increased the percentage of cells expressing TRH mRNA and relative amounts of TRH (and other neuronal markers) mRNAs. The percentage and intensity of GFP⁺ cells detected by FACS are very low as expected for a weak promoter as TRH. The only result which appears to contradict this conclusion is that the percentage of TRH mRNA positive neurons detected by ISH after FACS purification was only increased 15-fold, compared with higher increases observed by counting fluorescent cells. However, the percent TRH mRNA neurons detected by ISH was an underestimation because in this experiment a high background of silver grains probably reduced our ability to detect cells expressing low levels of TRH mRNA. Experiments involving ISH for both TRH and GFP are required to solve this issue, but an important fact is that the enrichment of TRH mRNA positive neurons is not observed if cells are transfected with the control vector.

One report suggests that chick embryonic hypothalamic TRH neurons can be transfected efficiently (Lezoualc'h et al., 1992); for this purpose, the authors transfected with Transfectam a plasmid which expresses CAT under the control of the -554/0 region of the rat TRH promoter and obtained data suggesting that expression was cell specific. Our data is in agreement with this, since the TRH promoter conferred luciferase activity in hypothalamic cell cultures but not in fibroblasts. It appears therefore that a relatively limited extent of the 5' region of the TRH gene is sufficient to produce cell specific expression in hypothalamic TRH neurons grown in vitro.

Purification of specific populations of CNS cells by FACS has generally been obtained with the use of monoclonal antibodies (Liepelt et al., 1990); few studies have used transfection of a fluorescent reporter under the control of a cell-type specific promoter (Wang et al., 2000). Our data clearly show that transfection of adherent neurons with PEI is fully compatible with their analysis or purification by FACS.

In conclusion, we demonstrate that under our experimental conditions, transfection of adherent mammalian post-mitotic neurons of hypothalamic origin with PEI gives the best combination of efficiency and reproducibility when compared with several commonly used techniques. This opens the possibility to use transfection

of mammalian CNS post-mitotic neurons for new applications including the purification of specific subtypes of neurons.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to W. Balkan and A. García Carrancá for the gift of the plasmids; to Luis Llorente Peters for the use of the FACS Vantage. We also thank P. Joseph-Bravo for the careful review of the manuscript, to M. Cisneros, F. Romero and M. Villa for technical support as well as to E. Mata and S. González for providing the animals used in this study. Supported in part by grants from DGAPA-UNAM IN216496 and IN223599, CONACYT-INSERM and EU CII*-CT93-0301.

References

- Balkan W, Tavianini MA, Gkonos PJ, Roos BA. Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology* 1998;139:252–9.
- Benda P, De Vitry F, Picart R, Tixier-Vidal A. Dissociated cell cultures from fetal mouse hypothalamus: patterns of organization and ultrastructural features. *Exp Brain Res* 1975;23:29–47.
- Boldyrev A, Song R, Lawrence D, Carpenter DO. Carnosine protects against excitotoxic cell death independently of effects on reactive oxygen species. *Neuroscience* 1999;94:571–7.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7297–301.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- Chu G, Hayakawa H, Berg P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res* 1987;15:1311–26.
- Cole RL, Konradi C, Douglass J, Hyman SE. Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron* 1995;14:813–23.
- Collas P, Alestrom P. Nuclear localization signal of SV40 T antigen directs import of plasmid DNA into sea urchin male pronuclei in vitro. *Mol Reprod Dev* 1996;45:431–8.
- Glover CP, Bienemann AS, Heywood DJ, Cosgrave AS, Uney JB. Adenoviral-mediated, high-level, cell-specific transgene expression: a SYN1-WPRE cassette mediates increased transgene expression with no loss of neuron specificity. *Mol Ther* 2002;5:509–16.
- Goldfarb DS, Garipey J, Schoolnik G, Kornberg RD. Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* 1986;322:641–4.
- Gorlich D, Mattaj JW. Nucleocytoplasmic transport. *Science* 1996;271:1513–8.
- Guerra-Crespo M, Ubieta R, Joseph-Bravo P, Charli JL, Pérez-Martínez L. BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB^{-/-} hypothalamic neurons in primary culture. *Eur J Neurosci* 2001;14:483–94.
- Horbinski C, Stachowiak MK, Higgins D, Finnegan SG. Polyethylenimine-mediated transfection of cultured postmitotic neurons from rat ganglia and adult human retina. *BMC Neurosci* 2001;2:2–9.

- Hurley MJ, Gerard DJ, Jauniaux E, Stern GM, Uchida K, Bradford HF. Cultured human foetal cerebral cortex, transfected with tyrosine hydroxylase cDNA, as a source of neural transplant material. *J Neural Transm* 2001;108:781–92.
- Jaworski DM, Kelly GM, Hockfield S. Intracranial injury acutely induces the expression of the secreted isoform of the CNS-specific hyaluronan-binding protein BEHAB/brevican. *Exp Neurol* 1999;157:327–37.
- Jiao S, Cheng L, Wolff JA, Yang NS. Particle bombardment-mediated gene transfer and expression in rat brain tissues. *Biotechnology (NY)* 1993;11:497–502.
- Joseph-Bravo P, Pérez-Martínez L, Lezama L, Morales-Chapa C, Charli JL. An improved method for the expression of TRH in serum-supplemented primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Brain Res Protoc* 2002;9:93–104.
- Kaech S, Kim JB, Cariola M, Ralston E. Improved lipid-mediated gene transfer into primary cultures of hippocampal neurons. *Mol Brain Res* 1996;35:344–8.
- Kichler A, Behr J-P, Erbacher P. Polyethylenimines: a family of potent polymers for nucleic acid delivery. In: Huang L, Hung M-C, Wagner E, editors. *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego, CA: Academic Press, 1999:192–206.
- Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, Danos O. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med* 2001;3:135–44.
- Lambert RC, Maulet Y, Dupont JL, Mykita S, Craig P, Volsen, Feltz A. Polyethylenimine-mediated DNA transfection of peripheral and central neurons in primary culture: probing Ca²⁺ channel structure and function with antisense oligonucleotides. *Mol Cell Neurosci* 1996;7:239–46.
- Legendre P, Tixier-Vidal A, Brigant JL, Vincent JD. Electrophysiology and ultrastructure of mouse hypothalamic neurons in culture: a correlative analysis during development. *Brain Res* 1988;471:273–85.
- Lezoualc'h F, Hassan AH, Giraud P, Loeffler JP, Lee SL, Demeneix BA. Assignment of the beta-thyroid hormone receptor to 3,5,3'-triiodothyronine-dependent inhibition of transcription from the thyrotropin-releasing hormone promoter in chick hypothalamic neurons. *Mol Endocrinol* 1992;6:1797–804.
- Li H, Chan STH, Tang F. Transfection of rat brain by electroporation. *J Neurosci Methods* 1997;75:29–32.
- Liepelt U, Kindler-Rohrborn A, Lennartz K, Reinhardt-Maelicke S, Rajewsky MF. Differentiation potential of a monoclonal antibody-defined neural progenitor cell population isolated from prenatal rat brain by fluorescence-activated cell sorting. *Dev Brain Res* 1990;51:267–78.
- Litman P, Barg J, Rindzoonski L, Ginzburg I. Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron* 1993;10:627–38.
- Liu YC, Storm DR. Expression of a neuromodulin-beta-galactosidase fusion protein in primary cultured neurons and its accumulation in growth cones. *Mol Cell Biochem* 1991;104:29–34.
- Meichsner M, Doll T, Reddy D, Weisshaar B, Matus A. The low molecular weight form of microtubule-associated protein 2 is transported into both axons and dendrites. *Neuroscience* 1993;54:873–80.
- Midoux P, Mendes C, Legrand A, Raimond J, Mayer R, Monsigny M, Roche AC. Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res* 1993;21:871–8.
- Ohki EC, Tilkins ML, Ciccarone VC, Price PJ. Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *J Neurosci Methods* 2001;112:95–9.
- Pérez-Martínez L, Carreón-Rodríguez A, González-Alzati ME, Morales C, Charli JL, Joseph-Bravo P. Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* 1998;68:345–54.
- Pérez-Martínez L, Charli JL, Joseph-Bravo P. Development of pro-TRH gene expression in primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Dev Brain Res* 2001;130:73–81.
- Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, Demolombe S, Behr JP, Escande D. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 1998;273:7507–11.
- Rupprecht AP, Coleman DL. Transfection of adherent murine peritoneal macrophages with a reporter gene using DEAE-dextran. *J Immunol Methods* 1991;144:157–63.
- Simonato M, Manservigi R, Marconi P, Glorioso J. Gene transfer into neurons for the molecular analysis of behaviour: focus on herpes simplex vectors. *TINS* 2000;23:183–90.
- Sola B, Staedel C, Remy JS, Bahr A, Behr JP. Lipospermine-mediated gene transfer technique into murine cultured cortical cells. *J Neurosci Methods* 1997;71:183–6.
- Tabuchi A, Sano K, Nakaoka R, Nakatani C, Tsuda M. Inducibility of BDNF gene promoter I detected by calcium-phosphate-mediated DNA transfection is confined to neuronal but not to glial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:818–23.
- Tixier-Vidal A, Nemeskeri A, Faivre-Bauman A. Primary cultures of dispersed hypothalamic cells. In: Vincent JD, Kordon C, editors. *Ultrastructural and Functional Features of Differentiation. Biologie Cellulaire des Processus Neurosécrétoires Hypothalamiques*. Paris: Presses du C.N.R.S., 1978:777–801.
- Uribe RM, Pérez-Martínez L, Covarrubias ML, Gomez O, Covarrubias L, Charli JL, Joseph-Bravo P. Phorbol ester or cAMP enhance thyrotropin-releasing hormone mRNA in primary cultures of hypothalamic cells. *Neurosci Lett* 1995;201:41–4.
- Wang S, Roy NS, Benraiss A, Goldman SA. Promoter-based isolation and fluorescence-activated sorting of mitotic neuronal progenitor cells from the adult mammalian ependymal/subependymal zone. *Dev Neurosci* 2000;22:167–76.
- Watanabe SY, Albsoul-Younes AM, Kawano T, Itoh H, Kaziro Y, Nakajima S, Nakajima Y. Calcium phosphate-mediated transfection of primary cultured brain neurons using GFP expression as a marker: application for single neuron electrophysiology. *Neurosci Res* 1999;33:71–8.
- Wiesenhöfer B, Humpel C. Lipid-mediated gene transfer into primary neurons using fugene: comparison to C6 glioma cells and primary glia. *Exp Neurol* 2000;164:38–44.
- Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME. Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci* 1996;16:5425–36.
- Yang K, Faustinella F, Xue JJ, Whitson J, Kampfl A, Mu XS, Zhao X, Taghialatela G, Perez-Polo JR, Clifton G, Hayes RL. Optimizing liposome-mediated gene transfer in primary rat septo-hippocampal cell cultures. *Neurosci Lett* 1994;182:287–90.
- Zanta MA, Belguise-Valladier P, Behr JP. Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:91–6.
- Zingg JM, Pedraza AG, Jost JP. Characterization of a genomic clone covering the structural mouse MyoD1 gene and its promoter region. *Nucleic Acids Res* 1991;19:6433–9.

Capítulo 4

Los arreglos de ADN y la exploración génica del cerebro

Magdalena Guerra-Crespo, Jean-Louis Charli y Leonor Pérez-Martínez

Revista de la Academia Mexicana de Ciencias (En prensa)

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Cuernavaca, Mor. 62210, México.

INTRODUCCION

En las células de los organismos vivos, los genes son las unidades que codifican para la síntesis de proteínas, compuestos responsables de dar forma y función a todas las células. Los genes están constituidos por ADN (ácido desoxiribonucleico), una molécula larga de dos cadenas formando una doble hélice. Cada cadena es un polímero lineal donde el monómero es un desoxinucleótido, compuesto por una base nitrogenada, un azúcar (desoxiribosa) y un grupo fosfato. La información genética es dictada por el arreglo de los distintos tipos de nucleótidos, definidos por la base nitrogenada que puede ser de dos tipos: purina (adenina o guanina) o pirimidina (citosina o timina). El apareamiento entre las dos cadenas se realiza por enlaces entre átomos de hidrógeno, conocidos como puentes de hidrógeno que ocurren siempre entre una adenina y una timina o entre una guanina y una citosina, por lo que se dice que las cadenas son complementarias (**Figura 1**).

La expresión génica es el proceso altamente regulado por el cual la información contenida en esa estructura se transmite inicialmente mediante el proceso de transcripción a productos de ARN (ácido ribonucleico). El ARN es un polímero lineal de ribonucleótidos similar al ADN, pero de una sola cadena, cuyas bases nitrogenadas pueden aparearse con bases complementarias del ADN, proceso conocido como hibridación. Finalmente, la secuencia de las bases del ARN es leída durante la síntesis de proteínas (traducción).

La vida en sus diversas formas proviene en gran parte de la compleja expresión coordinada de miles de genes y de sus productos (proteínas). En una célula, los niveles del ARN definen en parte la cantidad de cada proteína, y por consiguiente, el impacto que tiene esta en la fisiología celular. Por lo tanto, el determinar los niveles de ARN y como cambian en respuesta al medio interno o externo (regulación) o en respuesta a distintas patologías ha sido una actividad recurrente de los biólogos en las últimas décadas. Durante la segunda mitad del siglo XX, el análisis de la regulación y expresión de genes a nivel del ARN se realizaba a través de los métodos tradicionales de la biología molecular. La limitante principal, durante esta época, fue que el análisis se restringía a un número reducido de genes por experimento. En la década pasada sin embargo, este

paradigma cambió, debido a dos factores principales: la secuenciación completa del genoma de diferentes organismos, incluyendo la del humano, y el desarrollo de tecnologías para análisis génico en masa, como los arreglos de ADN que permiten monitorear el nivel de expresión de miles de genes a la vez. Nace entonces una nueva área en la ciencia: la genómica funcional, que permite el estudio global de los genomas y de sus funciones, por lo que hoy en día, es posible identificar cambios globales a nivel de ARN que ocurren en diferentes procesos biológicos normales y patológicos.

Los arreglos de ADN consisten en general de una matriz sólida muy pequeña, de dimensiones similares a las de un porta objetos para microscopio óptico (1.3 X 1.3 cm). A esta matriz, están unidos miles de fragmentos de ADN de una sola cadena que de manera individual corresponden a parte de la secuencia de un gen específico. Sobre esta matriz, cada tipo de fragmento de ADN está localizado en una posición conocida, separado de otros tipos por distancias minúsculas pero suficientes para distinguirlos. Esto permite determinar de manera paralela y cuantitativa los niveles de ARN o ADN presentes en una muestra biológica. Aunque las aplicaciones son muy amplias, las más usuales corresponden al análisis de los cambios temporales y espaciales de expresión génica en distintos tipos de células, tejidos y organismos. En el ámbito clínico se han utilizado en investigaciones toxicológicas y en el diagnóstico de enfermedades. Esta nueva tecnología ha permitido que la expresión de prácticamente todos los genes de humano pueda ser examinada en enfermedades como el cáncer. Lo más impresionante ha sido la demostración de la existencia de patrones de expresión génica distintos entre tumores de diferente origen anatómico, lo que permitió definir nuevos subgrupos de cáncer con apariencia histológica similar. Varias compañías biotecnológicas e institutos de investigación en todo el mundo se encuentran actualmente en la búsqueda de marcadores moleculares (ARNs o proteínas) que permitan la detección de enfermedades y el desarrollo de nuevas drogas para su tratamiento farmacológico. Se espera que en el futuro dichos tratamientos lleguen a ser personalizados de acuerdo al perfil de expresión de genes presentado por un tipo específico de enfermedad, de tal manera que sean más efectivos y menos tóxicos que los actuales.

TIPOS DE ARREGLOS DE ADN

A los arreglos de ADN se les puede clasificar con base en la densidad de fragmentos de ADN presentes en la matriz como macro o microarreglos [Freeman y cols. (2000)]. En la actualidad se hace referencia a ellos de manera general e indistinta como microarreglos o “chips” de ADN. Hasta ahora dos tipos de plataformas se han desarrollado: arreglos de ADN complementario (ADNc) y arreglos de oligodesoxinucleótidos (también llamados arreglos de oligonucleótidos).

El ADNc es una cadena de ADN que fue copiada a partir de un templado de ARN, algo como la copia de la secuencia transcrita de un gen; este copiado se llama transcripción reversa. En los arreglos de ADNc, cada tipo de ADNc se deposita sobre filtros de nylon o laminillas de vidrio (**Figura 2**). Asimismo, estos arreglos también pueden ser contruidos agrupando genes cuya expresión depende de un contexto o tipo de célula específico (por ejemplo, un “linfocchip” contiene fragmentos de ADN sintetizados a partir de la secuencia de genes importantes en la biología del linfocito). La gran ventaja de este tipo de arreglo es que puede generarse en cualquier laboratorio de biología molecular con un bajo costo. Sin embargo, desde el punto de vista práctico, trabajar con un número grande de ADNc para generar un arreglo de alta calidad puede resultar complicado. Actualmente, es posible adquirir arreglos de ADNc manufacturados por diferentes compañías en los Estados Unidos (Incyte Genomics <http://www.sinteny.com/> y Research Genetics <http://www.resgen.com/>).

Los oligonucleótidos son pequeñas cadenas de ADN sintetizadas químicamente de acuerdo a la información sobre la secuencia de un gen. Existen dos tipos de arreglos de oligonucleótidos, aquellos en los que se depositan oligonucleótidos previamente sintetizados sobre una matriz de manera análoga a como se efectúa para los de ADNc o bien, los que se basan en un método que concertando la química combinatoria (fabricación de múltiples productos en un número limitado de pasos) con la fotolitografía (impresión de un producto en un área específica) permite, de manera automatizada, la síntesis de oligonucleótidos (hasta 300 000 tipos) directamente sobre una superficie de silicón (**Figura 3**). Esta tecnología genera arreglos conocidos como “GeneChips”, con

cientos de miles de oligonucleótidos empacados a una alta densidad, por lo que es posible el análisis de gran parte de un genoma utilizando muestras muy pequeñas de ARN.

A diferencia de los arreglos de ADNc, el “GeneChip” es altamente específico ya que cada gen está representado por hasta 20 diferentes secuencias cortas obtenidas de toda la región codificadora de ese gen, que al hibridar en forma paralela dan mayor validez al ensayo. Hasta hace poco, el diseño de oligonucleótidos había sido limitado por la disponibilidad de las secuencias, pero ahora con el conocimiento de las secuencias completas del genoma humano y de otros genomas resultará más eficiente y sistemático. La compañía Affymetrix (Santa Clara, CA, E.U; <http://www.affymetrix.com/>) es pionera en esta tecnología y ha generado diferentes “GeneChips” disponibles comercialmente que incluyen gran parte del genoma de organismos como el humano, la rata, el ratón y plantas como *Arabidopsis*. Estos microarreglos representan el mayor número de genes en comparación a cualquier otro arreglo, lo que los hace sumamente útiles, pero sin duda, presentan la desventaja de su alto costo, lo que restringe significativamente su empleo en investigación básica en países como el nuestro.

REALIZACION DE UN EXPERIMENTO CON MICROARREGLOS DE ADN

El poder de los arreglos de ADN como herramientas experimentales proviene del principio de la complementariedad de las cadenas de ácidos nucleicos (ADN y ARN) a través del apareamiento de bases ó hibridación.

La preparación de la muestra de interés (blanco) para hibridar el arreglo requiere la síntesis de ADNc a partir de ARN purificado de tejido o de células. El marcado del blanco y el paso de hibridación dependen del tipo de arreglo en uso. Los arreglos de ADNc son hibridados simultáneamente con dos blancos de ADNc, uno generado a partir de ARN de la muestra de interés y otro de una muestra control que se utiliza como una base de comparación. Estos blancos son sintetizados independientemente por transcripción reversa en presencia de nucleótidos unidos a dos distintos fluoróforos (moléculas que al ser excitadas con luz ultravioleta emiten fluorescencia) pero hibridados en conjunto sobre un solo arreglo, lo cual permite la cuantificación, con un detector de fluorescencia asistido por computadora, de los cambios en la expresión génica reportando

los datos como la relación entre los valores de los dos fluoróforos (**Figura 4 A**). Alternativamente, los arreglos de oligonucleótidos son hibridados con ARNc (cadena copiada a partir de ADNc) proveniente de una sola muestra y marcado con un solo fluoróforo. En este caso, se sintetiza ADNc a partir de ARN y se introduce al mismo tiempo, un sitio de reconocimiento para la enzima que sintetiza ARN (ARN polimerasa). Esto permite la síntesis posterior de ARNc en una reacción de transcripción en presencia de ribonucleótidos unidos a biotina. Posteriormente, el ARNc de la muestra de interés y el del control se hibridan con chips independientes, lo que permite que cada ARNc se una a su secuencia específica en el arreglo. La hibridación se detecta a través de la unión de estreptavidina a la biotina presente en el ARNc. Esta unión se reconoce gracias a que la estreptavidina está acoplada a ficoeritrina, un fluoróforo que emite luz en rojo. Finalmente, se cuantifica con un detector de fluorescencia asistido por computadora, la intensidad de la señal fluorescente generada por cada ARN al hacer incidir un rayo láser en el “GeneChip” (**Figura 4 B**). En los 2 casos, los datos son introducidos en programas que analizan la intensidad de la señal y proveen una lectura que generalmente está acoplada a un mapa de imágenes, en el cual la intensidad de cada punto correspondiente a un gen individual indica su nivel de expresión.

ANALISIS DE DATOS

Los estudios de expresión génica utilizando la tecnología de arreglos de ADN permiten evaluar la expresión de casi todo un genoma a partir de una sola muestra biológica. Normalmente esta expresión se compara a la de muestras control. Para este efecto, se requiere de la asistencia de la informática, es decir, de bases de datos almacenados y de programas diseñados específicamente para el análisis de la gran cantidad de información generada. Existen en el mercado de la bioinformática diversos programas especializados en analizar resultados a gran escala cuyo fin común es calcular la tasa de variación de expresión génica entre las muestras que están siendo comparadas. Este nivel de cambio provee un estimado de las cantidades relativas de una especie de ARN dada en una condición particular. Este tipo de análisis funciona cuando se requiere identificar si la expresión de los genes de interés se incrementa o disminuye. Sin

embargo, cuando es necesario identificar patrones de expresión génica, es decir, reconocer grupos de genes cuya expresión aumente o disminuya de manera similar bajo condiciones normales o de experimentación, el estudio exigirá otras herramientas computacionales divididas en dos tipos generales: agrupamientos jerárquicos y mapas auto-organizados [Eisen y cols. (1998)]. Estos análisis utilizan fórmulas matemáticas ó algoritmos para predecir diferentes probabilidades de agrupamiento. Cada algoritmo aporta capacidades de análisis muy diferentes; por lo que su selección dependerá de las necesidades del estudio a realizar. Los sistemas jerárquicos permiten el análisis de datos con base en algún patrón de interés. De esta manera, se identificaron por ejemplo, a los genes que tenían la máxima o mínima expresión en cada una de las fases del ciclo celular de levadura. Los resultados obtenidos jerárquicamente son normalmente representados en forma similar a la de un árbol filogenético en donde la longitud de cada rama indica el grado de relación entre los grupos. El inconveniente de este sistema es que considera sólo ciertos grupos de genes, lo que causa que los resultados generados puedan no necesariamente reflejar lo que ocurre en la totalidad del genoma analizado sino más bien depender de decisiones específicas de análisis impuestas por el programa. Esto condujo a la creación de los mapas auto-organizados también llamados redes neurales que identifican patrones inesperados (al azar) a partir de todos los datos originales, sin imponer la estructura rígida de análisis observada en las formas jerárquicas, por lo que son hoy en día los más utilizados.

APLICACIONES ACTUALES DE ESTA TECNOLOGIA

Hasta hoy, una parte del uso de los microarreglos de ADN se ha enfocado hacia la investigación y el tratamiento del cáncer, con la idea principal de lograr clasificar tumores con base a la expresión de genes específicos. Por ejemplo, recientemente se publicó un estudio en el que se identificaron con microarreglos de ADN 35 genes cuya expresión, conforme avanza el proceso neoplásico, se incrementa en muestras de tejido cervical canceroso a partir de niveles indetectables o muy bajos en el tejido normal. Por lo tanto los autores proponen el uso de estos genes como marcadores de este tipo particular de cáncer [Chen y cols. (2003)].

La aplicación de los microarreglos de ADN al sistema nervioso se ha visto retrasada con respecto a otras disciplinas dada la gran variedad de tipos y redes neuronales existentes. Dentro de los organismos vivos, el cerebro posee la mayor diversidad de expresión génica respecto a cualquier otro órgano del cuerpo; para su estudio es normalmente subdividido en regiones, con base en la morfología y fisiología. Un objetivo de la neurobiología moderna es identificar que genes determinan un tipo celular específico ó fenotipo y cómo este órgano alcanza su elevada capacidad plástica y cognitiva. Los microarreglos de ADN representan una herramienta potencial para identificar cuáles son los genes que participan en estos procesos. Los resultados obtenidos de esta manera complementarán aquellos que han sido generados con las técnicas actuales basadas en la localización anatómica y las propiedades electrofisiológicas y bioquímicas de un tipo celular específico.

Recientemente, a través del uso de microarreglos de ADN, investigadores interesados en el estudio de la respuesta del cerebro a diferentes condiciones de estrés (como una infección viral o un estrés emocional) mostraron que el cerebro no responde de la misma manera a cada condición sino que existen grupos de genes regulables de manera específica. Lo anterior es el inicio en la búsqueda de marcadores moleculares que definan los diferentes tipos de estrés. Esta información permitirá eventualmente el desarrollo de drogas más específicas para recuperar la homeostasis del organismo en situaciones de estrés [Reyes y cols. (2003)].

CARACTERIZACION DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE UN TIPO NEURONAL UTILIZANDO ARREGLOS DE ADN

Nuestro laboratorio ha estudiado por varios años el metabolismo de la hormona liberadora de tirotropina (TRH), un mensajero intercelular en el sistema nervioso central y la adenohipófisis. Algunas neuronas del hipotálamo (una región localizada en la base del cerebro de los mamíferos) producen TRH para controlar múltiples funciones incluyendo algunas de las secreciones de la glándula adenohipófisis y el sistema autónomo. En el laboratorio, nos interesa entender cómo se sintetiza la TRH y cómo los

sistemas nervioso y endócrino regulan este proceso durante el desarrollo y en el animal adulto.

Uno de nuestros objetivos es identificar algunos de los marcadores moleculares que son específicos de las neuronas TRHérgicas (células que sintetizan y secretan la TRH) fetales. Para estudiar bajo condiciones controladas los mecanismos que inician la biosíntesis y expresión de la TRH, utilizamos cultivos de hipotálamo fetal de rata. Estos cultivos contienen diversas poblaciones celulares entre ellas, células gliales, endoteliales y diferentes tipos neuronales que expresan múltiples neuropéptidos y neurotransmisores. Las células TRHérgicas son una pequeña proporción de las células presentes en los platos de cultivo, lo que representa una limitante para su estudio bioquímico. Para alcanzar nuestro objetivo, decidimos aislar a las células TRHérgicas de la población total con la idea de caracterizar su perfil de expresión génica, utilizando arreglos de ADN. Para seleccionar las células TRHérgicas, se introdujo a los cultivos hipotalámicos una molécula de ADN que permite la expresión de una proteína que emite luz verde únicamente en las neuronas TRHérgicas. Solamente aquéllas células que producen TRH emiten luz verde al ser observadas bajo un microscopio de luz ultravioleta. Esto nos ayudó a seleccionarlas por citometría de flujo, una técnica que permite separar las células verdes del resto ya que sólo éstas emiten fluorescencia cuando un rayo láser incide sobre ellas. Hemos generado ARNc a partir de estas células y lo hemos utilizado como blanco para hibridar un “GeneChip” (**Figura 5**). El “GeneChip” que utilizamos es el U34A de la compañía Affymetrix que nos permite evaluar la expresión de 7000 genes conocidos del genoma de rata.

La caracterización de la expresión génica de las células TRHérgicas hipotalámicas fetales permitirá a corto plazo identificar algunos de los ARNm que se expresan preferentemente en estas neuronas, lo que nos pudiera dar información valiosa sobre los genes que participan de manera específica en el proceso de diferenciación del fenotipo TRHérgico.

PERSPECTIVAS

Para algunos investigadores entre los que destaca Erick Lander, la genómica es considerada para las ciencias biológicas como el equivalente a la tabla periódica para la química, al generar un inventario de genes [Lander (1999)]. Esta idea resume la importancia del impacto de la tecnología de microarreglos de ADN en nuestro tiempo. Sin embargo, es indudable que a pesar de lo impresionante de su crecimiento, su aplicación está en sus inicios y se espera que llegará a tener en poco tiempo un impacto aún más profundo.

Un aspecto importante para este crecimiento no sólo se concentra en la creación de formas novedosas de manufactura de microarreglos de ADN o en la mejoría de cada componente de esta metodología, sino también en el obtener la mayor información posible del análisis de expresión global, con la ayuda de un gran número de herramientas matemáticas. Es necesario por lo tanto, diseñar nuevos algoritmos para la organización de los datos y desarrollar mejores métodos computacionales que ofrezcan manipular, analizar y representar los resultados producidos en forma expedita y sencilla (tablas o gráficas). En nuestro país, la UNAM cuenta con la primera unidad de microarreglos de México (<http://smcg.cifn.unam.mx/MicroarreglosDNA-IFC/index.html>) en donde al igual que diferentes compañías en los Estados Unidos, se está trabajando en la creación de nuevos algoritmos para el análisis de datos.

Otro factor a considerar para el mejoramiento del manejo de los datos es el relacionado a la forma en que la información está depositada en las páginas públicas de resultados vía internet. Los sitios o páginas que la almacenan lo hacen en archivos que sólo muestran un compendio de los genes estudiados sin permitir al usuario definir ningún tipo de relación entre ellos, por lo que se precisa de la creación de programas que transfieran la información contenida en las bases públicas a programas en los que sea posible un análisis más detallado para interpretar los datos en forma de imágenes y texto.

Todas estas mejoras permitirán simplificar y agilizar el estudio de los genomas, así como proponer modelos de redes funcionales o de asociación de genes biológicamente significativos en diferentes procesos biológicos normales y patológicos.

Agradecimientos. Los autores agradecen la revisión minuciosa al manuscrito que hicieron los Drs. Agustín López y Federico Sánchez. La investigación mencionada en este manuscrito fue apoyada parcialmente por los donativos IN223599 e IN227002 de la DGAPA-UNAM.

REFERENCIAS ESPECIFICAS

Chen, Y., C. Miller, R. Mosher, X. Zhao, J. Deeds, M. Morrissey, B. Bryant, D. Yang, R. Meyer, F. Cronin, B.S. Gostout, K. Smith-McCune, y R. Schlegel (2003), "Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays", *Cancer Res.*, 63, 1927-1935.

Eisen, M.B., P.T. Spellman, P.O. Brown y D. Botstein (1998), "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14863-14868.

Freeman, W.M., D.J. Robertson y K.E Vrana (2000), "Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis", *Biotechniques*, 29, 1042-1055.

Lander, E.S.(1999), "Array of hope", *Nature Genetics*, 21, 3-4.

Reyes, T.M., J.R. Walker, C. DeCino, J.B. Hogenesch, y P.E. Sawchenko (2003), "Categorically distinct acute stressors elicit dissimilar transcriptional profiles in the paraventricular nucleus of the hypothalamus", *J. Neuroscience*, 23, 5607-5616.

PARA SABER MAS

Brown, P.O., y D. Botstein (1999), "Exploring the new world of the genome with DNA microarrays", *Nature Genetics*, 21, 33-37.

Burgess, JK. (2001), "Gene expression studies using microarrays", *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 28, 321-328.

Véase www.genesifter.net para el análisis de datos de microarreglos.

Magdalena Guerra-Crespo obtuvo el grado de Lic. en Biología en la Facultad de Biología, Universidad Veracruzana. Actualmente, es estudiante de doctorado en Ciencias Bioquímicas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Jean-Louis Charli es doctor en Ciencias de la Naturaleza por la Universidad de Paris VI. Realiza investigación en el campo de la neurobiología molecular y celular. Es autor de alrededor de 70 artículos de investigación en revistas de circulación internacional. Es investigador en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, miembro del Sistema Nacional de Investigadores y de la Academia Mexicana de Ciencias.

Leonor Pérez-Martínez obtuvo el grado de doctor en filosofía en la Universidad de Basilea, Suiza. Es investigadora en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Su interés principal de investigación es el desarrollo del sistema nervioso y regeneración neuronal.

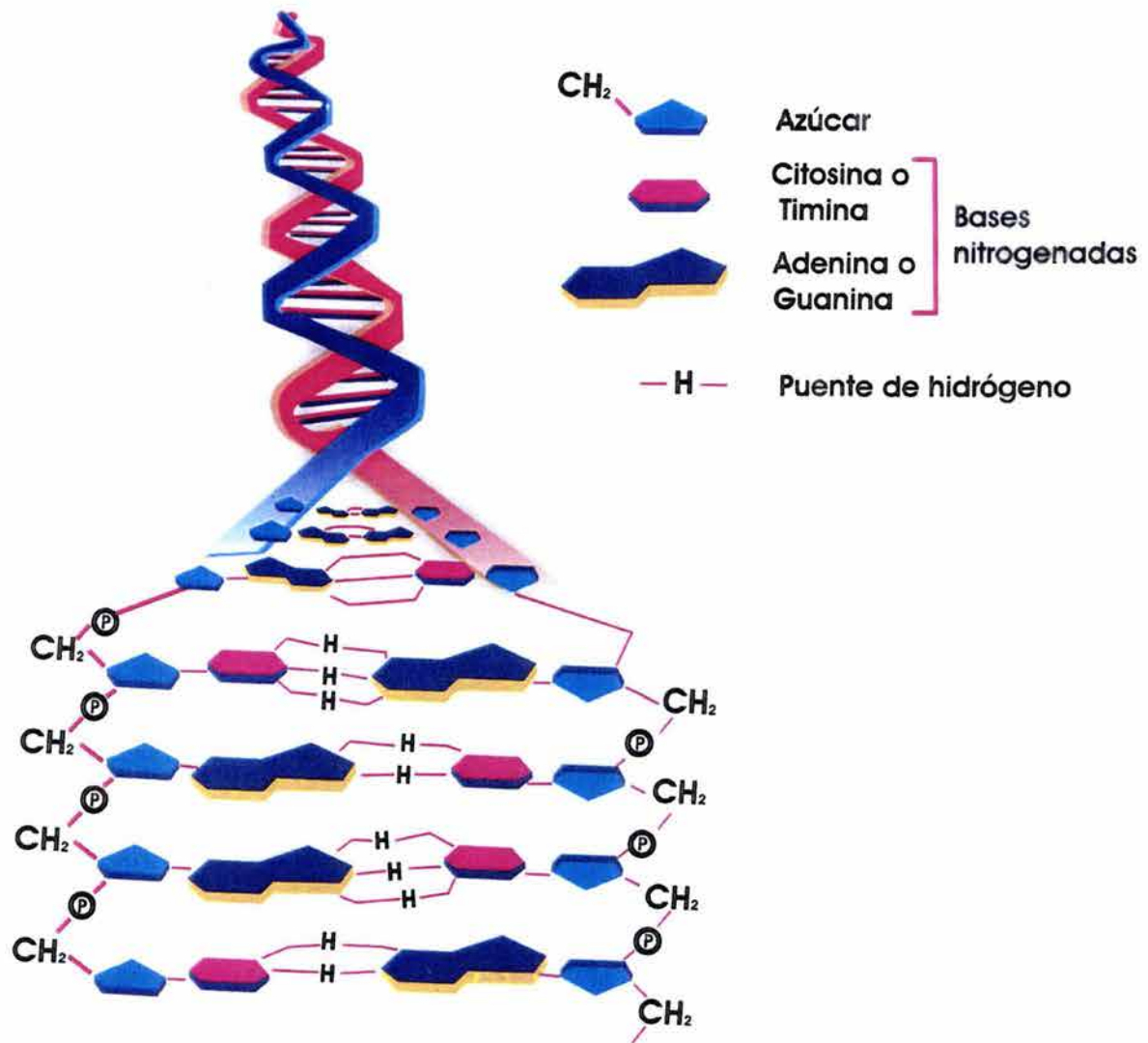


Figura 1. Estructura del ADN. La molécula de ADN es una doble hélice constituida por 2 cadenas de nucleótidos (una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato) complementarias entre sí y unidas por puentes de hidrógeno que constituyen el eje de la hélice. Toda la información genética es leída como si fuera un alfabeto de 4 letras (las 4 bases nitrogenadas) cuyo orden dicta la producción de distintas proteínas. Las cadenas permanecen unidas a través de 2 puentes de hidrógeno si la unión es entre una adenina y una timina o de tres puentes entre una guanina y una citosina. La parte exterior de la doble hélice esta formada por grupos fosfatos y azúcares a los cuales están unidas las bases nitrogenadas.

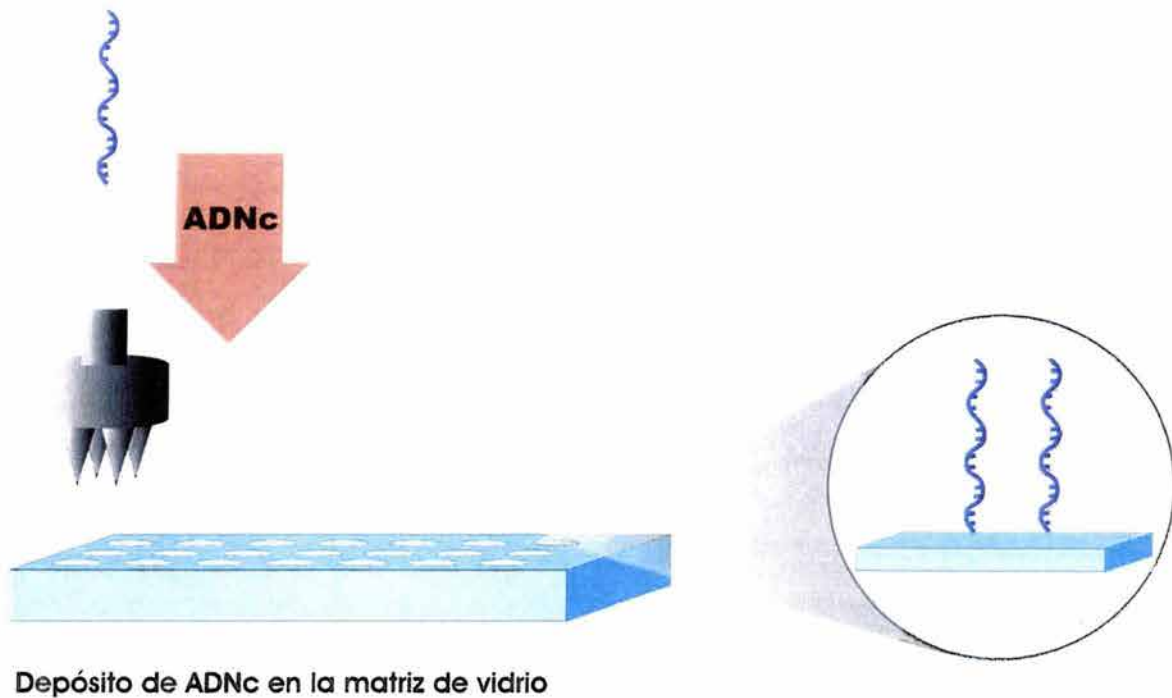


Figura 2. Manufactura de microarreglos de ADN complementario. Los ADN complementarios (ADNc) son tomados en pequeñas cantidades con el uso de brazos robotizados para ser depositados sobre una superficie de vidrio, cubierta con un químico cargado positivamente que permite la unión del ADN cargado negativamente. Réplicas de cada arreglo pueden ser impresas simultáneamente a gran velocidad y tratadas posteriormente para inmovilizar el ADN sobre la matriz.

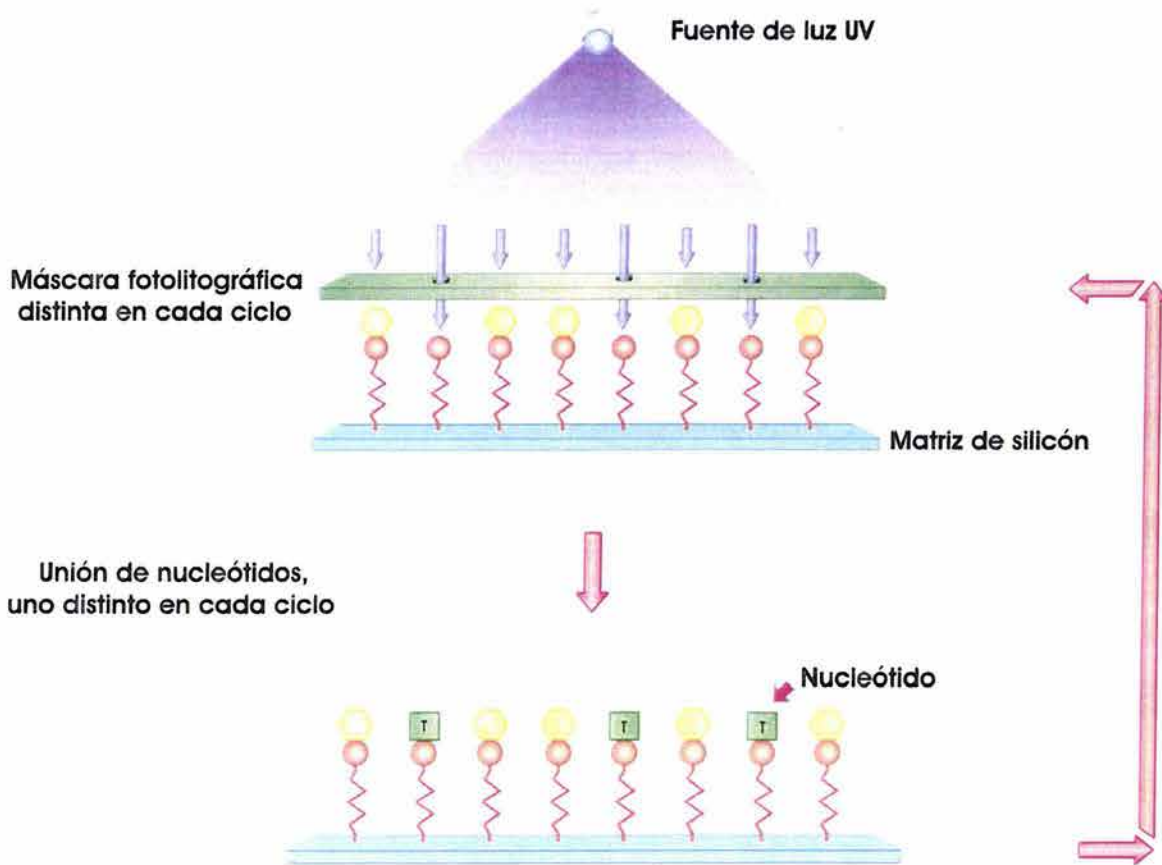


Figura 3. Manufactura de microarreglos de oligonucleótidos (“GeneChips”). Los arreglos de oligonucleótidos consisten en una matriz que contiene moléculas que sirven de base para el anclaje de nucleótidos provistos con un grupo protector removible por acción de la luz. La síntesis de las sondas se realiza en forma paralela a través de la adición progresiva de nucleótidos a cada cadena de oligonucleótido. Para definir que cadena recibirá el nucleótido en cada ciclo, se coloca sobre la matriz una máscara que contiene orificios muy pequeños. La incidencia de luz ultravioleta a través de los orificios durante un paso de síntesis remueve el componente fotosensible y permite la unión de un nucleótido. En el siguiente paso de síntesis, una segunda máscara es aplicada para desproteger otras áreas sobre la superficie, permitiendo que otro nucleótido se acople a esas zonas. Este proceso se repite hasta que las sondas alcanzan una longitud definida (usualmente de 25 nucleótidos).

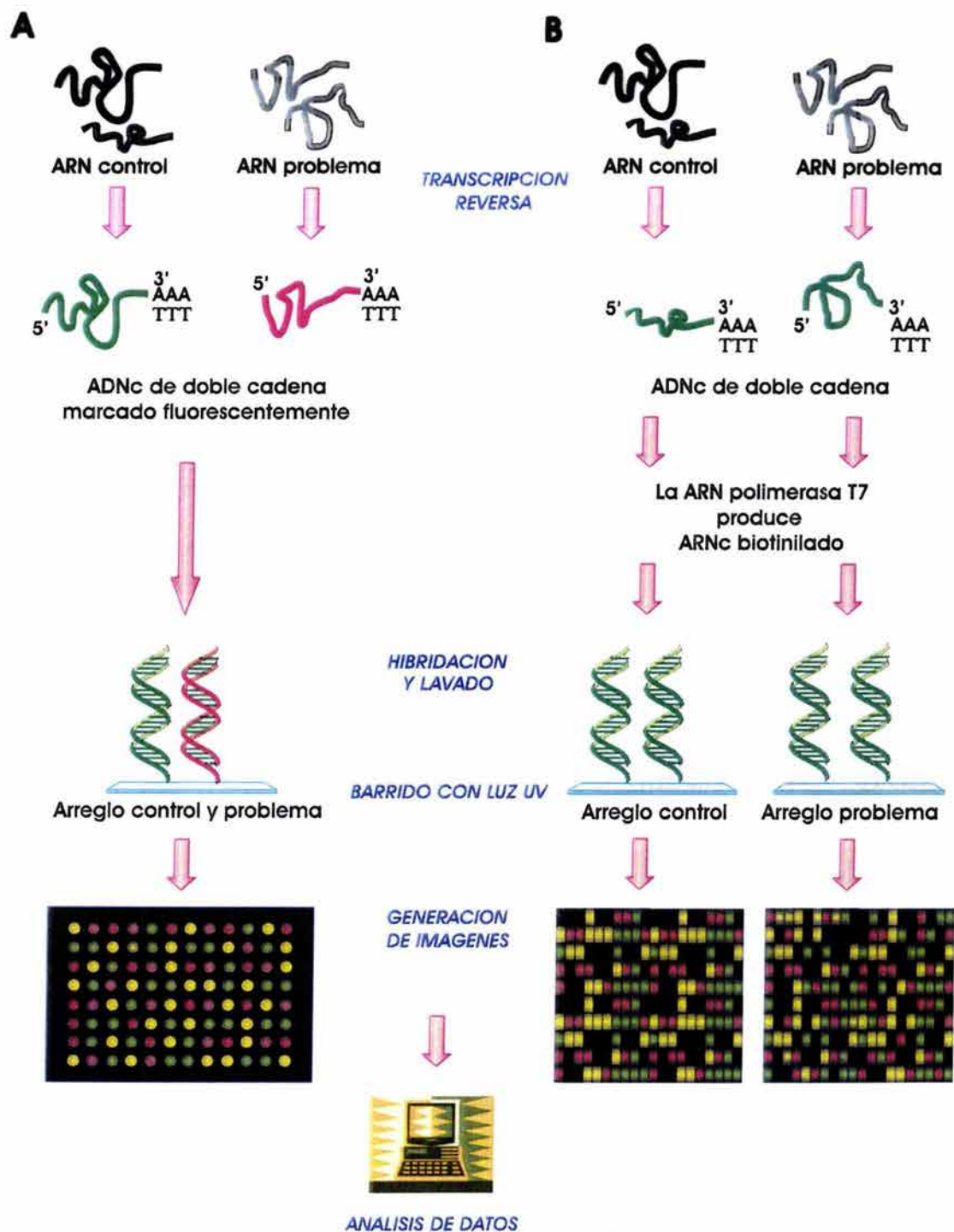


Figura 4. Generación del blanco, hibridación y análisis de microarreglos de ADN. Los microarreglos se hibridan con blancos generados a partir de ARN que proviene de una muestra control y de la muestra a analizar (ARN problema). A) Microarreglos de ADNc. A partir de los ARNs, se generan por separado en el paso de transcripción reversa, ADNcs que incorporan colorantes fluorescentes que emiten luz de diferente color. Los blancos son hibridados juntos en un solo arreglo de ADN; inmediatamente después, la matriz es lavada con una solución que retira

el material unido inespecíficamente. El paso de un rayo láser sobre la superficie del arreglo, genera señales fluorescentes independientes, y la superposición de ambas fluorescencias, produce una imagen para análisis. Si la expresión de un gen es más alta en la muestra problema, la señal se representará como un punto en color verde; si es mayor en la muestra control la señal será roja, mientras que se observará en color amarillo cuando resulten similares en ambas muestras. Los programas de análisis de estos mapas de expresión en color, calculan entre otros datos, la magnitud de la diferencia de expresión de cada ARN entre las muestras comparadas. B) Microarreglos de oligonucleótidos. El ADNc generado a partir de cada ARN (problema y control) es procesado para generar ARNc marcado con biotina. Las muestras son hibridadas de manera independiente en arreglos distintos y posteriormente detectadas con un fluoróforo (ficoeritrina) unido a avidina. La intensidad de la señal fluorescente generada por cada ARN al hacer incidir un rayo láser sobre el arreglo es cuantificada con un detector de fluorescencia asistido por computadora. Como en (A), los datos son introducidos en programas que analizan la intensidad de color de cada punto correspondiente a un gen individual con lo que es posible calcular la magnitud de la diferencia de expresión de cada ARN entre las muestras comparadas.

Capítulo 5

Caracterización del transcriptoma de las neuronas TRHérgicas del hipotálamo fetal mediante el uso de microarreglos de ADN

INTRODUCCION

El cerebro es considerado como la región de mayor complejidad respecto a cualquier otro órgano del cuerpo (Hahn y Laird, 1971; Colantuoni et al, 2000). Las propiedades funcionales de regiones específicas del cerebro son determinadas parcialmente por los genes que son expresados en células individuales. Esta expresión génica ocurre en regiones definidas y durante tiempos diferentes en el desarrollo, lo que indica que es sujeta a finos mecanismos de regulación. Dicha expresión, da lugar a dos clases de productos: ARNm's y finalmente proteínas, que molecularmente hablando constituyen el fenotipo celular. La existencia de diferentes tipos y redes neuronales da como resultado la heterogeneidad funcional y anatómica, que limita de manera importante el estudio del SN debido a variados problemas técnicos. Uno de ellos, es la falta de marcadores moleculares para muchos fenotipos específicos; la mayoría de los que existen actualmente, se han identificado por métodos que permiten reconocer un número reducido de genes (hibridación *in situ* o inmunohistoquímica). La clasificación de un tipo celular, se ha efectuado en su mayoría con base a su localización anatómica, morfología individual o propiedades electrofisiológicas. En la actualidad, esta situación ha cambiado radicalmente, gracias al avance en la secuenciación de diferentes genomas y el desarrollo de tecnologías para análisis génico en masa como los arreglos de ADN. Así, el determinar la expresión de miles de genes en un sólo ensayo empleando "chips" de ADN, permite de manera eficiente la identificación de patrones de expresión génica de fenotipos neuronales no caracterizados e identificar por lo tanto, marcadores particulares de esa población celular. Lo anterior, conduce a su vez a hipotetizar sobre los mecanismos de regulación de esos genes bajo diferentes condiciones y en un futuro incorporar los resultados obtenidos de un transcriptoma al estudio global de un organismo.

El análisis de una región particular *in vitro*, no es mucho menos compleja que la situación que ocurre *in vivo*. En este caso, consiste de cultivos heterogéneos conteniendo distintas poblaciones celulares en proceso de diferenciación o ya diferenciadas. Para identificar los transcritos involucrados en la especificación del fenotipo TRHérgico, nosotros empleamos cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata, transfectados con un vector que contiene a la proteína reportera GFP, bajo la actividad del promotor de TRH.

Esta estrategia nos permite aislar específicamente del cultivo mixto, a las células que expresan TRH a través de citometría de flujo (FACS).

Para caracterizar la población TRHérgica hipotalámica, se compararon los genes expresados en las células purificadas con los presentes en los cultivos primarios heterogéneos a través del uso de microarreglos de oligonucleótidos de la compañía affymetrix.

MATERIALES Y METODOS

Estrategia experimental (Ver Fig. 1).

Para la caracterización del fenotipo TRHérgico se hicieron 3 grupos experimentales: **A)** Cultivos transfectados con el vector phrGFP-TRH y purificada por FACS la población fluorescente (células TRHérgicas). Para este punto se destinaron dos microchips. **B)** Cultivos transfectados con el vector phrGFP-TRH y separada toda la población por FACS. Se emplearon también dos microarreglos. Este grupo fue planteado para determinar cambios de expresión que pudieran deberse al proceso de transfección o a la citometría. **C)** Cultivos primarios de hipotálamo sin transfectar. Se utilizó un sólo microarreglo.

Se realizaron 3 cultivos independientes para purificar 50,000 células fluorescentes, de las que se obtuvo el ARNc para hibridar a un solo chip, por lo que en total se hicieron 6 cultivos para hibridar a ambos microarreglos del grupo A. Las células y el ARNc para los grupos B y C fueron igualmente obtenidas a partir de 3 cultivos por chip.

Cultivo primario de hipotálamo fetal de rata y transfección.

Una amplia descripción de ambas metodologías se encuentra en el capítulo 2 y 3 respectivamente.

Purificación celular.

Las células fueron purificadas de acuerdo al protocolo de uso del FACSVantage descrito en el capítulo 3.

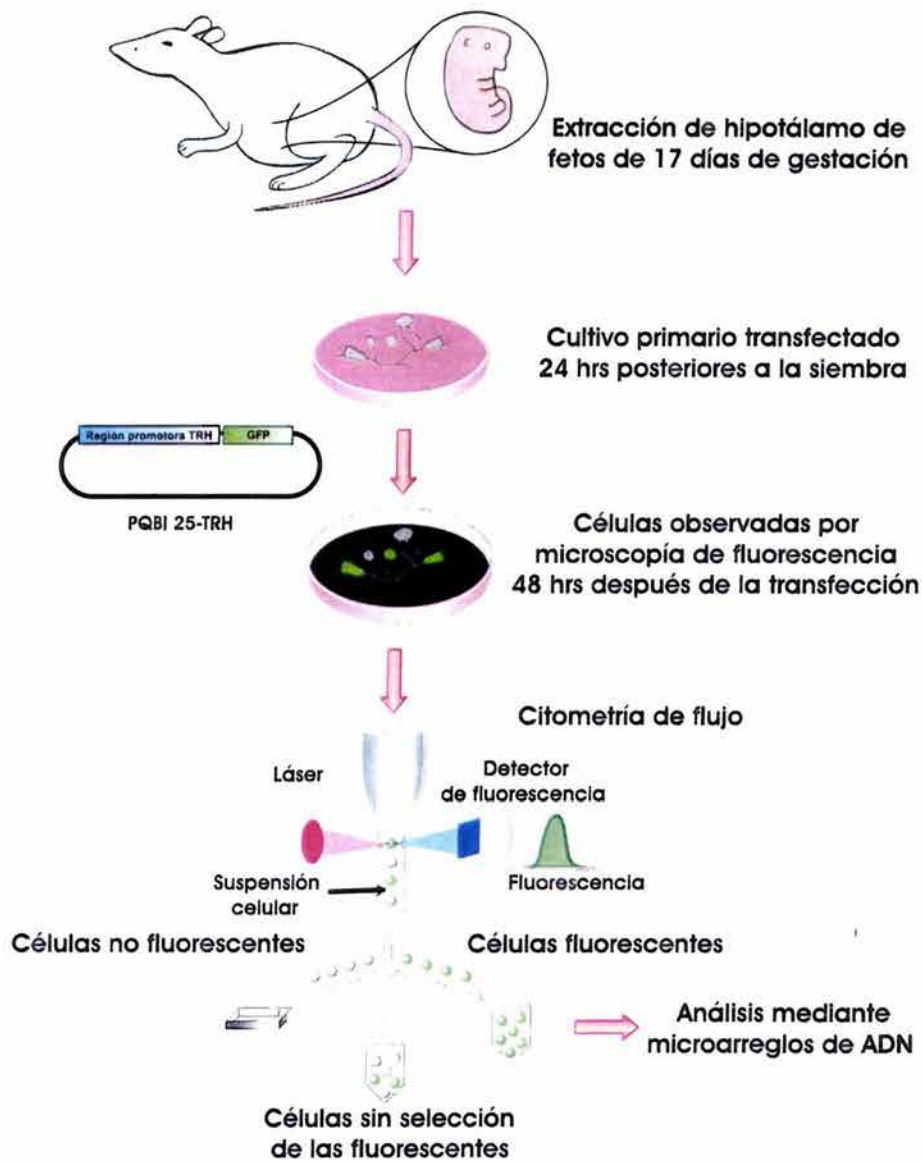


Figura 1. Protocolo para la purificación de neuronas expresando la TRH a partir de cultivos de hipotálamo fetal de rata. Los hipotálamos de fetos de 17 días de gestación son extraídos, las células dispersadas y mantenidas en cultivo. Un día después de su siembra, son transfectadas con los vectores pQBI 25-TRH o pHRGFP-TRH, que dirigen la expresión de la proteína GFP a partir del promotor del TRH. Dos días después, las células que expresan esta proteína emiten fluorescencia. Esta fluorescencia es detectada al pasar las células por el rayo láser de un citómetro de flujo, lo que permite seleccionar las células fluorescentes y recolectarlas simultáneamente. Estas células son almacenadas en una solución que estabiliza el ARN que se emplea para generar el blanco que se hibrida con el microarreglo.

Generación del plásmido phrGFP-TRH.

Se construyó el vector phrGFP-TRH que contiene la secuencia de ADN que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) de *Renilla reniformis* (Stratagene) bajo el control del promotor de TRH. Para ello, el promotor de TRH de rata (-776/+84) escindido del vector pNASS-rTRH-Luc (Balkan, et al., 1998) (EcoRI, BamHI y EcoRV) se subclonó en los sitios EcoRI y BamHI del plásmido pACT2. Finalmente, el fragmento conteniendo el promotor de TRH se clonó en los sitios SacI y BamHI del plásmido phrGFP carente de promotor. El plásmido fue purificado por columnas de cromatografía para maxiprep de Qiagen (Qiagen, EUA), resuspendido en H₂O y almacenado a -20 °C.

Secuenciación del plásmido phrGFP-TRH.

El vector fue secuenciado (ABI Prism 3700 DNA Analyzer, CA, USA). para verificar que el promotor de TRH se encontrara en fase. Se diseñaron para ello con el programa Oligo 4 un par de oligonucleótidos, uno de ellos correspondiente a la región 3' del vector phrGFP y con este se secuenció la región 3' del promotor de TRH: 5'- ATG CAT AGA TCT TCT AGA TA-3' (1-20 pb de phrGFP). El otro oligonucleótido corresponde a la región 5' de phrGFP: 3'- TGC AGG CCG GTG TTC TTC AGG A-5' (133-154 pb de phrGFP).

Purificación del ARN.

Las células recolectadas por citometría de flujo se almacenaron a -80 °C en STAT-60 hasta su utilización. Para extraer el ARN, las muestras fueron descongeladas en hielo y se realizó la extracción siguiendo el protocolo de las Mini columnas "RNeasy" de Qiagen (Qiagen, Valencia California). En cada caso, se les adicionó 0.2 volúmenes de cloroformo y fueron mezcladas con vortex. Posteriormente, se centrifugaron a 16,000 g durante 20-30 min. La fase acuosa fue transferida a otro tubo y se les adicionó una determinada cantidad de H₂O con DEPC o PBS para que todas las muestras tuvieran el mismo volumen final de 100 µl al ser procesadas. Se adicionó a cada muestra 350 µl de buffer RLT (fórmula de Qiagen, al que previamente se le agregó β-mercaptoetanol) por cada 100 µl de solución acuosa y se mezcló con vortex. Posteriormente, se adicionaron 250 µl de etanol (100 %) por cada 100 µl de solución acuosa y se mezcló por medio de

pipeteo (volumen final de 700 µl). No se debe centrifugar después de mezclar. Para recuperar la mayor cantidad posible de ARN en el caso de muestras que contienen baja concentración de este ácido nucleico, fue necesario aplicar dos veces los 700 µl de lisado a la columna de unión de ARN colocada en un tubo de recolección de muestra, en cada aplicación se centrifugó durante 30 seg a 10,000 rpm para recuperar el lisado. Se adicionaron a la columna 700 µl de buffer RW1 (fórmula de Qiagen), se centrifugó brevemente, y se eliminó esta solución. Posteriormente, se adicionaron 500 µl de buffer de lavado RPE (con etanol, fórmula de Qiagen), se centrifugó brevemente y se desechó la solución; este lavado se realiza de 1-3 veces. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de colección y sin aplicar ninguna solución se centrifugó por 2 min a 10,000 rpm para secar la membrana de la columna. Se transfirió la columna a un tubo final de recolección y se aplicaron 30 µl de agua libre de nucleasas (precalentada a 45⁰ C) que permaneció en la columna por 2 min, después de este tiempo, se centrifugó por 2 min a 10,000 rpm para eluir el ARN. Como la concentración de ARN esperada es baja, se aplicaron nuevamente los 30 µl de eluido a la misma columna. Se determinó la concentración usando un BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto CA, EU) y fué almacenado a -80⁰ C.

Síntesis del ARNc.

A) Primer ciclo de amplificación.

Síntesis de ADNc. El ADNc fue sintetizado a partir de ARN total en dos pasos usando el kit de SUPERScript Choice system (GibcoBRL, Rockville, Md) y el primer de transcripción reversa 5'-GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG (T7-(dT)₂₄-3' (Genset, LaJolla, California), que contiene el sitio promotor de la enzima ARN polimerasa T7. **La síntesis de la primera cadena** fue realizada en un volumen de reacción de 20 µl. 200 ng de ARN fueron alineados a 100 pmolas/reacción (1 µl) de primer T7-(dT)₂₄ a 70⁰ C por 10 min y la reacción fue detenida por enfriamiento en hielo durante 2 min. La transcripción reversa se realizó con las concentraciones finales de buffer 1X (50 mM de Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 10 mM de ditiotretitol, 500 µM de cada desoxinucleótido (dNTP: dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 40 U/reacción de inhibidor de RNAsa y la mezcla de ARN-primer T7-(dT)₂₄. La reacción fue incubada a 42⁰ C por 2 min y posteriormente se adicionaron 200

U/ μ l de enzima transcriptasa reversa (SuperScript II). Se continuó la incubación a 42⁰ C durante 1 hora y nuevamente la reacción fue detenida en hielo. **La síntesis de la segunda cadena de ADNc** fue realizada en un volumen final de 150 μ l, incorporando los 20 μ l totales de reacción de la primera cadena. Las concentraciones finales fueron: Buffer 1X (25 mM de Tris-HCl pH 7.5, 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 0.15 mM de dinucleótido de nicotinamida y adenina-beta (β -NAD⁺), 200 μ M de cada dNTP, 10 U/reacción de ADN ligasa (E.Coli), 40 U/reacción de ADN polimerasa (E.Coli), 2 U/reacción de RNasa H. La mezcla fue incubada a 16⁰ C por 2 horas. Para rellenar los extremos de la doble cadena de ADNc, se adicionaron 10 U (2 μ l, 5 U/ μ l) de T4 ADN polimerasa a la reacción y la incubación se continuó a 16⁰ C durante 15 minutos. Para terminar la reacción se adicionaron 10 μ l de 0.5 M de EDTA. La doble cadena de ADNc fue purificada por precipitación con etanol. A la reacción se le adicionó 1 μ l de 5 mg/ml de glicógeno, 0.6 volúmenes de 5 M de NH₄OAc (92 μ l) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (612 μ l). El contenido fue mezclado y centrifugado inmediatamente a 14,000 rpm por 20 min a 4⁰ C. El precipitado fue lavado con 1 ml de etanol al 70 % frío y centrifugado a 14,000 rpm por 5 min a 4⁰ C. Se eliminó el etanol cuidadosamente y se aplicó vacío durante 5-10 min para secar la pastilla que fue posteriormente almacenada a -20⁰ C durante toda la noche antes de proceder a la reacción de transcripción *in vitro* (TIV).

Transcripción *in vitro*. La síntesis de ARNc fue realizada por TIV utilizando el kit de MEGAscript T7 (No. 900182, Ambion, Austin, Texas). La pastilla de ADNc fue resuspendida a T. A. en un volumen final de 20 μ l con los siguientes reactivos: Buffer de reacción de Ambion 1X, 7.5 mM de cada nucleótido (ATP, GTP, CTP, UTP) y la mezcla de enzimas de Ambion. La reacción fue incubada a 37⁰ C durante 4 horas. Para la purificación del ARNc, se adicionaron 80 μ l de H₂O para tener el producto de la transcripción, en un volumen final de 100 μ l y procesarlo utilizando Mini columnas "RNeasy" de Qiagen de acuerdo a las especificaciones del proveedor (protocolo descrito anteriormente para la extracción de ARN). En el último paso de purificación, el ARNc fue eluído con 30 μ l de H₂O DEPC y se determinó la concentración midiendo la absorbancia en 260 nm. El ARNc fue almacenado a -20⁰ C antes de continuar al siguiente paso de amplificación.

B) Segundo ciclo de amplificación.

Síntesis de ADNc. La síntesis de la primera cadena del segundo ciclo de amplificación fue realizada usando también el kit de SUPERScript Choice system en un volumen de reacción de 20 μ l. El ARNc utilizado para la segunda amplificación fue de 100–250 ng. El volumen de la reacción se redujo a 10 μ l por medio de vacío, antes de proceder al siguiente paso en el que el ARNc es mezclado con 1 μ g/reacción (1 μ l) de hexámeros al azar. El ARNc fue desnaturalizado por incubación a 70⁰ C durante 10 minutos y detenida la reacción en hielo por 2 min. A la mezcla de 11 μ l de ARN-primer T7-(dT)₂₄, se le adicionó el buffer 1X (50 mM de Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 10 mM de ditiotreitól, 500 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 40 U/reacción de inhibidor de RNAsa. La reacción fue incubada a 42⁰ C por 2 min y posteriormente se le adicionaron 200 U/ μ l de la enzima transcriptasa reversa (SuperScript II) para un volumen final de 20 μ l. Se prosiguió con la incubación a 42⁰ C durante 1 hora. Al término, se adicionó 1 μ l de RNAsa H (2 U/ μ l) y se incubó 20 min a 37⁰ C. La reacción fue calentada a 95⁰ C por 5 min para desnaturalizar la RNAsa H y separar el híbrido de ADN/ARN. La reacción fue detenida por enfriamiento en hielo. Para la **síntesis de la segunda cadena de ADNc**, a la mezcla que contiene la primera cadena se le adicionó 1 μ l con 100 pmol/ μ l de T7-(dT)₂₄. Fue incubada a 70⁰ C por 10 min y entonces colocada en hielo. Posteriormente, los siguientes reactivos le fueron adicionados en un volumen final de 150 μ l: Buffer 1X (25 mM de Tris-HCl pH7.5, 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 0.15 mM β -NAD⁺), 200 μ M de cada dNTP, 40 U/reacción de ADN polimerasa (E.Coli). La reacción fue incubada a 16⁰ C por 2 horas. Para rellenar los extremos de la doble cadena de ADNc, se adicionaron a la reacción 2 μ l de T4 DNA polimerasa (5 U/ μ l) y fue incubada a 16⁰ C durante 15 minutos más. La limpieza de la doble cadena de ADNc se efectuó por precipitación con etanol con el mismo protocolo descrito anteriormente para la limpieza de la doble cadena de ADNc del primer ciclo de amplificación.

TIV y marcaje de ARNc utilizando un kit para la alta producción de transcritos de ARN (Enzo Bioarray, Farmingdale, NY). 20 μ g de ARNc fueron marcados en un volumen final de reacción de 40 μ l. La mezcla de marcaje consistió en buffer de amplificación 1X, mezcla de ribonucleótidos marcados con biotina 1X (biotina-11-CTP y

biotina-16-UTP), ditiotretitol 1X, inhibidor de RNAsa 1X, T7 ARN polimerasa 1X. La reacción fue incubada a 37⁰ C durante 4 hrs. La limpieza del blanco de ARNc se realizó con Mini columnas “RNeasy” de Qiagen de manera similar a la descrita previamente para el transcrito del primer ciclo de amplificación. Se adicionaron en este caso, 60 µl de H₂O al ARNc (100 µl totales) para efectuar la purificación. Al finalizar el proceso, el producto fue eluído con 50 µl de H₂O DEPC y se determinó la concentración del ARNc producido tomando 2 µl de la reacción a la que se le adicionaron 98 µl de H₂O para medir la absorbancia en 260 nm.

El ARNc biotinilado (40 µg) se fragmentó en una mezcla de reacción de 40 µl conteniendo 40 mM de Tris-acetato pH 8.1, 100 mM de acetato de potasio y 30 mM de acetato de magnesio, se incubó a 94⁰ C por 35 min y se detuvo la reacción en hielo. El tamaño de los fragmentos fue confirmado usando un BioAnalyzer 2100.

Microarreglo.

Se empleó el arreglo de oligonucleótidos U34A de rata de la compañía Affymetrix (Santa Clara, California, USA), que detecta ~7000 genes de rata (*Rattus norvegicus*) y 1000 secuencias de codificación desconocida (EST). Cada chip contiene oligonucleótidos de 25 bases de longitud y cada gen está representado por ~20 oligonucleótidos complementarios obtenidos de toda la región codificadora de ese gen. Para incrementar la especificidad de la detección, cada oligonucleótido complementario (“perfectmatch”) es representado por un oligo imperfecto que contiene un cambio de un sólo nucleótido en su secuencia (“mismatch”) y se encuentra en posición físicamente adyacente en el arreglo. Los microchips fueron hibridados con 20 µg de ARNc (blanco) obtenido de ARN de células TRHérgicas purificadas y cultivos primarios transfectados y no transfectados utilizados como control (ver estrategia experimental).

Hibridación, tinción y detección de la señal del Genechip.

El fragmento de ARNc marcado con biotina fue hibridado al arreglo de acuerdo al protocolo de Affymetrix (Affymetrix Santa Clara, California). La muestra de ARNc fragmentada y marcada fue disuelta en el buffer de hibridación (200 µl) que contenía 100 mM de ácido metanesulfónico (MES), 1 M NaCl, 20 mM de EDTA, 0.01 % de Tween 20, 0.1 mg/ml de ADN de esperma de salmón (Sigma) y 500 µg/ml de albúmina de suero

bovina (BSA) acetilada (Sigma), 50 pM del oligonucleótido control B2 marcado con biotina (5' bioGTC AAG ATG CTA CCG TTC AG 3'), así como una mezcla de ARNc eucarióticos, empleados como controles de la eficiencia de hibridación (Affymetrix) y que fueron procesados como se describe anteriormente utilizando el promotor para la ADN polimerasa T7. Esta mezcla fue desnaturalizada a 99^o C durante 5 min y equilibrada a 45^o C por 5 min más, para después ser inyectada a cada GeneChip. La hibridación se realizó a 45^o C durante 16 hrs, en un horno de hibridación rotatorio (modelo 320; Affymetrix) a 60 rpm. Los arreglos fueron lavados en la estación de fluidos varias veces de manera no rigurosa (suaves) (25^o C) a 60 rpm, con concentraciones variables de buffer 6X SSPE-T (1M NaCl, 0.006 M EDTA, 0.06 M Na₃PO₄, 0.005 % de Triton X-100), MES y Tween 20 para posteriormente realizar varios lavados rigurosos (fuertes) a 50^o C. Los GeneChips fueron teñidos por 15 min a T. A. y 60 rpm con 10 µg/ml de estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes, Inc., Eugene Oregon), en una solución con buffer 6X de SSPE-T y 1 mg/ml de BSA acetilada. La señal fluorescente fue amplificada utilizando una concentración de 3 µg/ml de anticuerpos de cabra anti-estreptavidina biotinilados (Vector Laboratories, Burlingame, California) durante 10 min a T. A. Los Genechips fueron nuevamente teñidos con 10 µg/ml de estreptavidina-ficoeritrina por 15 min a T. A. Posteriormente, fueron lavados 2 veces a T. A. con buffer 6X SSPE-T y la señal detectada con el GeneArray 2500 Scanner (Hewlett-Packard, Santa clara, California), asistido por el programa GeneChip 3.1 (Affymetrix). Las intensidades de las señales fueron medidas para determinar la expresión de los genes, con el empleo del programa Microarray Suite 5.0 (Affymetrix).

Análisis de los datos .

Los datos fueron normalizados para corregir la señal de fondo del microarreglo y analizados utilizando el programa Microarray Suite 5.0 de Affymetrix. Los datos obtenidos son reportados como “promedio de las diferencias” de cada transcrito presente en el GeneChip. Como mencioné anteriormente, cada transcrito o EST es representado por ~20 oligonucleótidos “perfect match” y su correspondiente “mismatch”. El valor del “promedio de las diferencias” de cada transcrito o EST es obtenido del promedio de las señales del “perfectmatch” menos el promedio de las señales del “mismatch”. Las

comparaciones realizadas entre las células TRHérgicas purificadas por FACSVantage fueron reportadas como “veces de cambio” con respecto al control de cultivo primario de hipotálamo transfectado y separada toda la población por FACS. La expresión de los transcritos fue considerada incrementada o disminuida significativamente si 1) el valor normalizado del “promedio de las diferencias” era superior a la señal de fondo del microarreglo y si 2) el número de veces de cambio (nivel de cambio) fue mayor a 1. Los resultados son expresados como el Log_2 del nivel de cambio. Este valor indica el cambio en el nivel de expresión de un transcrito determinado al comparar el control y el experimental. Ej. Un $\text{log}_2 = 1$ indica un incremento de 2 veces.

RT-PCR de un marcador neuronal (Tau) y uno glial (GFAP) de las células fluorescentes purificadas por FACSsort.

Debido a que en el proceso de purificación celular por FACS se obtiene un número reducido de células, se utilizó el protocolo de “células a ADNc” (Ambion, Austin, Texas, EU), para determinar la expresión tanto de TRH como de marcadores neuronales y gliales. Esta estrategia permite hacer la transcripción reversa y la PCR directamente en el lisado celular, sin requerir la purificación de ARN, proceso que representa una limitante debido a la pérdida de material cuando la cantidad de ARN es muy pequeña.

Para realizar la RT-PCR de las células que no son separadas por citometría como es el caso de los cultivos primarios hipotalámicos normales, las células fueron primeramente cosechadas retirando el medio para después ser lavadas con 1 ml de PBS 1X a T. A. e incubadas con 1 ml de tripsina al 1 % en PBS-EDTA (0.53 mM) a 37° C durante 5 min. La reacción fue inactivada con 5 % de suero y las células concentradas por centrifugación a 450 g durante 3 min a T. A., lavadas con PBS 1X, nuevamente centrifugadas y resuspendidas en PBS 1X para determinar con el hemocitómetro el número de células; finalmente, fueron resuspendidas en buffer de lisis (fórmula Ambion, volumen variable). En el caso de las células purificadas por FACS, el número de células es determinado por el citómetro y las células recolectadas son centrifugadas y la pastilla resuspendida en buffer de lisis (fórmula Ambion, volumen variable). A partir de este punto, todas las muestras fueron procesadas de la misma forma: Incubadas 5 min a 75° C

para lisar las membranas celulares e inactivar las RNAsas endógenas y el lisado crudo fue tratado por 30 min a 37⁰ C con 1 µl de DNAsa I por cada 50 µl de buffer de lisis (concentración final de 0.04 U/µl) para degradar el DNA genómico. Posteriormente, la enzima es inactivada a 75⁰ C durante 5 min.

El ARN fue transcrito reversamente a partir de 5 µl de lisado celular, adicionando 4 µl de dNTP (2.5 mM cada uno), 2 µl de oligo dT (50 µM en TE) y ajustado el volumen a 16 µl con H₂O libre de nucleasas, se mezcló el tubo y calentó 3 min a 85⁰ C. Se colocó en hielo durante 1 min, se centrifugó brevemente y se adicionaron 2 µl de buffer 10 X de transcripción reversa, 1 µl de transcriptasa reversa MMLV y 1 µl de inhibidor de RNAsas (10 U/µl). Se mezcló nuevamente y se incubó a 42⁰ C por 1 hora.

Para el ensayo de PCR, se tomaron 5 µl de la reacción de transcripción reversa, a los que se les adicionó 5 µl de buffer de PCR 10 X, 4 µl de dNTP (2.5 mM cada uno), 1.25 unidades de DNA polimerasa y 50 picomolas de oligonucleótidos para la amplificación con los siguientes primers: Tau sentido: 5'-GGT GAG GGA TGG GGG TGG TA-3' (2179-2198 pb), tau antisentido 5' GTG ACT GGC TCT CGT GGC A-3' (2278- 2297 pb) (Sadot et al., 1994), producto de 119 pb. Para GFAP sentido: 5'-ACC TCG GCA CCC TGA GGC AG-3' (459-478 pb), GFAP antisentido 5' CCA GCG ACT CAA CCT TCC TC-3' (580-599 pb) (Hoshimaru, et al., 1996). Producto de 141 pb.

Para la estandarización de ambos pares de oligonucleótidos se hicieron amplificaciones de 25, 30 y 35 ciclos. El programa de amplificación para Tau consistió de un ciclo a 94⁰ C por 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificación, cada ciclo consistió en: 94⁰ C por 1 min, 55⁰ C por 1 min y 72⁰ C por 2 min. Por último una extensión de 72⁰ C por 15 min. Para GFAP el programa fue también de 35 ciclos a 94⁰ C por 2 min, 60⁰ C por 2 min, 72⁰ C por 2 min y una extensión de 72⁰ C por 10 min. Para analizar el producto de RT-PCR se cargaron alícuotas de 10 µl en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio y las bandas visualizadas con luz UV.

RT-PCR de mensajeros observados con diferencias significativas en los microarreglos.

Las células fluorescentes purificadas y sin purificar fueron procesadas como se describe anteriormente por el protocolo para pequeña cantidad de material biológico con el sistema de “células a ADNc”.

Para la amplificación de TRH y G3PDH (control interno) se utilizaron las condiciones descritas en el capítulo 2 y/o 3.

Los siguientes primers de oligonucleótidos (excepto neurofilamento H) fueron diseñados de acuerdo a las secuencias disponibles en el “GenBank”:

Neurofilamento-H sentido 5'-GCA CAG ACC AAA AGA CAG CC-3' y antisentido 5'-GGG GGC AGT TTT TAG TCA CGC-3', producto de 380 pb (Sotelo-Silveira, et al, 2000). **Gene regulado positivamente por la 1,25-dihidroxitamina D3** sentido 5'-CTG ATG GAG GCA CAG TGA GA-3' y antisentido 5'-CTC GGG TGG AGT GCT TAG AG-3', producto de 184 pb; **factor-4 similar a kruppel (KLF4)** sentido 5'-CTG AAC AGC AGG GAC TGT CA-3' y antisentido 5'-GTG TGG GTG GCT GTT CTT TT-3', producto de 218 pb; **colágena** sentido 5'-GTC CAC GAG GTG ACA AAG GT-3' y antisentido 5' -CAT CTT TTC CAG GAG GTC CA-3', producto de 189 pb; **GFP** sentido 5'-CTT CGC CTT CGA CAT CCT GA-3' y antisentido 5'-AGG CCG GTG ATG GTC TTC TT-3', producto de 264 pb. La amplificación de neurofilamento H, del gen regulado positivamente por la 1,25-dihidroxitamina D3, la colágena, y la GFP, se realizó durante de 30 ciclos de amplificación. Cada ciclo consistió en una desnaturalización a 94° C por 1 min 15 segundos, alineamiento a 60° C por 1 min y extensión a 72° C por 2 min, seguido por un ciclo final de extensión a 72° C por 10 min. En el caso del factor-4 similar a kruppel, la única diferencia en el proceso de PCR fue la temperatura de alineamiento a 64° C. Para la estandarización se hicieron amplificaciones de 20, 25, 30 y 35 ciclos para cada par de oligonucleótidos. Para analizar el producto de RT-PCR se cargaron alícuotas de 15 µl en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio y las bandas visualizadas con luz UV.

RESULTADOS

I. Análisis de la expresión de Tau y GFAP en las células purificadas por FACSORT.

Los ensayos de aislamiento de las células TRHérgicas usando el FACSORT demostraron un 60 % de enriquecimiento. Para corroborar estos datos realizamos ensayos de RT-PCR para el ARNm de Tau (marcador neuronal) y GFAP (marcador glial). Empleamos en estos ensayos como control interno a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y estimamos los niveles de expresión a través de densitometría.

Debido a que la expresión del vector transfectado o al estrés físico al que es sometida la célula, podrían disminuir o abatir los niveles de los ARNm endógenos, se utilizaron los siguientes controles en los ensayos de RT-PCR:

A) Cultivos primarios hipotalámicos no transfectados.

B) Cultivos transfectados con pQBI 25-TRH no pasados por FACS.

En **A** y **B** las células fueron cosechadas al tercer día en cultivo, tiempo similar a cuando se les somete a purificación.

C) Cultivos transfectados con pQBI 25-TRH y pasada por FACS toda la población sin selección de las fluorescentes.

D) Células transfectadas pero seleccionada por FACS la población sin fluorescencia (GFP negativas).

Tau, es una proteína asociada a microtúbulos (MAP) involucrada en el crecimiento de neuritas. Se localiza únicamente en el cuerpo celular y la porción proximal del axón de neuronas en desarrollo y es considerada por lo tanto un marcador neuronal (Litman, 1993). Las condiciones de PCR utilizadas son las reportadas por Sadot et al (1994), pero fue necesario determinar el número de ciclos (35) para visualizar una banda específica en nuestras condiciones de cultivo. Los resultados indican que las células fluorescentes purificadas contienen el mayor nivel de expresión del ARNm de Tau, siendo 88 % superior respecto a los diferentes controles de células no purificadas que es equivalente al 100% (**Fig. 1**).

La **GFAP** es una proteína que pertenece al grupo III de filamentos intermedios y es marcador de astroglia en el sistema nervioso central, por lo que es usada ampliamente como marcador de células gliales (Steinert and Roop, 1988). Realizando la PCR por 35 ciclos, observamos que las células purificadas contienen el menor nivel de expresión del ARNm de GFAP (32 %) con respecto a los diferentes controles de células no purificadas (100 %)(Fig. 2).

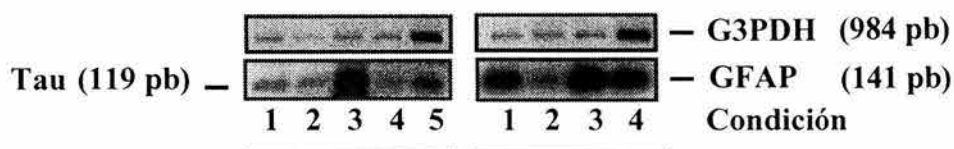


Figura 2. RT-PCR de G3PDH, Tau y GFAP realizado a partir del ARN de células purificadas por FACS y controles sin purificar. Para **Tau**: carril 1: células de cultivo primario no transfectadas (NT); carril 2: células GFP; carril 3: células purificadas (PF+); carril 4: células de cultivo transfectado sin pasar por FACS; carril 5: células de cultivo primario transfectadas y pasadas por FACS sin selección de las fluorescentes (PF±). Para **GFAP**: carril 1: células de cultivo primario no transfectadas (NT); carril 2: células purificadas (PF+); carril 3: células de cultivo transfectado sin pasar por FACS; carril 4: células de cultivo primario transfectadas y pasadas por FACS sin selección de las fluorescentes (PF±).

El análisis por PCR sugiere que la población celular enriquecida por citometría de flujo es neuronal, además de sugerir que no se afectó drásticamente el estado general del ARN de las células sometidas al proceso de transfección y separación por FACS, verificado por la expresión de otros ARN'sm distintos al de la TRH.

II. Purificación de las células TRHérgicas por FACSVantage.

La GFP de *Aequoria victoria* es actualmente muy utilizada como marcador de células vivas en estudios de transfección transitoria, sin embargo, la producción de líneas celulares estables puede ser complicada debido a su citotoxicidad. Existen antecedentes que indican la inducción de muerte celular cuando la GFP es excitada por periodos largos, en los que se generan radicales libres tóxicos para la célula (Clontech, 1996;

Hanazono et al, 1997; Liu et al, 1999). De mayor relevancia es el hecho de que estudios realizados utilizando microarreglos de ADN en la línea celular HeLa, demuestran cambios en la expresión génica de alrededor de 2000 genes (la mayoría relacionados con muerte celular). Estas diferencias no eran visibles por microscopía de fluorescencia, pero se determinó que eran debidas únicamente a la expresión de la proteína verde, al no observarse variaciones de expresión en el microarreglo hibridado a partir del blanco de células transfectadas con un vector que expresaba la GFP de *Renilla reniformis* (Stratagene 2000). Si bien en nuestras condiciones, la expresión de la GFP de *Aequoria* no altera la sobrevivencia celular, no podemos descartar la posibilidad de que ocurran cambios a nivel génico. Esto podría únicamente ser determinado comparando un microarreglo hibridado con el blanco generado a partir de células transfectadas con el plásmido pQBI 25-TRH que contiene la GFP de *Aequoria* con otro que haya sido hibridado con el blanco sintetizado de las células transfectadas con el vector que contenga la GFP no citotóxica; sin embargo, un análisis así resulta problemático por el costo de los arreglos. Una estrategia alternativa fue clonar un nuevo vector con el promotor de TRH dirigiendo la expresión de la GFP de *Renilla reniformis*: phrGFP-TRH.

La eficiencia de transfección, así como el nivel de fluorescencia con el nuevo plásmido analizado por FACS es similar (0.4 %) a la obtenida con pQBI 25-TRH usando el protocolo descrito en el capítulo 4.

El mayor porcentaje de pureza de las células TRHérgicas utilizando el FACSort fue de 60 % (ver capítulo 4). A pesar de realizar diferentes modificaciones durante la estandarización de la purificación, no fue posible incrementar este porcentaje. Aunque se trata de un enriquecimiento alto, se requieren mayores niveles de pureza para determinar el perfil transcripcional del fenotipo TRHérgico. El FACSort empleado es un modelo básicamente de utilidad preparativa, por lo que era posible que el no obtener mayor pureza se debiera a las limitaciones propias del aparato de citometría empleado. Por esta razón, decidimos realizar la separación celular en otro citómetro, el FACSVantage, conocido por su alta eficiencia de purificación al operar bajo un principio de enriquecimiento celular diferente al empleado por el FACSort. En este caso, las células no son tomadas por un tubo colector, sino que la región de flujo donde va la célula se carga positiva (célula fluorescente) o negativamente (célula no fluorescente) al pasar por

el láser. Las células son seleccionadas con base a esa carga en el momento en que llegan a un magneto; este sistema es llamado “separación de alta eficiencia”. Con este sistema fue posible incrementar la pureza de las células TRHérgicas hasta el 94 %, valor confiable para realizar la caracterización del perfil TRHérgico transcripcional (**Fig. 3**).

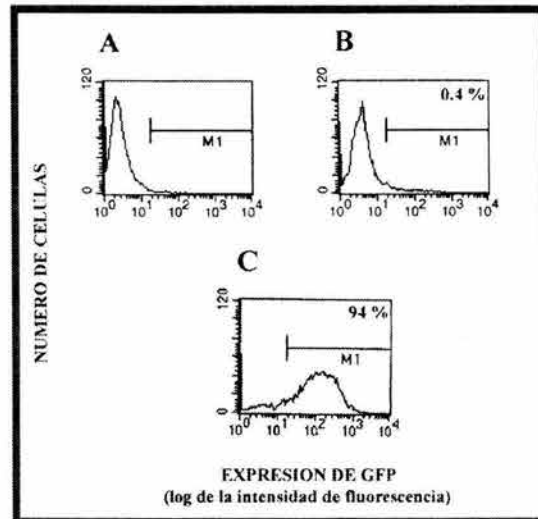


Figura 3. Análisis por FACS antes o después de la citometría preparativa por FACSVantage de células transfectadas. Al DIV 1, las células fueron transfectadas sin plásmido (A), o con phrGFP-TRH (B y C). Al DIV 3, las células fueron analizadas por FACS (A-B) o purificadas y re-analizadas por FACS (C). M1= región de células GFP⁺. Los porcentajes en B y C indican el % de células fluorescentes.

III. Análisis del fenotipo TRHérgico por microarreglos.

El análisis por microarreglos indicó 21 transcritos que fueron incrementados o disminuídos significativamente en los dos microarreglos de células TRHérgicas: La **tabla I** describe estos transcritos y su nivel de cambio.

Identificador de Affymetrix	Transcrito	Nivel de cambio de expresión	Función
rc_AI014135_g_at	Secuencia transcrita	3.08	Desconocida
rc_AI639488_at	Secuencia transcrita con similaridad a pir:A42772	3.03	Desconocida
rc_AA818677_at	<u>Neurofilamento H</u>	2.88	Soporte estructural neuronal
rc_AI014169_at	<u>Gen regulado positivamente por la 1,25-dihidroxitamina D3</u>	2.58	Desconocida
rc_AA892647_at	Secuencia transcrita con similaridad a pir:I48404 (Histona 4)	2.43	Desconocida
L26292_g_at	<u>Factor 4 similar a Kruppel</u>	2.18	Factor transcripcional
rc_AI639457_g_at	Secuencia transcrita	2.05	Desconocida
rc_AA893870_g_at	EST197673 de ADNc del extremo 3' de Rattus norvegicus	1.98	Desconocida
rc_AA858520_at	Folistatina	1.75	Inhibidor de la FSH
M63282_at	Factor de activación de la transcripción 3	1.70	Factor transcripcional
rc_AI639510_at	Secuencia transcrita	1.70	Desconocida
X06769cds_g_at	c-fos	1.55	Factor transcripcional
rc_AI072943_at	Secuencia transcrita	1.55	Desconocida
rc_AI172476_at	Gen inducido tempranamente por TGFβ	1.50	Factor transcripcional
M13101cds_f_at	Región larga interespaseada de ADN repetitivo, LIN4 (L1Rn)	1.45	Desconocida
M13100cds#1_g_at	Región larga interespaseada de ADN repetitivo, LIN3 (L1Rn)	1.23	Desconocida
S63521_i_at	Proteína GRP78 regulada por glucosa	1.15	Respuesta a estrés
X05472cds#2_at	Región terminal repetida de 2.4 kb de ADN de rata	1.13	Desconocida
M73049_at	Intermexina alpha	0.83	Soporte estructural neuronal
Z78279_g_at	<u>Colágena Tipo I alpha 1</u>	-1.68	Soporte estructural glial
X70369_s_at	Colágena Tipo III alpha 1	-2.10	Soporte estructural glial

Tabla I. Relación de transcritos con diferencias significativas en los microarreglos provenientes de células purificadas (PF+), comparado con los microarreglos de células de cultivos primarios transfectadas y pasadas por FACS sin selección de las fluorescentes (PF±) (n=2). Los datos son el log₂ del nivel de cambio (ej. un log₂ =1, indica un incremento de 2 veces en la expresión). Los transcritos que se encuentran subrayados fueron corroborados por RT-PCR.

IV. Análisis por RT-PCR de la expresión de transcritos observados con diferencias significativas en los microarreglos.

La aplicación de métodos como el de microarreglos para analizar a nivel transcripcional problemas neuronales específicos está siendo cada vez más utilizado. Sin embargo, el número de transcritos identificados con este sistema es grande, de manera que resulta complicado estudiar cada uno de ellos a detalle, pero sin duda, indican el camino para nuevas y futuras investigaciones. Como un paso inicial, nosotros corroboramos por RT-PCR algunos de los transcritos significativos con un nivel de cambio mayor a 2 entre las células TRHérgicas purificadas y el control de células de cultivo primario transfectadas y pasadas por FACS sin selección de las fluorescentes (PF±).

Los cambios en los niveles de expresión de los transcritos obtenidos con los microarreglos, fueron consistentes con el análisis por RT-PCR. Para cada amplificación los controles de células de cultivo primario no transfectadas (NT) y células de cultivo primario transfectadas y pasadas por FACS sin selección de las fluorescentes (PF±), representan el 100%. En el caso de neurofilamento H, el incremento fue de 610 %; por el contrario, no hubo expresión de colágena tipo III alpha 1 en las células purificadas, mientras que si está presente en los controles de células no purificadas (NT y PF±). El gen regulado positivamente por la 1,25-hidroxivitamina D3 muestra un incremento de 552 %, similar al factor-4 similar a kruppel (KLF4) con un incremento de 513 %. El valor del control interno G3PDH se mantuvo constante en las 3 diferentes muestras (**Fig. 4**).

Un hecho que nos llamaba la atención del análisis por microarreglo fue que el transcrito de TRH no está presente a pesar de que esta es la población enriquecida. Una posibilidad es que la expresión del vector exógeno disminuye de manera importante la expresión del gen endógeno y esto ocasiona bajos niveles que son indetectables por el ensayo de microarreglo. Para verificar esta posibilidad, realizamos un ensayo de RT-PCR cuya sensibilidad es mayor a la del microarreglo. En las células purificadas por FACS se obtuvo un incremento de 300 % en la expresión de TRH con respecto al 100 % del control de células de cultivo primario transfectadas y pasadas por FACS sin selección de las fluorescentes (PF±) (**Fig. 4**). Este resultado confirma la expresión de TRH en las

células purificadas. Sin embargo, por la sensibilidad de la RT-PCR, se esperaba que el nivel de cambio fuera mayor, lo que sugiere que su ausencia en los microarreglos se debe a una competencia por la maquinaria transcripcional entre el promotor transfectado y el endógeno. Por otra parte, ensayos de PCR en los que se amplificó a la GFP en las células purificadas y células control de cultivo primario transfectadas y pasadas por FACS sin selección de las fluorescentes (PF±) corroboran la competencia por la transactivación de los promotores. En este mismo ensayo se observa una disminución de la expresión de TRH endógeno en las células transfectadas (PF±) respecto al cultivo normal sin transfectar (NT), al mismo tiempo que se aumenta la GFP en las células transfectadas (PF±) (Fig. 4).

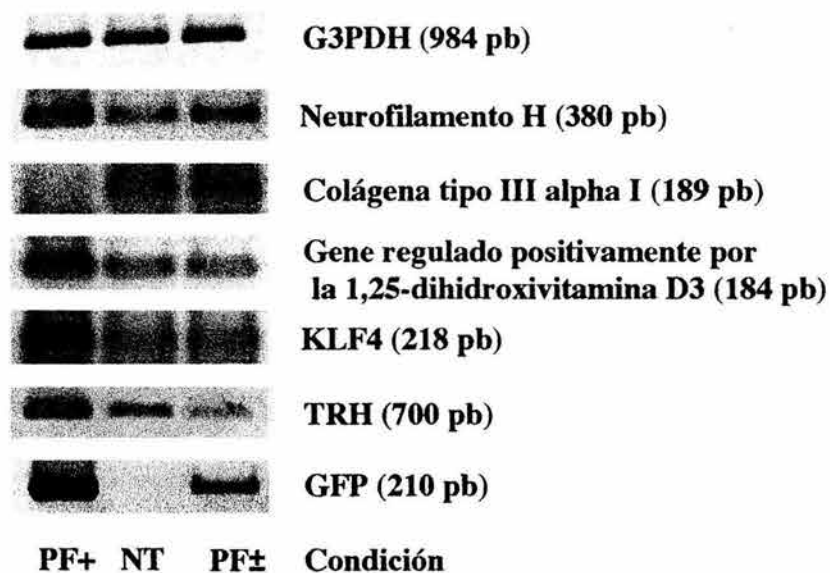


Figura 4. RT-PCR de neurofilamento H, colágena tipo III alpha 1, gene regulado positivamente por la 1,25-hidroxitamina D3, KLF4, TRH y GFP realizado a partir del ARN de células purificadas por FACSvantage y controles sin purificar. Carril 1: células purificadas (PF+); carril 2: células de cultivo primario no transfectadas (NT); carril 3: células de cultivo primario transfectadas y pasadas por FACS sin selección de las fluorescentes (PF±). Como control interno se amplificó la G3PDH.

DISCUSION

Uno de los mayores retos para el estudio de las bases moleculares que conducen a la especificación de un fenotipo en el SNC es su diversidad celular (McConnell, 1995). En este estudio, determinamos el transcriptoma del fenotipo neuronal TRHérgico hipotalámico mediante el empleo de microarreglos de oligonucleótidos. Analizamos la expresión transcripcional de este tipo celular en etapa de diferenciación terminal seleccionando por citometría de flujo, a las células TRHérgicas a partir de cultivos primarios hipotalámicos.

El análisis por microarreglos indicó que 21 transcritos se expresan específicamente en las células TRHérgicas. El transcrito de función conocida con mayor diferencia de expresión en el microarreglo es el neurofilamento H, filamento intermedio que se expresa únicamente en células neuronales (Schwartz et al, 1994). Este incremento fue corroborado por RT-PCR. Ensayos similares de RT-PCR demuestran también el enriquecimiento del marcador neuronal Tau en células purificadas. Validamos también por esta técnica, un transcrito que disminuyó su expresión, el de la colágena tipo III, alpha 1, la cual se expresa en células gliales (Bunge et al, 1980; Greenberg et al, 1980) y no existe hasta ahora algún reporte que describa su localización en neuronas. Ensayos de RT-PCR demuestran también la disminución de la expresión de la proteína glial GFAP en células purificadas por FACSORT. Estos resultados indican que la población celular purificada por citometría a partir de cultivos hipotalámicos transfectados con el vector que contiene el promotor de TRH fusionado a la GFP es neuronal.

Posible función de la 1,25-dihidroxitamina D3 en el fenotipo de TRH.

De manera interesante, el microarreglo mostró la expresión del transcrito regulado positivamente por la 1,25-dihidroxitamina D3. Respecto a esto, se ha reportado que la administración de esta vitamina incrementa en un 50 % los niveles del péptido de TRH en el hipotálamo de ratas adultas (Tornquist y Lamberg, 1983). Esto sugiere, que la vitamina D puede tener una participación directa sobre la expresión de TRH.

La función clásica reconocida de la vitamina D3, es la de regular la homeostasis de calcio y fosfato en el plasma (intestino, hueso y riñón entre otros), así como la

formación del hueso (revisado en Darwish y DeLuca, 1993), sin embargo, recientemente se le han implicado acciones en tejidos como el cerebro que no tienen relación con esta función.

La vitamina D3 puede ser obtenida de la ingesta o ser sintetizada en la piel a partir de una hormona precursora en una reacción catalizada por la luz ultravioleta del sol. Esta forma es biológicamente inactiva en el plasma y se requiere de 2 reacciones enzimáticas para dar lugar a la 1,25-dihidroxitamina D3, reacciones que son catalizadas por la D3 25-hidroxilasa y la 25-hidroxitamina D3-1 α -hidroxilasa expresadas en el hígado y el riñón respectivamente (revisado en Sutton y MacDonald, 2003). Recientemente, se determinó, que ambas enzimas son sintetizadas en el cerebro de rata (Hosseinpour y Wikvall, 2000; Zehnder et al, 2001). La enzima que inactiva a esta vitamina, la D3 24-hidroxilasa también se expresa en tejido cerebral (Naveilhan et al, 1993). Por lo anterior, actualmente se considera que la biosíntesis y degradación de la vitamina D3 se lleva a cabo de forma local en el cerebro, sin requerirse de la forma activa del plasma. En las células blanco que no sintetizan la vitamina D3, ésta es internalizada por difusión.

Los efectos biológicos de la 1,25-dihidroxitamina D3 son mediados por su receptor (RVD), que es similar a otros receptores de hormonas esteroideas como el de glucocorticoides y progesterona localizados en el citosol y transportado al núcleo posteriormente a la unión de su ligando (Auricchio, 1989). La expresión del RVD ha sido determinada en el cerebro y específicamente en el hipotálamo de embriones de ratas a partir del E12 (Veenstra et al, 1998) y en el hipotálamo de ratas adultas (Prufer et al, 1999).

La actividad de RVD inicia al heterodimerizar con el receptor de ácido retinoico (receptor nuclear); en esta conformación se unen a sus elementos de respuesta en el promotor de genes que responden a la vitamina D3 (ERVD), lo que resulta en la activación o inhibición transcripcional. Estos elementos de respuesta están constituidos por 2 secuencias hexaméricas repetidas ricas en guanina que están separadas por una pequeña secuencia de 3 nucleótidos (revisado en Darwish y DeLuca, 1993). A nivel del elemento de respuesta génica, se ha demostrado que la regulación del promotor de osteocalcina, un gen responsable de la diferenciación del osteoblasto en el hueso se lleva a cabo por un mecanismo complejo de remodelación de la cromatina regulado por la

vitamina D3 (Paredes et al, 2002). La unión de la vitamina D3 a su receptor activa la transcripción al remover el nucleosoma presente en la región 5' del ERVD en el promotor, lo que permite la unión del receptor en forma de heterodímero. En este proceso intervienen diferentes proteínas coreguladoras como WINAC y WSTF (Paredes et al, 2002).

Desconocemos si el promotor de TRH contiene el ERVD, pero de estar presente, este mecanismo de regulación podría estarse llevando a cabo directamente en el promotor de TRH o en promotores de otros genes de la célula TRHérgica, cuyos productos podrían regular la expresión del tripéptido.

Se desconoce hasta ahora la función del gen regulado por la 1,25-dihidroxitamina D3 y que fue identificado en el análisis por microarreglo en las células TRHérgicas, sin embargo, por todo lo mencionado anteriormente es factible que participe en el complejo de expresión transcripcional probablemente como un coregulador, pero esto es algo que necesita ser comprobado. Actualmente, existen estudios que señalan la relevancia de la vitamina D3 como reguladora de la expresión de ciertos genes como el NGF, específicamente en el SNC. La síntesis de NGF (ARNm y proteína) es incrementada en neuronas hipocampales en desarrollo (Brown et al, 2003) y en ratas adultas (Saporito et al, 1994). También se conoce su participación en la regulación de neurotransmisores como dopamina, cuya concentración en la corteza cerebral e hipotálamo se incrementa en respuesta a la hormona D3 en ratas adultas (Baksi y Hughes, 1982).

No descartamos la posibilidad de que el papel de la vitamina D3 como posible regulador de la diferenciación, se deba no únicamente a incrementar la expresión de la TRH, sino también por la regulación de moléculas que participan en la proliferación celular. La acción de la vitamina D3 en diferenciación ha sido reconocida en un amplio rango de células cancerosas como las de mama o próstata, leucemia mieloide, líneas celulares neoplásicas y carcinomas de colon (Garcion et al, 2002). El mecanismo molecular de acción aún se encuentra en estudio, pero se sabe que la vitamina D3 impide la mitosis por disminuir la expresión de proteínas que intervienen en mediar la progresión del ciclo celular como las ciclinas D1, B1 y la proteína de retinoblastoma (pRb) en

células promielocíticas (Laud et al, 1997). También ejerce un incremento en la expresión en los genes antimitóticos p21 y p27 en una línea celular (Rots et al, 1999).

El proceso de diferenciación es el resultado de un balance entre señales positivas que inducen la expresión de genes neuronales y señales negativas que inhiben la proliferación celular para con ello mantener el fenotipo neuronal. Por lo tanto, dada la participación de la vitamina D3 en otros sistemas como los descritos anteriormente, es posible que esta regule el fenotipo TRHérgico al inducir la expresión de TRH directamente o de otros genes neuronales importantes para este fenotipo. El hecho de que la vitamina D3 se expresa en etapa adulta sugiere que participe en el mantenimiento del fenotipo inhibiendo señales antiproliferativas.

Aun falta por comprobar la relevancia fisiológica de esta hormona en nuestras condiciones pero de llevarse acabo podría permitir en un futuro el regular la expresión de TRH en algunos problemas fisiológicos en los que los niveles del péptido se encuentren disminuídos como en el hipertiroidismo.

Posible función del factor-4 similar a kruppel (KLF4) en el fenotipo de TRH.

El análisis por microarreglo indicó también la inducción en la expresión de manera significativa de 3 factores transcripcionales que han sido relacionados directamente en mediar eventos de diferenciación celular: KLF4, el factor activador de la transcripción 3 (ATF3) y el gen inducido tempranamente por TGF β (TIEG). De ellos corroboramos por PCR a KLF4 porque su expresión en el microarreglo era mayor.

El KLF4 es llamado así por su homología con la proteína kruppel descrita en *Drosophila*. Pertenece a una familia de factores que contienen secuencias que coordinan moléculas de zinc (3 dedos de zinc) (Shields, 1996) y que se unen a la secuencia consenso 5' -CACCC- 3' (Turner y Crossley, 1999). Diferentes estudios realizados sobre este factor lo señalan como un regulador de la proliferación y diferenciación. Se ha demostrado su participación en procesos de diferenciación celular inicialmente en el intestino, donde su expresión está relacionada con el estado de arresto celular (Shields, 1996). En fibroblastos NIH3T3 se expresa únicamente durante el arresto celular y su sobreexpresión inhibe la proliferación de estas células, así como las de una línea celular de cáncer de colon, la HT29 (Shields, 1996; Shie et al, 2000).

En la epidermis, KLF4 regula la diferenciación terminal de la piel (se expresa en células epiteliales post-mitóticas). Ratones “knockout” de KLF4 mueren 15 horas después del nacimiento por defectos en la función protectora de la piel como lo demuestra la penetración y pérdida de fluidos (Segre et al, 1999). El KLF4 inducido por TGF β actúa sobre el fenotipo celular del músculo vascular liso (vena aorta) al regular la expresión de genes específicos en estas células como actina SM α y calponina en etapa neonatal de ratas (King et al, 2003).

Su expresión analizada por ISH se observa de manera abundante en el tracto gastrointestinal y la piel desde el E10.5 en ratones y en menor proporción en el mesénquima cefálico. En estructuras cerebrales su expresión no ha sido analizado detalladamente, sólo se ha reportado en las meninges del cerebro anterior en el E16.5 (Ohnishi et al, 2000). Nuestra observación de la expresión de kruppel en cultivos primarios de hipotálamo y en neuronas TRHérgicas es el primer reporte de su detección en el SNC.

Se han elucidado varios mecanismos moleculares por los que KLF4 regula la diferenciación terminal y la salida del ciclo celular. Se ha determinado que KLF4 activa directamente genes de diferenciación tardía como la keratina 4 en líneas celulares originadas de epitelio escamoso del esófago, (Okano et al, 2000). Por otra parte, se ha demostrado que KLF4 se une y transactiva directamente a la proteína p21 que es inhibidora de las cinasas dependientes de ciclinas, lo cual resulta en el arresto del ciclo celular en la transición de G1-S. También se ha observado que KLF4 reprime a la ciclina D1 *in vitro* cuando se une a su promotor (Shie et al, 2000).

La regulación que probablemente ejerza KLF4 sobre el fenotipo TRHérgico puede ser similar al reportado: a) regulando directamente la expresión de la TRH al unirse a su elemento consenso dentro del promotor. De hecho, se ha descrito anteriormente que KLF4 puede unirse al sitio de SP1, otro miembro de la familia de factores transcripcionales de dedos de zinc y presente en el promotor de TRH (Maue 1990), o b) inhibiendo la expresión de genes involucrados en proliferación celular.

Si bien los datos obtenidos por microarreglo y RT-PCR además de los antecedentes bibliográficos proveen de múltiples caminos para investigación futura, se

requieren experimentos para determinar la participación *in vitro e in vivo* de la vitamina D3 y kruppel.

Posible función de otros factores de transcripción en el fenotipo de TRH.

A) Gen inducido tempranamente por TGF β (TIEG).

Otro transcrito presente en las células TRHérgicas pero que no fue corroborado es TIEG, un factor de transcripción similar a kruppel descrito recientemente (Subramaniam et al, 1995) y que debe su epónimo a ser regulado por el factor de crecimiento tumoral beta (TGF β). El TGF β ha sido implicado durante el desarrollo, la función inmune y la diferenciación (Massagué et al, 2000). Estudios publicados en relación al hipotálamo, indican su participación en la regulación del eje neuroendócrino. TGF β incrementa la expresión de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LH-RH) (Melcangi et al, 1995) y disminuye la de la hormona liberadora de gonadotropos (GnRH) (Bouret, 2000). También se ha determinado su participación en la disminución de los niveles del ARNm de proopiomelanocortina (POMC) en el núcleo arcuato (Bouret et al, 2001). En esta estructura cerebral, el TGF β es secretado por astrocitos y los núcleos con mayor expresión son el PVN y supraóptico (Gao et al, 2000).

Los eventos que conducen a la regulación de las diferentes hormonas en estos ejemplos hipotálamicos no se ha determinado, pero se conoce la vía clásica de señales que sigue TGF β . El ligando se une a un complejo integrado por dos receptores del tipo serina-treonina cinasas conocidos como TGF β I y TGF β II. La activación directa del receptor tipo II por el ligando da como resultado la unión del receptor tipo I a la superficie celular y ser fosforilado por el receptor tipo II. Por su parte el receptor tipo I fosforilado activa a su vez por fosforilación a las proteínas Smad 2 y 3. Las Smad activadas son liberadas del complejo de receptores y se asocian con Smad 4 en el citosol para de esta forma ser translocadas al núcleo, donde regulan la expresión de genes. La regulación negativa de esta vía es efectuada por la proteína Smad 7 que se une al receptor tipo I e impide su activación (Massagué et al, 2000). La participación de TIEG en la cascada de señales consiste en inhibir la transcripción de la proteína inhibitoria Smad 7

(Johnsen et al, 2002a) e incrementar la expresión de Smad 2 (Johnsen et al, 2002b), lo que permite a TGF β realizar su efecto.

Ambos receptores del TGF β así como las proteínas Smad 2 y 3 se expresan en el hipotálamo (Bouret et al, 2001). El transcrito de TIEG no ha sido estudiado en el cerebro, sin embargo, un mecanismo de regulación similar al descrito por Johnsen podría estarse llevando a cabo en las células TRHérgicas (Johnsen et al, 2002a y b). Las células que expresan TRH pueden ser parte de la población hipotalámica expresando los diferentes miembros de la vía de señales de TGF β (receptores y Smad's).

B) Factor de activación de la transcripción 3 (ATF3).

ATF3 es un factor transcripcional que pertenece a la familia de la proteína que se une al elemento de respuesta a AMPc (CRE) y que está compuesta por una secuencia (cierre) de leucinas. La familia ATF/CREB se une al elemento de respuesta CRE dentro del promotor de los genes que regulan. ATF3 se expresa en el cerebro (Natale et al, 2003) pero no se ha estudiado en detalle en estructuras específicas como el hipotálamo. ATF3 es un gen inducible por estrés y en el cerebro se incrementa su expresión por daño celular (Mason et al, 2003). Recientemente, se demostró en células epiteliales que ATF3 es inducido por TGF β y que formando un complejo con Smad 3 directamente reprimen la expresión de la proteína Id1 implicada en la salida del ciclo celular (Kang et al, 2003). La función de ATF3 en las células TRHérgicas es probable sea similar a la descrita en otras regiones al regular negativamente la expresión de genes que impiden la diferenciación (Hai y Hartman, 2001) o alternativamente, podría regular directamente al promotor de TRH que contiene el elemento de respuesta a esta familia de factores transcripcionales (Lee et al, 1989). Es posible que bajo algún estímulo, ATF3 se una al promotor de TRH para mantener los niveles de expresión del péptido en el proceso de diferenciación.

C) c-fos

c-fos es un gen temprano inmediato (Sagar et al, 1988; Morgan y Curran, 1989), que se expresa en respuesta a estímulos distintos y ha sido una herramienta ampliamente utilizada para mapear activación neuronal en sitios específicos del cerebro. El gen de c-fos al ser traducido genera a la proteína Fos; esta proteína dimeriza con proteínas

nucleares codificadas por miembros de la familia c-jun e interacciona con secuencias *cis-específicas* en el DNA de genes blanco conocidas como sitios AP-1 para regular su transcripción (Chiu et al, 1988; Curran y Franza, 1988). La expresión de c-fos y de la proteína aumentan en respuesta a estrés agudo en varias regiones del cerebro incluyendo el hipotálamo, en donde el 25 % de neuronas TRHérgicas del PVN inducen la expresión de c-fos en respuesta al frío en ratas adultas a su vez que se incrementa la TRH liberada de la terminal nerviosa (Sánchez et al, 2001). Este hecho indica la relevancia de c-fos en regular la expresión de TRH en edad adulta, sin embargo, no se conoce si existe en etapa de diferenciación terminal algún tipo de regulación de TRH por c-fos. El transcrito de c-fos que se expresa en las células TRHérgicas sugiere que efectivamente puede intervenir en su regulación.

Finalmente, otro transcrito que se expresa significativamente en las células TRHérgicas es la folistatina, una proteína identificada inicialmente en la pituitaria y que específicamente inhibe la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) al unirse a la activina (Welt et al, 2002). MacConnell y colaboradores reportaron la expresión de folistatina en el hipotálamo y su posible participación en esta estructura, es regular a la activina también sintetizada en el hipotálamo y que incrementa de manera importante la liberación de la hormona luteinizante (HL) (MacConell et al; 1998), por lo que podría no tener una función en las células TRHérgicas y su acción podría ser en regular a la activina de las células blanco (HL).

Algunos de los transcritos identificados con diferencias significativas y algunos de ellos con niveles de cambio mayor a 2 se desconoce para que codifican y por lo tanto su posible función. Sin lugar a dudas, identificar el papel que sus proteínas pueden desempeñar en regular el fenotipo de TRH resulta de gran relevancia al ser moléculas completamente desconocidas.

Los resultados indican el enriquecimiento de una población neuronal, sin embargo, el transcrito de TRH no fue encontrado presente en el microarreglo y consideramos que esto puede tener dos razones: 1) Los factores de transcripción endógenos fueron utilizados para transactivar el promotor transfectado y esto ocasiona bajos niveles que son indetectables por el ensayo de microarreglo. Esta hipótesis fue corroborada mediante ensayos de PCR. Se confirmó la expresión de TRH en las células

purificadas, sin embargo, por tratarse de un ensayo de alta sensibilidad se esperaba que el nivel de cambio entre la condición control (PF±) y purificada fuera mayor al 300 % obtenido. Este resultado sugiere la disminución de la expresión de la hormona. Los ensayos de PCR también indican que los ARNm de TRH y GFP están enriquecidos en las células purificadas, sin embargo, se observa una disminución de la expresión de TRH endógeno en el control de las células transfectadas (PF±) respecto al control de cultivo normal sin transfectar (NT), al mismo tiempo que se aumenta la GFP en el control de células transfectadas (PF±). Lo anterior corroboró la idea de que la ausencia de TRH en los resultados de los microarreglos se debe a una disminución en su expresión, originada por la competencia de la maquinaria transcripcional entre el promotor transfectado y el endógeno. 2) Falta de sensibilidad del microarreglo. Se ha determinado en algunos estudios por microarreglos, la menor sensibilidad del ensayo comparado con PCR cuando se trata de transcritos de baja expresión (Taniguchi et al, 2001).

Al igual que la TRH otros transcritos propios de neuronas no fueron detectados en el análisis y es lógico considerar que la expresión baja de los mismos de manera similar a lo que ocurre con la TRH no permitió su detección. A favor de esta idea se encuentran los modelos del desarrollo del SNC los cuales postulan que aspectos específicos de fenotipos neuronales son dictados por ARNm's de baja abundancia o por aquéllos expresados en tiempos muy específicos en el desarrollo (Geschwind, 2000).

En conclusión, este estudio representa la primera aplicación de la tecnología de microarreglos para examinar el perfil del transcriptoma del fenotipo TRHérgico. Los resultados sugieren transcritos que pueden participar en la regulación de la etapa de diferenciación terminal de este fenotipo. Al mismo tiempo, proponemos que estos transcritos pueden regular la expresión de la TRH directamente sobre el promotor de TRH o vía indirecta mediada por la activación de otras proteínas en la célula TRHérgica que a su vez regulan la expresión de la TRH.

REFERENCIAS

- Auricchio F (1989). Phosphorylation of steroid receptors. *J Steroid Biochem.* **32**:613-22
- Baksi SN, Hughes MJ (1982). Chronic vitamin D deficiency in the weanling rat alters catecholamine metabolism in the cortex. *Brain Res.* **242**:387-90
- Bouret S, Prevot V, Croix D, Mitchell V, Beauvillain JC. Transforming growth factor beta affects GnRH mRNA expression in the male rat preoptic area. 30th Meeting of the Society for Neuroscience. New Orleans, USA. November 2000
- Bouret S, Chuoi-Mariot MT, Prevot V, Croix D, Takumi T, Jegou S, Vaudry H, Beauvillain JC, Mitchell V (2001). Evidence that TGF beta may directly modulate POMC mRNA expression in the female rat arcuate nucleus. *Endocrinology.* **142**:4055-65
- Brown J, Bianco JJ, McGrath JJ, Eyles DW (2003). 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* **343**:139-43
- Bunge MB, Williams AK, Wood PM, Uitto J, Jeffrey JJ (1980). Comparison of nerve cell and nerve cell plus Schwann cell cultures, with particular emphasis on basal lamina and collagen formation. *J Cell Biol.* **84**:184-202
- Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M (1988). The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell.* **54**:541-52
- Clontech (1996). Living color GFP application notes. CLONTECH Lab. Palo Alto, CA.
- Colantuoni C, Purcell AE, Bouton CM, Pevsner J (2000). High throughput analysis of gene expression in the human brain. *J Neurosci Res.* **59**:1-10
- Curran T, Franza BR Jr (1988). Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell.* **55**:395-7
- Darwish H, DeLuca HF (1993). Vitamin D-regulated gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* **3**:89-116
- Gao Y, Ng YK, Lin JY, Ling EA (2000). Expression of immunoregulatory cytokines in neurons of the lateral hypothalamic area and amygdaloid nuclear complex of rats immunized against human IgG. *Brain Res.* **859**:364-8
- Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, Berger F, Wion D (2002). New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab.* **13**:100-5
- Geschwind DH (2000). Mice, microarrays, and the genetic diversity of the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:10676-8
- Greenberg JH, Foidart JM, Greene RM (1980). Collagen synthesis in cultures of differentiating neural crest cells. *Cell Differ.* **9**:153-63
- Hanazono Y, Yu JM, Dunbar CE, Emmons RV (1997). Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage. *Hum Gene Ther.* **8**:1313-9
- Hai T, Hartman MG (2001). The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene.* **273**:1-11
- Hahn WE, Laird CD (1971). Transcription of nonrepeated DNA in mouse brain. *Science.* **173**:158-61
- Hoshimaru M, Ray J, Sah DW, Gage FH (1996). Differentiation of the immortalized adult neuronal progenitor cell line HC2S2 into neurons by regulatable suppression of the v-myc oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:1518-23
- Hosseinpour F, Wikvall K (2000). Porcine microsomal vitamin D(3) 25-hydroxylase (CYP2D25). Catalytic properties, tissue distribution, and comparison with human CYP2D6. *J Biol Chem.* **275**:34650-5

- Johnsen SA, Subramaniam M, Janknecht R, Spelsberg TC (2002a). TGFbeta inducible early gene enhances TGFbeta/Smad-dependent transcriptional responses. *Oncogene*. **21**:5783-90
- Johnsen SA, Subramaniam M, Katagiri T, Janknecht R, Spelsberg TC (2002b). Transcriptional regulation of Smad2 is required for enhancement of TGFbeta/Smad signaling by TGFbeta inducible early gene. *J Cell Biochem*. **87**:233-41
- Kang Y, Chen CR, Massague J (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell*. **11**:915-26
- King KE, Iyemere VP, Weissberg PL, Shanahan CM (2003). Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor beta 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *J Biol Chem*. **278**:11661-9
- Laud K, Hsieh T, Wu J (1997). Control of cell cycle regulatory protein expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human promyelocytic HL-60 leukemic cells cultured in serum-free medium. *Int. J. Oncol*. **11**:1119-1122
- Lee SL, Sevarino K, Roos BA, Goodman RH (1989). Characterization and expression of the gene-encoding rat thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Ann N Y Acad Sci*. **553**:14-28
- Litman P, Barg J, Rindzoonski L, Ginzburg I (1993). Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: Implications for neuronal polarity. *Neuron*. **10**: 627-638
- Liu HS, Jan MS, Chou CK, Chen PH, Ke NJ (1999). Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun*. **260**:712-7
- MacConell, SK (1995). Strategies for the generation of neuronal diversity in the developing central nervous system. *J. Neurosci*. **15**:6987-6998
- MacConell LA, Widger AE, Barth-Hall S, Roberts VJ (1998). Expression of activin and follistatin in the rat hypothalamus: anatomical association with gonadotropin-releasing hormone neurons and possible role of central activin in the regulation of luteinizing hormone release. *Endocrine*. **9**:233-41
- Massague J, Blain SW, Lo RS (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. **103**:295-309
- Mason MR, Lieberman AR, Anderson PN (2003). Corticospinal neurons up-regulate a range of growth-associated genes following intracortical, but not spinal, axotomy. *Eur J Neurosci*. **18**:789-802
- Maue RA, Kraner SD, Goodman RH, Mandel G (1990). Neuron-specific expression of the rat brain type II sodium channel gene is directed by upstream regulatory elements. *Neuron*. **4**:223-31
- Melcangi RC, Cavarretta I, Magnaghi V, Martini L, Galbiati M (2001). Interactions between growth factors and steroids in the control of LHRH-secreting neurons. *Brain Res Brain Res Rev*. **37**:223-34
- Morgan JI, Curran T (1989). Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci*. **12**:459-62
- Natale JE, Ahmed F, Cernak I, Stoica B, Faden AI (2003). Gene expression profile changes are commonly modulated across models and species after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. **20**:907-27
- Naveilhan P, Neveu I, Baudet C, Ohyama KY, Brachet P, Wion D (1993). Expression of 25(OH) vitamin D3 24-hydroxylase gene in glial cells. *Neuroreport*. **5**:255-7
- Ohnishi S, Laub F, Matsumoto N, Asaka M, Ramirez F, Yoshida T, Terada M (2000). Developmental expression of the mouse gene coding for the Kruppel-like transcription factor KLF5. *Dev Dyn*. **217**:421-9
- Okano J, Opitz OG, Nakagawa H, Jenkins TD, Friedman SL, Rustgi AK (2000). The Kruppel-like transcriptional factors Zf9 and GKLF coactivate the human keratin 4 promoter and physically interact. *FEBS Lett*. **473**:95-100
- Paredes R, Gutierrez J, Gutierrez S, Allison L, Puchi M, Imschenetzky M, van Wijnen A, Lian J, Stein G, Stein J, Montecino M (2002). Interaction of the 1alpha,25-dihydroxyvitamin

- D3 receptor at the distal promoter region of the bone-specific osteocalcin gene requires nucleosomal remodelling. *Biochem J.* **363**:667-76
- Prufer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R (1999). Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat.* **16**:135-45
- Rots NY, Iavarone A, Bromleigh V, Freedman LP (1999). Induced differentiation of U937 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 involves cell cycle arrest in G1 that is preceded by a transient proliferative burst and an increase in cyclin expression. *Blood.* **93**:2721-9
- Sadot E, Marx R, Barg J, Behar L, Ginzburg I (1994). Complete sequence of 3'-untranslated region of tau from rat central nervous system: implications for mRNA heterogeneity. *J. Mol. Biol.* **241**:325-331
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science.* **240**:1328-31
- Sanchez E, Uribe RM, Corkidi G, Zoeller RT, Cisneros M, Zacarias M, Morales-Chapa C, Charli JL, Joseph-Bravo P (2001). Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology.* **74**:407-22
- Saporito MS, Brown ER, Hartpence KC, Wilcox HM, Vaught JL, Carswell S (1994). Chronic 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated induction of nerve growth factor mRNA and protein in L929 fibroblasts and in adult rat brain. *Brain Res.* **633**:189-96
- Schwartz ML, Katagi C, Bruce J, Schlaepfer WW (1994). Brain-specific enhancement of the mouse neurofilament heavy gene promoter in vitro. *J Biol Chem.* **269**:13444-50
- Segre JA, Bauer C, Fuchs E (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet.* **22**:356-60
- Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC (2000). Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic Acids Res.* **28**:2969-76
- Shields JM, Christy RJ, Yang VW (1996). Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem.* **271**:20009-17
- Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Kun A, Benech JC, Sanguinetti C, Chalar C, Sotelo JR (2000). Neurofilament mRNAs are present and translated in the normal and severed sciatic nerve. *J Neurosci Res.* **62**:65-74
- Steinert PM, Roop DR (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem.* **57**:593-625
- Stratagene (2001). Recombinant Renilla Reniformis GFP displays low toxicity. *Strategies Newsletter.* **13**: 85-87
- Subramaniam M, Harris SA, Oursler MJ, Rasmussen K, Riggs BL, Spelsberg TC (1995). Identification of a novel TGF-beta-regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res.* **23**:4907-12
- Sutton AL, MacDonald PN (2003). Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol.* **17**:777-91
- Taniguchi M, Miura K, Iwao H, Yamanaka S (2001). Quantitative assessment of DNA microarrays--comparison with Northern blot analyses. *Genomics.* **71**:34-9
- Tornquist K, Lamber-Allardt C (1987). Systemic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the pituitary-hypothalamic axis in rats. *Acta Endocrinol (Copenh).* **115**:225-8
- Turner J, Crossley M (1999). Mammalian Kruppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci.* **24**:236-40
- Veenstra TD, Prufer K, Koenigsberger C, Brimijoin SW, Grande JP, Kumar R (1998). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors in the central nervous system of the rat embryo. *Brain Res.* **804**:193-205
- Welt C, Sidis Y, Keutmann HT, Schneyer AL (2002). Activins, inhibins and follistatins: from endocrinology to signalling--a paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med.* **227**:724-752

Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, Hewison M (2001). Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab.* **86**:888-94

Capítulo 6
Conclusiones

DISCUSION GENERAL

El sistema nervioso es el sistema más complejo del organismo, sus millones de neuronas (10^{12}) son bioquímicamente heterogéneas (McKay, 1989). Parte de esta diversidad se debe a un patrón de regulación en respuesta a múltiples señales (intracelulares y extracelulares) las cuales son reguladas de manera espacio-temporal durante el desarrollo. Esta diversidad complica el estudio del sistema nervioso en diferentes áreas. Una de ellas, es el análisis de la biosíntesis de péptidos del sistema nervioso.

En este trabajo doctoral nos enfocamos en el estudio de un neuropéptido, la TRH a nivel principalmente de su ARNm. Factores tróficos como las neurotrofinas y proteínas de la matriz extracelular ejercen su acción en procesos de diferenciación celular (Tucker et al, 2001), en el camino a esa diferenciación, se llevan a cabo mecanismos de regulación a diferentes niveles para la adquisición de determinados fenotipos peptidérgicos y uno de ellos es precisamente durante la síntesis de transcritos.

Se conoce poco cuáles son los procesos celulares que llevan a determinar la expresión del fenotipo TRHérgico en las neuronas hipotalámicas. En el presente estudio, se demostró que las células TRHérgicas hipotalámicas fetales que expresan el receptor TrkB, son las que responden a la acción del BDNF. Este resultado es de gran relevancia al sugerir que la población TRHérgica es heterogénea en cuanto a su respuesta hacia señales neurogénicas. En relación a esto, existe el antecedente de que las neuronas TRHérgicas de la porción parvocelular del NPV de rata adulta, incrementan de manera transitoria el nivel del ARNm de BDNF en respuesta a estrés por inmovilización, lo que no ocurre en otras áreas que no se encuentran involucradas en el eje que regula la respuesta a estrés (hipotálamo-hipófisis-médula adrenal) (Smith et al, 1995). Lo anterior sugiere que el BDNF regula la respuesta endócrina al estrés (Smith et al, 1995). De forma similar, el hipotiroidismo induce la expresión del ARNm de BDNF en el NPV de rata adulta y la adenohipofisis, pero no en el hipocampo ni en ninguna otra estructura cerebral no relacionada al eje HHT (Smith et al, 1995). No se conoce el mecanismo por el cual ocurre esta regulación. La expresión de la TRH es regulada negativamente por hormonas tiroideas únicamente en el NPV hipotalámico. El promotor de BDNF no contiene un elemento de respuesta a hormonas tiroideas (Giordano et al, 1992) pero es probable que los receptores tiroideos regulen su expresión a través de la

asociación con cofactores de transcripción presentes en el hipotálamo y la adenohipófisis que igualmente sean regulados por hormonas tiroideas en estos sitios específicos del SNC.

Algunas de las células que incrementan el nivel del ARNm de TRH en el cultivo primario realizado en este proyecto, podrían ser parte de la población fetal involucrada en estas respuestas neuronales. Resultados generados en el laboratorio indican que la expresión del ARNm que codifica para la isoforma catalítica del receptor TrkB antecede (E14) a la expresión del ARNm de TRH en el NPV (E16) de rata (González-Sánchez, 2001). Estos resultados apoyan la posibilidad de que la activación de este receptor durante el desarrollo sea uno de los elementos que participan en la determinación fenotípica de las neuronas TRHérgicas del NPV.

Lo anterior propone al BDNF como regulador de la TRH bajo diferentes estímulos fisiológicos. Es probable que el BDNF pueda tener un papel en otros paradigmas de estrés como la lactancia o en la regulación de la ingesta de agua y comida. Este comportamiento alimenticio es regulado por la TRH en el núcleo ventromedial (Vijayan y McCann, 1977). Dentro del cerebro, este núcleo contiene los niveles más altos de expresión del ARNm de BDNF alrededor del día postnatal 4, los cuales son superiores a los del hipocampo en esa misma etapa (Sugiyama et al, 2003).

El BDNF puede estar igualmente involucrado en la regulación de la TRH en áreas extrahipotálamicas independientes del eje HHT como el hipocampo. Recientemente, se ha demostrado que el nivel del péptido de TRH disminuye de manera importante en la patología de Alzheimer (40%). Esta disminución ha sido asociada con una hiperfosforilación de la proteína Tau lo que impide su unión a los microtúbulos del axón y con ello degeneración neuronal por la retracción axonal (Luo et al, 2002). Es posible que la TRH tenga una función neuroprotectora (Luo et al, 2002) y que pueda ser regulado por el BDNF, ya que el hipocampo es la estructura cerebral con la mayor concentración de BDNF en etapa adulta (Murer et al, 1999). Además de lo anterior, existe la hipótesis de que la disminución de BDNF en Alzheimer puede contribuir a la atrofia progresiva de las neuronas hipocampales y otras regiones cerebrales involucradas en esta enfermedad (Connor, 1997).

En conclusión, nuestros resultados junto con los publicados proponen al BDNF como regulador de la expresión de TRH en distintas etapas del desarrollo y bajo diferentes condiciones fisiológicas. Actualmente se ha propuesto el uso de neurotrofinas como terapia

en enfermedades neurodegenerativas (Skaper y Walsh, 1998). Por lo que el uso de BDNF en patologías asociadas con una disminución en la expresión de TRH podría ser considerado.

Con base a los resultados obtenidos con el BDNF y proteínas de la matriz extracelular, nos interesó conocer el fenotipo de las células que expresan TRH. Con este propósito realizamos la caracterización del transcriptoma de estas células por medio del uso de microarreglos de ADN. Estos nos permitió obtener una idea global de los mecanismos que pueden estar involucrados en el inicio de la biosíntesis de TRH al analizar simultáneamente la expresión de miles de genes. Para estudiar esta población minoritaria del cultivo primario hipotalámico fetal (2 %), se requirió aislarla de la población total. Para esto, se transfectaron los cultivos con un plásmido que contiene el promotor de TRH fusionado a la proteína verde fluorescente utilizando polietilenimina con el fin de reconocer a las células que expresan la TRH y separarlas por FACS. La eficiencia de transfección obtenida (>12%), es una de las más altas reportadas en el SNC, solamente inferior a la de lipofectamina 2000 en cultivos primarios hipocampales y corticales (Ohki et al, 2001). Este hecho resulta de gran relevancia dadas las dificultades que existen actualmente de transfectar neuronas post-mitóticas. Al mismo tiempo, en la selección de las células fluorescentes por citometría, alcanzamos un valor de 94 % de pureza de la población TRHérgica, esto nos señala la confiabilidad del ensayo de microarreglos en relación a que los transcritos presentes provienen específicamente de este tipo neuronal.

De los diferentes transcritos analizados por el microarreglo U-34A de Affymetrix y confirmada su expresión en células TRHérgicas por RT-PCR, consideramos de gran relevancia al gen regulado positivamente por la 1,25-dihidroxitamina D3. Nuestro interés se debe a que existen reportes que señalan que la administración de la vitamina D3 incrementa en un 50 % los niveles del péptido de TRH en el hipotálamo de rata adulta (Tornquist y Lamberg, 1983). Esto sugiere, que la vitamina D puede tener una participación directa sobre la expresión de TRH y es factible que la proteína regulada por la vitamina D, participe en el complejo de expresión transcripcional probablemente como un coregulador. De demostrarse *in vivo* o *in vitro* la relevancia de la regulación de la TRH por la vitamina D3 en etapas terminales del desarrollo, permitiría que pudiera ser empleada en la terapia de infantes prematuros que sufren frecuentemente de hipotiroxinemia, patología en la que se encuentra disminuída la hormona tiroidea tiroxina, T₄, como resultado de una disminución en

el nivel de TRH (Hadeed et al, 1981). La administración de vitamina D3 permitiría incrementar los niveles de TRH, lo cual resultaría en un tratamiento de fácil administración y económico que la propia TRH utilizada actualmente.

El microarreglo sugiere también que la expresión de 3 factores de transcripción comunes a distintos tipos celulares y que han sido relacionados directamente en mediar eventos de diferenciación celular son importantes en el fenotipo TRHérgico: KLF4, ATF3 y TIEG. Con base a los antecedentes ya descritos en la discusión del capítulo 5, proponemos que estos transcritos pueden regular la expresión de la TRH directamente sobre el promotor de TRH o vía indirecta mediada por la activación de otras proteínas en la célula TRHérgica que a su vez regulan la expresión de la hormona. Llama la atención que factores de transcripción involucrados en regular otras moléculas en diferentes tiempos en el desarrollo puedan regular específicamente al TRH, sin embargo, la complejidad del sistema nervioso de la que hablaba desde el inicio de esta discusión, está determinada en parte por la gran diversidad de expresión de genes. Esta enorme diversidad en patrones de expresión génica es llevada a cabo con un relativamente pequeño número de factores de transcripción. El modelo aplicado generalmente a los procariontes de “una proteína por gen” es en el sentido del desarrollo algo indecuaado, por el contrario, se requiere de la acción combinada de proteínas reguladoras de la transcripción en organismos eucariotes para generar la diversidad de la expresión génica que culmina en la gran variedad de fenotipos neurales y por lo tanto de funciones (McKay, 1989).

Además de las sutiles diferencias en la combinación de factores de transcripción, la interacción con sitios específicos en el ADN y el que su expresión sea modificada por estímulos extra e intracelulares tienen profundas consecuencias para el fenotipo celular. Los resultados obtenidos con los microarreglos generados a partir de las células TRHérgicas purificadas, concuerdan con esta idea de que factores transcripcionales comunes para la regulación de otros fenotipos peptidérgicos son igualmente requeridos en la etapa de diferenciación terminal del tipo neuronal TRHérgico.

Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio apoyan la posibilidad de que durante el desarrollo, la neurotrofina BDNF sea uno de los elementos que participan en la determinación fenotípica de las neuronas TRHérgicas e indica nuevos elementos que pueden intervenir en su regulación, lo que nos ofrece a su vez nuevas posibilidades de estudio de

dicha hormona. Para generar parte de estos resultados se implementó la tecnología de microarreglos y una metodología que permite enriquecer una población neuronal minoritaria.

CONCLUSIONES GENERALES

La primer parte de este trabajo demostró que las neuronas hipotálamicas fetales que expresan TRH son heterogéneas en relación a las influencias extracelulares que regulan la expresión del ARNm del péptido. Algunas dependen de la acción de BDNF, mientras que otras son independientes. Lo anterior, debido a que observamos que el BDNF incrementa los niveles del ARNm de TRH, únicamente en una población de neuronas hipotalámicas TRHérgicas que expresan TrkB (receptor específico de BDNF). Lo cual sugiere que esta población depende de la acción de BDNF para la expresión de TRH. Estos resultados en conjunto nos llevan a proponer que:

i) El BDNF ejerce efectos específicos, temprano en el desarrollo, en el establecimiento del fenotipo TRHérgico.

ii) El BDNF secretado de manera local contribuye a mantener la expresión del ARNm de TRH y del péptido observados en el hipotálamo *in vivo*.

Siguiendo con el objetivo de determinar algunos de los mecanismos que inician la expresión de TRH en las neuronas hipotalámicas, la segunda parte de este proyecto de tesis abordó la caracterización del transcriptoma de las células TRHérgicas hasta ahora desconocido. Como primer paso, las células TRHérgicas se tuvieron que purificar de la población total. Durante este proceso, demostramos que bajo nuestras condiciones experimentales, el uso de la polietilimina (PEI) para transfectar neuronas post-mitóticas de origen hipotalámico resultó ser un método eficiente y reproducible en comparación con varias técnicas usadas comúnmente. En la última parte de este trabajo se describen elementos del transcriptoma TRHérgico del hipotálamo fetal que permiten describir el fenotipo de estas células. En conjunto este trabajo proporciona elementos metodológicos para estudiar poblaciones neuronales *in vitro*, en particular, aquéllas representadas por un número reducido. Sin duda estos resultados servirán de base en un futuro para determinar los mecanismos que inducen y regulan la expresión de la TRH.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos con el BDNF, hicieron surgir varias interrogantes o perspectivas que empezaron a estudiarse en el laboratorio y que actualmente continúan en análisis:

A) El BDNF puede colaborar en la adquisición del fenotipo TRHérgico neuroendócrino, es decir, específicamente en el NPV del hipotálamo?

Se demostró que el ARNm del TrkB catalítico, se expresa en la región hipotalámica que dá origen al NPV antes de que se expresé el ARNm de TRH en dicho núcleo, lo cual apoya la idea de la activación de la isoforma catalítica del receptor TrkB durante el desarrollo.

B) Las células hipotalámicas neonatales responden de manera similar a las neuronas hipotalámicas fetales a los efectos del BDNF (exógeno) sobre la expresión del ARNm de TRH al DIV 4?

Los resultados indican que en cultivos neonatales de rata se incrementan los niveles de ARNm y péptido de TRH en respuesta al BDNF.

C)Cuál es la vía o vías de señalización que sigue el BDNF para regular los niveles del ARNm de TRH en los cultivos primarios de hipotálamo fetales?

Los resultados sugieren que se trata de mecanismos regulados por las MAP cinasas, similar a lo que ocurre en otros fenotipos peptidérgicos.

D) Además de lo anterior, actualmente se está caracterizando un ratón transgénico que expresa la GFP bajo el control del promotor de TRH. Este será una herramienta muy útil para analizar en diferentes etapas de desarrollo del ratón, la colocalización de neurotrofinas y sus receptores (de la familia de NGF, FGF β y EGF) en las células TRHérgicas. Este estudio permitirá eventualmente profundizar en el estudio de los mecanismos que participan en la regulación de la biosíntesis de TRH.

E) Nos interesa también investigar en el ratón transgénico de TRH, la ontogenia del BDNF y su receptor. Esto permitirá: i) determinar si el establecimiento del fenotipo TRHérgico depende de la expresión de BDNF y TrkB catalítico, ii) si la expresión de la forma catalítica de TrkB se restringe a la misma subpoblación TRHérgica desde un inicio o si

se expresa de manera general temprano en el desarrollo. Por su parte, este mismo estudio realizado en etapa adulta nos indicaría si es importante en mantener este tipo neuronal.

F) Del análisis con microarreglos obtuvimos que uno de los genes incrementados en las células TRHérgicas es el regulado positivamente por la 1,25-dihidroxitamina D3. En el hipotálamo de rata adulta la adición de la vitamina D3 incrementa en un 50 % los niveles del péptido de TRH. Por lo que sería muy interesante determinar su efecto en la expresión de TRH en los cultivos primarios de hipotálamo fetal. Estos estudios podrían hacerse con los cultivos primarios normalmente empleados en los que se analizaría el nivel del ARNm y péptido de TRH. Otra opción es purificar las células TRHérgicas del ratón transgénico y tratarlas con la vitamina D3. Es posible que en estos cultivos podamos investigar también la participación de factores de transcripción en respuesta al BDNF o vitamina D3 como transactivadores del gen de TRH.

G) A nivel bioinformático nos interesa analizar los transcritos identificados en el microarreglo que no se conoce para que codifican con el objetivo de determinar por homología a que proteína pueden corresponder.

REFERENCIAS

- Connor B, Young D, Yan Q, Faull RL, Synek B, Dragunow M (1997). Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* **49**:71-81
- Giordano T, Pan JB, Casuto D, Watanabe S, Arneric SP (1992). Thyroid hormone regulation of NGF, NT-3 and BDNF RNA in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* **16**:239-45
- González-Sánchez JA (2001). Expresión del ARNm que codifica al receptor de neurotrofinas TrkB^{TK+} en el núcleo paraventricular de hipotálamo de rata durante el desarrollo y su relación con la expresión del ARNm de la hormona liberadora de tirotropina. Tesis de Maestría, UNAM
- Hadeed AJ, Asay LD, Klein AH, Fisher DA (1981). Significance of transient postnatal hypothyroxinemia in premature infants with and without respiratory distress syndrome. *Pediatrics.* **68**:494-8
- Luo L, Yano N, Mao Q, Jackson IM, Stopa EG (2002). Thyrotropin releasing hormone (TRH) in the hippocampus of Alzheimer patients. *J Alzheimers Dis.* **4**:97-103
- McKay, RDG (1989). The origins of cellular diversity in the Mammalian central nervous system. *Cell.* **58**:815-821
- Murer MG, Boissiere F, Yan Q, Hunot S, Villares J, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R (1999). An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. *Neuroscience.* **88**:1015-32
- Ohki EC, Tilkins ML, Ciccarone VC, Price PJ (2001). Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *J Neurosci Methods.* **112**:95-99
- Skaper SD, Walsh FS (1998). Neurotrophic molecules: strategies for designing effective therapeutic molecules in neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci.* **12**:179-93
- Smith MA, Makino S, Kim SY, Kvetnansky R (1995). Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology.* **136**:3743-3750
- Sugiyama N, Kanba S, Arita J (2003). Temporal changes in the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* **115**:69-77
- Tornquist K, Lamber-Allardt C (1987). Systemic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the pituitary-hypothalamic axis in rats. *Acta Endocrinol (Copenh).* **115**:225-8
- Tucker KL, Meyer M, Barde YA (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci.* **4**:29-37
- Vijayan E, McCann SM (1977). Suppression of feeding and drinking activity in rats following intraventricular injection of thyrotropin releasing hormone (TRH). *Endocrinology.* **100**:1727-30

Apéndice

Extracellular matrix proteins increase the expression of pro-TRH and pro-protein convertase PC1 in fetal hypothalamic neurons *in vitro*

Research report

Extracellular matrix proteins increase the expression of pro-TRH and pro-protein convertase PC1 in fetal hypothalamic neurons in vitro

Jerome Niquet^{a,1}, Leonor Pérez-Martínez^a, Magdalena Guerra^a, Dominique Grouselle^b,
Patricia Joseph-Bravo^a, Jean-Louis Charli^{a,*}

^a Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico

^b U 159, Institut National de la Santé et la Recherche Biomedicale, Paris 75014, France

Accepted 30 November 1999

Abstract

External clues for neuron development include extracellular matrix (ECM) molecules. To explore ECM influence on the early development of peptide phenotype in the CNS, we have compared pro-TRH levels in primary cultures of rat hypothalamic cells plated either on poly-lysine (PL) (control) or on PL plus one of various ECM molecules at 10 µg/ml. Fetal day 17 cells plated at a density of 1250/mm² were grown in a serum free medium made of Neurobasal medium supplemented with B27 (GIBCO). Cultures, consisting mainly of neurons, were analyzed at DIV 2. ECM proteins induced morphological effects in agreement with previously published studies. The amount of pro-TRH per dish, quantified by Western blotting, was increased to 275% for laminin, 191% for fibronectin and 173% for tenascin-C (control = 100%); there was no effect of vitronectin. Laminin or fibronectin did not change pro-TRH mRNA or TRH levels but enhanced levels of the pro-protein convertase PC1 suggesting that the ECM molecules did regulate the translational status of pro-TRH. In conclusion, we have shown that some ECM proteins increased pro-TRH level in vitro; this may contribute to the enhancement of pro-TRH levels observed early in vivo in the hypothalamus. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: TRH; Pro-TRH; Hypothalamus; Laminin; Fibronectin; Vitronectin; Tenascin-C; Pro-protein convertase PC1

1. Introduction

External clues for neuron development include molecules from the extracellular matrix (ECM). Embryonic neural tissues contain a dynamic ECM composed of many types of molecules with multiple patterns of expression, some of which are substantially reduced by the end of development. ECM role on neural cell migration and neurite extension has been extensively studied [3,19,29]. Less is known about its influence on the early development of neurotransmitter and in particular peptide phenotype in CNS [13,14].

The rodent hypothalamus contains various populations of neurons that synthesize the tri-peptide thyrotropin-releasing hormone (p_{glu}-his-proNH₂; TRH) from a high molecular weight precursor, pro-TRH [18]. Recent studies show that enzymes potentially involved in the initial steps of pro-TRH processing in hypothalamic TRH neurons include the two pro-protein convertases PC1 and PC2. These enzymes can process pro-TRH in vitro [12,24,30]. Mature PVN TRH neurons contain PC1 and/or PC2 mRNAs [27,28].

Hypothalamic expression of TRH is developmentally regulated in vivo. Pro-TRH mRNA levels increase from E14 to P20; the ratio of TRH over pro-TRH protein levels augments until adulthood and the levels of the processed peptide, until P20–P35, suggesting an acceleration of TRH processing during development [5,7,15,22]. PC1 and PC2 mRNAs expression in the central nervous system also initiates late during embryonic development; the hypothalamus is a major site of PC1 mRNA localization [33].

* Corresponding author. Fax: +52-73170805; e-mail: charli@ibt.unam.mx

¹ Present address: Laboratory of Epilepsy Research, VAMC, North Hills, CA 91343, USA.

Development of hypothalamic TRH biosynthesis has also been studied *in vitro*, in primary cultures of fetal hypothalamic neurons. Accumulation of pro-TRH mRNA, decrease of pro-TRH and enhancement of TRH levels are detected during a period of 2–3 weeks *in vitro*; maturation of TRH biosynthesis *in vitro* seems to follow a pattern similar to that occurring *in vivo* [9,15] (Pérez-Martínez et al., unpublished). Many hypothalamic TRH neurons maintained in primary culture do contain PC1 (mRNA or protein) [25] (Pérez-Martínez et al., unpublished).

Diffusible factors from hypothalamus may contribute to the development of TRH expression in culture; some of these are probably of glial origin [6]. We recently identified BDNF as a diffusible agent that increases pro-TRH mRNA levels in primary cultures of hypothalamic cells [16].

To address whether ECM influence the early development of peptide phenotype, we have compared pro-TRH expression in primary cultures of rat hypothalamic cells plated either on poly-lysine (PL) or on PL plus one of various ECM molecules present in developing neural tissues [19]. The molecules tested were: laminin (a potent stimulator of neurite outgrowth [28]), fibronectin (which promotes neurite outgrowth less efficiently than laminin [1]), tenascin-C (a member of the tenascin family containing multiple domains with adhesive and anti-adhesive properties either promoting or inhibiting neurite elongation *in vitro* [20]) and, vitronectin (a protein also able to promote neurite outgrowth *in vitro* [23]).

Cells were grown in a serum free medium that inhibits the development of glia to limit ECM production by these cells in order to identify molecules with a direct influence on neurons. We focused on the early steps of development of post-mitotic neurons, when growing neurites sense information from ECM. Pro-TRH mRNA, TRH and PC1 levels were determined to correlate their expression with that of pro-TRH. We show that various ECM molecules enhance pro-TRH levels probably due to the activation of the translation of pro-TRH mRNA.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wistar rats were treated according to the “Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research” of the Society for Neuroscience (USA).

2.2. Cell culture

Primary cultures were established from Wistar rat. Hypothalami from fetal day 17 were enzymatically dissociated with trypsin; cells were plated either on 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly-lysine (PL) (control) or on PL plus one of various ECM molecules (either from Chemicon, Temecula, CA,

USA or from Sigma, St. Louis, MO, USA), each deposited from a solution at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS, a concentration giving near maximal biological effects in many *in vitro* paradigms [21,31]. Dishes were extensively washed with PBS before use. Cells plated at a density of 1250/ mm^2 in 35 mm plastic Petri dishes were grown in 2 ml of a serum free medium made of Neurobasal supplemented with B27 (GIBCO) and 10^{-9} M 17β -oestradiol in a humidified atmosphere of 7% CO_2 –93% air at 37°C. Cultures were analyzed at DIV 2.

Survival was determined with trypan blue counting as living those cells excluding the colorant.

2.3. Immunoblotting

Specific protein levels were determined by Western blotting using a previously characterized pro-TRH specific polyclonal antibody (80B7) that detects a 35-kDa band [15], a neuron specific enolase (NSE) polyclonal antibody that detects a 47-kDa band (Chemicon, Temecula, CA, USA) and a specific polyclonal antibody for PC1 [32]. The PC1 antibody (DAM3) directed against the N-terminus detects two bands in brain extracts: a high MW precursor (87 kDa) and a 66-kDa protein that is the biologically active convertase. These bands are detected in rat hypothalamus in a developmentally regulated pattern (O. Vindrola, unpublished).

For pro-TRH or NSE blotting, cells were scraped in PBS and centrifuged for 30 min at 4°C (14000 $\times g$); the cell pellets were frozen until use. Cell pellets or hypothalami were immersed in SDS sample buffer, sonicated and heated at 100°C for 5 min. For PC1 blotting, cells or hypothalami were extracted as described [32].

Samples were analyzed by electrophoresis on SDS 10% poly-acrylamide gels under reducing conditions followed by transfer onto a nitrocellulose membrane. After transfer, the membranes were stained with 5% red Ponceau. Membranes were saturated with 5% skimmed milk in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 8.0) (TBS) at room temperature for 30 min and incubated overnight with TBS containing 0.5% skimmed milk and a primary antibody. Primary antibody dilutions were: 1:3000–1:4000. After several washes, the blots were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (1:2000–1:4000; Amersham) for 4 h. Immunoreactive proteins were revealed with the ECL Western blotting system (Amersham) and their level was measured by densitometry; amount of protein and time of reaction were adjusted to obtain a linear relationship between amount of protein and signal.

2.4. Reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was obtained, quantified and submitted to semi-quantitative RT-PCR for pro-TRH mRNA using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) as

an internal control [26] (Pérez-Martínez et al., unpublished). These amplification conditions allow to detect, in primary cultures of hypothalamic cells, relative TRH mRNA changes similar to those detected by Northern blot analysis [26]. These conditions were slightly modified because of the low level of pro-TRH mRNA in DIV 2 culture: (1) G3PDH and pro-TRH cDNAs were amplified independently (in distinct tubes from the same cDNA reaction), to reduce competition between the two amplifications; (2) amplification cycle number was increased to 35 and extension time to 25 min to facilitate detection of cDNAs.

2.5. TRH radioimmunoassay (RIA)

TRH was extracted from cultured cells and quantified with a specific RIA as described [6].

2.6. Statistics

In most cases, data are pooled from various experiments. Data represent the mean ± S.E.M. values. One-way ANOVA followed by Duncan multiple range test was used to determine statistical significance between individual means. Differences were considered as significant at $p < 0.05$.

3. Results

Since the main purpose of this study was to analyze the effect of ECM molecules on pro-TRH levels and because the exact pattern of pro-TRH expression during the short time-window of analysis chosen in our study was un-

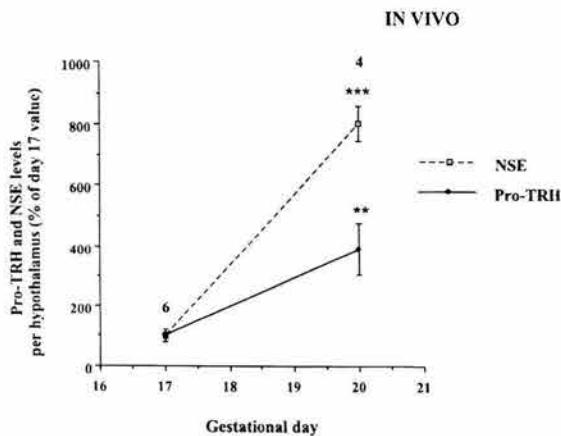


Fig. 1. Hypothalamic pro-TRH and NSE levels increased during late fetal development. E17 or E20 hypothalami were dissected, proteins extracted and analyzed by Western blotting and densitometry as described in Section 2. Data are mean ± S.E.M. (number of independent determinations above bars). **: $p < 0.005$; ***: $p < 0.001$ vs. control.

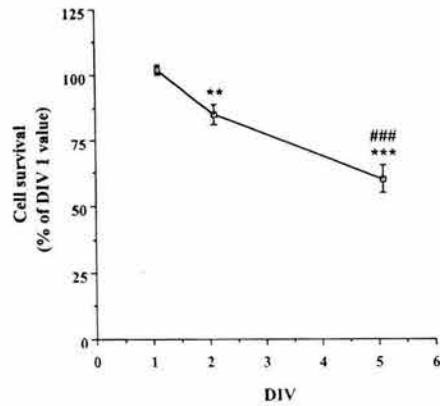


Fig. 2. Survival of hypothalamic cells decreased over time in culture. F17 hypothalamic cells were plated onto poly-lysine coated Petri dishes and grown in Neurobasal-B27 as described in Section 2. Survival was determined by staining cells with trypan blue and counting as live the cells that excluded the colorant. Data are mean ± S.E.M. of six independent determinations. **: $p < 0.01$ vs. DIV 1; ***: $p < 0.001$ vs. DIV 1; ###: $p < 0.001$ vs. DIV 2.

known, in vivo hypothalamic pro-TRH levels were determined as a reference. We observed that pro-TRH and NSE

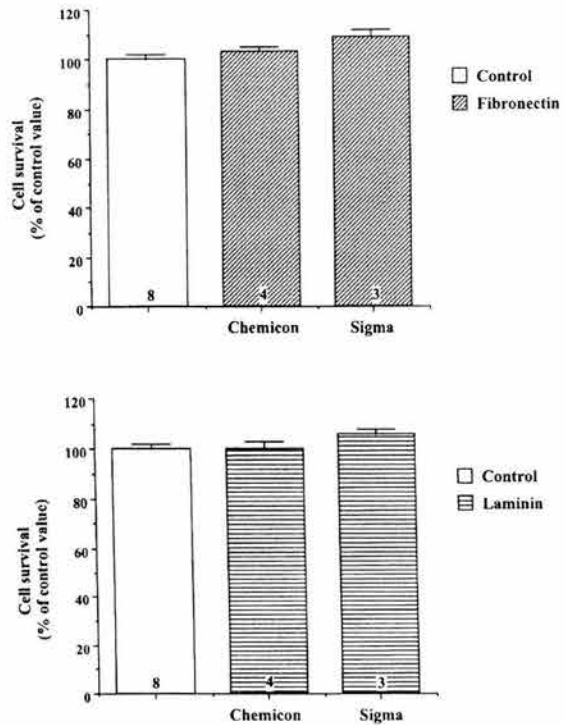


Fig. 3. Laminin or fibronectin did not change survival of hypothalamic cells in culture. F17 hypothalamic cells were plated onto poly-lysine coated Petri dishes and grown in Neurobasal-B27 as described in Section 2. At DIV 2, survival was determined by staining cells with trypan blue and counting as live the cells that excluded the colorant. Data are mean ± S.E.M. (number of independent determinations inside bars).

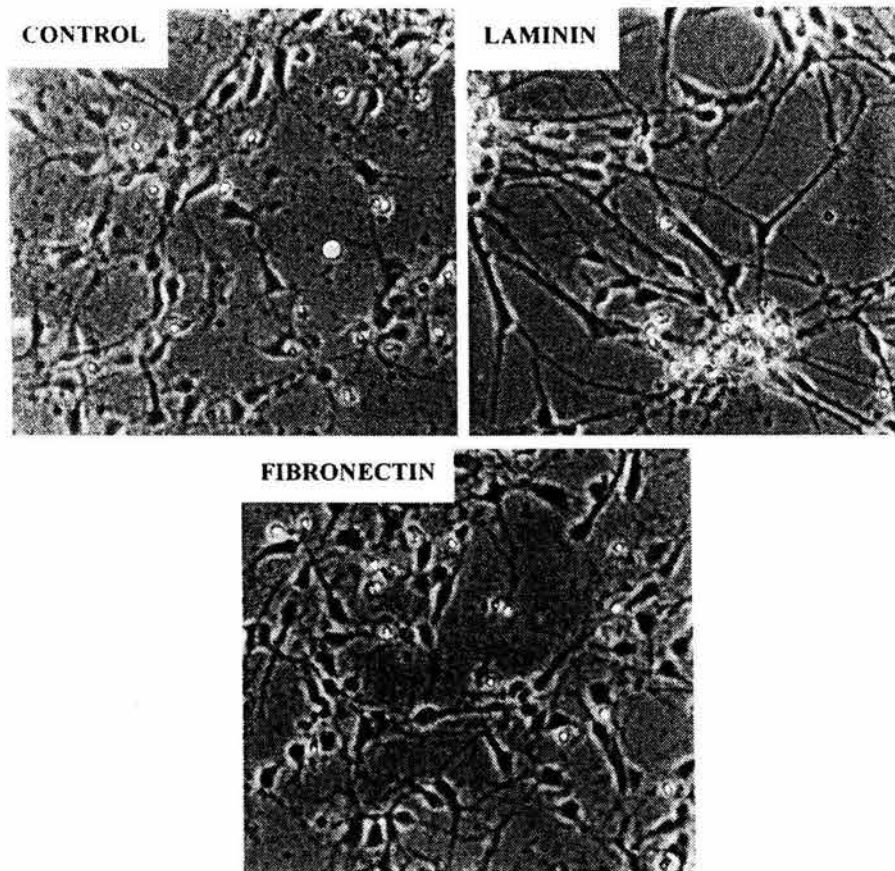


Fig. 4. ECM molecules modified morphological development of hypothalamic neurons. E17 hypothalamic cells were plated onto poly-lysine (control), poly-lysine plus laminin (from Sigma) (laminin) or poly-lysine plus fibronectin (from Sigma) (fibronectin) coated Petri dishes and grown in Neurobasal-B27 as described in Section 2. Cells were photographed under phase contrast microscopy at DIV 2. Original magnification: $40\times$.

levels per hypothalamus increased between E17 and E20 (Fig. 1); pro-TRH levels are therefore developmentally regulated in this time window, as previously described for pro-TRH mRNA levels [5], and are an adequate parameter to determine whether ECM influence TRH biosynthesis *in vitro*.

In control conditions, cultures consisted mainly of neurons (NSE positive) with less than 1% of cells positive for glial fibrillary acidic protein. An apparent increase in the number of cells with neurites and the size of neurites was observed by phase contrast microscopy between DIV 1 and DIV 2. TRH mRNA expression was low but detectable by RT-PCR from DIV 1. A small percentage of the cells was positive for TRH mRNA (detected by *in situ* hybridization [ISH]). Hypothalamic cultures expressed various ECM molecules including laminin and tenascin-C as detected by Western blotting analysis (not shown).

Cell survival decreased with time in culture (Fig. 2). Laminin or fibronectin did not change the percentage of cell survival at DIV 2 (Fig. 3) but laminin, fibronectin,

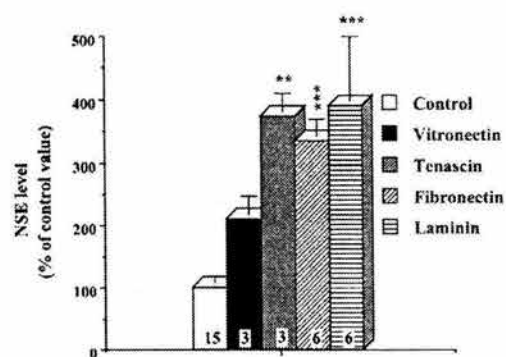


Fig. 5. ECM molecules increased NSE levels in primary cultures of hypothalamic cells. F17 hypothalamic cells were plated onto poly-lysine alone (control) or combined with either laminin or fibronectin or tenascin-C or vitronectin (each from Chemicon) coated Petri dishes and grown in Neurobasal-B27 as described in Section 2 for 2 DIV. NSE levels were determined by Western blotting and densitometry as described in Section 2. Data are mean \pm S.E.M. (number of independent determinations inside bars). **: $p < 0.005$; ***: $p < 0.001$ vs. control.

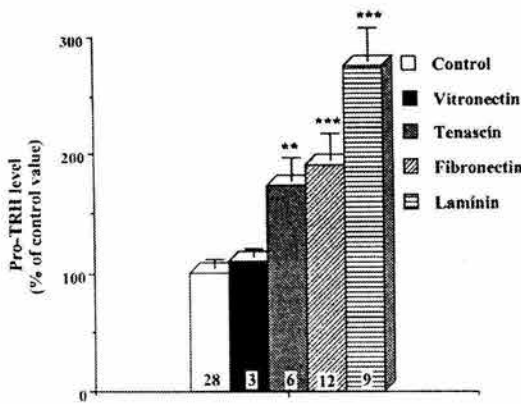


Fig. 6. ECM molecules increased pro-TRH levels in primary cultures of hypothalamic cells. F17 hypothalamic cells were plated onto poly-lysine (control), poly-lysine plus either laminin or fibronectin or tenascin-C or vitronectin (each from Chemicon) coated Petri dishes and grown in Neurobasal-B27 as described in Section 2. At DIV 2, pro-TRH levels were determined by Western blotting and densitometry as described in Section 2. Data are mean \pm S.E.M. (number of independent determinations inside bars). **: $p < 0.005$; ***: $p < 0.001$ vs. control.

tenascin-C and vitronectin exerted a general effect on the morphology of hypothalamic neurons maintained in serum free medium for 2 DIV. Phase contrast microscopy analysis showed that the coating of plates with either laminin or fibronectin increased the number of cells with neurites and the size of neurites (Fig. 4); vitronectin effect was less pronounced; tenascin-C induced cell aggregation (not shown).

These morphological effects occurred together with an increase of NSE; similar increases were obtained with laminin, fibronectin and tenascin-C while vitronectin was less effective (Fig. 5). Most ECM proteins assayed (except vitronectin) increased pro-TRH expression at DIV 2; the strongest effect was observed with laminin (Fig. 6). To test

Table 1
Effects of laminin and fibronectin preparations from two commercial sources on pro-TRH or NSE levels were similar
F17 hypothalamic cells were plated onto poly-lysine (PL), PL plus laminin or PL plus fibronectin coated Petri dishes and grown in Neurobasal-B27 as described in Section 2. NSE or pro-TRH levels were determined by Western blotting and densitometry as described in Section 2. Data are mean \pm S.E.M. (number of independent determinations). Mean control values were taken as 100%

	NSE	pro-TRH
PL	100 \pm 10 (6)	100 \pm 13 (11)
PL + laminin SIGMA	221 \pm 10 (6)	409 \pm 47 (6)****
PL + laminin CHEMICON	389 \pm 144 (6)**	275 \pm 28 (9)****, #####
PL	100 \pm 10 (9)	100 \pm 7 (19)
PL + fibronectin SIGMA		203 \pm 33 (6)*
PL + fibronectin CHEMICON	335 \pm 30 (6)**	191 \pm 22 (12)***

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$; ****: $p < 0.001$ vs. control; #####: $p < 0.001$ vs. laminin SIGMA.

if ECM molecule effects were dependent on the commercial source of protein, additional experiments were performed with laminin and fibronectin. Effects of fibronectin on pro-TRH levels were independent of the source of protein. Laminin effects on pro-TRH or NSE levels were quantitatively different depending on protein source; however, with each protein preparation a similar trend was observed (Table 1).

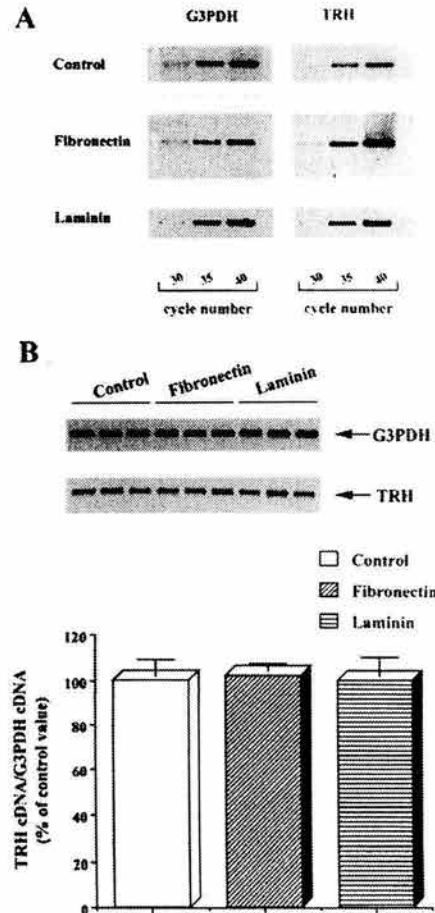


Fig. 7. Laminin or fibronectin did not change pro-TRH mRNA levels in primary cultures of hypothalamic cells. F17 hypothalamic cells were plated onto poly-lysine (control), poly-lysine plus laminin (Sigma) or poly-lysine plus fibronectin (Sigma) coated Petri dishes and grown in Neurobasal-B27 as described in Section 2. At DIV 2, pro-TRH mRNA levels were determined by RT-PCR using G3PDH as an internal control. Panel A: representative amplification of pro-TRH and G3PDH cDNAs at increasing cycle number for control or experimental samples. Quantification of the intensity of PCR products using a Fluor-S multi-imager (Biorad) revealed a linear relationship between cycle number and signal intensity (not shown). Panel B: 35 cycle PCR products were quantified and the data (TRH cDNA over G3PDH cDNA signals) plotted as percentage changes, control culture values taken as 100% (lower part). Data are mean \pm S.E.M. of 12 independent determinations. The upper part depicts a representative photograph of the ethidium bromide-stained gel of PCR products; three independent samples from each group are shown.

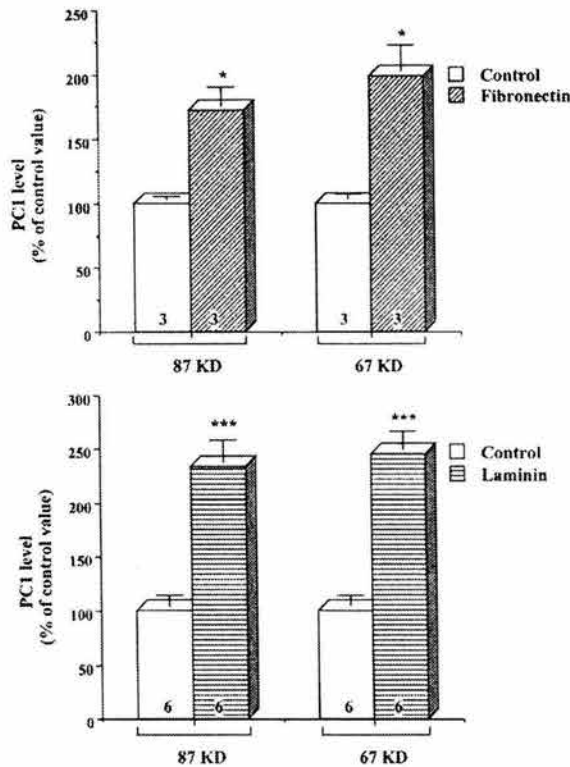


Fig. 8. Laminin or fibronectin (from Sigma) increased pro-PC1 and PC1 levels in primary cultures of hypothalamic cells. F17 hypothalamic cells were plated onto poly-lysine (control), poly-lysine plus laminin or poly-lysine plus fibronectin (both proteins from Chemicon) coated Petri dishes and grown in Neurobasal-B27 as described in Section 2. At DIV2, pro-PC1 and PC1 levels were determined by Western blotting and densitometry as described in Section 2. Data are mean \pm S.E.M. (number of independent determinations inside bars). *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$ vs. control.

To determine whether pro-TRH changes are due to a transcriptional control, we analyzed pro-TRH mRNA levels. Treatments with laminin or fibronectin did not change the amount of total RNA recovered per Petri dish (6.1 ± 0.3 μ g for control, 6.8 ± 0.4 for laminin, 6.7 ± 0.4 for fibronectin, means \pm S.E.M., $n = 9$). PCR conditions were optimized to detect a linear relationship between the amplification cycle number and the amount of product. Fig. 7A shows that amplification for 35 cycles satisfied this requirement. In these conditions, we found that laminin or fibronectin had no effect on G3PDH mRNA levels (control: $100 \pm 2\%$, laminin 99 ± 3 , fibronectin 98 ± 3 , $n = 12$; Fig. 7B) or on pro-TRH mRNA levels (Fig. 7B).

Pro-TRH accumulation may, therefore, be due to an increased translation of pro-TRH mRNA or to a decreased processing. To test this latter possibility the levels of one of the PCs involved in pro-TRH processing were evaluated. At DIV 2, hypothalamic neurons in serum free medium expressed the two PC1 bands, the precursor band being stronger (not shown). Both bands were enhanced when cells were plated on laminin or fibronectin (Fig. 8). Other experiments showed that coating with laminin did not change TRH levels at DIV 2 (control: 58 ± 6 pg/dish; laminin: 70 ± 12 pg/dish, $n = 5$).

4. Discussion

Previous studies suggested that in vivo TRH biosynthesis in rodent hypothalamus increases during development, as a consequence of increased pro-TRH mRNA levels and pro-TRH processing [7,15]. These events may be determined, in part, through specific interactions with extracellular signals. Interactions of multiple neuronal surface components with several functional domains of ECM molecules can lead to cascades of effects on cell behavior. The purpose of this study was to determine, in an in vitro model that partially mimics the development of hypothalamic neurons, whether ECM molecules have an impact on pro-TRH levels, during the early post-mitotic development of TRH neurons.

Since during this time-window, in vivo pro-TRH levels have not been reported, we initially analyzed their levels to determine the behavior of this parameter in vivo. Pro-TRH levels increased between E17 and E20, as occurs for pro-TRH mRNA [5] (Pérez-Martínez et al., unpublished), suggesting that during late fetal life, the effect of increased pro-TRH processing [15] on pro-TRH levels is compensated by enhanced pro-TRH mRNA levels and/or translational activity.

We have shown that pro-TRH is enhanced *in vitro* by some ECM proteins. The morphological effect of each of the ECM molecules tested on hypothalamic cells was in agreement with previously published studies [1,8,10,23]. Although ECM molecules differed in their morphological effects on hypothalamic cells, most increased pro-TRH expression. For example, tenascin-C appeared non-adhesive for hypothalamic neurons, as previously shown for various categories of CNS neuron [8] and increased pro-TRH levels. On the tenascin-C substrate, cell–cell interactions may be preponderant over cell–matrix interactions and may contribute to pro-TRH control. Laminin or fibronectin treatments, which did not increase cell contacts, regulated pro-TRH levels probably as a direct consequence of neuron contact with ECM molecules. The ECM molecule receptor involved, whether an integrin or not, and the transduction pathways, are unknown. However, some ubiquitous molecules present during development such as $\beta 1$ integrin [17] are likely candidates. On the other hand, effects on pro-TRH levels had a tendency to be correlated with those on NSE levels, suggesting that increases in pro-TRH levels may be part of the program of differentiation accelerated by the interaction with ECM molecules.

We cannot completely exclude the possibility that ECM effects on pro-TRH levels were due to molecules contaminating the ECM preparations. However, the effects of laminin or fibronectin preparations on pro-TRH levels were qualitatively similar whatever the commercial source. Since vitronectin was also active, it is therefore unlikely that contaminants from five distinct ECM preparations have a similar biological activity.

To determine whether pro-TRH enhancement by ECM molecules is due to enhanced survival of TRH neurons, we intended to determine their effect on the number of TRH neurons using ISH. However, plating cells on the PL coated glass support required for ISH, reduced cell adhesion in comparison to adhesion on PL coated plastic dishes (not shown), making it impossible to obtain data that would be easily correlated with biochemical data obtained on a plastic support. However, indirect information suggests that survival of TRH neurons did not increase. We could not detect any variation in total cell number. Most importantly, if the TRH cell number changed, a modification of pro-TRH mRNA levels should be detected, which was not the case (see below). Pro-TRH enhancement per dish is therefore probably due to an increased amount of pro-TRH per cell.

Pro-TRH levels may change according to pro-TRH mRNA levels. However, we did not detect any change in pro-TRH mRNA levels, in spite of using the RT-PCR protocol that previously allowed us detection of small changes in pro-TRH mRNA levels in hypothalamic cells [26] and amplification conditions which assured a linear relationship between input RNA and signal. Accumulation of pro-TRH could be due to an inhibition of pro-TRH processing but since the levels of the catalytically active

form of PC1 (the 66-kDa form) were increased by ECM molecules and TRH levels were not decreased, inhibition of pro-TRH processing is unlikely. A more plausible interpretation of our data is that the enhancement of pro-TRH levels is due to a translational control. Previous studies have shown that adhesion of fibroblasts to the ECM induces a rapid increase in the translation of pre-existing mRNAs [2,11]. A similar event may occur in dissociated neurons plated onto ECM molecules. A recent study shows that, in AtT₂₀ cells transfected with pre-pro-TRH cDNA driven by a constitutive promoter, addition of dexamethasone enhances pro-TRH levels in spite of increased pro-TRH processing; it was suggested that, among various effects, dexamethasone enhances the translational rate of pro-TRH [4].

Whether some of these ECM molecules are expressed in the vicinity of TRH neurons *in vivo* at the end of the prenatal development is not known but many are present in the CNS at this stage of development. ECM proteins may thus contribute to the prenatal enhancement of pro-TRH protein levels observed *in vivo* in the hypothalamus.

Diffusible factors may also directly regulate pro-TRH mRNA levels during early development of hypothalamic neurons. We have recently shown that BDNF enhances pro-TRH mRNA levels in primary cultures of hypothalamic neurons [16]. Since some trophic factors effects depend on ECM molecules [2], we tested whether BDNF effect on pro-TRH mRNA level depends on ECM and found it was independent of the presence of laminin (Guerra et al., unpublished). The developmental control of TRH expression seems therefore to involve various extracellular activities that impact independently on different levels of TRH metabolism.

Contact is fundamental for many developmental events. We suggest that the known general differentiation properties of the ECM are accompanied by specific effects on the fetal development of peptide phenotype in CNS neurons. These data suggest that ECM molecules exert effects on specific steps of peptide biosynthesis, in particular at translational levels.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to E. Mata and S. González for providing the animals used in this study, to L. Lezama for technical assistance and to O. Vindrola for the gift of PC1 antibody. Supported in part by grants from DGAPA-UNAM IN216496, CONACYT-INSERM and EU C11*-CT93-0301.

References

- [1] R. Adler, J. Jerdan, A.T. Hewitt, Responses of cultured neural retinal cells to substratum-bound laminin and other extracellular matrix molecules, *Dev. Biol.* 112 (1985) 100–114.

- [2] B.J. Benecke, A. Ben-Ze'ev, S. Penman, The control of mRNA production, translation and turnover in suspended and reattached anchorage-dependent fibroblasts, *Cell* 14 (1978) 931–939.
- [3] J.L. Bixby, W.A. Harris, Molecular mechanisms of axons growth and guidance, *Ann. Rev. Cell Biol.* 7 (1991) 117–159.
- [4] T.O. Bruhn, S.S. Huang, C. Vaslet, E.A. Nillni, Glucocorticoids modulate the biosynthesis and processing of thyrotropin releasing hormone (proTRH), *Endocrine* 9 (1998) 143–152.
- [5] J.M. Burgunder, T. Taylor, Ontogeny of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the rat diencephalon, *Neuroendocrinology* 49 (1989) 631–640.
- [6] J.L. Charli, C. Cruz, J.L. Redondo, C. Guerra, P. Joseph-Bravo, Homologous conditioned medium enhances expression of TRH in hypothalamic neurons in primary culture, *Dev. Brain Res.* 89 (1995) 155–160.
- [7] L. Covarrubias, R.M. Uribe, M. Méndez, J.L. Charli, P. Joseph-Bravo, Neuronal TRH synthesis: developmental and circadian TRH mRNA levels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151 (1988) 615–622.
- [8] A. Faissner, J. Kruse, J1/tenascin-C is a repulsive substrate for central nervous system neurons, *Neuron* 5 (1990) 627–637.
- [9] A. Faivre-Bauman, C. Loudes, A. Barret, C. Patte, A. Tixier-Vidal, Ontogenesis of peptidylglycyl alpha-amidation activity in the mouse hypothalamus in vivo and in serum-free medium cultures. Relation with thyroliberin (TRH) accumulation and release in vitro, *Brain Res.* 468 (1988) 261–267.
- [10] A. Faivre-Bauman, J. Puymirat, C. Loudes, A. Barret, A. Tixier-Vidal, Laminin promotes attachment and neurite elongation of fetal hypothalamic neurons grown in serum-free medium, *Neurosci. Lett.* 44 (1984) 83–89.
- [11] S.R. Farmer, A. Ben-Ze'ev, S. Penman, Altered translability of messenger RNA from suspended anchorage-dependent fibroblasts: reversal upon cell attachment to a surface, *Cell* 15 (1978) 627–637.
- [12] T.C. Friedman, Y.P. Loh, N.X. Cawley, N.P. Birch, S.S. Huang, I.M.D. Jackson, E.A. Nillni, Processing of prothyrotropin-releasing hormone (Pro-TRH) by bovine intermediate lobe secretory vesicle membrane PC1 and PC2 enzymes, *Endocrinology* 136 (1995) 4462–4472.
- [13] F. Fukamauchi, O. Aihara, M. Kusakabe, Reduced mRNA expression of neuropeptide Y in the limbic system of tenascin gene disrupted mouse brain, *Neuropeptides* 32 (1998) 265–268.
- [14] F. Fukamauchi, N. Mataga, Y.J. Wang, S. Sato, A. Yoshiki, M. Kusakabe, Tyrosine hydroxylase activity and its mRNA level in dopaminergic neurons of tenascin gene knockout mouse, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231 (1997) 356–359.
- [15] D. Grouselle, J. Destombes, A. Barret, P. Pradelles, C. Loudes, A. Tixier-Vidal, A. Faivre-Bauman, Evidence for high molecular weight immunoreactive thyrotropin releasing hormone (TRH) precursor forms in the developing mouse hypothalamus. Simultaneous immunolocalization with TRH in cultured neurons, *Endocrinology* 126 (1990) 2454–2464.
- [16] M. Guerra-Crespo, P. Joseph-Bravo, J.L. Charli, L. Perez-Martinez, BDNF increases TRH mRNA in hypothalamic $trkB^+$ neurons, *Soc. Neurosci. (USA) abstract*, 1999.
- [17] A. Howe, A.E. Aplin, S.K. Alahari, R.L. Juliano, Integrin signaling and cell growth control, *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (1998) 220–231.
- [18] R.M. Lechan, R. Toni, Thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuronal systems in the central nervous system, in: C.B. Nemeroff (Ed.), *Neuroendocrinology*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992, pp. 279–330.
- [19] P.C. Letourneau, M.L. Condic, D.M. Snow, Interactions of developing neurons with the extracellular matrix, *J. Neurosci.* 14 (1994) 915–928.
- [20] A. Lochter, L. Vaughan, A. Kaplony, A. Prochiantz, M. Schachner, A. Faissner, J1/tenascin-C in substrate-bound and soluble form displays contrary effects on neurite outgrowth, *J. Cell Biol.* 113 (1991) 1159–1171.
- [21] M. Manthorpe, E. Engvall, E. Ruoslahti, F.M. Longo, G.E. Davis, S. Varon, Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons, *J. Cell Biol.* 97 (1983) 1882–1890.
- [22] A. Nemeskeri, D. Grouselle, A. Faivre-Bauman, A. Tixier-Vidal, Developmental changes of thyroliberin (TRH) in the rat brain, *Neurosci. Lett.* 53 (1985) 279–284.
- [23] K.M. Neugebauer, C.J. Emmet, K.A. Venstrom, L.F. Reichardt, Vitronectin and thrombospondin promote retinal neurite outgrowth: developmental regulation and role of integrins, *Neuron* 6 (1991) 345–358.
- [24] E.A. Nillni, T.C. Friedman, R.B. Todd, N.P. Birch, Y.P. Loh, I.M.D. Jackson, Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinant PC1, *J. Neurochem.* 65 (1995) 2462–2472.
- [25] E.A. Nillni, L.G. Luo, I.M.D. Jackson, P. McMillan, Identification of the thyrotropin-releasing hormone precursor, its processing products, and its coexpression with convertase 1 in primary cultures of hypothalamic neurons: anatomic distribution of PC1 and PC2, *Endocrinology* 137 (1996) 5651–5661.
- [26] L. Pérez-Martínez, A. Carreón-Rodríguez, M.E. González-Alzati, C. Morales, J.L. Charli, P. Joseph-Bravo, Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interactions with the cAMP pathway, *Neuroendocrinology* 68 (1998) 345–354.
- [27] L.P. Pu, W. Ma, J.L. Barker, Y.P. Loh, Differential coexpression of genes encoding prothyrotropin-releasing hormone (Pro-TRH) and prohormone convertases (PC1 and PC2) in rat brain neurons: implications for differential processing of pro-TRH, *Endocrinology* 137 (1996) 1233–1241.
- [28] E. Sánchez, J.L. Charli, C. Morales, G. Corkidi, N. Seidah, P. Joseph-Bravo, R.M. Uribe, Expression of the proprotein convertases PC1 and PC2 mRNAs in TRH neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus, *Brain Res.* 761 (1997) 77–86.
- [29] J.R. Sanes, Extracellular matrix molecules that influence neural development, *Ann. Rev. Neurosci.* 12 (1989) 491–516.
- [30] P. Schaner, R.B. Todd, N.G. Seidah, E.A. Nillni, Processing of prothyrotropin-releasing hormone by the family of prohormone convertases, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 19958–19968.
- [31] G.C. Sephel, K.-I. Tashiro, M. Sasaki, D. Greatorex, G.R. Martin, Y. Yamada, H.K. Kleinman, Laminin A chain synthetic peptide which supports neurite outgrowth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 (1989) 821–829.
- [32] O. Vindrola, A. Chervin, M. Vitale, A.N. Mella, R. Aloyz, A. Basso, Elevated proenkephalin-derived peptide levels in ACTH-producing adenomas, *Endocrine* 8 (1998) 231–240.
- [33] M. Zheng, R.D. Streck, R.E.M. Scott, N.G. Seidah, J.E. Pintar, The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2 and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity, *J. Neurosci.* 14 (1994) 4656–4673.