



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO CORRELATIVO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PIROGLUTAMIL
AMINOPEPTIDASA (PPII) Y EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS RNA
MENSAJEROS DE LAS ISOFORMAS COMPLETA Y TRUNCADA DE LA PPII
DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

KARLA ELISA JUÁREZ CONTRERAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LEONOR PÉREZ-MARTÍNEZ



2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

*Dedico este trabajo a la Universidad Nacional Autónoma de México,
a mis papas Armando y Esther, y a mi abuelita Gloria, por haberme
dado todo para convertirme en bióloga y formado como la persona que
hoy soy.*

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por haberme aceptado como su hija, y a la **Facultad de Ciencias**, por haberme brindado buenos maestros, experiencias, amigos y enseñanzas que me han impulsado a querer convertirme en bióloga.

A mis **profesores de ciencias en la Prepa 2**, y a mi **papá**, por haber sido gran parte de la inspiración que me impulso a dedicarme a la biología. Y también a todos los **buenos profesores de la Facultad de Ciencias y del Instituto de Biotecnología**, que me permitieron dar cuenta de lo fascinante que era dedicarse a la ciencia.

A **Leonor**, por haberme dedicado su tiempo, enseñado a hacer las cosas bien y sobre todo, por haber fungido realmente como una tutora, y brindarme la confianza y libertad de trabajar y proponer por mi misma. ¡Muchas gracias!

A **Jean Louis**, por haberme aceptado como miembro de su grupo de trabajo, por los comentarios, el apoyo brindado durante la realización de este proyecto, y sobre todo, por haber tomado en cuenta mis deseos al permitirme realizar este proyecto. ¡Muchas gracias!

A **Carlos y Miriam**, por la amistad, las risas, el apoyo y las enseñanzas que me han compartido desde que llegue al Instituto de Biotecnología. ¡Muchas gracias!

A **Ivan, Miguel Vargas, Edna y Fide**, por haber compartido su tiempo enseñándome a trabajar y brindado apoyo en la realización de algunos experimentos necesarios para llevar a cabo este proyecto.

A la **señora Elena, Manuel, Miguel Olivera y Sergio del bioterio**, por todo el apoyo brindado en la realización de este proyecto.

A **Jose Luis Puente y Patricia Joseph**, por haber creado el taller de las biomoléculas y permitir que los estudiantes de la facultad de ciencias tengamos contacto con la ciencia de frontera.

A **Ramón, Lorenzo, Luis Felipe y Jean Louis**, por haber aceptado ser mis sinodales y por el enriquecimiento de sus comentarios en la realización de esta tesis.

A mis amigos de la facultad de ciencias **Adriana, Janet, Oliver, Carlos, Claudia, Miguel, Ale, Vania, Cristóbal e Itzel** por ser mis amigos, haber compartido conmigo sus enseñanzas en el camino de volvernos biólogos, y el gran apoyo que me han brindado desde que deje de vivir en la facultad de ciencias. ¡Muchas gracias!

Y a mis amigos de la facultad de ciencias que conocí hasta Cuernavaca **Candy, Iván y Francia**, por ser mis amigos, mi familia y el apoyo durante el tiempo que hemos vivido en Cuernavaca, sin el cual hubiera sido muy difícil terminar este trabajo. ¡Muchas gracias!

A mi **tío Raul y mi tía Carmen**, por haberme soportado viviendo en su casa y el apoyo que me brindaron a lo largo de la carrera.

A mis hermanos, **Armando y Cynthia**, por que a pesar de todos los conflictos siempre seremos hermanos y a **Lupe de la Prepa 2**, porque a pesar de la distancia aun es mi amiga y mi hermana.

Y sobre todo, muchas gracias a **mis papas, a mi abu Gloria, y a la fuerza interna**, por el amor, el apoyo incondicional y porque gracias a haberme enseñado y empujado a ser necia y no desistir nunca, hoy he concluido mi tesis y estoy ya en el posgrado. ¡Muchas muchas gracias!

ÍNDICE

	páginas
A. ABREVIATURAS	i
B. RESUMEN	ii
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. La regulación de la expresión génica en eucariontes multicelulares	1
1.1.1 Regulación transcripcional	1
1.1.1.1 Estructura y remodelación de la cromatina	1
1.1.1.2 Secuencias promotoras y factores de transcripción	2
1.1.1.3 Secuencias <i>enhancers</i>	2
1.1.1.4 Factores represores	3
1.1.1.5 Metilación del DNA	3
1.1.2 Regulación postranscripcional	4
1.1.2.1 Adición del cap 7-metilguanosina	4
1.1.2.2 Adición de la cola de poli-Adeninas	4
1.1.2.3 <i>Splicing</i>	4
1.1.2.3.1 El <i>splicing</i> alternativo	5
1.1.2.3.1.1 Papel de las isoformas de mRNA originadas por <i>splicing</i> alternativo.	5
1.1.2.3.1.2. Regulación del <i>splicing</i> alternativo	6
1.1.2.3.1.3 El <i>splicing</i> alternativo en el Sistema Nervioso Central y en la regulación de la expresión de genes durante su desarrollo	7
2. ANTECEDENTES	
2.1 La hormona liberadora de tirotrópina	9
2.1.1 La inactivación del TRH	9
2.2 La Piroglutamil Aminopeptidasa II	10
2.2.1 Estructura de la proteína	11
2.2.2 Estructura del gen de la PPII	12
2.2.3 Regulación de la actividad enzimática de la PPII en la adenohipófisis	12
2.2.4 Regulación de la actividad enzimática en el SNC	13

2.2.5	Regulación de la actividad enzimática durante el desarrollo	15
2.2.6	Regulación de la actividad enzimática por la PPII truncada	15
3.	HIPÓTESIS	19
4.	OBJETIVOS	19
5.	JUSTIFICACIÓN	20
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1	Colecta de tejido	21
6.2	Extracción del RNA total	22
6.3	Gel desnaturizante para RNA	22
6.4	Transcripción Reversa	23
6.5	Reacción en cadena de la polimerasa	23
6.6	Extracción de las membranas plasmáticas de cerebros	27
6.7	Cuantificación de proteína en membranas de cerebros	27
6.8	Extracción de membranas totales de células	28
6.9	Cuantificación de proteína en membranas de células CA-77	28
6.10	Ensayo enzimático para la PPII	29
6.11	Obtención del vector de expresión para PPII*	29
6.12	Cultivo de células	32
6.13	Tratamiento de células	32
6.14	Evaluación de la eficiencia de transfección	34
6.15	<i>Western blot</i>	34
6.16	Análisis estadístico	35
7.	RESULTADOS	
7.1	Integridad del RNA en gel desnaturizante	36
7.2	Estandarización de las condiciones para amplificar por RT-PCR	
	a) condiciones para amplificar el mRNA de la PPII*	39

b) condiciones para amplificar el mRNA de la PPII ^C	40
7.3 Patrón de expresión de mRNAs durante el desarrollo del SNC	
a) de la PPII ^C	42
b) de la PPII*	43
c) de la PPII ^C y PPII*	44
7.4 Patrón de actividad enzimática de la PPII durante el desarrollo del SNC	45
7.4 Relación entre patrón de expresión de mRNAs y actividad enzimática durante el desarrollo del SNC	46
7.5 Relación entre expresión de PPII ^C /PPII* y actividad enzimática durante el desarrollo del SNC	48
7.6 Relación entre expresión de PPII*/PPII ^C y actividad enzimática durante el desarrollo del SNC	49
7.7 Expresión de los mRNAs de la PPII ^C y PPII* en células CA-77	50
7.8 Actividad enzimática de la PPII en células CA-77	51
7.9 Patrón de restricción del vector empleado para expresar a la PPII*	52
7.10 Evaluación de la eficiencia de transfección	53
7.11 Cinéticas enzimáticas en células CA-77 sometidas a tratamientos	54
7.12 <i>Western blot</i> para la cola de histidinas	56
8. DISCUSIÓN	57
9. CONCLUSIONES	63
10. PERSPECTIVAS	64
11. APÉNDICE	65
12. REFERENCIAS	66

A. ABREVIATURAS COMUNES

TRH: hormona liberadora de tirotropina

PPII: Piroglutamil Aminopeptidasa II

PPII^C: Piroglutamil Aminopeptidasa II completa

PPII*: Piroglutamil Aminopeptidasa II truncada

SNC: Sistema Nervioso Central

E: día embrionario (ejemplo, E14)

P: día postnatal (ejemplo, P7)

M: meses (ejemplo, 3M)

TRH- β NA: TRH- β Naftilamida

GFP: Proteína Verde Fluorescente

T3: Triyodotironina

DIV: Días *in vitro*

DAP IV: Dipeptidil aminopeptidasa IV

PALABRAS CLAVE

Dominante negativa

Splicing alternativo

Peptidasa

Homodimerización

Heterodimerización

Proteína membranal de tipo II

B. RESUMEN

La Piroglutamil Aminopeptidasa II (PPII) es una metalopeptidasa dependiente de zinc, de la familia M1 de las aminopeptidasas. Su función, a diferencia de otros miembros de su familia, se restringe a la degradación de péptidos con secuencias muy similares a la de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la cual se ha descrito como su único sustrato biológico. La actividad enzimática de la PPII se detecta de manera preferencial a nivel de SNC, en donde varía de acuerdo a la región estudiada. Además, se ha reportado que durante el desarrollo, la actividad se regula en hipotálamo, corteza frontal y bulbo olfatorio, presentando en todos los casos un pico en días posteriores al nacimiento. Recientemente se caracterizó una isoforma de mRNA que se origina por *splicing* alternativo y que se traduce en una proteína truncada (PPII*) sin actividad enzimática. *In vitro*, la PPII* reduce de manera dependiente de dosis la actividad de la PPII completa (PPII^C) frente al TRH; *in vivo*, se expresa en mayores niveles que la PPII^C en órganos que presentan baja actividad de PPII. Dentro de nuestro grupo, se ha propuesto que la PPII* actúa como una dominante negativa de la PPII^C a través de la formación de heterodímeros no funcionales.

En el presente estudio determinamos el patrón de expresión de los mRNAs de la PPII^C y PPII*, así como el patrón de actividad enzimática de la PPII durante el desarrollo del SNC de la rata. Nuestros resultados muestran que las dos isoformas de mRNA se expresan desde estadios de desarrollo muy tempranos, mostrando un paralelismo en su expresión en la mayor parte de su ontogenia, exceptuando la etapa desde E19 hasta el día postnatal 0 (P0), en donde la expresión del mRNA de la PPII^C tiende a ser mayor que la del mRNA de la PPII*. De manera similar, la actividad enzimática se detectó temprano en la ontogenia (E14), alcanzando un pico máximo en P0 y P7, y disminuyendo en el adulto. Al comparar la relación de los mRNAs con los niveles de actividad enzimática, ésta fue menor cuando la expresión de los mRNAs de la PPII^C y PPII* fue similar (E14-E18, 3M y 5M). Sin embargo, cuando la expresión del mRNA de la PPII^C fue mayor que la del mRNA de la PPII*, la actividad fue mayor (E19-P0).

Por otro lado, determinamos la expresión de la PPII^C y PPII*, así como actividad enzimática de PPII en una línea celular que expresa de manera endógena al TRH: CA-77. De manera

interesante, las células que fueron mantenidas un día *in vitro* presentaron mayores niveles de mRNAs de PPII^C y PPII*, que las que fueron mantenidas cuatro días *in vitro*, lo cual apunta a que los niveles de expresión de los mRNAs se regulan en función de la concentración de factores de crecimiento. Aunado a ello, determinamos la actividad enzimática en células en las que sobreexpresamos a la PPII* o que tratamos con la hormona tiroidea T3, un regulador positivo de la actividad de PPII en adenohipófisis. Si bien los resultados que obtuvimos de estos experimentos son aún muy preliminares, apuntan a que en las células CA-77, la PPII* funciona como un regulador negativo de la actividad enzimática de la PPII^C, y que la T3, contrario a lo esperado, también funciona como un regulador negativo de la actividad enzimática en este contexto celular.

En conjunto, nuestros resultados apuntan a que la PPII* funciona *in vivo* como una dominante negativa de la PPII^C, y que el balance en la expresión de los mRNAs de las dos isoformas determina los niveles de actividad de la PPII durante el desarrollo del SNC de la rata.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *La regulación de la expresión génica en eucariontes multicelulares*

La regulación en la expresión génica que se da durante el desarrollo embrionario de los organismos multicelulares permite la existencia de la compleja diversidad molecular y funcional entre las células que los constituyen al ser adultos ^(1, 2). Dicha regulación se da de manera tan fina y sutil, que sólo el gen preciso es activado en la célula y momento adecuados ⁽³⁾, permitiendo que exista el arreglo justo de moléculas que dirijan el crecimiento, diferenciación y movimiento de células para formar un embrión tridimensional ⁽²⁾.

Si bien, dicho arreglo de moléculas se debe primariamente a la regulación a nivel transcripcional ^(1, 2), los tipos de regulación postranscripcional, traduccional y posttraduccional son también de vital importancia para determinar los niveles finales de los productos génicos ⁽⁴⁾.

1.1.1 *Regulación transcripcional*

La regulación transcripcional consiste primordialmente en decidir qué genes serán transcritos en el RNA inicial, y se debe principalmente a modificaciones en la cromatina y a la unión de moléculas activadoras y represoras en secuencias reguladoras en los genes ^(1,2).

1.1.1.1 *Estructura y remodelación de la cromatina*

Dentro de las células eucarióticas, el DNA no se encuentra libre, sino asociado de manera muy estrecha con histonas, en nucleosomas que constituyen a la cromatina ^(1, 3). Por la capacidad del DNA de formar bucles, la cromatina puede condensarse aún mas, lo cual hace menos disponible al DNA para los factores de transcripción y la RNA polimerasa, evitando que los genes que se encuentran en ese segmento condensado sean transcritos en RNA. A la cromatina más condensada, se le denomina heterocromatina, y presenta, como una de sus características, secuencias de DNA altamente repetitivas, y genes que la mayor parte del tiempo están silenciados. La cromatina menos condensada es la eucromatina y en ella se encuentran secuencias de DNA poco repetidas, y genes, que son transcripcionalmente activos ^(1, 5).

Sin embargo, la descondensación de la cromatina no es suficiente para convertir al DNA en un

molde accesible para la transcripción, ya que todavía existe la unión a las histonas y el empaquetamiento del DNA en los nucleosomas ⁽¹⁾. Para superar la barrera que constituye el empaquetamiento del DNA, existen proteínas que pueden modificar a las histonas, haciendo al DNA más accesible, y facilitando de esta manera, la unión de factores de transcripción y de la RNA polimerasa al DNA. Como ejemplos, están las acetilasas y los factores de remodelación de la cromatina. Las primeras reducen la carga positiva neta de las histonas, debilitando su unión con el DNA y otras proteínas, de manera que se facilite la unión de factores de transcripción al DNA ^(1, 5). Los segundos, recolocalizan a los nucleosomas en el DNA, dejando espacio libre sobre el DNA para que se le unan factores de transcripción ⁽¹⁾.

1.1.1.2 *Secuencias promotoras y factores de transcripción*

Una vez que el DNA se encuentra accesible, los factores de transcripción se unen a éste, y promueven el reclutamiento de las proteínas necesarias para transcribir al DNA en RNA. Los factores de transcripción reconocen en *trans* al DNA, en secuencias específicas denominadas promotores. En los promotores de eucariotes, algunas de las secuencias más comunes son la *TATA box* (TATAA) y la *Inr*, las cuales son reconocidas por la TBP (*TATA Binding Protein*) o la TAF 1 y TAF 2 del factor de transcripción TFIID, respectivamente ^(1, 6). En cualquiera de los casos, una vez que TFIID se ha unido, otros factores de transcripción, junto con la RNA polimerasa también se le unen, formando así el complejo de inicio de la transcripción, el cual cataliza la unión de ribonucleótidos ^(1, 6).

Los factores de transcripción pueden ser generales o particulares. En el caso de los generales, están implicados en la transcripción a partir de todos los promotores de genes transcritos por la RNA polimerasa II, y constituyen parte de la maquinaria transcripcional básica. En el caso de los particulares, se unen a secuencias de DNA que controlan la expresión de genes individuales y son por tanto responsables de regular la expresión génica ⁽²⁾.

1.1.1.3. *Secuencias enhancers*

Además de los promotores, otras secuencias de acción en *cis*, son las secuencias *enhancers*. Estas son secuencias presentes en el DNA, cuya función es reclutar a factores de transcripción que regulan la actividad de la RNA polimerasa. La particularidad de estas secuencias es que

estimulan la tasa transcripcional de un gen sin importar la dirección ni la distancia respecto al sitio de inicio de la transcripción, ya que la capacidad del DNA de formar bucles, permite que factores de transcripción unidos a *enhancers* interactúen con la RNA polimerasa o con factores de transcripción generales que se encuentran unidos al promotor ⁽¹⁾. Las secuencias *enhancers* pueden contener secuencias de unión para los mismos factores que se unen inmediatamente corriente arriba del promotor, pero con frecuencia contienen sitios de unión para esos factores y para factores distintos, lo cual aumenta la actividad del promotor por muchos órdenes de magnitud ⁽²⁾.

1.1.1.4 Factores represores

Los factores represores son proteínas que se unen a secuencias específicas en el DNA, inhibiendo la transcripción. En algunos casos, los represores simplemente interfieren con la unión de otros factores de transcripción al DNA a través de interacciones proteína-proteína ⁽¹⁾, mientras que en otros, compiten con factores de transcripción por unirse a secuencias en el DNA, o bien, inhiben directamente la transcripción, aún en la ausencia de un factor que actúe positivamente ⁽²⁾.

De esta manera, el balance entre la unión de activadores transcripcionales, que aumentan la tasa de transcripción mas allá de la tasa basal, y de represores transcripcionales, que la reducen, determina la tasa transcripcional de un gen ⁽²⁾.

1.1.1.5 Metilación del DNA

La metilación del DNA es un mecanismo que conduce al silenciamiento temporal o permanente de genes. En mamíferos consiste en la adición de un grupo metilo a un residuo de citosina que precede a uno de guanina (secuencia CpG), y se lleva a cabo por una metiltransferasa. Ocurre con frecuencia en genes que están presentes en la heterocromatina ^(1, 5, 7).

La metilación en las secuencias promotoras de ciertos genes previene el ensamblaje de complejos competentes de la transcripción ⁽⁷⁾, y promueve el reclutamiento de modificadores de histonas a la región, facilitando de esta manera el silenciamiento de genes ⁽⁵⁾.

1.1.2. Regulación postranscripcional

Una vez que el gen ha sido transcrito en un pre-mRNA, para que pueda ser traducido en proteína, debe ser modificado postranscripcionalmente, de manera que se genere una molécula funcional con la estabilidad suficiente para ser traducida y con la secuencia definida de los nucleótidos que han de ser traducidos en aminoácidos (1, 4, 8).

1.1.2.1 Adición del cap 7-metilguanosina

Todos los pre-mRNAs, al madurar, pasan por la remoción de un fosfato en el extremo 5' y la adición de una guanosina-metilada por una guanosiltransferasa, que se convierte entonces en un cap de 7-metilguanosina. Este cap protege al extremo 5' del mRNA contra degradación por ribonucleasas y funciona en el inicio de la síntesis de proteínas, fungiendo como una secuencia de reconocimiento para el complejo de inicio de la traducción (1, 8).

1.1.2.2. Adición de la cola de poli-Adeninas

La mayor parte de los pre-mRNAs, al madurar, son cortados cerca del extremo 3' entre una secuencia AAUAAA y una secuencia rica en GU. El corte ocurre aproximadamente 20 nucleótidos corriente abajo de AAUAAA. Dicha secuencia consenso, además de ser reconocida por enzimas que catalicen el corte, también es reconocida por la poli-A polimerasa, la cual adiciona una cola de poli adeninas (poli A), de hasta 250 adeninas, al extremo 3'. La presencia de la cola poli A aumenta la eficiencia de traducción del mRNA y brinda protección al extremo 3' del mRNA contra degradación por nucleasas (1, 8).

1.1.2.3 Splicing

Las regiones codificantes de la mayor parte de los genes se hallan interrumpidas por secuencias no codificantes que son removidas de las moléculas de pre-mRNA para producir mRNA a través del proceso de *splicing*. Este proceso se lleva a cabo de manera cotranscripcional por el *spliceosome*, un complejo de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs), ribonucleoproteínas nucleares accesorias (hnRNPs), RNAs nucleares pequeños (snRNAs) y otras proteínas accesorias que intervienen en el reconocimiento de los sitios de *splicing* (e.g. SF1; factor de *splicing* 1, U2AF; factor auxiliar U2) (9, 10).

A través de múltiples interacciones RNA-RNA, RNA-proteína y proteína-proteína, el *spliceosome* reconoce las uniones exón-exón y cataliza dos reacciones secuenciales de trans-esterificación que remueven intrones y ligan exones. En el 95-99% de los casos, la secuencia de reconocimiento de término de un intrón son GU en 5' (al inicio del intrón; sitio aceptor en 5') y AG en 3' (al final del intrón; sitio aceptor en 3'). Además de estas secuencias, los elementos exónicos e intrónicos en *cis*, enhancers y silenciadores del *splicing*, ayudan en la identificación correcta de los límites exón-intrón, evitando que los intrones sean incluidos en el mRNA ^(9, 10). A este tipo de *splicing* se le denomina canónico, y es el que clásicamente ocurre en muchos genes. En general, permite generar mRNAs maduros y estables con el marco abierto de lectura (ORF) completo y proteínas funcionales ⁽¹¹⁾.

1.1.2.3.2 El *Splicing* alternativo

Contrario al principio de “un gen, un polipéptido”, un pre-mRNA no solo madura en un mRNA con los exones empalmados (*splicing* canónico), sino que también puede madurar en una amplia diversidad de mRNAs (*splicing* alternativo) ^(9, 11), que de tener la estabilidad suficiente, se traducen en proteínas. Por lo anterior, el *splicing* constituye un mecanismo fundamental en la expresión diferencial de genes, y puede ser considerado como un paso regulatorio versátil ⁽¹¹⁾.

Las diferentes isoformas de mRNA originadas por *splicing* alternativo, pueden presentar todos o algunos de los exones presentes en el mRNA originado por *splicing* canónico, y en muchos casos, presentar intrones o segmentos de intrones ausentes en el mRNA originado por *splicing* canónico ^(9, 11).

El tener una amplia diversidad de mRNAs a partir de un gen, potencialmente permite a los organismos tener una amplia diversidad proteómica ^(12, 13, 14). Como ejemplo extremo, está el caso de *Drosophila melanogaster*, en la cual, las 38016 proteínas distintas que potencialmente pueden formarse a partir de las isoformas de mRNA del gen DSCAM (el cual codifica para una molécula de adhesión celular), superan el número de genes predichos en su genoma ^(12, 13).

1.1.2.3.2.2 Papel de las isoformas de mRNA originadas por *Splicing* alternativo

En la mayor parte de los casos, las proteínas originadas por *splicing* alternativo pueden traducirse en proteínas, sin embargo, dada la inestabilidad del RNA y la existencia de

secuencias que promueven su degradación, existen casos en los que las isoformas de mRNA son degradadas ^(15, 16).

Para los casos en los que las isoformas de mRNA originadas por *splicing* alternativo se traducen en proteína, estas proteínas pueden presentar una función similar, o variar en su actividad y localización dentro y fuera de la célula, presentando, para los casos en los que la función es distinta, pudiendo actuar de manera similar, mas eficiente ⁽¹¹⁾, antagónica (e.g. isoformas de Bcl-x) ⁽¹⁷⁾, como dominantes negativas (e.g. isoformas de dNOS1) ⁽¹⁸⁾ o completamente distinta (e.g. isoformas de neurexin- α ; isoformas del receptor de la tirosina quinasa RET) ^(19, 20) a la de la proteína que viene de un mRNA que madura por *splicing* canónico.

Sin embargo, como se señaló anteriormente, el tener una gran diversidad de isoformas de mRNA, no siempre implica que se vaya a tener una amplia diversidad de proteínas, pues el que el mRNA pueda o no traducirse depende de la estabilidad de su secuencia, es decir, de señales en *cis* que presenten en los 3' UTR's, de la longitud de su poly A, y de la estabilidad de su estructura secundaria ⁽⁴⁾. Usualmente, los mRNAs estables se expresan en niveles significativos en tejido específico, tipo celular o durante una etapa particular del desarrollo ⁽¹³⁾; asimismo, tienen una cola de poli A larga, y presentan como señal consenso a la secuencia de STOP (UAA, UAG, UGA) 55 aminoácidos antes de la última unión exón-exón ⁽¹⁶⁾. Usualmente, los mRNAs que presentan a la secuencia de STOP a una distancia mayor de 55 nucleótidos, son blanco del proceso *Non mediated decay*, a través del cual, se degradan los mRNAs que no han de traducirse en proteínas ⁽¹⁶⁾. En estos casos, el *splicing* alternativo, funge como un mecanismo de regulación de la expresión génica permitiendo de un encendido y apagado conveniente de la expresión génica y complementario a la regulación a nivel transcripcional.

1.1.2.3.2.3 Regulación del *splicing* alternativo

La selección de los sitios de *splicing* alternativo es regulada por un número de factores que determinan la composición precisa del mRNA dependiendo del tipo celular⁽¹¹⁾, de los procesos fisiológicos⁽²¹⁾, determinación del sexo ^(9, 11, 22, 24), en respuesta a factores estresantes⁽¹¹⁾, por etapas de desarrollo ^(22, 24) y cambio en la actividad neural ⁽¹³⁾.

De manera general, las señales que regulan el *splicing* alternativo lo hacen a través de modificaciones en el estado de fosforilación, localización intracelular y síntesis de proteínas del

spliceosome ^(22, 23). Como ejemplo de dichas señales están la despolarización, la presencia de hormonas, de citoquinas ^(22, 23) y de factores de crecimiento ^(22, 23, 25).

Durante el desarrollo, este mecanismo de regulación de la expresión de genes, juega un papel fundamental, permitiendo la expresión diferencial en el tiempo de proteínas originadas a partir de un mismo pre-mRNA, que cumplen con las funciones complejas que se requieren para formar a un organismo ⁽¹¹⁾.

1.1.2.3.2.4 El Splicing alternativo en el Sistema Nervioso Central y en la regulación de la expresión de genes durante su desarrollo.

En los eucariotas superiores, el *splicing* alternativo se lleva con frecuencia en el Sistema Nervioso Central (SNC), generando la gran variedad de proteínas que se requieren para apoyar las complejas propiedades adaptativas y de procesamiento que lo definen ⁽¹³⁾. Se conoce que al menos 30% de los genes que específicamente se expresan en neuronas son sujetos a este tipo de regulación génica ⁽¹³⁾. Muchos de estos están involucrados en el desarrollo y regeneración del SNC, e incluyen isoformas de factores de crecimiento y sus receptores, así como moléculas de adhesión celular y canales iónicos ⁽¹³⁾. Tan sólo en los humanos, que presentan en el 60 a 70% de sus genes una regulación a través de *splicing* alternativo, la mayor parte de los genes sujetos a este tipo de regulación se expresan preferencialmente a nivel de SNC ⁽¹³⁾.

Un ejemplo de gen sujeto a este tipo de regulación es el de *Laf-4* de *Mus musculus*, el cual presenta múltiples isoformas de mRNA que se expresan de manera diferencial durante el desarrollo, y que potencialmente pueden traducirse en factores de transcripción con actividad distinta ⁽²⁶⁾.

Por otro lado, las neurexinas son moléculas que se han descrito como fundamentales para la formación y función de conexiones sinápticas, y todos los genes que las codifican son sujetos a este tipo de regulación ^(19, 27). Tal es el caso de las isoformas α de *neurexin-I*, *neurexin II* y *neurexin III* de *Xenopus laevis*, las cuales se expresan de manera diferencial en tiempo y localización durante el desarrollo del SNC, fundamentalmente en la etapa de sinaptogénesis ⁽¹⁹⁾.

Un gen, también sujeto a este tipo de regulación es el de *dNOS* de *D. melanogaster* el cual presenta múltiples isoformas de mRNA que también se expresan de manera diferencial durante el desarrollo del SNC. Estas isoformas de mRNA codifican para sintetas de ácido nítrico, y de estas, únicamente una, la dNOS1, es capaz de sintetizar ácido nítrico, requiriendo de la homodimerización para realizar dicha función. El resto de las isoformas codifican para proteínas truncadas, y las que se han caracterizado, son incapaces de sintetizar ácido nítrico y pueden inhibir la actividad de la dNOS1 a través de heterodimerización no funcional⁽¹⁸⁾.

Como modelo de este tipo de regulación de la expresión génica, nosotros hemos tomado al gen de la Piroglutamil Aminopeptidasa II, el cual, se expresa de manera preferencial a nivel de SNC⁽²⁸⁾, y al madurar su pre-mRNA, puede originar en el cerebro de la rata una amplia diversidad de isoformas de mRNA, presumiblemente, a través de *splicing* alternativo⁽²⁹⁾. Hasta la actualidad, se han caracterizado funcionalmente a dos de esas isoformas, una que origina a una proteína completa con la capacidad de hidrolizar a la hormona liberadora de tirotrópina⁽²⁹⁾, y otra truncada, cuyo mRNA se expresa *in vivo* en tejidos de rata, y que *in vitro*, es capaz de traducirse en una proteína truncada, que actúa como una dominante negativa de la proteína completa⁽³⁰⁾.

2. ANTECEDENTES

2.1 La hormona liberadora de tirotrópina

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) es un tripéptido con la estructura pGlu-His-Pro-NH₂, que presenta las funciones de hormona, neurotransmisor y neuromodulador. Su función como hormona ha sido estudiada ampliamente, y se sabe que provoca la liberación de prolactina y tirotrópina, y bajo ciertas circunstancias, la de la hormona de crecimiento de la adenohipófisis ⁽³¹⁾.

Por otro lado, como neurotransmisor, provoca un amplio rango de respuestas conductuales al aplicarlo directamente en el cerebro, sin embargo, la mayor parte de las respuestas que provoca son transitorias y de corta duración ⁽³¹⁾, lo cual implica que los receptores para TRH (TRH-R1 y TRH-R2) pierden sensibilidad a éste ⁽³²⁾, o bien, que el péptido es inactivado a través de corte enzimático ⁽³¹⁾. Se sabe que en el SNC ambos fenómenos ocurren, no obstante, las evidencias apuntan a que la inactivación por corte enzimático es el mecanismo principal a través del cual termina la señal del TRH ⁽³³⁾.

2.1.1. La inactivación del TRH

Hasta la fecha se han descrito cuatro peptidasas capaces de inactivar al TRH. Dos de esas peptidasas son la Piroglutamil Aminopeptidasa I (PPI, EC 3.4.19.3) y la Prolil Endopeptidasa (PE; EC 3.4.21.26). *In vitro*, la PPI inactiva al TRH cortando en el enlace pGlu-His ⁽³⁴⁾, y la PE, lo hace cortando entre His-Pro ⁽³⁵⁾, sin embargo, se ha propuesto que *in vivo* no juegan un papel fundamental en la inactivación del TRH. Esto último debido a que se distribuyen en muchos tejidos, son mayoritariamente citosólicas, degradan un amplio rango de sustratos ^(34, 35), se desconoce en que compartimiento celular podrían inactivar al TRH ⁽¹⁵⁾, y en algunos estudios, al inhibirlas, se ha observado que no aumentan los niveles extracelulares de TRH ^(36, 37).

Por otro lado, existen dos peptidasas, que se han propuesto como fundamentales en terminar la señal del TRH *in vivo*. Estas son la Tiroliberinasa y la Piroglutamil Aminopeptidasa II (PPII; EC 3.4.19.6). Ambas presentan una especificidad de sustrato restringida, y las evidencias apuntan a que son codificadas a partir del mismo gen, y que ocurre un evento de *splicing* alternativo ⁽³⁸⁾ o de corte enzimático en la PPII que da origen a la Tiroliberinasa ^(38, 39). Esta

última es una enzima sérica que se origina en el hígado y su única función descrita es la de inactivar al TRH en la sangre, cortando entre el enlace pGlu-His⁽³⁸⁾. Para el caso de la PPII, ésta se expresa y actúa principalmente a nivel del SNC, y en menores niveles, en otros órganos, tales como adenohipófisis, hígado y pulmón⁽²⁸⁾. La inactivación del TRH al cortar en el enlace pGlu-His, constituye hasta hoy su única función descrita⁽³³⁾, y las evidencias experimentales indican que la inactivación mediada por la PPII es el mecanismo principal a través del cual se termina la señal del TRH en SNC⁽³³⁾.

2.2.. *La Piroglutamil Aminopeptidasa II*

La PPII es una metalopeptidasa dependiente de Zinc⁽⁴⁰⁾, del clan MA de la familia M1 (*Membrane alanil aminopeptidases*) de las aminopeptidasas. Por su función, se le conoce también como “Ectoenzima degradadora de TRH” o “Enzima degradadora de TRH unida a membrana”⁽⁴⁰⁾.

La familia MI de las aminopeptidasas se encuentra ampliamente distribuida en los reinos biológicos, desde bacterias hasta animales⁽³⁹⁾. Su sitio activo presenta la secuencia consenso del clan MA: el motivo His-Glu-Xaa-Xaa-His (‘HEXXH’) seguido de un Glu posicionado C-terminal al motivo en 18 a 72 residuos. Los ligandos del Zinc lo constituyen las dos histidinas en el motivo^(39, 40). Como característica de la familia se encuentra el motivo conservado: Gly-X-Met-Glu-Asn, en el que X puede ser Ala o Gly⁽⁴⁰⁾.

Los miembros que constituyen a esta familia son aminopeptidasas, que en su mayoría, remueven aminoácidos en el N-terminal de una amplia diversidad de péptidos⁽³⁹⁾, exceptuando a la PPII, la cual se ha caracterizado como una peptidasa altamente específica^(33, 40).

A diferencia de otros miembros de su familia, la especificidad de la PPII se restringe a la degradación de péptidos con estructuras muy similares a la del TRH. Con la excepción de pGlu-Phe-Pro-NH₂, la PPII solo hidroliza péptidos de no más de cuatro aminoácidos, con la estructura general pGlu-His-X o Y, en donde X puede ser Pro, Ala o Trp, mientras que Y puede ser Pro-NH₂, Pro-Gly o Pro-β Naftilamida. En comparación con el TRH, todos los análogos de TRH y derivados de tripéptidos probados (3-metil-TRH, TRH ácido, TRH

metilamida, Glp-His-pyrrolidina, entre otros) son hidrolizados considerablemente mas lento o no por completo, indicando que la entidad completa del TRH es reconocida por la enzima. Por otra parte, la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante (LH-RH), con la secuencia pGlu-His, inhibe efectivamente la degradación de TRH, pero no es hidrolizada ⁽⁴¹⁾. Ni el péptido similar a TRH: pGlu-Glu-Pro-NH₂, ni los péptidos como la neurotensina, gastrina o bombesina, son hidrolizados por la PPII ⁽⁴⁰⁾. Estos requerimientos estructurales la hacen una de la neuropeptidasas degradadoras más específicas descritas ⁽⁴¹⁾.

La actividad de la PPII se halla presente en niveles bajos en adenohipófisis, hígado, pulmón, corazón y bazo, entre otros, y se presenta de manera preferencial en el SNC, encontrándose ahí los niveles de actividad más altos ⁽²⁸⁾. Aun dentro del SNC, los niveles de actividad son diferentes dependiendo de la región estudiada, siendo el bulbo olfatorio, la corteza y el hipocampo las regiones que mayor actividad de PPII presentan ^(42, 43).

La PPII presenta características que la hacen ideal para inactivar al TRH eficientemente, ya que es una ectopeptidasa (con su sitio activo ubicado hacia el medio extracelular) ⁽⁴⁴⁾, con una localización probablemente postsináptica, pues colocaliza con receptores del TRH en las células blanco de TRH ^(45, 46). Esas características, aunadas a su restringida especificidad, y que al inhibirla, haya una mayor recuperación de TRH en rebanadas de cerebro ⁽⁴⁷⁾, son evidencias que apuntan a que la inactivación mediada por la PPII es el mecanismo principal a través del cual se termina la señal del TRH ⁽³³⁾.

2.2.1. Estructura de la proteína

En cuanto a su estructura, se ha predicho que es una proteína integral de membrana de tipo II, es decir, con una sola hélice transmembranal y con el dominio carboxilo terminal hacia el espacio extracelular. Su dominio intracelular es corto, y presenta un residuo de treonina que potencialmente podría ser un sitio de fosforilación por la Proteína Kinasa C (PKC). Su dominio transmembranal se encuentra muy cerca del extremo amino terminal, y está compuesto por 22 aminoácidos precedidos por una secuencia básica de terminación de transferencia. Su dominio extracelular es muy largo, encontrándose dentro de éste, la secuencia consenso de las metalopeptidasas dependientes de Zinc que constituye al sitio activo, con el

residuo de ácido glutámico separado por 18 aminoácidos. Asimismo, hay una secuencia consenso para sulfatación por tirosina (aminoácido 381) y 12 posibles sitios de N-glicosilación^(29, 48), además de cisteínas importantes para la función hidrolítica y para poder dimerizar covalentemente⁽⁴⁹⁾ (Figura 1 A y B).

Evidencias experimentales sugieren que para poder funcionar hidrolíticamente, la PPII forma homodímeros que se insertan en la membrana plasmática. Si bien, se ha propuesto al residuo de cisteína 68 (en el dominio extracelular) como importante para la homodimerización covalente⁽⁴⁹⁾, se sabe que no es un requerimiento fundamental para su función⁽⁴⁹⁾, y observaciones previas apuntan a que la homodimerización puede ocurrir a través de otros residuos en el dominio extracelular⁽⁵⁰⁾.

2.2.2 Estructura del gen de la PPII

El gen de la PPII se encuentra en el cromosoma 7 de la rata, y está compuesto de 412063 pares de bases, organizados en 19 exones y 18 intrones. La región no traducida está contenida en el exón 1 (31 pares de bases que constituyen el 5' UTR) y en el exón 19 (2835 pares de bases que constituyen el 3' UTR)⁽⁵¹⁾. El mRNA que al madurar por *splicing* conserva solo los exones consta de 5989 nucleótidos, que se traducen en la proteína de 1025 aminoácidos que hidroliza al TRH⁽²⁹⁾ (En adelante denominada PPII completa, PPII^C).

A través de estudios por *Northern blot*, se sabe que existen más transcritos de la PPII, además del que origina a la PPII^C. Estos transcritos son de distintos tamaños, desde 2.4 hasta 9.5 kb. Se desconoce el origen de esos transcritos, aunque las evidencias experimentales por *Southern blot*, indican que existe un solo gen de la PPII, por lo que un mecanismo que se ha propuesto para el origen de esos transcritos es el *splicing* alternativo⁽²⁹⁾.

2.2.3 Regulación de la actividad enzimática de la PPII en la adenohipófisis.

Hasta el momento, las evidencias sobre regulación de la actividad de la PPII se tienen a nivel de adenohipófisis, en donde el mRNA y actividad enzimática de la PPII son regulados positivamente en respuesta a la hormona tiroidea triyodotironina (T3)⁽⁵²⁻⁵⁶⁾. Ello se sabe en base en estudios en los que se ha inyectado T3 en ratas, y determinado actividad enzimática con extractos membranales de adenohipófisis, así como en cultivos primarios de adenohipófisis en presencia de T3, en los cuales, se ha observado aumento en la actividad enzimática y en los

niveles de mRNA a los pocos días *in vitro*. Se han observado efectos opuestos en extractos membranales de adenohipófisis de ratas a las que se les provoca hipotiroidismo por inyección de Propiltiouracilo (PTU)^(52-54, 56).

Por otro lado, los niveles séricos de hormonas modulan los niveles de mRNA y actividad de la PPII, ya que en ratas ovariectomizadas (y por tanto, con bajos niveles de estrógenos), la actividad de la PPII aumenta, y ese efecto se ve revertido por el 17- β -oestradiol (E_2)⁽⁵³⁾. Además, la actividad de la PPII varía de acuerdo al género, ya que se ha observado menor actividad enzimática en cultivos primarios realizados a partir de hembras que de machos⁽⁵⁷⁾. Asimismo, se sabe que la actividad de la PPII varía durante el ciclo estral⁽⁵⁸⁾, encontrándose los niveles más bajos en el día diestro 2⁽⁵⁸⁾ y también varía durante el ciclo circadiano de ratas machos, encontrándose una disminución en los niveles de mRNA y de actividad enzimática por la mañana⁽⁵⁹⁾.

Un modulador importante de la actividad de la PPII lo constituye el TRH, el cual regula negativamente la actividad enzimática, presumiblemente, a través de la activación de los receptores de TRH⁽⁶⁰⁾.

2.2.4 Regulación de la actividad enzimática en el SNC

Se han llevado a cabo estudios con el fin de elucidar si factores como la T3 o los estrógenos, regulan la actividad de la PPII en el SNC, sin embargo, no se ha observado efecto con alguno de estos factores sobre la actividad en el SNC^(54, 55). La poca evidencia que se tiene de regulación de la actividad enzimática de la PPII en el SNC se ha encontrado en paradigmas experimentales, tales como el *kindling* amigdalino (un modelo de epilepsia)⁽⁶¹⁾ y la inyección aguda de etanol⁽⁶²⁾.

Para el caso del *kindling* amigdalino, se ha encontrado que la actividad de la PPII se ve regulada positivamente en regiones epileptogénicas, tales como amígdala, hipocampo, corteza frontal y núcleo accumbens. Asimismo, se ha observado que estos cambios están asociados con cambios en los niveles de mRNA de la PPII⁽⁶¹⁾.

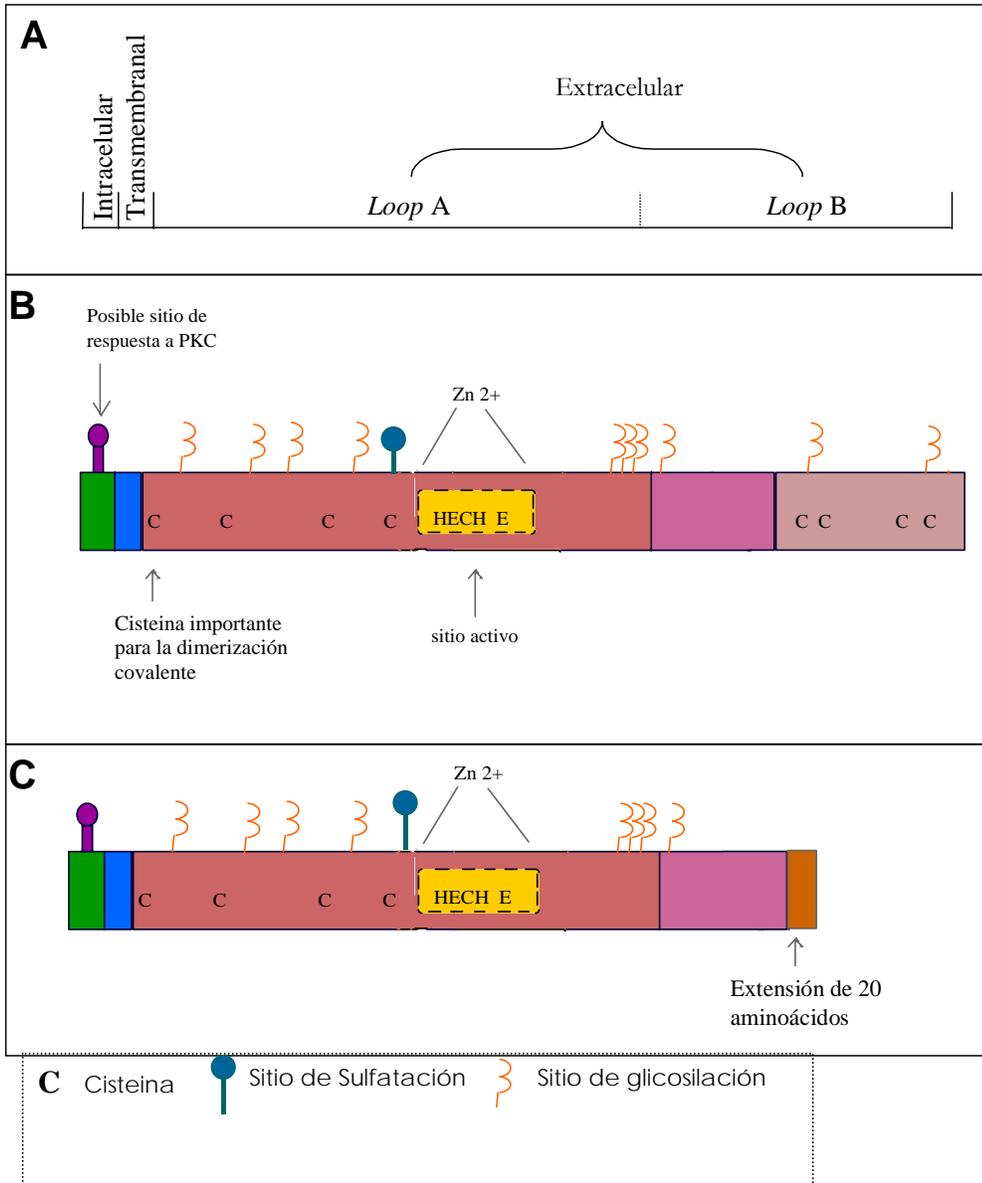


Figura 1. Estructura de la PPII^C y de la PPII^{*}. A) La PPII^C es una proteína transmembranal con un dominio intracelular pequeño (verde) en el que se encuentra un posible sitio de respuesta a PKC, un dominio transmembranal corto (azul) y un dominio extracelular muy largo formado por el loop A (rosa), y el loop B (fucsia y lila). En el dominio extracelular se encuentra el sitio activo, un posible sitio de sulfatación, cisteínas importantes para la dimerización covalente y para la función hidrolítica frente al TRH, así como 12 posibles sitios de N-glicosilación. B) La PPII^{*} tiene un dominio intracelular y transmembranal idénticos al de la PPII^C. En el dominio extracelular presenta el sitio activo íntegro y algunas de las cisteínas importantes para su función, entre ellas, la que se requiere para la dimerización covalente (Cys 68, ver figura). El *loop B* no se halla íntegro, y carece de dos posibles sitios de N-glicosilación y de 4 cisteínas esenciales para la función hidrolítica frente al TRH. Hacia la región C terminal presenta una extensión de 20 aminoácidos (anaranjado), ausentes en la PII^C.

En el caso de la administración aguda de etanol, se ha observado que tanto la actividad de PPII como sus niveles de mRNA se ven regulados negativamente en regiones del sistema límbico en las que las neuronas TRHérgicas son moduladas, como la corteza frontal, hipotálamo, hipocampo y amígdala ⁽⁶²⁾.

2.2.5 Regulación de la actividad enzimática durante el desarrollo

Estudios llevados a cabo en algunas zonas del SNC y en adenohipófisis mostraron que la PPII se regula durante el desarrollo ⁽⁶³⁾. En el hipotálamo, la actividad es detectable desde el día embrionario 16, la etapa más temprana estudiada. La actividad aumenta hacia el nacimiento y presenta niveles máximos en el día postnatal 8 (P8). La actividad decrece hacia los días P46 y P66, manteniendo niveles ligeramente más altos que los detectados en la etapa prenatal. En el bulbo olfatorio, la actividad es detectable desde el primer día postnatal (P0), la etapa más temprana estudiada, y presenta dos picos, uno en el día P3 y otro en el día P22 ⁽⁶³⁾.

En la corteza cerebral posterior, la actividad es detectable desde P0, la etapa más temprana estudiada. Alcanza los niveles máximos en P8, y decrece hacia el día P22, manteniendo hacia etapas posteriores (P46 y P66), niveles de actividad enzimática ligeramente más altos que los detectados en P0 ⁽⁶³⁾.

En la adenohipófisis, el estudio se llevó a cabo desde el día P0, y la actividad fue detectable hasta el día P8, coincidiendo con la maduración del control de las funciones adenohipofisarias por el hipotálamo y con el inicio de la expresión de PRL y producción de hormonas tiroideas. Los niveles máximos se detectan en P22, y tienden a disminuir hacia la etapa adulta, alcanzando niveles ligeramente más altos que en el día P8 ⁽⁶³⁾.

2.2.6 Regulación de la actividad enzimática por la PPII truncada

Recientemente, se caracterizó en nuestro laboratorio a una isoforma de mRNA distinta a la de la PPII^C, que se expresa *in vivo* en tejidos de rata y que codifica para una proteína truncada (PPII*) ⁽³⁰⁾. Se ha propuesto que este mRNA se origina por *splicing* alternativo, ya que presenta un segmento de 90 nucleótidos del intrón 14 entre el exón 14 y 15. Este segmento del intrón está en fase con el marco abierto de lectura, y lleva dos codones consecutivos de *STOP* (TAG

TGA) Estos codones de *STOP* corresponden a los nucleótidos 2494-2499 en el cDNA de la PPII* de la rata, y hacen que el mRNA al traducirse, origine una proteína truncada hacia el extremo carboxilo terminal₍₃₀₎ (Figura 2).

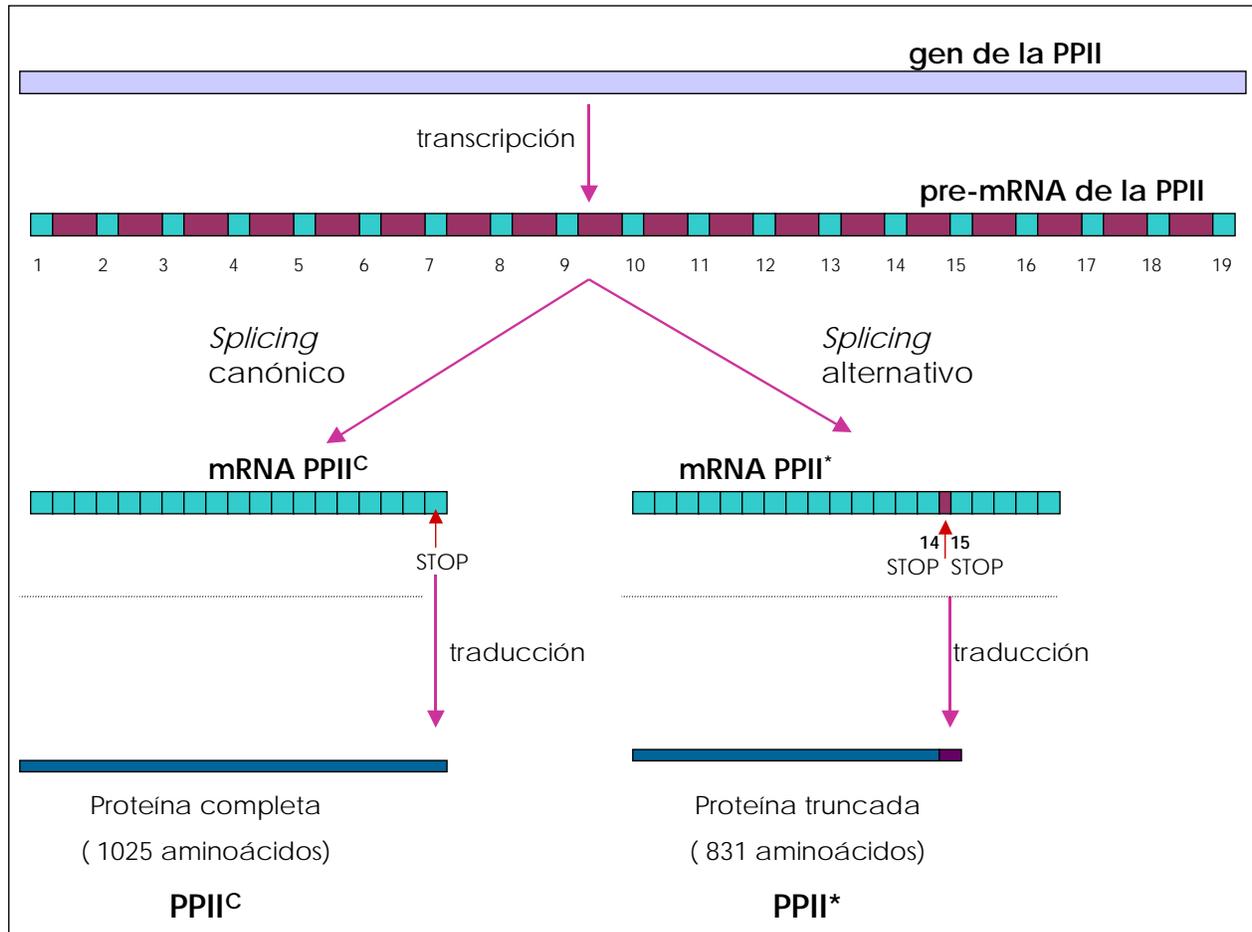


Figura 2. Origen de la PPII^C y de la PPII*. El gen de la PPII se transcribe en un pre mRNA organizado en 19 exones (azul) y 18 intrones (rojo). Este pre mRNA puede madurar por *splicing* canónico en un mRNA que conserva solo los exones y que se traduce en una proteína completa, la PPII^C. Por otro lado, ese mismo pre-mRNA puede madurar por *splicing* alternativo en un mensajero que conserva todos los exones y que presenta entre el exón 14 y el 15, un segmento de 90 nucleótidos del intrón 14 (cuadro rojo en mRNA PPII*). Ese segmento está en fase con el marco abierto de lectura y lleva dos codones consecutivos de STOP, que hacen que la traducción se detenga prematuramente, y se origine una proteína truncada, la PPII*.

La PPII* es una proteína truncada hacia el extremo carboxilo terminal, con los dominios intracelular y transmembranal íntegros. A diferencia de la PPII^C, que presenta 1025 aminoácidos, la PPII* presenta solo 850. Los aminoácidos de los que carece, se encuentran en el dominio extracelular, en una región predicha para ser el *loop* B de la PPII^C. Entre los

aminoácidos de los que carece, se encuentran cuatro cisteínas que por mutaciones dirigidas, se han determinado como fundamentales para la actividad hidrolítica de la enzima. Asimismo, carece de dos posibles sitios de N-glicosilación, que se han propuesto como importantes para la conformación tridimensional de la enzima. De manera interesante, presenta el sitio activo íntegro y la cisteína 68, importante para la dimerización covalente. Por otro lado, presenta una extensión de 20 aminoácidos traducidos a partir de los nucleótidos en el intrón 14 que preceden a los dos codones consecutivos de STOP en el mRNA (Figura 1B)₍₃₀₎.

El cDNA de la PPII* está clonado en un vector y se ha expresado en células C6 y COS-7. En ensayos enzimáticos llevados a cabo en membranas de estas células, la proteína expresada no presenta actividad hidrolítica frente al TRH, sin embargo, al cotransfectarla con vectores de expresión para la PPII^C, inhibe la actividad hidrolítica de la PPII^C frente al TRH de manera dependiente de dosis, pues la actividad hidrolítica disminuye conforme se aumenta la relación de vectores PPII*/PPII^C. A través de *Western blot* para la etiqueta de histinas de los vectores, se ha verificado que la señal para la PPII^C no se ve afectada por la expresión de la PPII*, pero en cambio, hay una menor formación de homodímeros de PPII^C, y aparece una banda de menor peso molecular. Esta banda presenta un peso intermedio entre el esperado para los homodímeros PPII^C-PPII^C y PPII*-PPII*, al parecer, un heterodímero PPII^C-PPII*, cuya señal aumenta de manera proporcional a la relación de vectores PPII*/PPII^C. El mecanismo propuesto para explicar la disminución de la actividad hidrolítica de la PPII^C al coexpresar PPII^C y PPII* es la heterodimerización no funcional. Esto es, en presencia de solo PPII^C, se forman homodímeros PPII^C:PPII^C, capaces de inactivar al TRH. Cuando la PPII* se expresa, hay una menor formación de homodímeros PPII^C:PPII^C y se forman heterodímeros PPII^C:PPII*, así como homodímeros PPII*:PPII*, siendo tanto los heterodímeros como los homodímeros PPII*:PPII*, incapaces de inactivar al TRH (Figura 3)₍₃₀₎.

El hecho de no poder hidrolizar al TRH se ha atribuido a que carece de un fragmento del dominio extracelular importante para llevar a cabo la hidrólisis (es decir, las 4 cisteínas en el *loop* B). Si bien, presenta un segmento de 20 aminoácidos adicionales hacia el extremo carboxilo terminal, a este segmento no se le atribuye la carencia de actividad, ya que al transfectar vectores que codifican para una PPII truncada sin la extensión o con un dominio extracelular mas largo que el de la de la PPII* en células C6, y llevar a cabo ensayos enzimáticos en membranas de estas células, se observa ausencia de actividad enzimática. Esto

indica que el dominio extracelular entero es necesario para que la enzima presente actividad hidrolítica ⁽³⁰⁾.

Se ha propuesto que la PPII* actúa como dominante negativa de la PPII^C, y como evidencia *in vivo*, se tiene que en órganos con baja actividad de PPII (tales como hígado, pulmón, corazón y riñón), la expresión del mRNA de PPII* es mayor que la de la PPII^C, y que en regiones del SNC que presentan mayor actividad de PPII (hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, corteza frontal), la expresión del mRNA de la PPII^C tiende a ser mayor que el de la PPII* ⁽³⁰⁾.

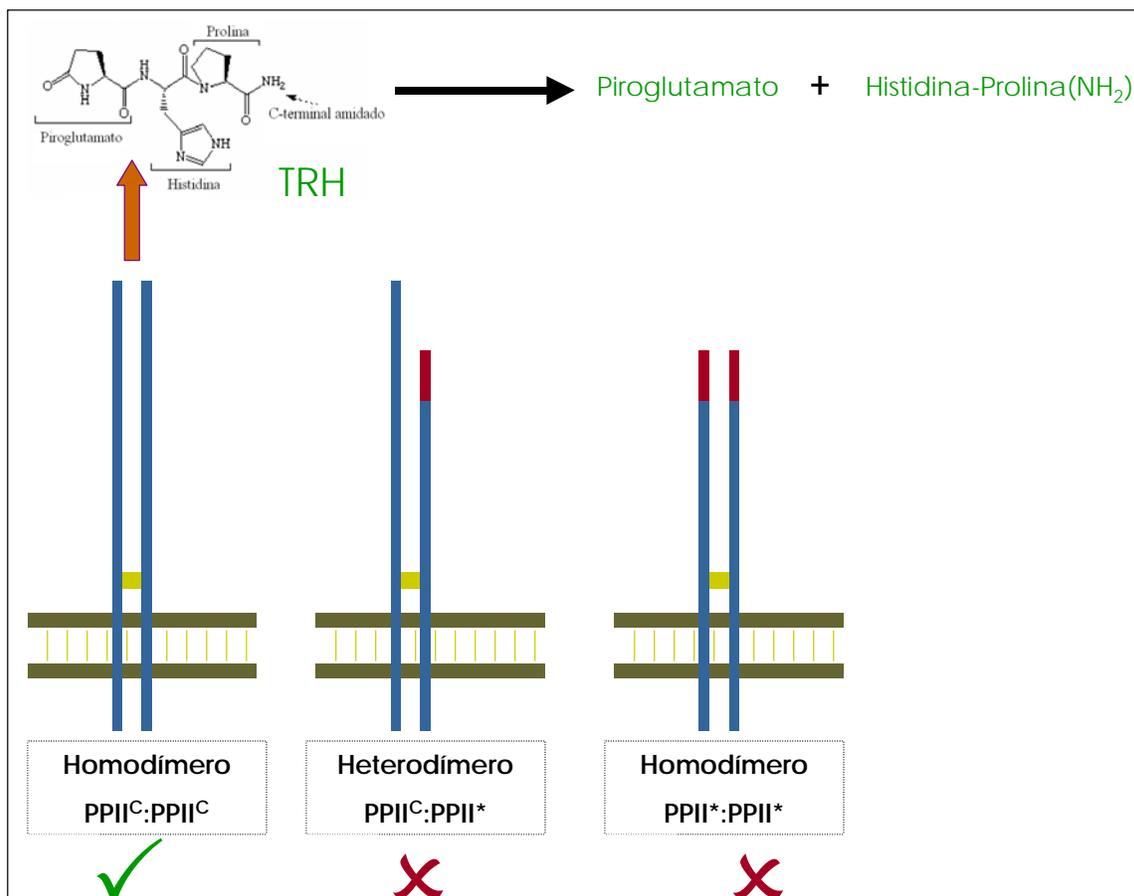


Figura 3. La PPII* inhibe la actividad de la PPII^C a través de heterodimerización no funcional. La PPII^C en forma de homodímeros PPII^C:PPII^C es capaz de inactivar al TRH, separándolo en pGlu e His-ProNH₂. En presencia de la PPII*, pueden formarse heterodímeros PPII*:PPII^C y homodímeros PPII*:PPII*, incapaces de inactivar al TRH.

3. HIPÓTESIS

Actualmente, se desconoce el patrón de expresión del mRNA de la PPII^C y de la PPII* durante el desarrollo del SNC. Con base en resultados obtenidos recientemente en el laboratorio ⁽³⁰⁾, se ha propuesto que el balance en la expresión de ambas formas puede ser determinante en los niveles de actividad enzimática de la PPII que se han observado en algunas zonas del SNC durante el desarrollo ⁽⁶³⁾.

Es así que con base en que se ha observado que la actividad de la PPII es regulable durante el desarrollo ⁽⁶³⁾, que la PPII* funciona *in vitro* como una dominante negativa en células C6 y COS-7⁽³⁰⁾, y que existen proteínas truncadas que actúan como dominantes negativas durante el desarrollo ⁽¹⁸⁾, proponemos que la PPII* funciona como una dominante negativa durante el desarrollo del SNC.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si la actividad enzimática de la PPII se encuentra afectada por la expresión de la PPII* durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central de la rata.

Objetivos particulares

- 1.- Determinar el patrón de expresión del mRNA de la PPII^C y PPII* durante el desarrollo del SNC de la rata
- 2.- Determinar si el balance en la expresión de los mRNAs de la PPII^C y PPII* correlaciona con el patrón de actividad enzimática durante el desarrollo del SNC de la rata
- 3.- Determinar si la PPII* funciona como dominante negativa en una línea celular que exprese endógenamente a la PPII.

5. JUSTIFICACIÓN

El *splicing* alternativo es un mecanismo de suma importancia en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo ^(11, 24), en especial del SNC ⁽¹³⁾, por lo que elucidar si el papel que juega la PPII* durante el desarrollo del SNC es el de dominante negativa frente a la PPII^C, permitirá elucidar su papel funcional *in vivo*, y contribuirá al conocimiento que se tiene sobre dominantes negativas que se traducen a partir de mRNAs madurados por *splicing* alternativo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

COLECTA DE TEJIDO

Embriones completos (E12), regiones anteriores de embriones (E13), cabezas (E14 a E18) y cerebros completos de estadios embrionarios (E19 a E21), postnatales (Día postnatal P0, P7, P14, P21 y P30) y adultos (3M y 5M) de ratas (*Rattus Norvegicus*) de la cepa Wistar fueron disectados bajo condiciones estériles y almacenados a -80°C hasta su uso.

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

A partir del tejido colectado, se extrajo RNA total siguiendo el método descrito previamente ⁽⁶⁴⁾. Empleamos dos embriones en el caso E12, dos regiones anteriores de embriones en el caso de E13, y una cabeza o cerebro de cada uno de los estadios posteriores (E14 a 5M), ajustando la cantidad de tejido de cada estadio a los volúmenes de reactivos.

Brevemente, se homogenizó el tejido con 400 μl de solución D (4M tiocinato de guanidina, 25 mM citrato de sodio pH 7, 0.5 % sarcosil, 0.1 M β -mercaptoetanol) por cada 70-100 μg de tejido. Dependiendo del peso del tejido, se dividió el homogenizado en tubos estériles de 1.5 ml (400 μl del homogenizado por tubo). Se precipitaron sales y proteínas agregando 40 μl de acetato de sodio (2M, pH 4), 400 μl de fenol y 100 μl de cloroformo-isoamilalcohol (49:1), mezclando en el vortex después de agregar cada reactivo. Después se incubaron por 15 minutos a 4°C y se centrifugaron a 13000 rpm, por 17 minutos, a 4°C (Eppendorf, centrífuga 5403). Se recuperó la fase acuosa superior, y el RNA se precipitó con 450 μl de isopropanol, mezclando en vortex e incubando las muestras a -20°C por dos horas. Después de ese tiempo, las muestras se descongelaron a 4°C , y se llevó a cabo una segunda centrifugación a 13000 rpm, por 17 minutos a 4°C . Después de retirar el sobrenadante, las pastillas se resuspendieron en una mezcla de isopropanol (300 μl)-solución D (300 μl) y se incubaron por 72 horas a -20°C . Posteriormente, las muestras se descongelaron a 4°C , se mezclaron en vortex y se centrifugaron a 13000 rpm, por 22 minutos, a 4°C . Se desecharon aproximadamente 450 μl del sobrenadante, y se llevó a cabo un lavado de sales con 400 μl de etanol al 70%, centrifugando a 13000 rpm, por 22 minutos, a 4°C . Todo el sobrenadante fue desechado, y los tubos permanecieron de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente para secar las

pastillas. Las pastillas fueron resuspendidas en agua estéril tridestilada tratada con Dietilpirocarbonato (H_2O DEPC), y se congelaron a $-80^{\circ}C$, tomando antes una alícuota de 2 μ l. Con la alícuota de 2 μ l, se determinó la concentración de RNA haciendo una dilución 1:150, y leyendo la absorbancia a 260 nm (Biofotómetro, *Eppendorf*). La concentración se estimó de acuerdo a la siguiente fórmula $[RNA] = \text{absorbancia } 260\text{nm} * 0.04 * \text{factor de dilución}$. La lectura de las muestras también se llevó a cabo a 230, 280 y 320 nm. La relación 260/280 siempre tuvo que ser mayor a 1.5 para emplear las muestras en la transcripción reversa. De acuerdo a las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro, se tomó el volumen necesario para tener alícuotas de 1 y 2 μ g de RNA de cada una de las muestras, que fueron congeladas inmediatamente a $-80^{\circ}C$ hasta su uso.

Para el caso de las células CA-77, se colectaron células de 4 pozos de 15.6 mm, utilizando 400 μ l de solución D y raspando con el émbolo de una jeringa estéril de 1 ml. Se resuspendió el homogenizado con la jeringa y se colocó en un tubo estéril de 1.5 ml. El resto de la extracción de RNA se llevó a cabo de la manera arriba descrita.

GEL DESNATURALIZANTE PARA RNA

Para visualizar a las subunidades 18 S y 28 S ribosomales del RNA, se separaron las muestras de 2 μ g de RNA en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes.

Para ello, en material esterilizado por calor y lavado con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, se preparó un gel de agarosa al 1%, empleando como buffer MAE 1X, pH 7 (0.02 M MOPS, 5 mM acetato de sodio y 1 mM de EDTA.) . Una vez que el gel se encontraba a una temperatura cercana a $50^{\circ}C$, se agregó Formaldehído al 37% (2.2% del volumen final del gel).

Todas las muestras se llevaron al mismo volumen final con H_2O DEPC. De acuerdo con ese volumen final, se adicionaron cuatro volúmenes de *buffer de carga para RNA* (55% de formamida desionizada, 8% de formaldehído, 5% de MAE 10X, 4% de glicerol al 80%, 1% de azul de bromofenol al 2%). Las muestras se desnaturalizaron calentándolas a $65^{\circ}C$ por 5 minutos. Inmediatamente se cargaron en los pozos del gel, y se separaron a 100 V de 1 a 2 horas en buffer MAE 1X, pH 7. Las muestras fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV (Fluor S, *Biorad*).

TRANSCRIPCIÓN REVERSA

La Transcripción Reversa (RT) se llevó a cabo en un solo ensayo para todos los estadios de desarrollo de la manera previamente realizada ⁽⁶⁵⁾, empleando por 1 µg de RNA total (en 12 µl de *H₂O DEPC*) los siguientes volúmenes de reactivos: 8.9 µl de *H₂O DEPC*, 6 µl de *Buffer 5X* para RT (Invitrogen; 250mM Tris-HCl pH 8.4, 375 mM KCl, 15nM MgCl₂), 3 µl de ditiotreitól (DTT, *Invitrogen*; 0.1M), 0.6 µl de dNTPs (Invitrogen; 10 mM) y 0.5 µl de Transcriptasa Reversa (RT M-MMLV, *Invitrogen*; 200 unidades/µl). De manera breve, se descongelaron las muestras de 1 µg de RNA a 4°C, se llevaron a un volumen de 12 µl con *H₂O DEPC* y se incubaron por 5 minutos a 65°C para desnaturalizar al RNA. Posteriormente, se incubaron por 5 minutos a 4°C y se les agregaron todos los reactivos, contenidos ya en una mezcla de reacción. Inmediatamente las muestras se incubaron a 37°C por dos horas. El cDNA obtenido fue almacenado a -20°C hasta su uso.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevó a cabo para todos los casos, empleando 3 µl de cDNA en un volumen final de reacción de 25 µl, con 16.5 µl de *H₂O* estéril, 2.5 µl de amortiguador para PCR 10X (*Biogénica*; 100mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, gelatina 10µg/ml), 1.25 µl de MgCl₂ 20 X (*Biogénica*; 30 mM) 0.5 µl de oligonucleótido sentido, 0.5 µL de oligonucleótido antisentido y 0.25 µL de Amplificasa (*Biogénica*; 5 unidades/µl).

Los oligonucleótidos para amplificar el mRNA de ciclofilina fueron los empleados previamente ⁽⁶⁶⁾: CycS: 5'-GGGGAGAAAGGATTTGGCTA-3' y Cyc-AS: 5'-ACATGCTTGCCATCCAGCC-3', a una concentración de 50 pmol/µl. El producto generado es de 256 pb. Las condiciones de la PCR para todos los estadios de desarrollo fueron: 24 ciclos que consistieron en 95°C por 45 segundos de desnaturalización, 62°C por 30 segundos de alineamiento, y 72°C por 1 minuto de extensión, seguido de una extensión final de 72°C por 7 minutos.

Para amplificar a las dos isoformas en un solo ensayo, empleamos los oligonucleótidos empleados previamente⁽³⁰⁾ PPII*up: 5'-GTGCAGGCCTGATTGATGATG-3' y PPII*down: 5'-GACAGTGTCTTGTTCCTCCAAAGC-3' a una concentración de 25 pmol/μl. Para probar su eficiencia de amplificación se emplearon las condiciones descritas previamente ⁽³⁰⁾, en cDNA de cerebro de postnatal 6 (P6) e hipotálamo de adulto de 5 meses(H). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización a 95° C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos que consistieron en 95° C por 45 segundos, 60° C por 30 segundos, y 72° por 1 minuto, seguido de una extensión final de 72° por 7 minutos. Los productos generados son de 341 p.b (PPII^C) y 426 p.b (PPII*) (Ver figura 4).

Para amplificar sólo al mRNA de la PPII* empleamos el mismo oligonucleótido sentido PPII*up descrito arriba y el oligonucleótido antisentido PPII*down: 5'-GCAGTGTGTGCATTCACACAG-3', a una concentración de 25 pmol/μl. Su eficiencia de amplificación se probó en cDNAs de P6 y H bajo las mismas condiciones de PCR que se emplearon con los oligonucleótidos PPII*up y PPII*down. El producto generado es de 339 p.b (Ver figura 4).

Para amplificar únicamente al mRNA de la PPII^C, diseñamos en el programa Primer 3 ⁽⁶⁷⁾ los oligonucleótidos siguientes: PPII^Cup: 5' TCAATCAAACCTGGCTACTTCA 3' y PPII^Cdown: 5' CCCTCCGTAGCTCTTCATGT 3'. El producto generado es de 399 p.b (Ver figura 4). Para verificar que los oligonucleótidos fueran específicos para el mRNA de la PPII de rata, realizamos un alineamiento de secuencias en el algoritmo Blast (*Basic Local Alignment Search*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)⁽⁶⁸⁾. Los oligonucleótidos diseñados se solicitaron en la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Su eficiencia para amplificar al mRNA de la PPII^C, se probó en cDNA de cerebro completo de embrión de 17 días (E17) y rata de 6 días postnatales (P6), bajo una temperatura de alineamiento cercana a la recomendada por la Unidad de Síntesis. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos que consistieron en 95° por 45 segundos, 60°C por 30 segundos, y 72° por 1 minuto, seguido de una extensión final de 72° por 7 minutos

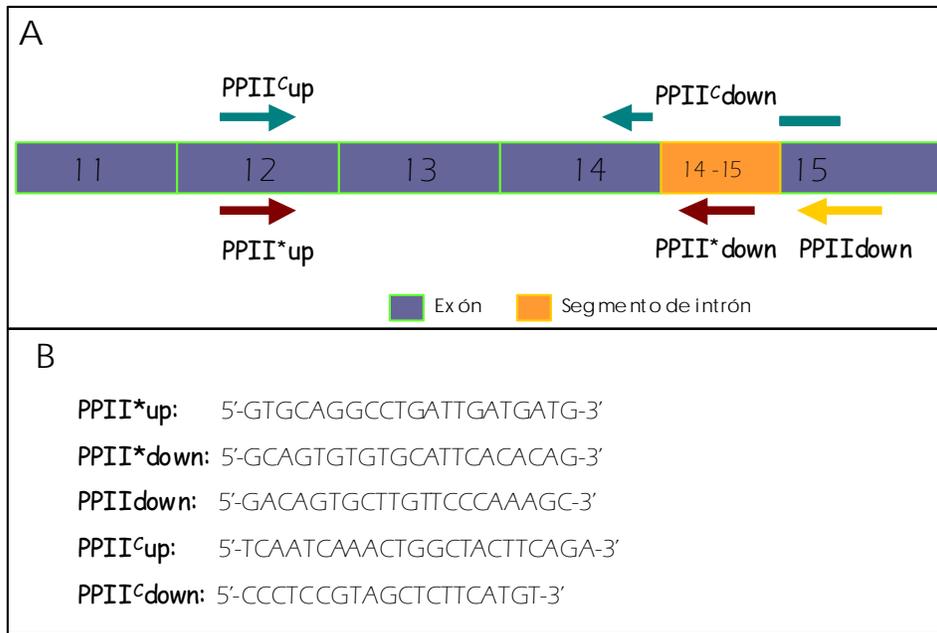


Figura 4. Oligonucleótidos empleados para amplificar al mRNA de la PPII^C y al de la PPII* por PCR semicuantitativa. La amplificación de los mRNAs de PPII^C y PPII* en un solo ensayo se llevó a cabo empleando los oligonucleótidos PPII*up y PPII_{down}, que permiten diferenciar los dos productos de PCR por diferencia de peso molecular. La amplificación del mRNA de la PPII* se llevó a cabo empleando los oligonucleótidos PPII*up y PPII*down. La amplificación del mRNA de la PPII^C se llevó a cabo empleando los oligonucleótidos PPII^Cup, PPII^Cdown. Se muestra la región del mRNA que abarca cada oligonucleótido. El segmento de intrón 14-15 solo está presente en el mRNA de la PPII*, mientras que el exón 14 continuo sólo está presente en el mRNA de la PPII^C (panel A). Se muestran las secuencias de oligonucleótidos empleados(panel B).

*Estandarización de oligonucleótidos PPI*up- PPII*down y PPII^Cup-PPII^Cdown*

Llevamos a cabo una estandarización de los juegos de oligonucleótidos PPII*up –PPII*down, y PPII^Cup-PPII^Cdown, empleando cDNA de un cerebro de embrión de 15 días (E15) y cDNA de un cerebro de adulto de 3 meses (3M). La estandarización para cada juego de oligonucleótidos, se llevó a cabo en dos reacciones independientes, una para el cDNA de E15 y otra para el de 3M. Para ello, empleamos las siguientes condiciones de PCR: Un paso único de desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 15, 20 ,25, 30 ó 35 ciclos que consistieron en 95°C por 45 segundos de desnaturalización, 56°C por 30 segundos de alineamiento, y 72°C por 1 minuto de extensión, seguido de una extensión final de 72° por 7 minutos. Paralelamente se realizó un gradiente de temperaturas para optimizar el alineamiento, utilizando las siguientes temperaturas: 58°C, 60°C, 62°C y 64°C bajo las mismas condiciones de amplificación.

*Condiciones de amplificación del mRNA de la PPII**

Con base en los resultados de la estandarización, para el estudio durante la ontogenia, llevamos a cabo la PCR de PPII* bajo las condiciones siguientes: un paso único de desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos que consistieron en 95° C por 45 segundos de desnaturalización, 64° C por 30 segundos de alineamiento, y 72° C por 1 minuto de extensión, seguido de una extensión final de 72° por 7 minutos.

Condiciones de amplificación del mRNA de la PPII^C

Con base en los resultados de la estandarización, para el estudio durante la ontogenia, llevamos a cabo la PCR de PPII^C bajo las condiciones siguientes: un paso único de desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos que consistieron en 95°C por 45 segundos de desnaturalización, 62°C por 30 segundos de alineamiento, y 72°C por 1 minuto de extensión, seguido de una extensión final de 72° por 7 minutos.

Visualización de productos de PCR

Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2 % empleando como *buffer* TBE 0.5X (0.045 M Tris-boratos y 0.001 M EDTA; pH 8). Paralelamente se separó un marcador de 100 p.b. (*New England Biolabs*). Para el caso de la PPII^C y PPII*, tomamos 10 µl de los productos de PCR y los llevamos a un volumen de 12 µl con *buffer de carga para DNA* 6X (1mM EDTA, 0.25% de Azul de bromofenol, 0.25% de Xileno cyanol, 30% de Glicerol en agua). Para el caso de la ciclofilina, tomamos 5 µl de los productos de PCR y los llevamos a un volumen de 12 µl con 5 µl de agua y 2 µl de *buffer de carga para DNA*.

Los productos de PCR separados en el gel, fueron teñidos con bromuro de etidio (BrEt) y visualizados en un transiluminador de luz UV (*FluorS-Biorad*). La cuantificación de la densidad óptica de los productos se llevó a cabo usando el programa *Multi-Analyst* (*Biorad*).

Para determinar el patrón de expresión de los mRNAs de la PPII^C y PPII* durante el desarrollo del SNC, se calculó un cociente del valor de la densitometría de la señal con PPII^C_{up}-PPII^C_{down} o con PPII*_{up}-PPII*_{down} entre el de la densitometría para cycS-cycAS para cada una de las etapas de desarrollo.

Para calcular la relación de expresión PPII^C/PPII*, se calculó un cociente del valor de la densitometría de la señal con PPII^C_{up}-PPII^C_{down} entre el de la densitometría de la señal con PPII*_{up} y PPII*_{down} para cada una de las etapas de desarrollo. Para calcular la relación PPII*/PPII^C, se calculó un cociente de la manera inversa que para PPII^C/PPII*.

EXTRACCIÓN DE LAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS DE CEREBROS

La extracción de membranas de los cerebros, se llevó a cabo a través del método previamente empleado ⁽⁶³⁾. De manera breve, los tejidos fueron homogenizados en *buffer fosfatos* (50mM, pH 7.5; ver apéndice) ajustado la cantidad de buffer al peso del tejido (10 ml por cada gramo de tejido). En el caso de los estadios embrionarios se emplearon de 2 a 7 cabezas o cerebros (0.2 - 0.3 g), de manera que pudiera obtenerse una cantidad de membrana suficiente para llevar a cabo el ensayo enzimático de PPII. En el caso de los estadios postnatales, solo en P0 se emplearon dos cerebros, mientras que en el resto de los estadios se empleó solo un cerebro.

Una vez homogenizados los tejidos, se llevó a cabo una centrifugación a 1000 g, por 15 minutos, a 4°C (Centrífuga J221, Beckman). Los sobrenadantes fueron colectados y almacenados a 4°C, en tanto que las pastillas fueron resuspendidas en la mitad del volumen de *buffer fosfatos* inicial, centrifugándose posteriormente a 1000 g, por 15 minutos a 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes y las pastillas fueron desechadas. Los primeros y segundos sobrenadantes se juntaron y se llevó a cabo una última centrifugación a 17000 g por 15 minutos a 4°C.

Los sobrenadantes se desecharon y las pastillas fueron resuspendidas en *buffer fosfatos* (1/10 del volumen inicial). Las membranas extraídas se almacenaron a -80° C hasta su uso.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN MEMBRANAS DE CEREBROS

La cuantificación de proteína se llevó a cabo a través del método de Lowry ⁽⁶⁹⁾. Brevemente, éste consistió en agregar a cada 5µl de muestra, 95 µl de H₂O estéril, 100 µl de NaOH 1 N y

900 μl de Solución E (98% Carbonato de Sodio, 1% Tartrato de Sodio y Potasio y 1% de sulfato de cobre). Los reactivos fueron mezclados en *vortex* y se dejaron reposando a temperatura ambiente por 10 minutos. Entonces, se agregaron 100 μl de Folin 2N, se mezclaron todos los reactivos con *vortex*, y se dejaron reposando a temperatura ambiente por 30 minutos para entonces leer en un espectrofotómetro a 280 nm (modelo DU650, *Beckman*). Para poder calcular la concentración de proteína, se realizó una curva patrón con BSA desde 0 hasta 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

EXTRACCIÓN DE MEMBRANAS TOTALES DE CÉLULAS

El método a través del cual se extraen membranas totales de células fue modificado del empleado previamente (70). Brevemente, este consistió en cosechar a las células y congelarlas a -80°C . Las membranas se extrajeron empleando *buffer de extracción* (10 mM NaPO_4 pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 μM pepstatina A, 5 mM Yodoacetamida, 1.5 mM DNasa, 2.5 mM MgCl_2), usando un émbolo de jeringa de 1 ml. Para los pozos de 15.6 mm, las células se rasparon con 80 μL de *buffer de extracción*; para los platos de 35 mm, con 300 μL de *buffer de extracción*, y para los platos de 100 mm, con 500 μL de *buffer de extracción*. Los lisados celulares se transfirieron a tubos estériles de 2 ml. La lisis se completó congelando a -20°C y descongelando a 4°C tres veces. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 22 psi (120000 g) por 45 minutos a 4°C (ultracentrífuga de aire frío, *Beckman*). El sobrenadante se desechó y la pastilla fue resuspendida en *buffer fosfatos*.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN MEMBRANAS DE CÉLULAS CA-77

Para cuantificar la proteína en membranas de células se empleó el método de Bradford. Brevemente, este consistió en tomar 2 μl de muestra, completar con 798 μL de agua estéril y agregar 200 μl del reactivo de Bradford (*Biorad Protein Assay*, *Biorad*). Se mezclaron todos los reactivos con *vortex*, y se dejaron reposando 10 minutos para entonces leer en un espectrofotómetro a 280 nm (modelo DU650, *Beckman*). Para poder calcular la concentración de proteína, se realizó una curva patrón de BSA desde 0 hasta 80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA PIROGLUTAMIL AMINOPEPTIDASA II

El ensayo para medir la actividad enzimática de la PPII fue modificado del empleado previamente ⁽³⁰⁾. Brevemente, este consistió en agregar en tubos de 0.6 ml, 50 μ l de Bacitracina y N-etilmaleimida (1 mM), 20 μ l de DAPIV (2 miliunidades de enzima), el volumen suficiente para tener 61, 100 ó 150 μ g de proteína, llevando a un volumen final de 390 μ L con *buffer fosfatos*. Se incubaron las muestras por 10 minutos a 37°C con agitación para posteriormente agregar 10 μ l de TRH β -Naftilamida. Para el caso de las membranas de cabezas y cerebros, y de las células CA-77 en la caja de 10 mm, incubamos las muestras por tres horas, y tomamos alícuotas de 50 μ L de cada muestra a los 30, 60, 120 y 180 minutos (Ver figura 5). Para el caso de las membranas de células CA-77 en platos de 35 mm, incubamos las muestras por seis horas, y tomamos alícuotas de 50 μ L de cada muestra a los 60, 120, 240 y 360 minutos. Detuvimos la reacción agregando 50 μ l de metanol absoluto a 4°C.

Adicionalmente, al terminar de tomar las cuatro alícuotas, agregamos a cada una 300 μ L de solución 1:1 de *buffer fosfatos* – metanol. Las muestras se almacenaron a –20°C. De 12 a 72 horas después de concluido el ensayo enzimático, se leyó la β -Naftilamida liberada en cada uno de los tiempos en un espectrofluorómetro (modelo L550B, *Perkin Elmer*). Previo a la lectura, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente (modelo 5415, *Eppendorf*). 350 μ L de los sobrenadantes se leyeron en los valores de emisión 335 y 15, y de excitación 410 y 20.

OBTENCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN PARA PPII*

El vector de expresión para PPII* fue el empleado previamente ⁽³⁰⁾. Este es un pcDNA 3.1 His/A en el que está clonado el cDNA de la PPII* desde Not-1 hasta Xba-1. Presenta un sitio de restricción adicional *Not*-I después de *Xba*-I. Asimismo, presenta un *cassette* de resistencia a ampicilina. Para su amplificación, se transformaron 50 μ l de bacterias competentes x-10-gold por choque térmico (42°C por 45 segundos) con 50 ng de plásmido purificado. Las células transformadas se mantuvieron 5 minutos en hielo, y se les agregó 1 ml de medio Luria-Betani (LB). Estas se mantuvieron 1 hora a 37°C en agitación constante.

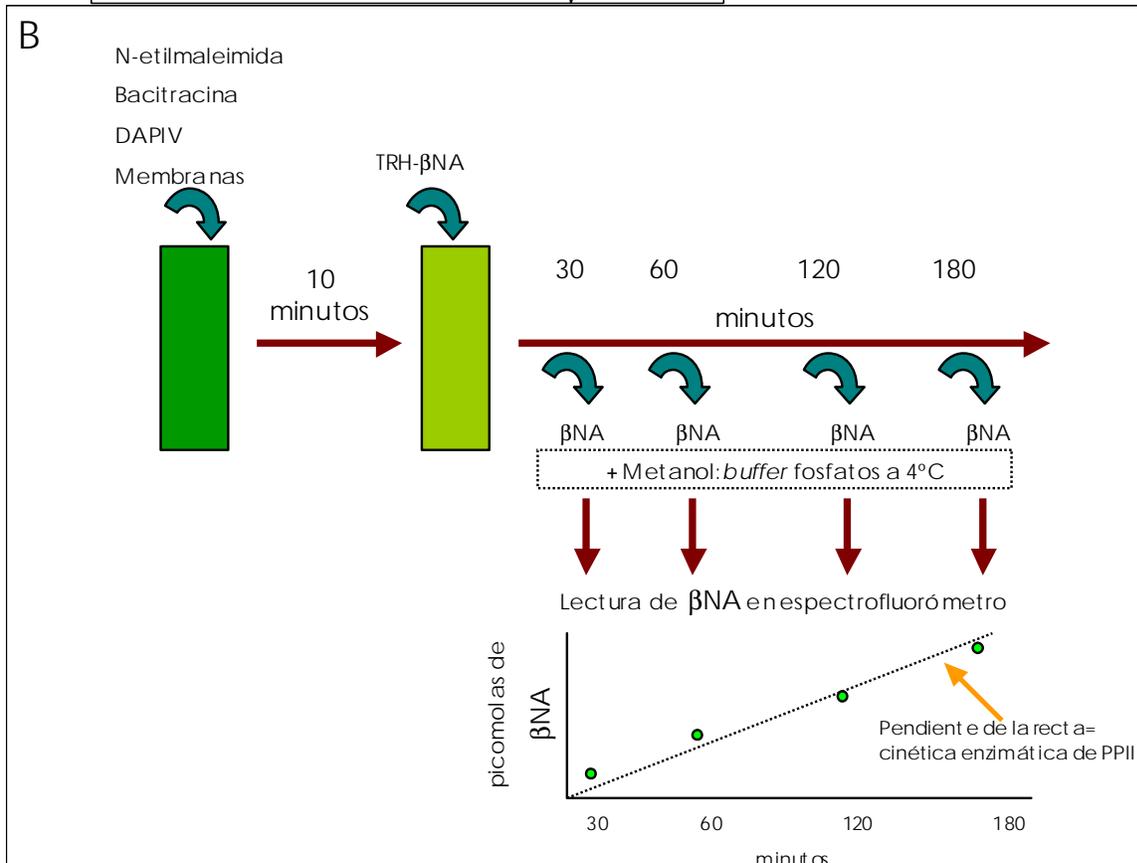
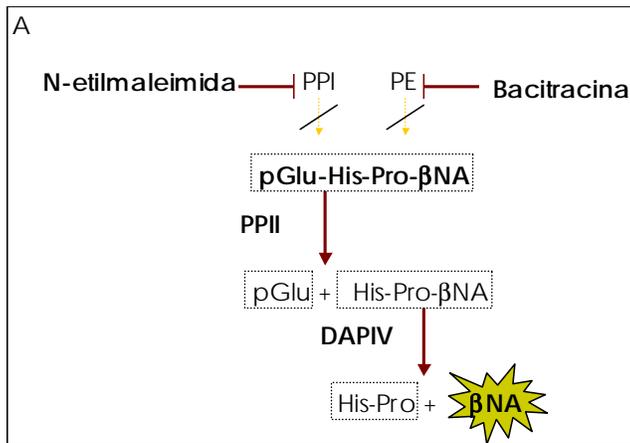


Figura 5.- Ensayo enzimático para PPII. La base de este ensayo consiste en que la PPII separa al TRH-βNaftilamida (TRH-βNA) en pGlu e His-ProβNA. Una vez que la PPII ha actuado, la DAPIV corta entre Pro y βNA, la cual puede ser detectada entonces en un espectrofluorómetro. Ya que la enzima PPI corta el mismo enlace que la PPII y la PE puede separar a la βNA del TRH-βNA, se emplean inhibidores para estas enzimas citosólicas (N-etilmaleimida para la PPI, y Bacitracina para la PE), por sí en las membranas extraídas hubiera contaminación de citosol (panel A). El ensayo se lleva a cabo a 37°C en agitación, incubando las proteínas de membrana en presencia de N-etil maleimida, bacitracina y DAP-IV. Una vez transcurridos 10 minutos de incubación, se agrega el sustrato TRH-βNA y se deja incubando en agitación a 37°C por 3 horas. Se toman alícuotas a los 30, 60, 120 y 180 minutos, deteniendo la reacción en cada una de las alícuotas con metanol absoluto. Se completa el volumen a 400 μL con solución 1:1 de buffer fosfatos y metanol. Se leen las picomolas libres de βNA en un espectrofluorómetro, y al graficarlo en el tiempo, la pendiente de la recta indica la cinética de actividad enzimática de la PPII. Al corregirlo contra la cantidad de proteína empleada (mg), se obtiene la actividad específica (picomolas β-Naftilamida/minuto/mg de proteína)

Se tomaron 100 μl del cultivo y se plaquearon en una caja Petri con LB-agar y ampicilina (100 μl / 100 ml de medio LB-agar). La caja se incubó 14 horas a 37°C. Posteriormente, con un asa estéril, se tomaron seis colonias. Cada colonia se llevó a 7 ml de medio LB con ampicilina (100 μl / 100 ml de medio LB) contenido en tubos de ensaye. Los tubos se incubaron en agitación constante por 12 horas a 37°C. Se tomaron 2 ml de cada uno de los cultivos y se extrajo DNA de plásmido con el kit MiniPrep de Quiagen (de la manera descrita por el fabricante). La concentración del DNA se determinó por la absorbancia a 260 nm (Biofotómetro, *Eppendorf*), empleando la fórmula $[\text{dsDNA}] = \text{absorbancia } 260\text{nm} * 0.05 * \text{factor de dilución}$.

La integridad del DNA se determinó por digestión enzimática, para lo cual se tomó el volumen necesario para tener 1 μg de DNA y se digirió con la enzima *Not-I*. La digestión se llevó a cabo en un volumen de 10 μl , empleando NE Buffer 3 pH 7.9 (100 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 10 mM MgCl₂, 1mM ditiotreitól; *New England Biolabs*), 0.3 μl de BSA (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; *New England Biolabs*) y 1 μl de *Not-I* (10000 unidades/ml; *New England Biolabs*), a 37°C por dos horas.

Los productos de digestión (0.7 μl) y 0.5 μg del DNA no digerido se separaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Paralelamente, se separó un marcador de 1Kb (*New England Biolabs*).

De una de las colonias que presentó el patrón de restricción esperado, se tomaron 2 ml del cultivo en el tubo de ensaye y se llevaron a 100 ml de medio LB. El cultivo se incubó en agitación constante por 12 horas a 37°C. Se tomaron los 100 ml del cultivo y se extrajo DNA de plásmido con el kit MidiPrep de Quiagen (de la manera descrita por el fabricante). Después de determinar la concentración de DNA, se verificó nuevamente el patrón de restricción digiriendo con la enzima *Not-I* y separando los productos de la digestión y el DNA purificado no digerido en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

CULTIVO DE CÉLULAS

La línea celular CA-77 fue cultivada en medio suplementado (45% de *Dulbecco Modified Eagle Medium*, *Gibco*; 45% de Mezcla Nutritiva F10, *Gibco*; 10% de Suero Fetal Bovino; *Terracelli*) bajo las condiciones de 37°C y 5% de CO₂.

Las células fueron plaqueadas en cajas de 100 mm, cajas de 35 mm y pozos de 15.6 mm. En el caso de las células de las cajas de 100 mm, éstas fueron empleadas para extraer membranas plasmáticas para medir actividad enzimática de la PPII. Para este propósito, las células se cosecharon 7 días después de plaquearse cuando tenían el 60% de confluencia.

En el caso de las células de las cajas de 35 mm y los pozos de 15.6 mm, éstas fueron empleadas para llevar a cabo los distintos tratamientos experimentales abajo descritos. De manera breve, dos horas previas a la siembra, se recubrieron pozos y platos con poli-D-Lisina (0.5%). Se retiró el exceso de Poli-D-Lisina y después de dos lavados con agua estéril, se plaquearon 8×10^5 células en las cajas de 35 mm y 2×10^5 células en los pozos de 15.6 mm. Veinticuatro horas después, se sometieron a los tratamientos a continuación descritos.

TRATAMIENTO DE CÉLULAS

En todas las cajas y pozos se retiró el medio suplementado y se agregó medio no suplementado (50% DMEM, 50% F10). Entonces en dos de los platos de 35 mm y uno de los pozos de 15.6 mm se transfectó con el vector pcDNA 3.1 HisA/PPII*, en tanto que en dos de los pozos, se transfectó con el vector p-IRES-GFP empleado previamente (71) (Ver tabla 1). Las células de los platos de 35 mm se transfectaron con 1600 ng de DNA, en tanto que las de los pozos de 15.6 mm se transfectaron con 800 ng de DNA. La transfección se llevó a cabo con lipofectamina (*Lipofectamine 2000*, 1 mg/ml; *Invitrogen*).

Brevemente, la mezcla de transfección se preparó de la siguiente manera: en tubos estériles de 1.5 ml se preparó el DNA (800 a 1600 ng DNA en 50 µl de medio no suplementado) y en tubos de propileno de 5 ml la lipofectamina (3 µl de Lipofectamina en 50 µl de medio no suplementado). Una vez transcurridos 5 minutos de preparada la lipofectamina, el DNA se mezcló con la lipofectamina y se incubó por 20 minutos. Finalmente, se agregaron 100 µl de la mezcla de transfección a cada caja o pozo.

Después de una incubación a 37°C por cinco horas, se retiró la mezcla de transfección y se agregó medio suplementado en todas las cajas y pozos. En uno de los platos de 35 mm transfectados con pcDNA 3.1 HisA/PPII* y otro que se había mantenido sólo en presencia de medio no suplementado, se agregó en ese momento Hormona Tiroidea (T3) en una concentración de 10⁻⁹ M (Ver tabla 1).

Todas las células, a excepción de las que se habían transfectado con p-IRES-GFP, se cosecharon a las 72 horas. Para el caso de estas últimas, se fijaron con paraformaldehído, llevando a éste a una concentración final de 2 M. Posteriormente, se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se retiró todo el líquido de los pozos, y se lavó con PBS 1X (0.14M NaCl, 2.7 mM KCl, 0.015 M Na₂HPO₄; pH 7.5) dos veces. Los pozos se mantuvieron a 4°C cubiertos con papel aluminio, para posteriormente llevar a cabo el conteo de células que expresaran a la Proteína Verde Fluorescente (GFP).

	Transfección 24 horas	+	Adición de T3 5 horas	+	Cosecha/Fijación 72 horas
TRATAMIENTOS	transfectadas		con T3 10 ⁻⁹ M		
PPII endógena	∅		∅		
Con PPII*	PPII*		∅		
Con T3	∅		✓		
Con PPII* + T3	PPII*		✓		
Con GFP	GFP		∅		

Tabla 1. Tratamiento de las células CA-77. Una vez transcurridas 24 horas después de la siembra, las células se transfectaron (con pcDNA 3.1 His A/PPII* o con p-IRES-GFP) o se mantuvieron solo en medio no suplementado (∅). Cinco horas después de incubar con la mezcla de transfección o de mantener en medio no suplementado, se substituyó el medio con medio suplementado en todas las cajas y pozos. En ese momento, se agregó T3 10⁻⁹ M (✓). Transcurridas 72 horas las células fueron fijadas (células con GFP) o cosechadas (el resto de las células).

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN

Se visualizaron las células que habían sido transfectadas con el vector p-IRES-GFP, y se contaron en seis campos claros, y campos de fluorescencia con el aumento 40X (microscopio invertido *Nikon Diaphot 300*). Las células que expresaban a la GFP fueron restadas del número total de células de cada campo.

WESTERN BLOT

Se realizó un primer *Western blot* empleando un anticuerpo contra la cola de Histidinas del vector pcDNA 3.1 HisA/PPII*. De manera breve, se tomaron 6.5 µg de proteínas membranales de las células transfectadas con PPII* (con PPII*; tabla 1) y 8 µg de células transfectadas con PPII* y tratadas con T3 (con PPII*+ T3; tabla 1). Como controles negativos, se tomaron 6.5 µg de proteínas de células tratadas con T3 (con T3; tabla 1), y 8 µg de proteínas de las células no transfectadas (PPII endógena; tabla 1). Todas las muestras se llevaron a 20 µl con *buffer fosfatos* y se completaron a 24 µl con *buffer de carga para proteínas 1X* (50 mM Tris Cl pH 6.8, 100 mM de ditioneitol, 2% SDS, 0.1% de azul de bromofenol, 10% de glicerol). Las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 7%, con *buffer de corrida* (25 mM Tris, 250 mM glicina pH 8.3, 0.1% SDS) a 0.25 Amp. De manera paralela se separó un marcador de peso molecular del rango de 10 a 170 kDa (*Page ruler, Fermentas*). Posteriormente, se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa por dos horas a temperatura ambiente empleando *buffer de transferencia* (39 mM glicina, 48 nM Tris base, 0.037% SDS, 20% metanol; pH 8.3). Una vez transcurrido ese tiempo, se tiñó la membrana con rojo de Ponceau por tres minutos y se lavó con agua.

Posteriormente, se bloqueó la membrana en *solución de bloqueo* (94.9 % TBS 1X (0.025 M Tris-Cl, pH 8.0; 15 mM NaCl, 0.0027 M KCl), 5% leche descremada, 0.1% Tween) por dos horas a temperatura ambiente. Después, se incubó con un anticuerpo anti-histidinas conjugado a fosfatasa alcalina (*Monoclonal Antipolyhistidine – Alkalyne Phosphatase conjugate; Sigma-Aldrich*) diluido 1:1500 en solución de bloqueo, por 12 horas a 4°C en movimiento constante. Posteriormente, se realizó un lavado de dos minutos en *TBS-T* (99.9% TBS 1X, 0.1% Tween) conteniendo 0.4 gr de NaCl/ml, y luego tres lavados de 10 minutos en *TBS-T*

Para revelar la fosfatasa acoplada al anticuerpo se emplearon como sustratos NBT (*4-Nitroblue tetrazolium chloride*, Roche) y BCIP (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*, Roche). Para ello, en 5 ml de *buffer para revelar fosfatasa* (TrisHCl 0.1M, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 5 mM), se agregaron en la oscuridad 25 µl de NBT y 18.75 µl de BCIP. La membrana se incubó en la oscuridad con esta solución en agitación constante por tres horas.

Para realizar el segundo *Western blot*, se realizaron tres lavados de 10 minutos con *solución de lavado* (0.2 M glicina pH 2.5, 0.5 M NaCl), y luego tres lavados de 5 minutos en *TBS-T*. Se incubó la membrana con un anticuerpo anti-histidinas- policlonal de conejo (*His probe rabbit polyclonal IgG*; *Santa Cruz Biotechnology*) diluido 1:500 en *solución de bloqueo* por 12 horas a 4°C en movimiento constante. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con *TBS-T*, y se incubó la membrana con un anticuerpo anti conejo-HRP (*goat anti rabbit IgG HRP*, *Santa Cruz Biotechnology*) diluido 1:3000 en solución de bloqueo por 2 horas y media a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con *TBST-T* y se reveló por quimioluminiscencia siguiendo las instrucciones del fabricante (*ECL Perkin Elmer*).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los patrones de expresión de cada mRNA, de la relación de expresión de los mRNAs y de la actividad enzimática durante el desarrollo del SNC, se realizó a través de pruebas de Análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Para comparar los patrones de expresión de los mRNAs PPII^C y PPII* durante el desarrollo del SNC, se realizó una prueba de ANOVA de dos vías. Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron por el post-hoc de Duncan, siendo significativas cuando $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

Cuando se requiere evaluar los niveles de expresión de un mRNA, resulta de suma importancia saber que el RNA con el que se esté trabajando se encuentre íntegro, de manera que los resultados que se obtengan sean una representación fidedigna de los niveles de expresión en la célula y no de un problema técnico. Mas aún, en un estudio durante la ontogenia, es importante que el RNA de todos los estadios de desarrollo presente una calidad buena y similar. Una forma de saberlo, es al leer la absorbancia de las muestras a 230, 260, 280 y 320 nm en un espectrofotómetro, y al evaluar la señal de las subunidades ribosomales 18 S y 28 S de RNA en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes.

Nosotros, posterior a la extracción de RNA, leímos una alícuota de cada una de las muestras en un espectrofotómetro a las absorbancias antes mencionadas. Todas las muestras presentaron una baja contaminación proteica, pues la relación 260/280 fue mayor a 1.5. La concentración de RNA fue calculada empleando la fórmula descrita en materiales y métodos.

Tomamos 2 μg de RNA de cada muestra para separar a las subunidades ribosomales 18 S y 28 S en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes. Para todos los casos, observamos una buena calidad de RNA, ya que se distinguían las subunidades 18 S y 28 S ribosomales, y a excepción del estadio E20 de la primera extracción, observamos una relación 2:1 de la subunidad 28 S respecto a la 18 S ribosomal (Figura 6).

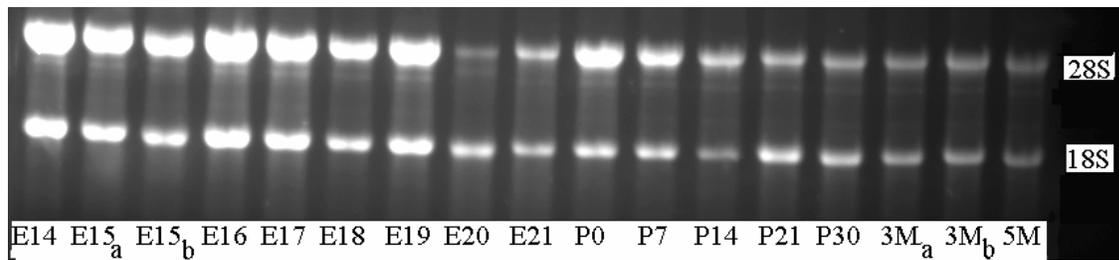


Figura 6.- Integridad del RNA total de la primera extracción de RNA, obtenido a partir de cerebros completos de diferentes etapas durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central. 2 μg de RNA total fueron separados en un gel de agarosa al 1%. Las letra E representa días embrionarios, mientras P representa días Postnatales y M, meses. En el caso de E15, y 3M, las letras a indican el RNA que se empleó para estandarizar los juegos de oligonucleótidos, en tanto las letras b indican el RNA que se empleó para llevar a cabo el estudio durante el desarrollo.

La primera aproximación para detectar la expresión de los mRNAs de la PPII^C y la PPII* fue emplear un juego de oligonucleótidos (PPII*up-PPII^{down}; par B) anteriormente empleados₍₃₀₎

ue permiten amplificar ambos mRNAs en una misma reacción. Evaluamos su eficiencia usando cDNA de hipotálamo de rata adulto (H) y cDNA de cerebro de rata postnatal de 6 días (P6). Asimismo, empleando los mismos cDNAs, evaluamos la eficiencia de amplificación de otro juego de oligonucleótidos (PPII*up-PPII*down; par A) también empleados previamente ⁽³⁰⁾, los cuales permiten amplificar sólo al mRNA de la PPII*.

Al separar los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, observamos que con los oligonucleótidos del par B, había amplificación de bandas inespecíficas (Figura 7, carril 5) y que la señal detectada para el mRNA de la PPII* era mucho más débil que la detectada los oligonucleótidos del par A en los dos cDNAs empleados (Figura 7, comparar carril 2 con 4, y carril 3 con 5).

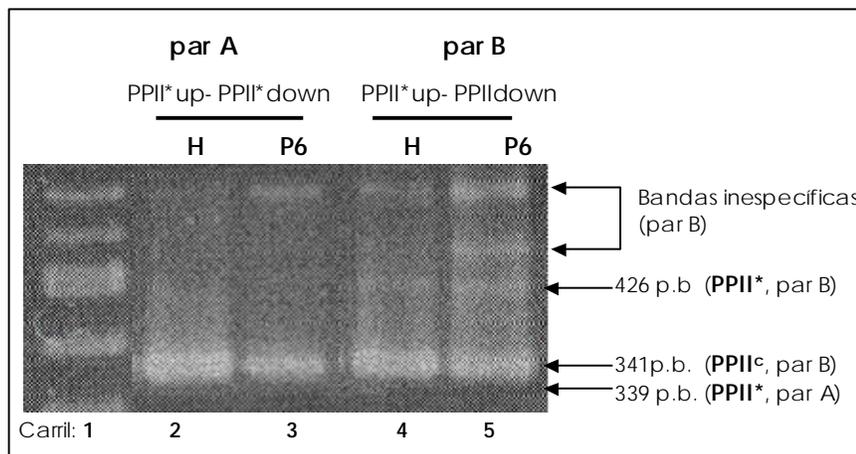


Figura 7.- Productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos par A (Izquierda) ó par B (Derecha). Se amplificó al mRNA de la PPII* y de la PPII^C en cDNA de hipotálamo adulto (H) y cDNA de postnatal de 6 días (P6). Al amplificar a los mRNAs de la PPII^C y de la PPII* con el par B, puede observarse la presencia de bandas inespecíficas de mayor peso molecular que las esperadas (carril 5), y además, que la señal detectada para el mRNA de la PPII* (426 p.b, carril 4 y 5) es mucho mas débil que la detectada para ese mRNA con el par A (339 p.b., carril 2 y3)

Para descartar que las señales de los dos mRNAs durante el estudio ontogenético fueran producto de una mayor afinidad de los oligonucleótidos por algún mRNA y/o de una competencia de los mRNAs, decidimos usar un juego de oligonucleótidos que sólo amplificara al mRNA de la PPII*, y otro que sólo amplificara al de la PPII^C.

Ya que al emplear el juego de oligonucleótidos que sólo amplifican al mRNA de la PPII* (PPII*up-PPII*down), observamos una amplificación eficiente y ausencia de bandas

inespecíficas, decidimos emplear este juego de oligonucleótidos para el estudio durante la ontogenia del SNC.

Los oligonucleótidos diseñados para amplificar solo al mRNA de la PPII^C (PPII^Cup-PPII^Cdown), se probaron en cDNA de cerebro de embrión de 17 días (E17) y de posnatal de 6 días (P6). Bajo las condiciones empleadas observamos una amplificación eficiente y la ausencia de bandas inespecíficas (Figura 8). Por tal motivo decidimos emplear este juego de oligonucleótidos para llevar a cabo el estudio durante la ontogenia del SNC.

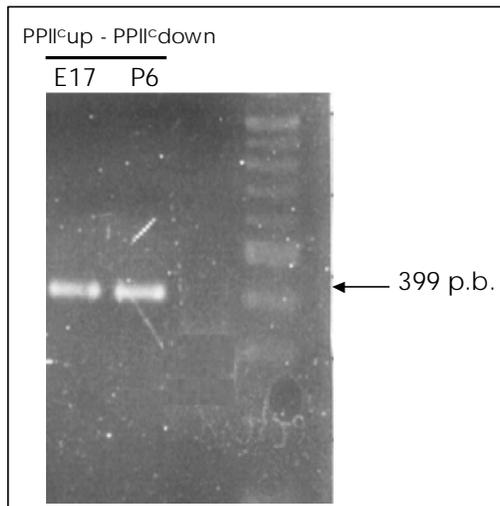


Figura 8.- Productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos PPII^Cup y PPII^Cdown. Se amplificó al mRNA de la PPII^C en cDNA de cerebro de embrión de 17 días (E17) y postnatal de 6 días (P6). La amplificación dio lugar a una banda del tamaño esperado (399 p.b.). No hubo amplificación de productos inespecíficos bajo las condiciones empleadas.

Si bien bajo las condiciones empleadas para ambos juegos de oligonucleótidos, la amplificación fue eficiente, requeríamos de asegurarnos que bajo las condiciones a emplearse en el estudio durante la ontogenia, la señal de ambas isoformas fuera detectable en todos los estadios de desarrollo y que además, no estuviese tan saturada que las comparación entre señales no fuera posible. Por tal motivo, decidimos estandarizar ambos juegos de oligonucleótidos en cDNA de cerebros de embrión de 15 días (E15) y de adulto de 3 meses (3M).

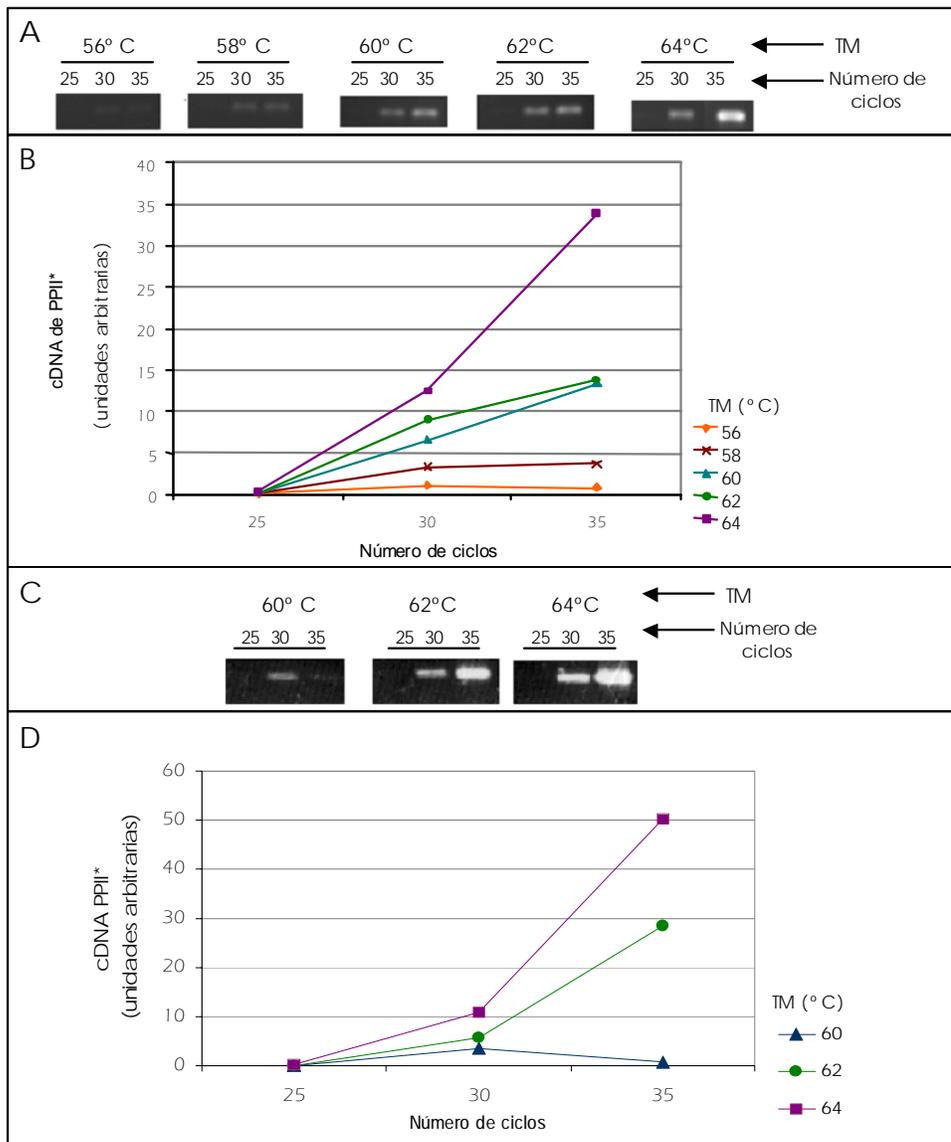


Figura 9.- Estandarización de oligonucleótidos que amplifican sólo al RNA mensajero de la PPII*. Se estandarizó el juego de oligonucleótidos PPII*up-PPII*down en cDNA de cerebro de embrión de 15 días (E15) y cDNA de cerebro de adulto de 3 meses (3M). Se muestran los productos de la estandarización separados en un gel de agarosa en E15 (panel A) y 3M (panel C). A una TM de 64° C y a 30 ciclos de amplificación, la reacción se encuentra en fase logarítmica en E15 (línea morada, panel B) y 3M (línea morada, panel D).

Al estandarizar el juego de oligonucleótidos PPII*up y PPII*down utilizando cDNA de E15, observamos una amplificación eficiente a una TM de 64°C, y a 30 ciclos de amplificación. Bajo estas condiciones la reacción se encuentra en fase logarítmica (Figura 9, carril 14 del panel A y línea morada del panel B). Al realizar la estandarización usando cDNA de 3M, observamos los mismos resultados (Figura 9, carril 8 del panel C y línea morada del panel D),

lo cual nos indicó que a una TM de 64°C y 30 ciclos de amplificación, la señal sería detectable en la mayoría de los estadios de desarrollo y que además, sería comparable, por no estar en una fase de saturación.

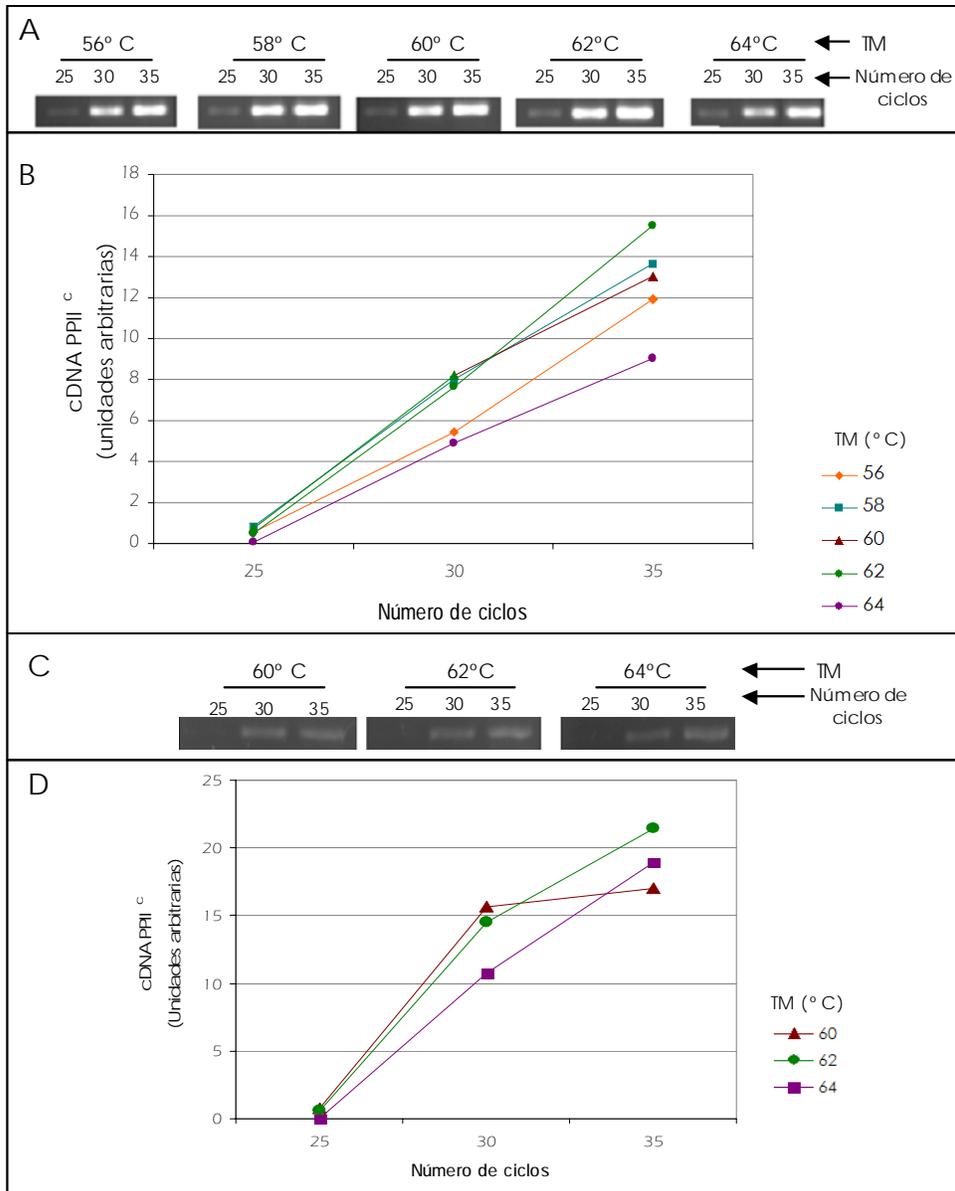


Figura 10.- Estandarización de oligonucleótidos que amplifican sólo al RNA mensajero de la PPII^c. Se estandarizó el juego de oligonucleótidos PPII^c_{up} - PPII^c_{down} en cDNA de cerebro de adulto de 3 meses (3M) y cDNA de cerebro de embrión de 15 días (E15). Se muestran los productos de la estandarización separados en un gel de agarosa en 3M (A) y E15 (C). A una TM de 62°C y a 30 ciclos de amplificación, la reacción se encuentra en fase logarítmica en 3M (línea verde, panel B) y E15 (línea verde, panel D).

Al estandarizar el juego de oligonucleótidos PPII^Cup y PPII^Cdown utilizando cDNA de 3M, observamos una amplificación eficiente a una T_M de 62°C, y a 30 ciclos de amplificación. Bajo estas condiciones, la reacción se encuentra en la fase logarítmica (Figura 10, carril 11 del panel A y línea verde del panel B). Al realizar la estandarización usando cDNA de E15, observamos los mismos resultados (Figura 10, carril 5 del panel C y línea verde del panel D), lo cual nos indicó que a una T_M de 62°C y 30 ciclos de amplificación, la señal sería detectable en la mayoría de los estadios de desarrollo y que además, sería comparable.

No detectamos señal del mRNA ni de la PPII^C ni de la PPII* a las T_M 's de 56 y 58°C con el cDNA de E15 (datos no mostrados). Asimismo, a 15 y 20 ciclos de amplificación no detectamos señal en ninguna de las T_M 's en los dos cDNAs empleados (datos no mostrados)

De acuerdo a los resultados de la estandarización de ambos juegos de oligonucleótidos, decidimos realizar las PCRs para todos los estadios de desarrollo bajo las condiciones que a continuación se describen. Para la amplificación del mRNA de la PPII*, empleamos una T_M de 64°C, en tanto que para la amplificación del mRNA de la PPII^C empleamos una T_M de 62°C. La amplificación en ambos casos fue por 30 ciclos. Amplificamos ciclofilina en el mismo cDNA, de manera que la señal de ese mRNA fungiera como control interno de la RT-PCR. Separamos los productos en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Al corregir la densidad óptica del cDNA de la PPII* y la del cDNA de la PPII^C contra la del cDNA de ciclofilina, obtuvimos el patrón de expresión de los dos mRNAs.

La señal de la PPII^C fue detectable desde el estadio de desarrollo E12 en embriones completos, y en cabezas de E14. Ya que la señal densitométrica para el mRNA de la PPII^C era muy baja en E12 y E13 (datos no mostrados), y además, habíamos empleado RNA de embriones (E12) y regiones anteriores de embriones (E13), decidimos tomar sólo en cuenta los cambios significativos respecto a la siguiente señal de PPII^C más baja detectada, que fue E18. Para comparar los resultados de cuatro experimentos, tomamos como el 100% el promedio de la señal densitométrica de la PPII^C corregida contra la de ciclofilina en E18.

En la figura 11 puede observarse que el mRNA de la PPII^c se regula durante el desarrollo, presentando aumentos significativos respecto a E18 en E19, P21, 3M y 5M.

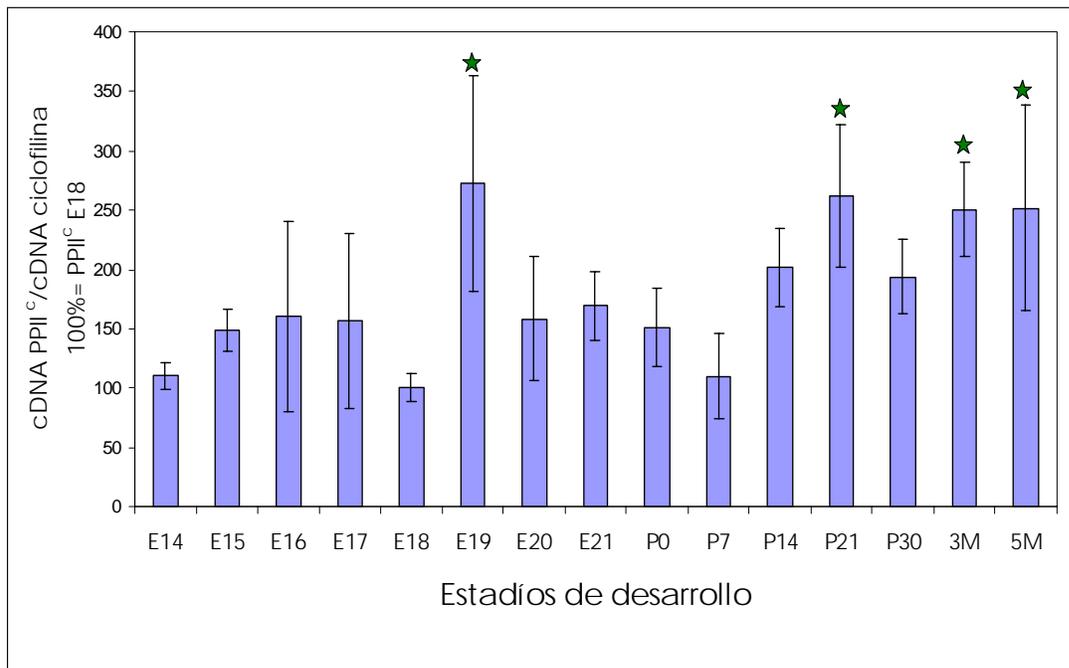


Figura 11. Patrón de expresión del mRNA de la PPII^c durante el desarrollo del SNC de la rata. Se muestra el promedio de cuatro experimentos (\pm error estándar; SE) en los que se amplificó al mRNA de la PPII^c, corrigiendo contra la señal densitométrica del mRNA de ciclofilina. Como el 100% se tomó promedio de la señal de PPII^c corregida contra la de ciclofilina en E18. Puede observarse que el mRNA de la PPII^c se regula durante el desarrollo del SNC ($F=2.239$, $p<0.05$), mostrando aumentos significativos respecto a E18, en E19, P21, 3M y 5M.

Para poder comparar los resultados de los cuatro experimentos del patrón de expresión de la PPII*, y poder comparar el promedio de este patrón con el del patrón de expresión para la PPII^c, tomamos como el 100% el mismo valor que empleamos para determinar el patrón de expresión de la PPII^c: el promedio de la señal densitométrica de la PPII^c corregida contra la de ciclofilina en E18.

La señal de la PPII* fue detectable desde E12 en embriones completos (datos no mostrados), y en cabezas de E14. Ya que como sucedió para el caso del mRNA de la PPII^c, no tomamos en cuenta para nuestro análisis las señales detectadas en E12 y E13, y decidimos tomar en cuenta los cambios significativos respecto a la siguiente señal más baja detectada que fue P0.

En la figura 12 puede observarse que el mRNA de la PPII* se regula durante el desarrollo, presentando aumentos significativos respecto a P0 en P21, 3M y 5M.

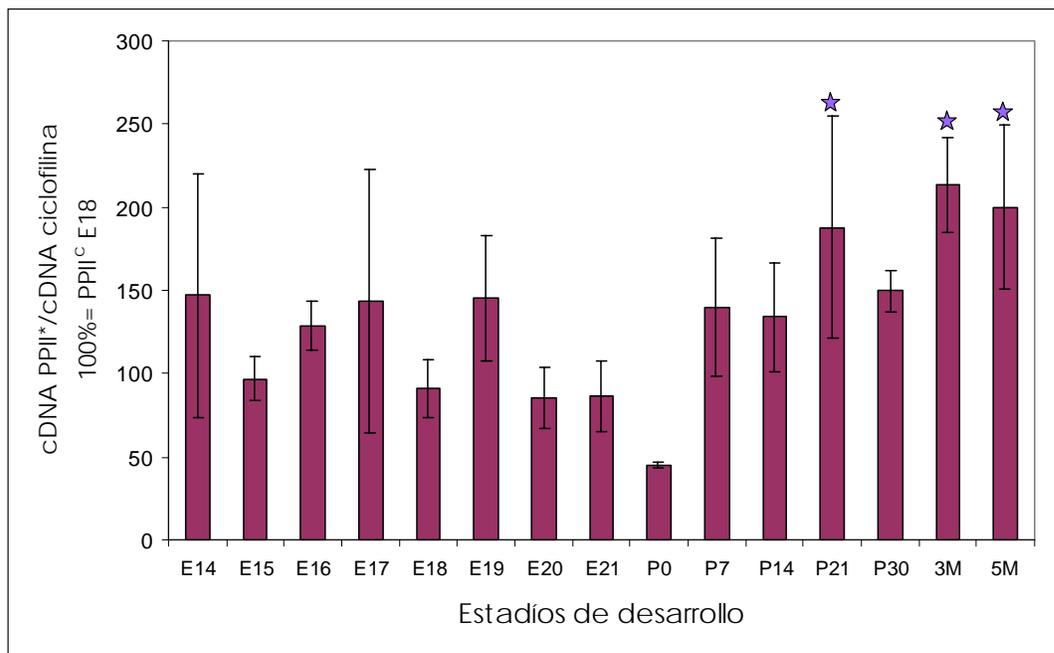


Figura 12. Patrón de expresión del mRNA de la PPII* durante el desarrollo del SNC de la rata. Se muestra el promedio de cuatro experimentos (\pm SE) en los que se amplificó al mRNA de la PPII*, corrigiendo contra la señal densitométrica de ciclofilina. Como el 100% se tomó el promedio de la señal de PPII^C corregida contra la de ciclofilina en E18. Puede observarse que el mRNA de la PPII* se regula durante el desarrollo del SNC ($F=2.263$, $p<0.05$), mostrando aumentos significativos respecto a P0 en P21, 3M y 5M.

Al comparar el patrón de expresión de los mRNAs de la PPII^C y PPII*, observamos una expresión paralela, con una ligera tendencia del mRNA de la PPII^C a expresarse en mayores niveles que el de la PPII* durante casi todos los estadios de desarrollo. Si bien, no se encontraron diferencias significativas entre la señal de los dos mRNAs en ninguno de los estadios de desarrollo, la tendencia del mRNA de la PPII^C a ser mayor que el de la PPII* es mas evidente desde E19 hacia P0, punto en el cual se observa el mayor desfase entre la señal del mRNA de la PPII^C respecto a la de PPII* (Figura 13).

Si bien, habíamos determinado los niveles de mRNA para las dos isoformas, desconocíamos si estos se estaban traduciendo. Ya que hasta la fecha, no se cuenta con anticuerpos específicos para la PPII^C ni para la PPII*, decidimos determinar los niveles de actividad enzimática de PPII de los estadios de desarrollo como una medida indirecta de la cantidad de proteína.

Además, al medir los niveles de actividad, lo correlacionaríamos con el balance de la expresión de las isoformas de mRNA PPII^C y PPII*.

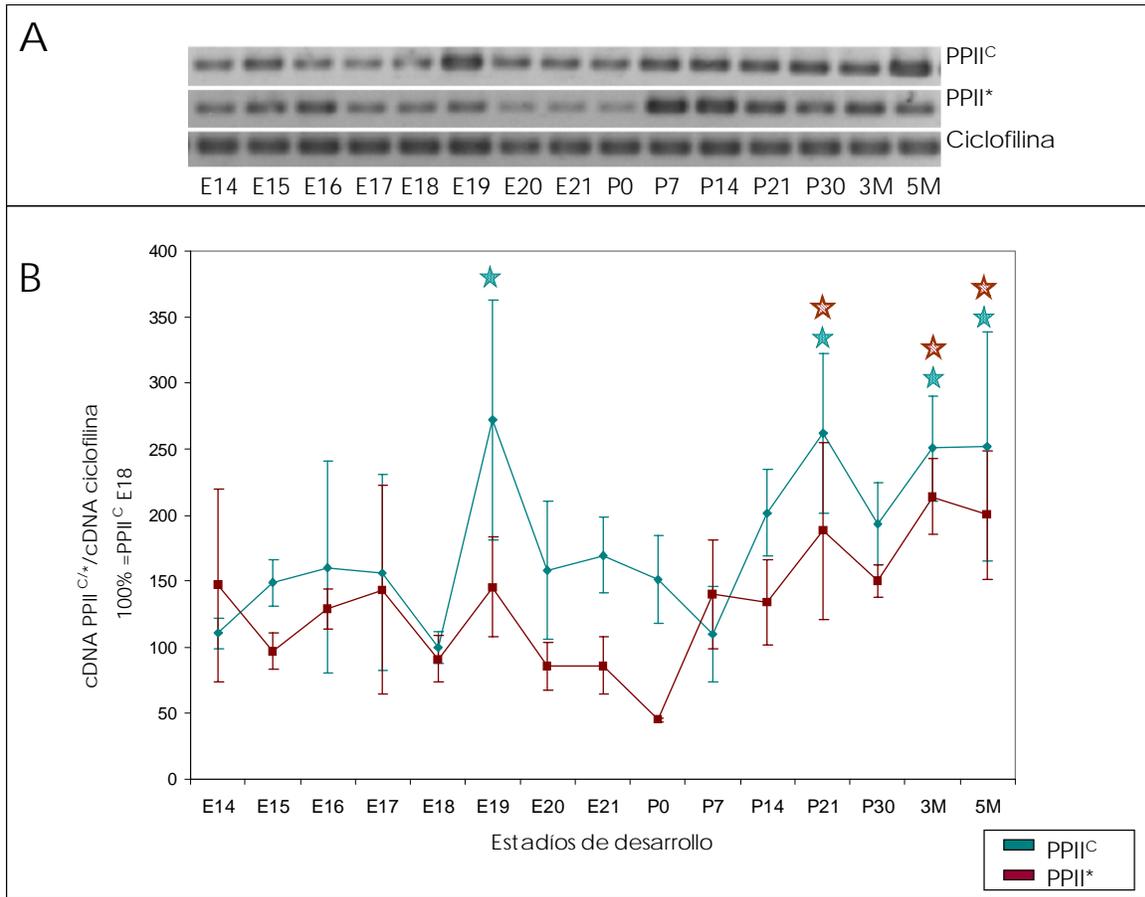


Figura 13. Patrón de expresión de los mRNAs de la PPII^C y PPII* durante el desarrollo del SNC de la rata. Se realizaron cuatro experimentos en los que se amplificó por PCR al mRNA de la PPII^C, PPII* y ciclofilina, Los productos se separaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En A, se muestra un gel representativo de la señal obtenida para los mRNAs de la PPII^C, PPII* y ciclofilina. En B, se muestra el promedio del patrón de expresión de los dos mRNAs (\pm SE).

Los mRNAs de la PPII^C y PPII* se expresan de manera paralela durante el desarrollo del SNC de la rata, siendo E19 (para el caso de la PPII^C), P21, 3M y 5M (para el caso de ambas), los estadios de mayor síntesis de mRNA. Si bien, no hay diferencias significativas entre la señal de la PPII^C y PPII* en ninguno de los estadios de desarrollo, hay una notable tendencia del mRNA de la PPII^C a expresarse en mayores niveles que el de la PPII* desde E19 hacia P0, punto en el cual se observa el mayor desfase entre las señales de los dos mRNAs.

Ya que en los ensayos de RT-PCR, los niveles de expresión de ambos mRNAs fueron muy bajos en el tejido de E12 y E13, decidimos determinar la actividad enzimática de la PPII a partir del estadio de desarrollo E14.

Determinamos la actividad de la PPII durante la ontogenia del SNC en tres experimentos independientes. Por razones técnicas, obtuvimos valores de actividad específica muy dispersos entre los experimentos, sin embargo, en general el patrón de actividad específica durante la ontogenia se mantuvo similar en los tres experimentos. Como control positivo empleamos membranas de P0 por lo que decidimos tomar el promedio de los tres experimentos como el 100%. En la figura 14 puede observarse que la actividad de la PPII se regula durante el desarrollo. Los niveles de actividad específica son bajos en las etapas embrionarias, detectándose el nivel más bajo en E16. Conforme avanza el desarrollo se observa un aumento de E19 a E21, y un pico máximo de actividad en P0 y P7. Después de P7, la actividad disminuye de manera gradual hacia etapas postnatales mas avanzadas, detectándose a los 3M y 5M, niveles de actividad específica muy similares a los de E17 y E18.

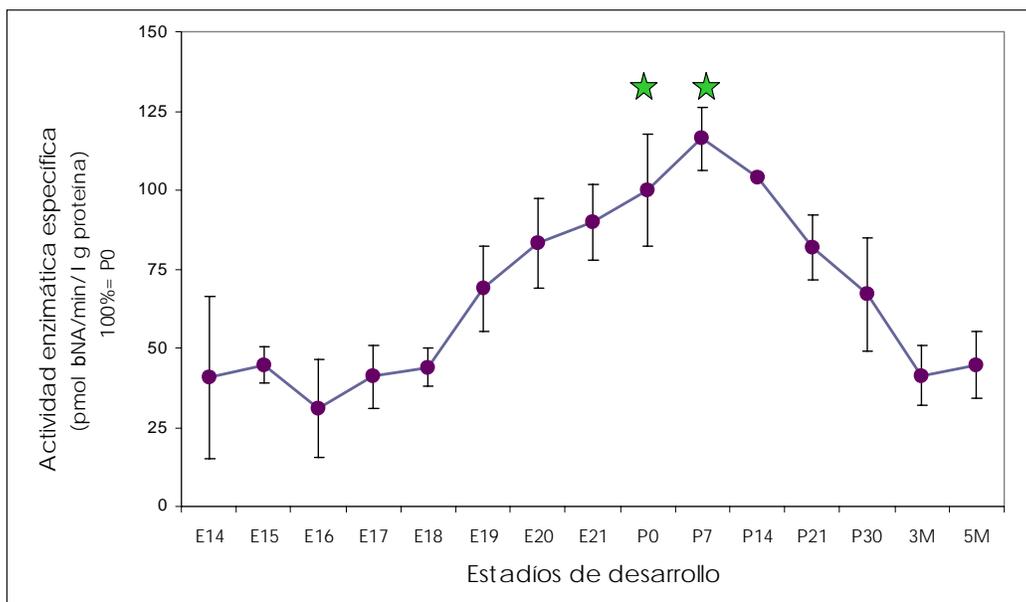


Figura 14. Patrón de la actividad específica de la PPII durante el desarrollo del SNC de la rata. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (\pm SE), tomando la actividad específica de membranas P0 como el 100% (ver texto). Puede observarse que la actividad enzimática se regula durante el desarrollo, observándose niveles bajos en etapas embrionarias tempranas y en etapas postnatales avanzadas. Los niveles más bajos de actividad específica se detectan en E16, y respecto a este estadio, se observa un aumento significativo en P0 y P7, siendo estos, los estadios con los mayores niveles de actividad específica ($F=5.825$, $p<0.05$). Nota: Por errores técnicos, solo se tomaron en cuenta dos de los tres valores para P14, por lo que no se muestra error estándar.

Con el objetivo de determinar si los niveles de actividad de la PPII reflejan el balance en los niveles de síntesis de los RNAs mensajeros de la PPII^C y PPII*, relacionamos los patrones de expresión de ambos mRNAs con la actividad (figura 15).

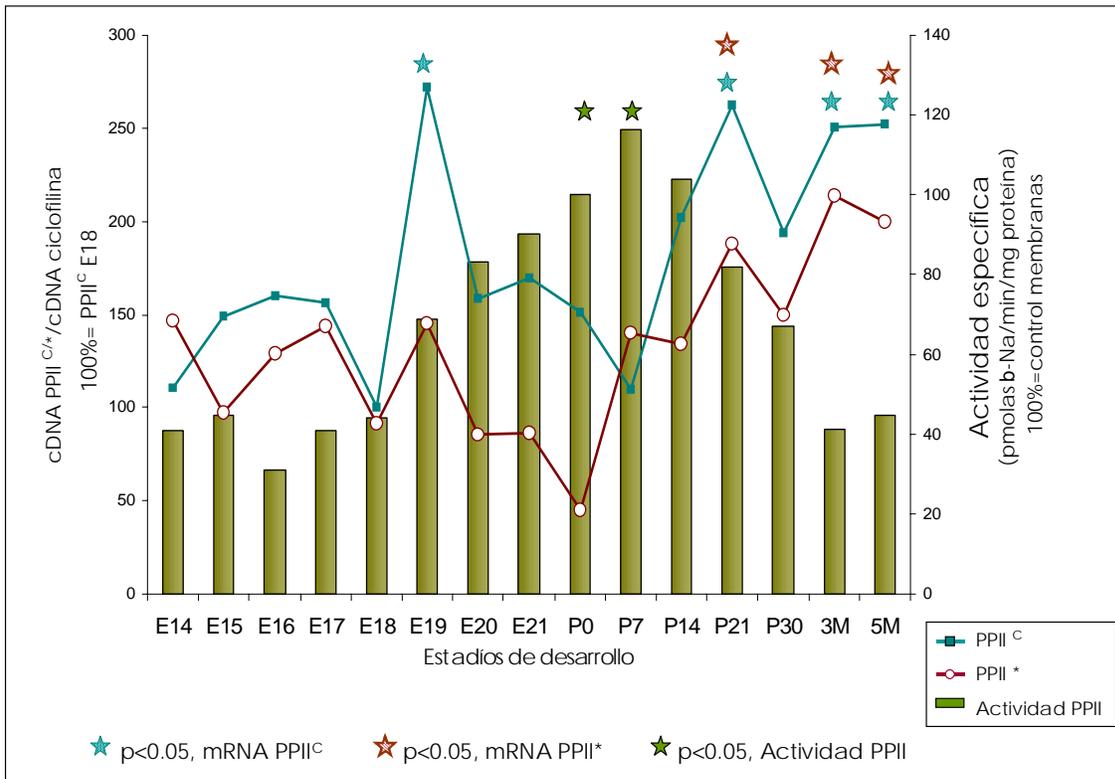


Figura 15. Patrón de expresión de los mRNAs PPII^C y PPII*, y de la actividad de la PPII durante el desarrollo del SNC de la rata. La actividad enzimática de la PPII es baja en etapas embrionarias anteriores a E19, en las cuales, la síntesis de ambos mRNAs es muy similar. Los niveles del mRNA de la PPII^C tienden a ser mayores que los de la PPII* desde E19 hacia P0, puntos en los cuales se observa una tendencia de la actividad específica a aumentar, siendo significativo el aumento en P0 y P7. Posterior a P7, los niveles de actividad específica tienden a disminuir, siendo muy similares los de las etapas 3M y 5M a los detectados en etapas embrionarias (E14-E18). Interesantemente, en P21, 3M y 5M se detectan los niveles más altos de síntesis de ambos mRNAs.

Se observa que la actividad de la PPII se mantiene en niveles bajos en etapas embrionarias anteriores a E19, lo cual correlaciona con una síntesis muy similar de ambos mRNAs. Sin embargo, en E19 hay una síntesis del mRNA de la PPII^C significativamente alta, lo cual coincide con una tendencia de la actividad a aumentar a partir de ese estadio. La actividad específica continúa aumentando hacia P0, lo cual coincide con la tendencia del mRNA de la PPII^C a expresarse en niveles mayores que el de la PPII*. De manera interesante, es en P0, uno de los dos puntos con la actividad específica más alta, en donde se observa la mayor diferencia

en la expresión de los mRNAs (los niveles de mRNA de la PPII^C son mayores que los de la PPII^{*}). Posteriormente, en el estadio P7 se observan niveles de actividad específica significativamente altos, observándose una tendencia del mRNA de la PPII^{*} a expresarse en mayores niveles que el de la PPII^C. Posterior a ello se vuelve a observar un paralelismo en la síntesis de los dos mRNAs, y la actividad tiende a decrecer hacia etapas postnatales más avanzadas, detectándose niveles de actividad específica muy similares a los de estadios embrionarios (E14-E18) en 3M y 5M. Sin embargo, en estos dos puntos, y en P21, los niveles de síntesis de ambos mRNAs son significativamente altos.

Dado que uno de los objetivos del presente estudio es determinar si el balance en la expresión de las dos isoformas es determinante sobre los niveles de actividad específica de la PPII durante el desarrollo del SNC, determinamos el cociente de la señal densitométrica del mRNA de la PPII^C con la del mRNA de la PPII^{*} ($PPII^C/PPII^*$) y lo correlacionamos con los niveles de actividad específica (Figura 16). Si bien, no encontramos diferencias significativas de la relación $PPII^C/PPII^*$ entre los estadios de desarrollo, se observa que la relación es cercana a 1 en estadios tempranos de desarrollo (E16-E18), puntos en los cuales la actividad específica es baja. En E19 se observa una tendencia de la relación $PPII^C/PPII^*$ a ser mayor, coincidiendo de manera interesante con la tendencia de la actividad específica a aumentar en ese estadio. En E20 y E21, la relación se mantiene en niveles muy similares a E19, mientras que la actividad específica sigue aumentando, y justo en P0, uno de los picos de actividad específica, la relación $PPII^C/PPII^*$ es la más alta. La relación $PPII^C/PPII^*$ es la más baja en el estadio P7, punto en el cual la actividad específica es muy alta. Posteriormente, la actividad específica tiende a disminuir, y se detectan niveles similares en P14 y P21 a los de E19 y E20, coincidiendo también con una relación $PPII^C/PPII^*$ muy similar. En los estadios P30, 3M y 5M, la relación $PPII^C/PPII^*$ se mantiene muy cercana a 1, y similar a la de los estadios E16-E18, mientras que la actividad específica continua disminuyendo, detectándose niveles de actividad específica bajos en 3M y 5M, y similares a los detectados en los estadios embrionarios anteriores a E19.

Para facilitar el análisis de nuestros resultados, calculamos también la señal densitométrica del mRNA de la PPII^{*} con la del mRNA de la PPII^C ($PPII^*/PPII^C$) y lo relacionamos con los niveles de actividad específica (Figura 17).

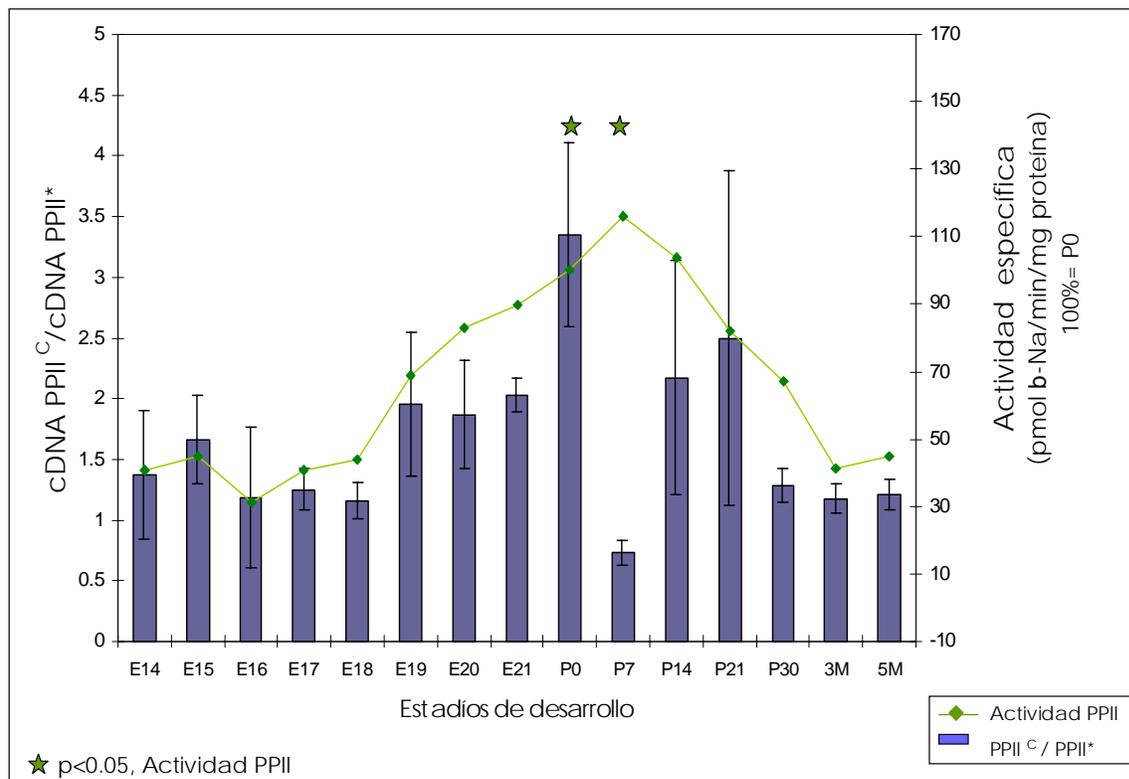


Figura 16. Patrón de la relación de expresión PPII^C/PPII*, y de la actividad de la PPII durante el desarrollo del SNC de la rata. La relación PPII^C/PPII* tiende a mantenerse en niveles ligeramente mayores a 1 en estadios embrionarios anteriores a E19, estadios en los cuales los niveles de actividad son bajos. La relación aumenta en E19, y se mantiene en niveles similares en E20 y E21, lo cual coincide con el aumento en actividad que se observa desde E19. En P0, la relación PPII^C/PPII* aumenta y presenta los niveles más altos de toda la ontogenia, coincidiendo con los niveles de actividad significativamente altos detectados en ese estadio. En P7, la relación PPII^C/PPII* es menor a 1, el nivel más bajo detectado en toda la ontogenia, contrastando sorprendentemente con los niveles de actividad significativamente altos en ese estadio. En P14 y P21, la relación vuelve a ser mayor a 1, y es similar a la encontrada en E19-E21, coincidiendo con niveles de actividad específica muy similares en los mismos estadios. En P30, 3M y 5M, se observa una tendencia de la actividad específica a disminuir, mientras que la relación PPII^C/PPII* se mantiene muy similar entre esos estadios, y similar a la encontrada en E17-E18, coincidiendo con niveles de actividad similares en esos estadios.

En general, la relación se mantiene en niveles similares entre los estadios E14-E18. Llamativamente, en E15 hay una ligera disminución en la relación PPII*/PPII^C, lo cual coincide con niveles de actividad enzimática ligeramente más altos con respecto a E16, en donde la relación PPII*/PPII^C muestra una tendencia a ser mayor, y se detectan los niveles de actividad específica más bajos. Posteriormente, la relación PPII*/PPII^C presenta una tendencia a disminuir desde E19 hacia P0, coincidiendo con un incremento en la actividad específica a aumentar desde E19 hacia P0, en donde junto con P7, la actividad específica es significativamente alta. De especial interés resultó el aumento en la relación PPII*/PPII^C en

P7, en paralelo con una alta actividad específica. Hacia P14, la relación PPII*/PPII^C decrece y se mantiene en niveles cercanos, pero menores a 1, desde ese estadio hacia 5M, mientras que se observa una tendencia de la actividad específica a decrecer desde P14 hacia 3M. Se observa también que la relación en 3M y 5M es similar a la encontrada en E17 y E18, con niveles similares de actividad específica a los encontrados en esos estadios.

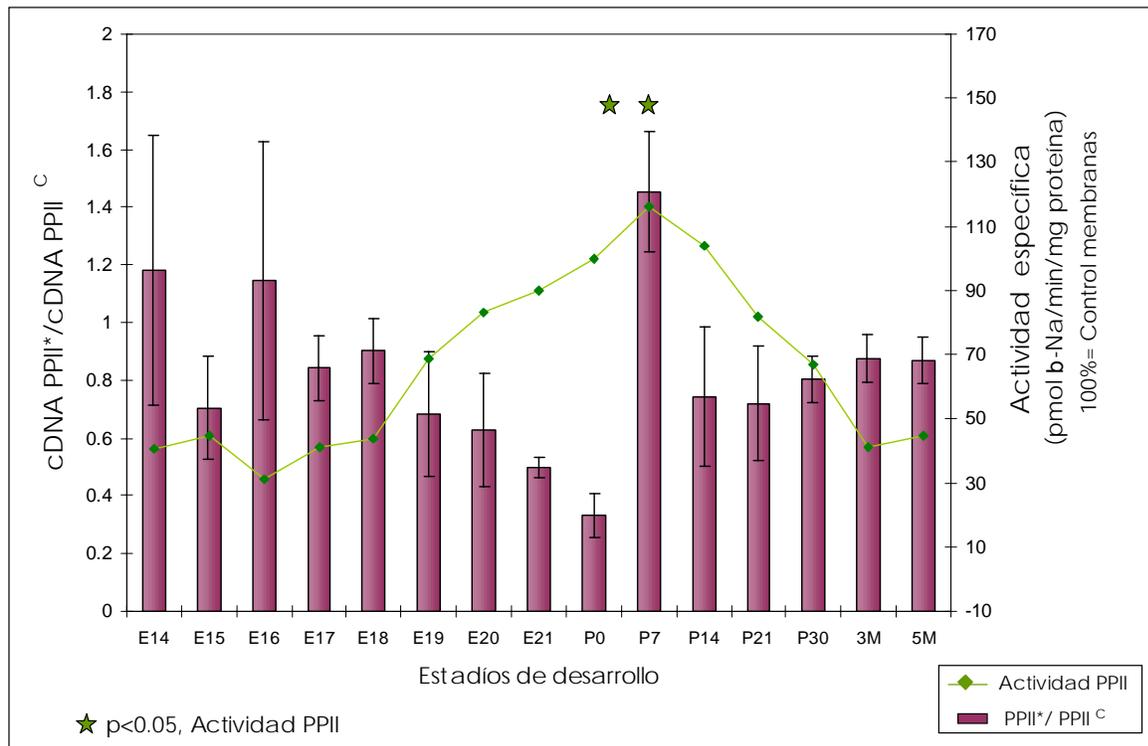


Figura 17. Patrón de la relación de expresión PPII*/PPII^C, y de la actividad durante el desarrollo del SNC de la rata. La relación PPII*/PPII^C tiende a mantenerse en niveles muy cercanos pero más bajos a 1 en casi todos los estadios de desarrollo. En estadios embrionarios anteriores a E19, no se observan cambios en la actividad específica, aunque se observa una ligera tendencia de la actividad enzimática a aumentar cuando la relación PPII*/PPII^C disminuye en E15. En E16, se detectan los niveles de actividad específica más bajos, encontrándose en este estadio una tendencia de la relación PPII*/PPII^C a ser mayor que en E15. La actividad específica tiende a aumentar desde E19 hacia P0, coincidiendo interesantemente con una tendencia de la relación PPII*/PPII^C a disminuir desde E19 hacia P0. En P0 se observa la relación PPII*/PPII^C mas baja, en tanto que los niveles de actividad enzimática son de los mas altos de toda la ontogenia. En contraste, en P7, la relación PPII*/PPII^C es la mas alta de toda la ontogenia, en tanto que la actividad enzimática sigue siendo significativamente alta en este estadio. Desde P14-5M, la relación PPII*/PPII^C se mantiene por debajo de 1, en niveles muy similares entre todos los estadios, en tanto que en estos puntos, se observa una tendencia de la actividad enzimática a disminuir. De manera interesante, la relación PPII*/PPII^C y la actividad enzimática en 3M y 5M es similar a la encontrada en los estadios de desarrollo E17 y E18.

Dado que el determinar el patrón de expresión de ambas isoformas de mRNA y de la actividad enzimática de la PPII, nos proporcionaría una idea meramente correlativa, requeríamos de un

modelo que reflejara lo que sucede cuando la expresión de la PPII* aumenta. Supusimos que las células CA-77 resultarían un buen modelo para tal fin, pues entre los neuropéptidos que sintetizan, se encuentra el TRH⁽⁷²⁾. Ya que desconocíamos si expresaban a los mRNAs de la PPII^C y PPII*, realizamos una RT-PCR en RNA extraído de células mantenidas un día *in vitro* (1 DIV, plato A) y otras mantenidas cuatro días *in vitro* (4DIV, plato B). Las condiciones que empleamos fueron las mismas que para el tejido de la ontogenia, y como control de la PCR, empleamos cDNA de cerebro completo de P0.

Al separar los productos de la PCR en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, observamos no sólo que las células CA-77 expresaban a ambos mRNAs, sino que además lo hacían en niveles muy similares. Interesantemente, los niveles de expresión en las células CA-77 del plato A fueron similares a los encontrados en el cDNA de P0, y mas altos que los encontrados en el plato B (Figura 19).

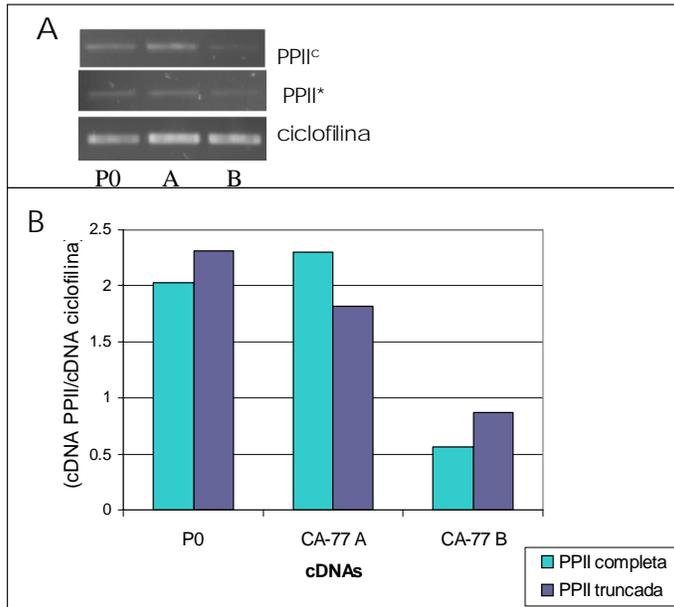


Figura 19. Las células CA-77 expresan los mRNAs PPII^C y PPII* en niveles similares. Se realizó una PCR en cDNA obtenido de platos de células CA-77 con tratamientos distintos: un plato mantenido un día *in vitro* (carril A y CA-77-A en panel A y B respectivamente) y otro mantenido cuatro días *in vitro* (carril B y CA-77-B en panel A y B respectivamente). En ambos casos se amplificó a los mRNAs PPII^C, PPII* y al de ciclofilina, como control interno. En A se muestran los productos de PCR separados en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En B se observa que los niveles de expresión de ambos mRNAs fueron similares entre ellos tanto en las células CA-77 A como en las CA-77 B. Además, al comparar la señal obtenida en el cDNA de las células CA-77 A con la obtenida en cDNA proveniente de un cerebro de rata P0, los niveles de expresión son similares.

Si bien, habíamos detectado la expresión de los dos mRNAs en las células CA-77, desconocíamos si presentaban actividad enzimática de PPII. Realizamos entonces un ensayo

enzimático para la PPII en membranas de las células bajo las mismas condiciones que para las membranas de cerebro, pero empleando 150 μg de proteínas de membrana. La actividad enzimática fue detectable, aunque el nivel de actividad específica fue mucho menor que en membranas de cerebro completo de P0 que se emplearon como control del ensayo enzimático (Figura 20).

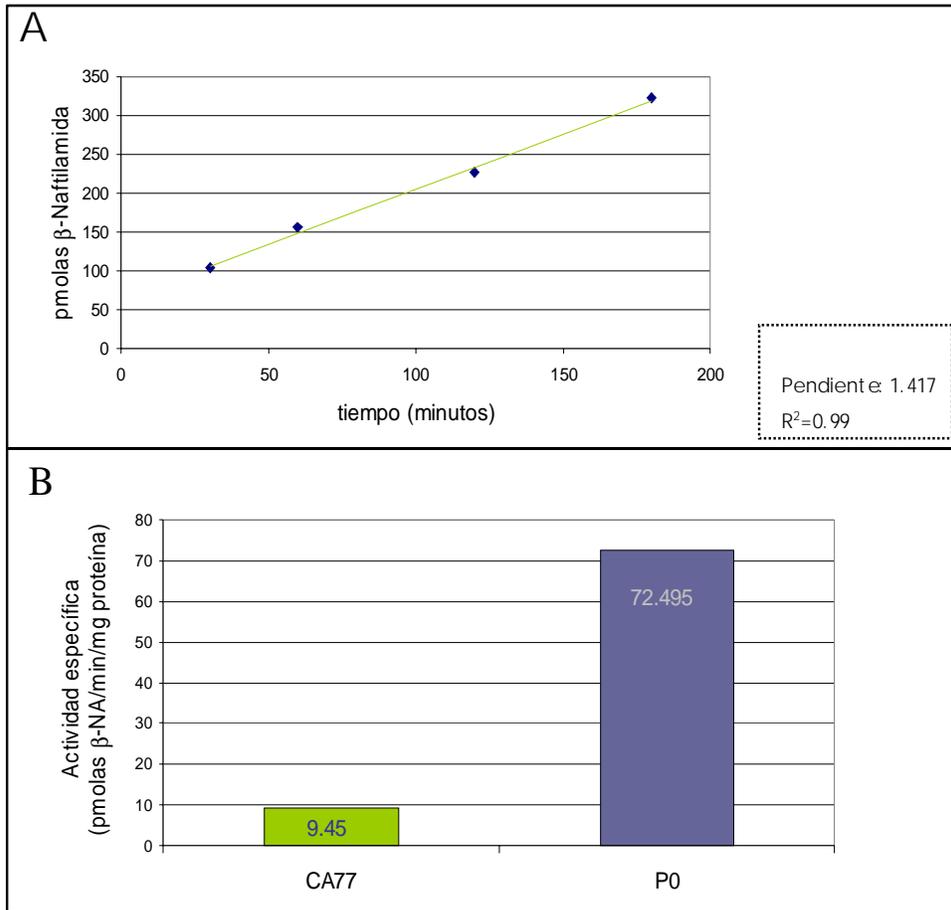


Figura 20. Actividad específica en membranas totales de células CA-77 y de cerebro de rata P0. Se realizó un ensayo enzimático de PPII en membranas totales de células CA-77 (150 μg de proteína). y como control del ensayo, se utilizaron membranas de cerebro de P0 (100 μg de proteína). La actividad enzimática fue detectable en las membranas de las células CA-77. En A se muestra la cinética enzimática en las membranas de células CA-77. Puede observarse que con 150 μg de proteína, la cinética se mantiene lineal en tres horas de monitoreo de la reacción. En B puede observarse que los niveles de actividad específica son menores en las membranas de las células CA-77 que en las de cerebro de P0.

Como una primera aproximación para elucidar como se regula la actividad de la PPII en las células CA-77, decidimos sobreexpresar a la PPII*. Por otro lado, queríamos saber si la PPII* funcionaba como dominante negativa en condiciones en que la actividad enzimática fuera alta, por lo que decidimos sobreexpresar a la PPII* en células estimuladas. Para estimular la actividad de la PPII, tratamos a las células con hormona tiroidea (T3) y evaluamos su efecto 72 horas después, que es el tiempo en el que se detecta la mayor expresión del mRNA y actividad enzimática con ese estímulo en cultivos de adenohipófisis ⁽⁵⁵⁾. Si bien, desconocíamos si la T3 fungiría como un estimulador de la expresión del mRNA de la PPII^C y actividad de la PPII en estas células, el hecho de que en membranas de adenohipófisis de ratas inyectadas con T3 ⁽⁵²⁾ y en cultivos primarios de adenohipófisis de rata estimulados con T3 lo haga ^(54, 57), nos hizo suponer que la T3 posiblemente estimularía la expresión del mRNA de la PPII^C y actividad de la PPII.

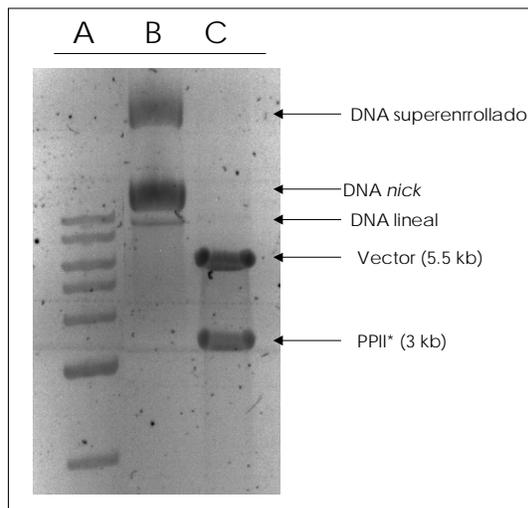


Figura 21. DNA del vector de expresión para PPII*, no digerido y digerido con la enzima de restricción *Not-I*. Se digirió 1 µg de DNA con la enzima de restricción *Not-I* y se separó en un gel de agarosa al 1% (C). En el mismo gel se separó 1 µg de DNA no digerido (B) y 3 µl de un marcador de 1kb (A). El DNA se observa íntegro, pues se distinguen las bandas de DNA superenrollado, DNA *nick* y DNA lineal. Al digerir el DNA con *Not-I*, se observó el patrón de restricción esperado: una banda de aproximadamente 5.5 kb que representa al vector y una de 3 kb, que representa cDNA de la PPII* separado del vector.

Para sobreexpresar a la PPII*, transfectamos a las células con el vector de expresión para PPII* empleado previamente ⁽³⁰⁾. Para estar seguros que los resultados obtenidos fueran producto de una transfección eficiente, requeríamos asegurarnos que el vector empleado tuviera el patrón de restricción esperado y que el DNA se encontrará íntegro. Aislamos DNA plasmídico, y

digerimos con la enzima de restricción *Not*-I. Al separar los productos de la digestión en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, observamos el patrón de restricción esperado. El DNA separado en el mismo gel se encontraba íntegro, pues se distinguían las bandas del DNA lineal, *nick* y superenrollado (Figura 21).

Por otra parte, para tener la certeza de que los resultados que observáramos en las cinéticas enzimáticas fueran producto de una transfección eficiente, transfectamos células con el vector de expresión p-IRES-GFP. El número de células que expresaron a la GFP respecto al número total de células nos indicó la eficiencia de la transfección. Esta resultó muy eficiente, pues 84.24 % expresaron fluorescencia (Figura 22).

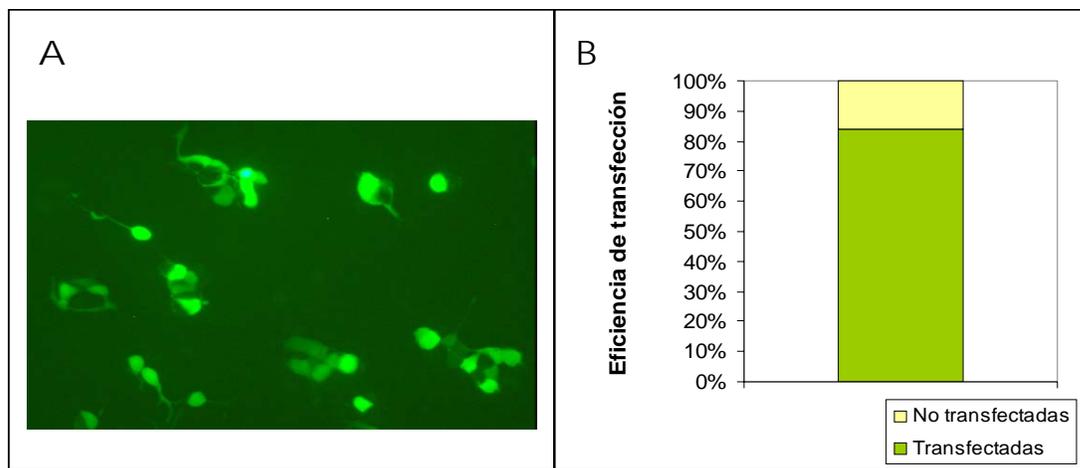


Figura 22. La transfección de las células CA-77 con el vector de expresión p-IRES-GFP fue eficiente. Se transfectaron células CA-77 con el vector de expresión p-IRES-GFP, y se evaluó la eficiencia de la transfección al microscopio de fluorescencia. Las células CA-77 transfectadas expresaron una alta fluorescencia (panel A) y al comparar el número de células que expresaban fluorescencia contra el número total de células, el 84.24 % (\pm 2.45 SE) se había transfectado.

Cultivamos y tratamos a las células tal como se describe en materiales y métodos, y las cosechamos a las 72 horas. Extrajimos membranas de las células como lo habíamos realizado previamente, sin embargo, por el número de células y tamaño de los platos, la cantidad de proteína fue muy poca, de 61 a 75 μ g. Esas cantidades eran aproximadamente la mitad de la concentración de proteína que habíamos empleado en nuestro ensayo previo con membranas de las células CA-77, y menor que la que empleamos en membranas de cerebro. De cualquier

manera decidimos realizar el ensayo enzimático, empleando 61 μg de proteína para cada uno de los tratamientos, y monitoreando por 6 horas la actividad enzimática.

La actividad enzimática en todos los platos fue baja, lo cual atribuimos a la baja concentración de proteína empleada, y a que las células CA-77 presentan poca actividad enzimática. Cabe mencionar que en el mismo ensayo enzimático, empleamos 50 μg de proteína del control positivo (membranas de P0), y observamos una cinética enzimática lineal y similar a la obtenida en otros ensayos en los que se había empleado como control positivo (datos no mostrados).

No pudimos comparar la actividad específica, pues en ninguno de los tratamientos, la actividad enzimática se comportó de manera lineal en los tiempos monitoreados. Sin embargo, sí observamos diferencias entre la cantidad de β -Naftilamida liberada en cada uno de los tiempos monitoreados.

Al comparar la cantidad de β -Naftilamida liberada a los 60, 120 y 240 minutos de las células transfectadas con PPII truncada (Figura 23, con PPII*) respecto a las células no transfectadas (Figura 23, PPII endógena), la cantidad de β -Naftilamida siempre fue menor en todos los tiempos. Para el caso de las células transfectadas con PPII truncada, se observó un cambio en la cantidad de producto liberado hasta los 360 minutos, sin embargo, dado que no contamos con datos de las células sin tratamiento para poder compararlo, no se muestran los datos.

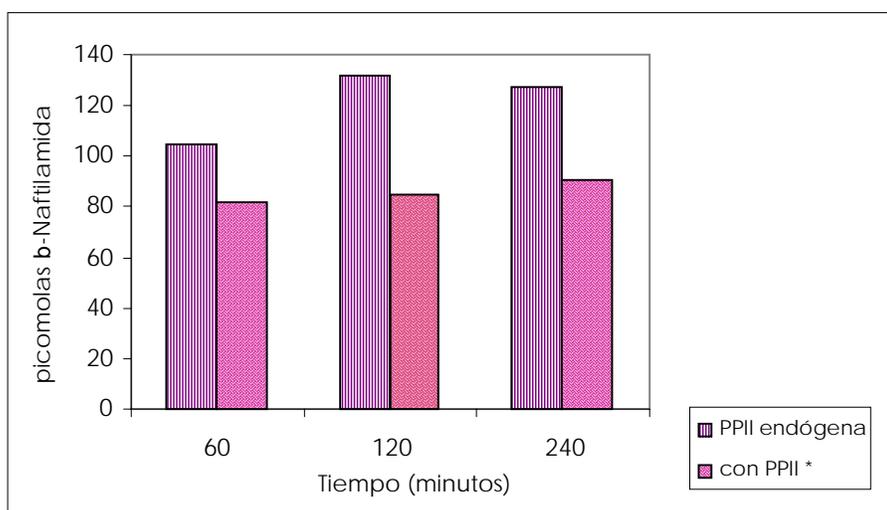


Figura 23. β -Naftilamida liberada en membranas de células con actividad endógena de PPII (PPII endógena) y transfectadas con PPII* (con PPII *). Las membranas de células transfectadas con PPII * liberaron una menor cantidad de β -Naftilamida respecto a las células con actividad endógena de PPII.

Contrario a lo esperado, la T3 no estimuló la actividad enzimática de la PPII, pues en los tiempos monitoreados de actividad en las membranas de las células no transfectadas (60, 120 y 240 minutos), la cantidad de β -Naftilamida liberada en las membranas de las células tratadas con T3 (Figura 24, T3) siempre fue menor que la liberada en las membranas de las células no transfectadas (Figura 24, PPII endógena). Para el caso de las membranas de las células tratadas con T3 y transfectadas con PPII* (Figura 24, T3+ PPII truncada), la cantidad de β -Naftilamida siempre fue menor que en las células tratadas con T3, y mucho menor que en las células no transfectadas. Además, no se observaron cambios en la cantidad de producto liberado antes de los 360 minutos (Figura 24).

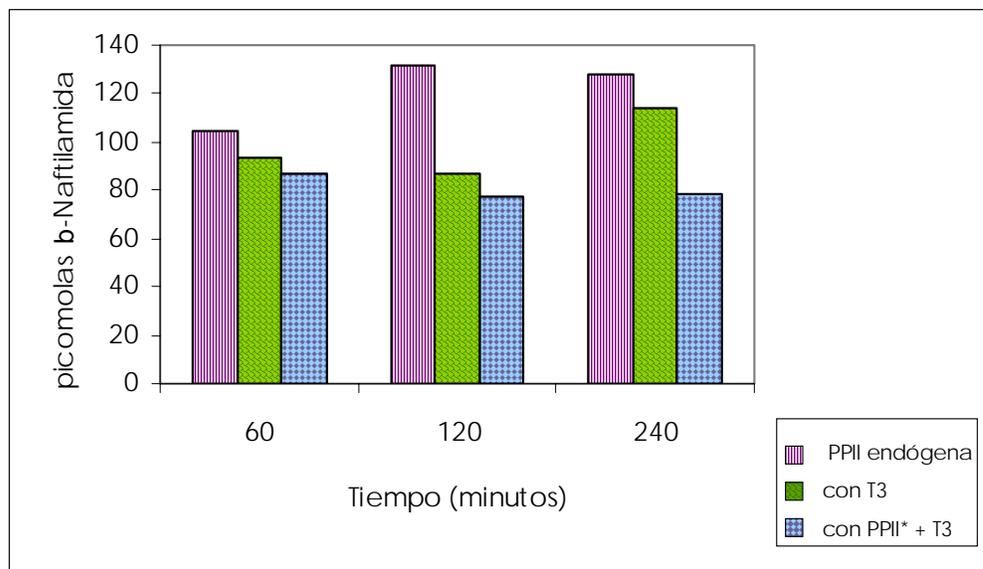


Figura 24. β -Naftilamida liberada en membranas de células con actividad endógena de PPII (PPII endógena), tratadas con T3 (con T3), y tratadas con T3 y transfectadas con PPII* (con PPII* + T3). La T3 no estimuló la actividad de la PPII, pues la cantidad de β -Naftilamida liberada en las células tratadas con T3 siempre fue menor que en las células con actividad endógena de PPII. Las células transfectadas con PPII* y tratadas con T3 liberaron menos β -Naftilamida respecto a las membranas de células tratadas con T3 y respecto a las que tenían actividad endógena de PPII.

Si bien, los datos que habíamos obtenido al evaluar la fluorescencia al microscopio, indicaron que lo observado en las cinéticas era producto de una transfección eficiente, queríamos asegurarnos que las membranas de las células realmente hubieran expresado a la PPII*. Para ello, realizamos un *Western blot* empleando un anticuerpo contra la cola de Histidinas del vector en el que está clonada la PPII*₍₃₀₎. Dada la baja cantidad de proteína obtenida, empleamos 6.5 μ g de proteína de las células transfectadas con PPII truncada y 8 μ g de proteína de las células

tratadas con T3 y transfectadas con PPII* para el SDS-PAGE. Como controles negativos empleamos membranas de las células no transfectadas y las tratadas con T3. Incubamos con el anticuerpo y revelamos la fosfatasa alcalina acoplada a este, con NBT y PCIB. Bajo las condiciones empleadas, no detectamos ninguna banda del peso esperado, y al haber transcurrido tres horas de revelado, detectamos bandas inespecíficas por debajo del peso esperado, tanto en los controles positivos como negativos (Datos no mostrados).

Decidimos entonces volver a realizar el *Western blot* empleando otro anticuerpo anti-histidinas. Lavamos la membrana con solución *stripping* y TBS-T, e incubamos con el anticuerpo antihistidinas. Posteriormente, incubamos con un anticuerpo secundario anticonejo-HRP y revelamos por quimioluminiscencia. Bajo las condiciones empleadas, no detectamos las bandas esperadas. Al dejar la membrana exponiendo por más de 24 horas, detectamos las mismas bandas inespecíficas que habíamos detectado revelando por fosfatasa alcalina (Datos no mostrados). Lo anterior lo atribuimos a la baja concentración de proteína utilizada, por lo que es necesario repetir estos experimentos.

8. DISCUSIÓN

La regulación de la expresión génica por *splicing* alternativo juega un papel fundamental durante el desarrollo de los organismos ⁽¹¹⁾. El hecho de que la actividad enzimática de la PPII se encuentre regulada por una dominante negativa que al parecer se origina por *splicing* alternativo, resultó sumamente interesante al iniciar este estudio, pues antes de ello, se desconocía como se regulaba la actividad de la PPII durante el desarrollo y sólo resultados *in vitro* obtenidos en nuestro grupo sugerían que el papel que desempeñaba la PPII* *in vivo* era el de una dominante negativa ⁽³⁰⁾. Dichos resultados mostraron que la actividad de la PPII disminuye de manera dependiente de dosis en cotransfecciones de PPII^C y PPII*, en donde a mayor relación PPII*/PPII^C hay menor actividad enzimática. Asimismo, se observó por *Western blot* en extractos membranales de células cotransfectadas, la aparición de una tercera banda, cuyo peso es intermedio entre el esperado para homodímeros PPII^C:PPII^C y homodímeros PPII*:PPII*. Se sugirió que dicha banda podría ser un heterodímero PPII^C:PPII*, y se propuso entonces, que el mecanismo de acción de la PPII* es el de actuar como una dominante negativa de la actividad de la PPII^C a través de heterodimerización no funcional ⁽³⁰⁾.

A través de este estudio hemos demostrado que los mRNAs de la PPII^C y PPII* se expresan durante el desarrollo del SNC desde etapas muy tempranas, mostrándose un paralelismo en la expresión durante casi toda la ontogenia, y detectándose los niveles de expresión más altos de la PPII^C en E19, y de ambas isoformas en los estadios postnatales P21, 3M y 5M. En etapas embrionarias tempranas (E12-E18), la síntesis de ambos mRNAs es baja, y muy paralela. Aunque los niveles de síntesis bajos coinciden en estas etapas con los niveles de actividad específica bajos, es factible suponer que la expresión tan paralela, y por ende, la formación de homodímeros (PPII^C:PPII^C) y heterodímeros (PPII^C:PPII*) en niveles similares, sea lo que determine los niveles bajos de actividad detectados.

En etapas embrionarias más tardías (E19-E21) y la etapa postnatal P0, es bastante claro que el balance en la expresión de ambos mRNAs determina los niveles de actividad enzimática. Puede observarse que a nivel de mRNAs, estas son las únicas etapas en las que se ve una tendencia de los mRNAs a presentarse en diferentes niveles, siendo más altos los niveles de PPII^C respecto a los de PPII*, particularmente en P0, en donde se observa el mayor desfase entre el nivel de PPII^C respecto al de PPII*. La relación PPII^C/PPII* también tiende a ser muy alta en estos estadios, mostrando en P0 la relación más alta de todos los

estadios considerados en este estudio. Al observar la relación $PP2I^*/PP2I^C$, puede observarse que ésta tiende a decrecer desde E19 hacia P0, presentando en P0 la relación mas baja de toda la ontogenia. De manera sumamente interesante, los cambios que vemos a nivel de mRNAs, y mas aún, los cambios en la relación $PP2I^C/PP2I^*$, y $PP2I^*/PP2I^C$, coinciden con cambios a nivel de actividad específica detectados. Es decir, cuando los niveles de síntesis de la $PP2I^C$ empiezan a ser más altos que los de la $PP2I^*$, es cuando se observa un aumento notable en la actividad específica (E19), y es en P0, en donde los niveles de actividad resultan ser de los más altos de toda la ontogenia, cuando la síntesis de $PP2I^C$ muestra las mayores diferencias respecto a los de $PP2I^*$.

Posiblemente, los altos niveles de expresión de la $PP2I^C$ en E19, contribuyan de manera importante al aumento en la relación $PP2I^C/PP2I^*$ que se va observando hacia P0, favoreciendo la formación de homodímeros $PP2I^C/PP2I^C$ más que de heterodímeros $PP2I^C/PP2I^*$ u homodímeros $PP2I^*:PP2I^*$.

Por otro lado, contrario a lo esperado, la etapa P7, en la que los niveles de actividad fueron de los más altos, mostró la relación de expresión $PP2I^C/PP2I^*$ más baja. Ello puede indicar o bien que la $PP2I^*$ tiene una función diferente en esta etapa del desarrollo, quizá distinto al de una dominante negativa de la $PP2I^C$; o bien, que los altos niveles de actividad detectados en la etapa P7 sean un reflejo de la alta síntesis de $PP2I^C$ en etapas anteriores que hubieran favorecido la formación de homodímeros $PP2I^C:PP2I^C$, y que más bien, la alta síntesis de $PP2I^*$ que ocurre en esa etapa contrarreste la gran cantidad de homodímeros que anteceden a P7, y ello conduzca a la disminución gradual de la actividad enzimática que se observa desde P14 hacia la etapa adulta. En las etapas P14 a 5M, la expresión de ambos mRNAs vuelve a ser muy paralela, y las relaciones $PP2I^C/PP2I^*$, y $PP2I^*/PP2I^C$ tienden a volverse muy cercanas a 1, coincidiendo con la disminución gradual en la actividad enzimática que se observa hacia la etapa adulta. Los datos encontrados en la etapa postnatal apuntan a que es el balance en la expresión de ambas isoformas lo que determina los niveles de actividad enzimática, ya que la síntesis de ambos mRNAs tiende a aumentar, siendo significativamente alta en los estadios P21, 3M y 5M.

Probablemente, en estas etapas haya una formación de homodímeros $PP2I^C:PP2I^C$ muy similar a la de heterodímeros $PP2I^C:PP2I^*$, sin embargo, el porque de esa síntesis tan alta de mRNAs, si el alcanzar ese balance en la expresión no requiere de niveles de síntesis tan altos (como sucede en E17-E18), lo desconocemos. Sin embargo, es importante mencionar que debido a la

limitante de no contar con anticuerpos específicos para la PPII^C o PPII*, desconocemos si la cantidad de proteína que se está sintetizando refleja los niveles de mRNAs en esta etapa, lo cual hace especulable que solo una fracción de mRNA se este traduciendo. Lo anterior, en base a que durante el desarrollo del SNC, los mecanismos de regulación cambian, y se conocen genes, cuyos mRNAs presentan una estabilidad diferente de acuerdo a la etapa de desarrollo. Tal es el caso del mRNA de *bicoid* de *Xenopus*, cuya estabilidad se regula en base a señales que se dan durante el desarrollo ⁽⁷³⁾, o de *hsp83* de *Drosophila melanogaster*, el cual presenta secuencias en el 3'UTR, que lo hacen inestables dependiendo de la etapa de desarrollo ⁽⁷⁴⁾. Sin embargo, los niveles de síntesis de mRNA tan altos que encontramos en la etapa adulta, nos hacen suponer que la no traducción del mRNA o su degradación no sería lo más factible, ya que usualmente los mRNAs que no se traducen y que son sujetos a degradación se transcriben en niveles bajos ⁽¹¹⁾, lo cual no es el caso de ninguno de los dos mRNAs de la PPII en la etapa adulta.

Una posibilidad, es que lo que este sucediendo en el contexto celular de la etapa adulta, sea que las dos isoformas de mRNA, además de traducirse en proteínas con la capacidad de regular los niveles de TRH, también tengan una función distinta. Existen casos en donde se ha sugerido que una misma isoforma de mRNA puede traducirse en una proteína con función distinta en etapas tempranas del desarrollo respecto a la que presenta en etapas mas tardías. Tal es el caso de la isoforma α del mRNA del gen *neurexin III* de *Xenopus laevis*, la cual se expresa tanto en el ovocito como en etapas embrionarias en donde inicia la sinaptogénesis ⁽¹⁹⁾. Ya que la función caracterizada de las neurexinas es la de guiar a las neuronas en el establecimiento de sinápsis, el hecho de que se exprese también en el ovocito, cuando no hay un embrión aún, ha conducido a proponer que las neurexinas pueden tener en este contexto un papel adicional al que juegan durante la sinaptogénesis ⁽¹⁹⁾. Para el caso de la PPII, nos apoyamos además en que se ha sugerido que las aminopeptidasas de la familia M1 (a la que pertenece la PPII) desempeñan un papel distinto al de degradar péptidos ⁽⁷⁵⁾, y como un ejemplo de ello, está el de la Aminopeptidasa Sensitiva a Puromicina, la cual tiene un papel fundamental durante la meiosis de *Arabidopsis thaliana* ⁽⁷⁶⁾.

Por otra parte, también es factible suponer que dada la complejidad en el SNC adulto, existen otras señales, además de la expresión de la PPII* que regulan la actividad de la PPII^C. Una de esas señales podría ser la expresión diferencial de isoformas de mRNA de la PPII en etapas

embrionarias y adultas, como sucede en genes como *laf-4* ⁽²⁶⁾, *neurexin-I, II y III* ⁽¹⁸⁾ y *dnos* ⁽⁵²⁾. Para el caso de la PPII, se ha demostrado por ensayos de *Northern blot* que existen diferentes isoformas de mRNA, que se expresan en el cerebro de ratas adultas ⁽²⁹⁾. Si bien, desconocemos si esas isoformas se expresan en etapas embrionarias o postnatales tempranas (e.g. P0-P14), el hecho de que se expresen en niveles altos en la etapa adulta, hace suponer que es factible que tengan un papel importante en la regulación de la actividad de la PPII. En base a lo anterior, suponemos que alguna(s) de estas isoformas pudiera reemplazar a la PPII* funcionando como dominantes negativas de la actividad hidrolítica de la PPII^C, o bien, que algunas de estas también puedan formar dímeros funcionales que sean capaces de degradar al TRH.

A pesar de que los datos que encontramos durante el desarrollo del SNC apuntan a que la PPII* funciona como una dominante negativa de la PPII^C, requeríamos de un experimento contundente en el que pudiéramos demostrarlo. Si bien, previamente en nuestro grupo, se había demostrado que la PPII* funciona como una dominante negativa en células cotransfectadas con PPII^C y PPII* que no expresan endógenamente actividad de PPII ⁽³⁰⁾, decidimos realizar un experimento en un modelo que expresara de manera endógena a la PPII. Dicho modelo resultó ser la línea celular CA-77, la cual, además de expresar de manera endógena al TRH (el sustrato de la PPII)⁽⁷²⁾, expresa a los mRNAs de la PPII^C y la PPII*, y actividad de PPII.

Los datos obtenidos en las células CA-77, si bien, son aún muy preliminares pues fueron experimentos que solo realizamos una vez, sugieren que la PPII* puede estar funcionando como una dominante negativa de la PPII^C, ya que en membranas de células que transfectamos con el vector de expresión para PPII*, los niveles de producto liberado (β -Naftilamida) durante el ensayo enzimático siempre fueron menores que en las membranas de las células no transfectadas.

Por otro lado, queríamos saber si la PPII* funcionaba como dominante negativa en condiciones en donde estuviera estimulada la actividad de la PPII^C. Una primera aproximación para inducir la actividad de la PPII^C, fue incubar a las células en presencia de T3. Esto en base a que previamente se había demostrado que la actividad de la PPII se veía estimulada en cultivos primarios de adenohipófisis ⁽⁵⁴⁾ y en extractos membranales de adenohipófisis de ratas a las que se les había inyectado T3 ⁽⁵²⁾. Dado que el origen de la T3 es la glándula tiroidea, y que la línea celular CA-77 proviene de un carcinoma de tiroides ⁽⁷²⁾, supusimos que en este

contexto, podríamos estimular la actividad de la PPII con T3. Sin embargo, no resultó así, y contrario a lo esperado, la incubación con T3 reprimió la actividad de la PPII, mostrando durante el ensayo enzimático, niveles del producto liberado (β -Naftilamida) menores que en las membranas de las células no transfectadas.

Ya que la T3 a través de su receptor, es un factor transcripcional que estimula o reprime la transcripción de genes dependiendo del contexto celular, y en contextos como el de la adenohipófisis estimula los niveles de mRNA y actividad enzimática de la PPII₍₅₂₋₅₇₎, el hecho de no haber encontrado ese efecto en las células CA-77, quizá se deba a que estas provienen de un carcinoma de glándula tiroides con un contexto celular muy distinto al de la adenohipófisis. A pesar de no haber estimulado la actividad de la PPII con T3, las membranas de células transfectadas con PPII* y tratadas con T3 mostraron una liberación de β -Naftilamida mas baja que las células sólo tratadas con T3. Cabe resaltar que el efecto inhibitorio no es tan notorio, como cuando se compara el producto liberado en las membranas de células sólo tratadas con T3 respecto al de células que presentan actividad endógena de PPII. Ello sugiere que PPII* ejerce un efecto sinérgico con la T3, disminuyendo aún más la actividad de la PPII.

Si bien, a través del análisis microscópico de las células transfectadas con GFP, observamos una transfección muy eficiente (84%), queríamos asegurarnos que la proteína PPII* se hubiera expresado. De la manera en que previamente se había realizado en nuestro grupo ⁽³⁰⁾, aunque con una cantidad menor de proteína, realizamos un *Western blot* empleando un anticuerpo contra la cola de Histidinas del vector en que está clonada la PPII*. Si bien, no detectamos la señal esperada con ninguno de los dos anticuerpos anti histidinas que empleamos, lo atribuimos a la baja cantidad de proteína empleada, y no a que las células no se hubieran transfectado de manera eficiente (por la eficiencia en la transfección que habíamos observado en el mismo ensayo en las células transfectadas con el vector p-IRES-GFP).

A pesar de ser muy preliminares, los resultados obtenidos en las cinéticas enzimáticas de las células CA-77 apuntan a que la PPII* ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de la PPII, ya que tanto en las células transfectadas con PPII* como en las estimuladas con T3 y transfectadas con PPII*, siempre se observó una liberación menor de β -Naftilamida respecto a las células no transfectadas y a las tratadas con T3, respectivamente.

Resultaría interesante saber si la PPII* funciona como una dominante negativa en un contexto en el que se encuentre estimulada la actividad de la PPII. Una primera aproximación podría ser evaluar los niveles de actividad en células tratadas con diferentes factores tróficos. Lo anterior parte de los resultados que obtuvimos al evaluar la expresión de los mRNAs de la PPII^C y PPII* en RNA obtenido a partir células que habían sido mantenidas 1 DIV y 4 DIV. Dichos resultados sugieren que los niveles de expresión de los mRNAs de la PPII* y PPII^C se regulan en función de la concentración de factores de crecimiento, puesto que los niveles de expresión de los dos mRNAs son menores en las células mantenidas 4 DIV respecto a las que se mantuvieron solo 1 DIV. Ya que los factores de crecimiento son señales que regulan el *splicing* a través de regular la actividad de proteínas del *spliceosome* ⁽²³⁻²⁵⁾, resulta factible suponer que los tipos de factores tróficos y los niveles de expresión de estos pudieran regular el *splicing* de la PPII durante el desarrollo.

Por otro lado, el saber si la expresión de las otras isoformas de mRNA de la PPII se regula durante el desarrollo, si estas isoformas pueden traducirse en proteína, y el papel que desempeñan durante el desarrollo del SNC, resultaría de suma importancia para elucidar el mecanismo por el que se regula la actividad de la PPII durante el desarrollo, y proponer algún mecanismo a través del cual se regule la actividad de otras moléculas ^(18, 26, 52) cuya expresión se ve regulada por *splicing* alternativo.

Aunado a lo anterior, es evidente que elucidar las señales que regulan el *splicing* en el gen de la PPII nos aportaría conocimiento sobre las funciones adicionales, a la de degradar al TRH, que la PPII pudiera tener durante el desarrollo del SNC.

9. CONCLUSIONES

- ❖ Los mRNAs de la PPII^C y PPII* se regulan durante el desarrollo del SNC, mostrando aumentos significativos en los estadios E19 (PPII^C) y P21, 3M Y 5M (PPII^C y PPII*)
- ❖ La actividad enzimática de la PPII se regula durante el desarrollo del SNC, mostrando los niveles más altos en P0 y P7
- ❖ Los niveles de actividad enzimática más bajos se detectan cuando los niveles de expresión de PPII^C y PPII* son muy similares, y se observan aumentos en la actividad justo cuando los niveles de expresión de PPII^C tienden a ser mayores que los de la PPII*.
- ❖ En conjunto, nuestros resultados apuntan a que la PPII* funciona *in vivo* como una dominante negativa de la PPII^C, y que el balance en la expresión de las dos isoformas determina los niveles de actividad de la PPII durante el desarrollo del SNC de la rata.

10. PERSPECTIVAS

- ❖ Determinar por un método cuantitativo, como una PCR en tiempo real o un *Northern blot*, los niveles de expresión de los mRNAs de la PPII^C y PPII* en los estadios E14, E15, E19, P0, P7, 3M y 5M
- ❖ Repetir el experimento de sobreexpresión de la PPII* y tratamiento con T3 en las células CA-77, empleando un mayor número de células. Asimismo, probar los mismos tratamientos en la línea de neuroblastoma humano SK-N-MC, la cual expresa a los mRNAs PPII^C y PPII*⁽⁷⁷⁾, y actividad de PPII⁽⁷⁸⁾.
- ❖ Determinar si los factores tróficos regulan el *splicing* del pre-mRNA de la PPII en la línea celular CA-77, realizando un experimento en donde se empleen concentraciones distintas de FBS y se determinen los niveles de mRNAs de la PPII^C y PPII* por RT-PCR.

11. APÉNDICE

Buffer fosfatos (50 mM, pH 7.5)

Para preparar 1 L:

40 ml de Fosfato de sodio monobásico 0.2 M

210 ml de Fosfato de sodio dibásico 0.2 M

Aforar a 1L con agua estéril

12. REFERENCIAS

1. Cooper, G. 2004. The Cell: A molecular approach. 3a ed. *Sinauer Associates*
2. Latchman,D. 2001. Transcriptional gene regulation in Eukaryotes. *Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons.* 1-6.
3. Lodish,H., Berck,A., Zipursky,S., Matsudaira,P., Baltimore, D. & Darnell,J. 2000. Molecular Cell Biology. 4 ed. *W.H. Freeman and Company.*
4. Newbury,S.F. 2006. Control of mRNA stability in eukaryotes. *Biochemical Society Transactions.* 34 (parte 1): 30-34
5. Eissenberg, J. & Elgin, S. 2005. Heterochromatin and Euchromatin. *Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons.* 1-7
6. Thomas, M. & Chiang, Ch. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 41: 105-178
7. Hornby,D. 2002. DNA Methylation. *Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons.* 1-4
8. Hodges,A.K. 2005. Posttranscriptional processing. *Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons.* 1-5
9. Black, D. 2003. Mechanisms of alternative pre-mRNA *splicing.* *Annu.Rev.Biochem.* 72: 291-336
10. Matlin, A., Clark, F. & Smith,C. 2005. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature reviews molecular cell biology.* 386:398
11. Valcárcel,J. & Smith,C. 2001. Alternative Splicing: Cell-type specific and developmental control. *Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons.* 1-9
12. Kriventseva,E., Koch,I., Apweiler,R., Vingron,M., Bork,P., Gelfand,M. & Sunyaev,S. 2003. Increase of functional diversity by alternative splicing. *Trends in genetics.*19(3):124-128
13. Lipscombe, D. 2005. Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Current Opinion in Neurobiology.* 15: 358-363
14. Stetefeld, J. & Ruegg,M. 2005. Structural and functional diversity generated by alternative mRNA splicing. *Trends in Biochemical Sciences.* 30(9): 515-520
15. Amrani,N., Sachs,M. & Jacobson,A. 2006. Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nature reviews Molecular Cell biology.* 7: 415-425

16. Lejeune, F. & Maquat, L. 2005. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Current opinion in cell biology*. 17: 309-315
17. Venables, J. 2004. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Research*. 64: 7647-7465
18. Stasiv, Y., Kusin, B., Regulski, M., Tully, T. & Enikolopov, G. 2004. Regulation of multimers via truncated isoforms: a novel mechanism to control nitric-oxide signaling. *Genes & Development*. 18: 1812-1823
19. Zeng, Z., Sharpe, C., Simons, P. & Górecki, D. 2006. The expression and alternative splicing of alpha-neurexins during *Xenopus* development. *Int.J.Dev.Biol*. 50: 39-46
20. de Graff, E., Srinivas, S., Kilkenny, C., D'Agati, V., Mankoo, B., Constantini, F. & Pachnis, V. 2001. Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. *Genes & development*
21. Kalnina, Z., Zayakin, P., Silina, K. & Line, A. 2005. Alterations of pre-mRNA Splicing in Cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 42: 342-357.
22. Stam, S. 2002. Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome. *Human Molecular Genetics*. 11(20): 2409-2416
23. Shin, C. & Manley, J. 2004. Cell Signaling and the control of pre-mRNA splicing. *Nature reviews molecular cell biology*. 5: 727-738
24. Lopez, A.J. 1998. Alternative *splicing* of pre-mRNA: Developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu. Rev. Genet*. 32: 279-305
25. Cheng, C., Yaffe, M. & Sharp, P. 2006. A positive feedback loop couples Ras activation and CD44 alternative splicing. *Genes & Development*. 20: 1715-1720
26. Britanova, O., Lukyanov, S., Gruss, P. & Tarabykin, V. 2002. The mouse *Laf4* Gene: Exon/Intron organization, cDNA sequence, alternative splicing, and expression during Central Nervous System development. *Genomics*. 80 :31-37
27. Rowen, L., Young, J., Birditt, B., Kaur, A., Madan, A., Philipps, D., Qin, S., Minx, P., Wilson, R., Hood, L. & Graveley, B. 2002. Analysis of the Human Neurexin genes: Alternative Splicing and the generation of protein diversity. *Genomics*. 79 (4): 587-597

28. Vargas, M.A., Cisneros, M., Herrera, J., Joseph-Bravo, P., Charli, J.L. 1992. Regional distribution of pyroglutamyl peptidase II in rat brain, spinal cord and organs. *Peptides*. 13: 25
29. Schauder, B., Schomburg,L., Köhrle,J. & Bauer, K. 1994. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 9534-9538
30. Chavez-Gutierrez, L., Bourdais,J., Aranda, G., Vargas, M.A., Matta-Camacho, E., Ducancel, F., Segovia, L., Joseph-Bravo, P. & Charli, J. 2005. A truncated isoform of pyroglutamyl aminopeptidase II produced by exon extension has dominant-negative activity. *Journal of Neurochemistry*. 92: 807-817.
31. O'Leary,R. & O'Connor,B. 1995. Thyrotropin-Releasing Hormone. *Journal of Neurochemistry*. 65(3): 953-960
32. Stocca, G. & Nistri, A. 1995. Enhancement of NMDA receptor mediated synaptic potentials of rat hippocampal neurones in vitro by thyrotropin releasing hormone. *Neurosci. Lett.* 184: 9-12
33. Charli, J., Vargas, M.A., Cisneros, M., De Gortari, P., Baeza, M.A., Jasso, P., Bourdais, J., Pérez, L., Uribe, R.M. & Joseph-Bravo, P. 1998. TRH inactivation in the extracellular compartment: Role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology*. 6 (1):45-57
34. McKeon, U. & O'Connor, B. 1998. Mammalian pyroglutamyl-peptidase I. 796-797 en Barret, A.J., Rawlings, N.D. & Woessner,J.F (EDS). 1998. Handbook of Proteolytic Enzymes. *Academic Press*
35. Yoshimoto, T. & Ito, K. 1998. Prolyl oligopeptidase. 372-374 en Barret, A.J., Rawlings, N.D. & Woessner,J.F (EDS). 1998. Handbook of Proteolytic Enzymes. *Academic Press*
36. Charli, J.L., Mendez, M., Joseph-Bravo, P. & Wilk, S. 1987. Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not change the *in vitro* release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides*. 9(4):373-8
37. Mendez, M., Cruz, C., Joseph-Bravo,P., Wilk, S. & Charli, J.L. 1990. Evaluation of the role of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. *Neuropeptides*. 17(2): 55-62

38. Schmitmeier, S., Thole, H., Bader, A. & Bauer, K. 2002. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *Eur. J. Biochem.* 1278-1286
39. *MEROPS, The peptidase database.* URL: <http://merops.sanger.ac.uk>
40. Bauer, K. 1998. Pyroglutamyl-peptidase II. 1005-1007 en: Barret, A.J., Rawlings, N.D. & Woessner, J.F (EDS). 1998. Handbook of Proteolytic Enzymes. *Academic Press*
41. Wilk, S. 1986. Neuropeptide-specific peptidases: does brain contain a specific TRH degrading enzyme? *Life Sci* 39: 1487-1492
42. Heuer, H., Erchen, J., Bauer, K. & Schäfer, M. 1998. Region-specific expression of thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *European Journal of Neuroscience.* 10 : 1465-1478
43. Vargas, M.A., Mendez, M., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P. & Charli, J. 1987. Regional distribution of the membrane-bound pyroglutamate amino peptidase-degrading thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Neuroscience letters.* 79:311-314.
44. Charli, J., Cruz, C., Vargas, M. & Joseph-Bravo, P. 1988. The narrow specificity Pyroglutamate Aminopeptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochemistry International.* 13(2):237-242.
45. Heuer, H., Schäfer, M., O'Donnell, D., Walker, P. & Bauer, K. 2000. Expression of Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor 2 (TRH-R2) in the Central Nervous System of Rats. *The Journal of Comparative Neurology.* 428: 319-336
46. Joseph-Bravo, P., Fresán, M.E. Cisneros, M., Vargas, M.A. & Charli, J.L. 1994. Pyroglutamyl peptidase II activity is not in the processes of bulbospinal TRHergic neurons. *Neuroscience Letters.* 178: 243-246
47. Charli, J., Méndez, M., Vargas, M.A., Cisneros, M., Assai, M., Joseph-Bravo, P., Wilk, S. 1989. Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides.* 14: 191-196
48. Bauer, K. 1994. Purification and characterization of the thyrotropin releasing hormone degrading ectoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 224: 387-396
49. Papadopoulos, T., Heuer, H. & Bauer, K. 2000. Analysis of the thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme by site-directed mutagenesis of cysteine residues. Cys68 is involved in disulfide-linked dimerization. *Eur. J. Biochem.* 267: 2617-2623

50. Chávez- Gutierrez, datos no publicados
51. Ensembl. URL: <http://www.ensembl.org>
52. Bauer, K. 1987. Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature*. 330 (26): 375-377
53. Bauer, K.. 1988. Degradation and biological inactivation of thyrotropin-releasing hormone (TRH). Regulation of the membrane bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie (Paris)*. 70: 69-74
54. Bauer, K., Carmeliet, P., Schulz, M., Baes, M. & Deneef, C. 1990. Regulation and Cellular localization of the membrane-bound Thyrotropin-Releasing Hormone-Degrading Enzyme in Primary Cultures of Neuronal, Glial and Adenohypophyseal Cells. *Endocrinology*. 127(3): 1224-1233
55. Ponce, G., Charli, J.L., Pasten, J., Aceves, C. & Joseph-Bravo, P. 1988. Tissue-specific regulation of Pyroglutamate Aminopeptidase II activity by Thyroid hormones. *Neuroendocrinology*. 48: 211-213
56. Schomburg, L. & Bauer, K. 1995. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the Thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-Degrading ectoenzyme. *Endocrinology*. 136 (8): 3480-3485
57. Vargas, M.A., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P., & Charli, J.L. 2000. Regulation of the adenohypophyseal pyroglutamyl peptidase II activity by TRH and phorbol esters. Dependence on the 3,3',5',-triiodothyronine and gender. *Endocrine*. 13: 267
58. Uribe, R.M., Joseph-Bravo, P., Pasten, J., Ponce, G., Méndez, M., Covarrubias, L. & Charli, J.L. 1991. Some events of TRH metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology*. 54: 493-498
59. Vargas, M.A., Uribe, R.M., Cisneros, M., Romero, F., González, S., Joseph-Bravo, P. & Charli, J.L. 2002. Thyrotropin-releasing hormone regulates the diurnal variation of pyroglutamyl aminopeptidase II activity in the male rat adenohypophysis. *European Journal of Endocrinology*. 147: 363-369
60. Vargas, M.A., Joseph-Bravo, P. & Charli, J. 1994. Thyrotropin –Releasing Hormone downregulates Pyroglutamyl Aminopeptidase II activity in adenohypophyseal cells. *Neuroendocrinology*. 60: 323-330

61. de Gortari,P., Romero, F., Cisneros, M. & Joseph-Bravo, P. 2005. Acute administration of alcohol modulates pyroglutamyl peptidase II activity and mRNA levels in rat limbic regions. *Neurochemistry International*. 46: 347-356
62. de Gortari,P., Uribe,R.M., García-Vázquez,A., Aguilar-Valles,A., Martínez,A., Valdés,A., Charli,J.L., Fernández-Guardiola,A. & Joseph-Bravo, P. 2006. Amígdala kindling differentially regulates the expresión of the elements involved in TRH transmisión. *Neurochemistry International*. 48: 31-42
63. Vargas, M.A., Herrera, J., Uribe, R.M., Charli, J. & Joseph-Bravo, P. 1992. Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohipofisis and pancreas. *Developmental Brain Research*. 66: 251-256.
64. Chomczynski,P. & Sacchi,N. 1987. Single-Step Method of RNA isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. 162: 156-159.
65. Pérez Martínez,L., Charli, J. & Joseph-Bravo,P. 2001. Development of pro-TRH gene expression in primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Developmental Brain Research*. 130: 73-81
66. Muller,Y.L., Reitstetter,R. & Yool, A.J. 1998. Regulation of Ca²⁺ dependent K⁺ channel expression in rat cerebellum during postnatal development. *Journal of Neuroscience*. 18: 16-25
67. Primer 3. URL: http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
68. National Center for Biotechnology Information. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
69. Lowry, O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. & Randall,R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Bio.Chem*. 193:265-275
70. Bourdais,J., Romero,F., Uriostegui,B., Cisneros,M., Joseph-Bravo,P. & Charli, J.L. 2000. [3-Me-His²]-TRH combined with dopamine withdrawal rapidly and transiently increases pyroglutamyl aminopeptidase II activity in primary cultures of adenohipofyseal cells. *Neuropeptides*. 34(2): 83-88
71. Pérez-Martínez Pérez-Martínez, L. & Jaworski, D. 2005. Tissue inhibitor of Metalloproteinase-2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal. *The Journal of Neuroscience*. 25(20): 4917-4929

72. Sevarino, K.A., Wu, P., Jackson, I.M., Roos, B.A., Mandel, G. & Goodman, R.H. 1988. Biosynthesis of thyrotropin releasing hormone by a rat medullary thyroid carcinoma line. *J. Biol. Chem.* 263: 620-623
73. Surdej, P. & Jacobs-Lorena, M. 1998. Developmental regulation of bicoid mRNA stability is mediated by the first 43 nucleotides of the 3' Untranslated region. *Molecular and Cellular Biology.* 18(5):2892-2900
74. Bashirullah, A., Cooperstock, R. & Lipshitz, H. 2001. Spatial and temporal control of RNA stability. *Proceedures of the National Academy of Sciences.* 98(13): 7025-7028
75. Albiston, A., Ye, S. & Chai, A. 2004. Membrane bound members of the M1 family: more than Aminopeptidases. *Protein and Peptide Letters. Bentham Science Publishers.* 11(5): 491-500
76. Sánchez-Morán, E., Jones, G.H., Franklin, C. & Santos, J.L. 2004. A Puromycin-Sensitive Aminopeptidase is essential for meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell.* 16: 2895-2909
77. Juárez-Contreras, K.E., datos no publicados
78. Chavéz-Gutierrez, L., datos no publicados