



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**PAPEL DE UNA ISOFORMA TRUNCADA DE LA
PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II EN UN CONTEXTO
NEURONAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

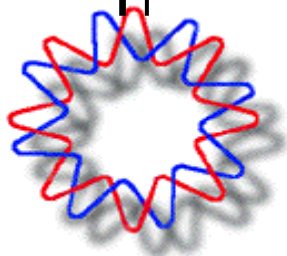
PRESENTA:

BIOL. KARLA ELISA JUÁREZ CONTRERAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LEONOR PÉREZ-MARTÍNEZ

2010





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 cada una de las personas que desde la
tierra o desde el cielo me apoyaron de todas las maneras
posibles a continuar en el camino de la ciencia.*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por que gracias a todo lo que me ha brindado como estudiante y como persona, hoy he culminado el siguiente paso en el camino hacia dedicarme a la ciencia.

A la Dra. Leonor Pérez, por compartir conmigo las ganas de descubrir a la PPII y aceptar seguir el camino a descubrirla. Por dedicarme su tiempo y su infinita paciencia para enseñarme y corregirme en hacer, hablar y escribir ciencia, contribuyendo de sobremanera en mi formación como científica.

Al Dr. Jean-Louis Charli, por estar siempre atento a cada uno de los pasos de este proyecto, por el gran apoyo y la atención recibida durante mi estancia en su grupo de trabajo, y por haberme contagiado las ganas de descubrir a la PPII.

A la Dra. Leonor Pérez, la Dra. Lourdes Massieu, la Dra. Cecilia Montañez, el Dr. José Luis Reyes, el Dr. Ignacio López y el Dr. Jean-Louis Charli, por todo el tiempo que dedicaron a corregir esta tesis, y por las sugerencias brindadas.

Al CONACYT, por haberme brindado una beca que me permitió realizar mis estudios de maestría.

A todo el personal que labora en el Instituto de Biotecnología, porque gracias al espacio, los aparatos, los reactivos, los protocolos, las enzimas, los anticuerpos, las proteínas, células, medios, *buffers* y centrifugas, pude realizar este proyecto.

A el M. en C. Carlos Pérez M., el Biol. Iván Lazcano, el Biol. Alan Jiménez, la Biol. Candy Ramírez, la Quim. Fidelia Romero, la Dra. Rosa Uribe, la M. en C. Miriam Martínez, el Dr. Miguel Vargas, el Quim. Miguel Cisneros, la Dra. Antonieta Coté, la Dra. Carmen Beltrán y el Dr. Gustavo Pedraza, por haberme dedicado parte de su tiempo en responder mis dudas, en enseñarme, en corregirme, en sugerirme, en proporcionarme reactivos y protocolos, y ayudarme a realizar experimentos que resultaron fundamentales para este proyecto.

A Sergio González, Rubén Blancas y al personal del bioterio, por el cuidado a las ratas que se requirieron para llevar a cabo este proyecto.

A Manuel Villa, Elena Martell y Miguel Olvera, por todo el apoyo administrativo y personal recibido durante mi estancia en el grupo.

A los chicos del Instituto de Biotecnología: Candy, Iván, Alan, Francia, Anabel, Luis Medina, Carlos P. Monter, Ana Tusie, Ana Isabel, Miriam, Erick, Adrián y Sol, porque de alguna u otra manera, sus preguntas, sus comentarios, sus críticas, haber escuchado cada uno de los resultados del proyecto, haberme permitido enseñarles, y compartir conmigo sus experiencias en el camino de volvernos científicos, contribuyeron de manera enorme en que me diera cuenta que el camino de la ciencia es en el que quiero continuar.

A los queridos amigos de Cuernavaca: Alan, Candy, Iván, Francia, Luis Medina, Ana Tusie, Ana Isabel, Anabel, Carol, Miguel Cardoso, Carlos P. Monter, Jorge y Elisa por compartir conmigo su tiempo, su espacio, su comida, sus experiencias, sus abrazos, sus conocimientos y sus sueños. Los días en Cuernavaca fueron mejores gracias a ustedes.

A mi hermosa familia de Cuernavaca: Alan, Candy, Ivan, Francia y Luis Medina. Sin sus abrazos, sus regaños, sus consejos, el tiempo que dedicaron escuchándome y todo el apoyo que me brindaron siempre, hubiera sido muy difícil ver la luz al final de este camino.

A mis muy entrañables amigos que viven en el DF : Janet, Guadalupe Velazquez, H. Adriana, Claudia Velazquez, Miguel H. Alva y Oliver, por ser mis cuates y tenerme presente en sus planes y pensamientos. Sus consejos y sus abrazos, ayudaron enormemente a querer culminar este paso.

A mis hermanos Armando y Cynthia, porque de alguna manera, su pasión por la música y compartir con ustedes las ganas de hacer cosas importantes durante nuestro paso por este planeta, me inspiran y me ayudan a darme cuenta que no es una locura tener sueños y apasionarse por ellos.

A mis padres, por supuesto, porque gracias a su apoyo incondicional, a sus enseñanzas, a el haberme hecho una persona perseverante e independiente, y al haberme empujado a no desistir nunca de mis sueños, hoy termino ya un paso más en el camino de volverme científica.

A mis tíos Araceli, Arturo, Carlos, Dora, Raúl, Carmen, Manuel, Valentina y Jesús, por estar pendientes de mi y de mis estudios, por su apoyo, su cariño y por sus consejos.

A mi abuelita Gloria y a la fuerza interna, porque día a día me impulsan a abrir los ojos, a levantarme y a continuar por este camino sin perder ni una pizca de la persona que soy.

INDICE

1.	ABREVIATURAS	1
2.	PALABRAS CLAVE	1
3.	NOTA IMPORTANTE PARA EL LECTOR	1
4.	RESUMEN	2
5.	INTRODUCCIÓN	
4.1	La regulación de la expresión génica en el Sistema Nervioso Central.....	4
4.2	El <i>splicing</i> como mecanismo de regulación de la expresión génica en el SNC.....	6
4.3	El <i>splicing</i> canónico o <i>bona fide</i>	7
4.4	Secuencias y proteínas auxiliares del <i>splicing</i>	9
4.5	El <i>splicing</i> alternativo.....	9
4.6	Regulación del <i>splicing</i> alternativo.....	10
4.7	Papel de las isoformas de mRNA originadas por <i>splicing</i> alternativo.....	11
4.8	Las proteínas dominantes negativas.....	12
6.	ANTECEDENTES	
5.1	El gen de la Piroglutamil Peptidasa II: Un gen con múltiples mRNAs.....	15
5.2	La hormona liberadora de tirotropina.....	15
5.3	La actividad enzimática de la Piroglutamil Peptidasa II completa.....	17
5.4	Estructura de la Piroglutamil Peptidasa II completa.....	19
5.5	Distribución de la actividad enzimática.....	20
5.6	Regulación de la actividad enzimática.....	21
5.7	La Piroglutamil Peptidasa II truncada.....	23
5.8	Estructura de la Piroglutamil Peptidasa II truncada.....	23
5.9	La PPII* como dominante negativa de la PPII ^C : antecedentes en cultivo.....	24
5.10	La PPII* como dominante negativa de la PPII ^C : antecedentes <i>in vivo</i>	26
7.	HIPÓTESIS	28
8.	OBJETIVOS	28
9.	JUSTIFICACIÓN	29
10.	MATERIAL Y MÉTODOS	
10.1	Cultivo de las células SK-N-MC.....	30

10.2	Pase de la línea células SK-N-MC.....	30
10.3	Criopreservación de la línea celular SK-N-MC.....	31
10.4	Decongelación de la línea celular SK-N-MC.....	31
10.5	Sobreexpresión de la PPII* en la línea celular SK-N-MC.....	32
10.6	Cosecha de células.....	33
10.7	Evaluación de la eficiencia de transfección en las células.....	33
10.8	Producción de los vectores para transfectar a las células SK-N-MC.....	34
10.9	Criopreservación de las bacterias transformadas con plásmidos.....	35
10.11	Cultivo primario de células hipotalámicas fetales de rata.....	35
10.12	Cultivos de células hipotalámicas mantenidas de 1 a 8 días.....	37
10.13	Ensayos de interferencia con siRNAs en cultivos primarios hipotalámicos.....	38
10.14	Ensayos de interferencia con siRNAs en cerebros de ratas.....	41
10.15	Visualización de la fluoresceína en los cerebros de ratas.....	43
10.16	Disección de regiones de cerebros de ratas.....	43
10.17	Extracción de RNA total.....	43
10.18	Electroforesis desnaturizante para RNA.....	44
10.19	Transcripción reversa.....	45
10.20	Reacción en cadena de la polimerasa.....	45
10.21	Electroforesis para productos de PCR.....	47
10.22	Obtención de membranas celulares.....	48
10.23	Ensayo para cuantificar proteína.....	49
10.24	Ensayo enzimático para la Piroglutamil Peptidasa II	49
10.25	<i>Western blot</i> para detectar histidinas.....	51
11.	RESULTADOS	52
12.	DISCUSIÓN	63
13.	RESUMEN DE RESULTADOS	68
14.	CONCLUSIONES	69
15.	PERSPECTIVAS	70
16.	APÉNDICE	71
17.	REFERENCIAS	78

A. INDICE DE FIGURAS

1. La formación de otros mRNAs por <i>splicing</i> alternativo modula la cantidad de proteína funcional que se forma dentro de la célula	7
2. La maquinaria molecular y el proceso de <i>splicing</i>	8
3. Origen y estructuras de la PPII completa y la PPII truncada.....	18
4. La PPII* carece de actividad enzimática frente a TRH e inhibe la actividad hidrolítica de la PPII ^C frente al TRH de manera dosis dependiente.....	25
5. El cociente de mRNAs PPII*/PPII ^C es mayor en órganos con baja actividad de PPII, y es menor en estadios de desarrollo con alta actividad de PPII.....	27
6. Disección de hipotálamos de embriones de 17 días de gestación de rata.....	36
7. siRNAs diseñados para interferir la expresión de la PPII* en la rata.....	37
8. Ensayo enzimático para la PPII	49
9. Determinación de las condiciones para amplificar a los mRNAs de las PPII ^C y PPII* humanas.....	53
10. Determinación de las condiciones para amplificar al mRNA de la G3PDH humana.....	54
11. Las células SK-N-MC son un sistema ideal para sobreexpresar a la PPII*.....	54
12. La sobreexpresión de la PPII* disminuye la actividad de la PPII en las células SK-N-MC.....	55
13. La expresión del mRNA de PPII* correlaciona de manera negativa con los cambios en la actividad de la PPII en el cultivo hipotalámico.....	56
14. La transfección de siRNAs contra la PPII* a 1280 nM empleando Amaxa provoca la disminución de la expresión del mRNA de la PPII*, pero también la pérdida de la actividad de PPII.....	58
15. La expresión del mRNA de la PPII* disminuyó al transfectar al siRNA A con PEI, mas no al transfectar al siRNA B.....	59
16. La transfección del siRNA PPII*A tiende a disminuir la expresión del mRNA de la PPII* y a aumentar la actividad de la PPII.....	61
17. La transfección del siRNA PPII*A intracerebroventricularmente, tiende a incrementar la actividad de la PPII en el Septum y el Hipocampo anterior, mas no en el Hipocampo posterior.....	62

1. ABREVIATURAS COMUNES

TRH: hormona liberadora de tirotrópina
PPII: Piroglutamil Peptidasa II
PPII^C: Piroglutamil Peptidasa II completa
PPII*: Piroglutamil Peptidasa II truncada
SNC: sistema nervioso central
TRH-βNA: TRH-βnaftilamida
βNA: βnaftilamida
GFP: proteína verde fluorescente
DAP IV: dipeptidil aminopeptidasa IV
siRNA: RNA de interferencia pequeño
NT siRNA: *non targeting* siRNA

2. PALABRAS CLAVE

Dominante negativa
Splicing alternativo
Peptidasa
Heterodimerización
siRNA
Sobreexpresión
in vivo

3. NOTA IMPORTANTE PARA EL LECTOR

El gen de la Piroglutamil Peptidasa II presenta múltiples isoformas de mRNA de las cuales únicamente dos han sido clonadas: la forma completa (PPII^C) y la forma truncada (PPII*). Des estas dos formas, sólo la PPII^C presenta actividad hidrolítica frente al TRH (su único sustrato biológico). Ya que esta actividad podrían presentarla otras isoformas de la PPII, a esta actividad se le denomina de manera generalizada actividad específica de PPII.

4. RESUMEN

El gen de la piroglutamil peptidasa II (PPII) en la rata está organizado en 19 exones y 18 intrones. A través de ensayos de *Northern blot* se ha demostrado que este gen es transcrito en múltiples mRNAs, de los cuales, dos han sido clonados. Uno de ellos presenta a los 19 exones, y se traduce en una proteína de 145 kDa (PPII completa; PPII^C). Esta proteína actúa como una metalopeptidasa dependiente de zinc, cuya función se restringe a la inactivación de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH; pGlu-His-Pro-NH₂), la cual se ha descrito como su único sustrato biológico. A esta actividad enzimática se le denomina de manera general actividad de PPII, y a la fecha, la PPII^C es la única isoforma que se sabe con esta actividad. El otro mRNA clonado presenta a los 19 exones más un segmento adicional de 87 nucleótidos insertado entre los exones 14 y 15. Este segmento corresponde al intrón 14, por lo que se ha propuesto que este mRNA se origina por *splicing* alternativo. La inserción de este segmento de intrón en el mRNA hace que la traducción de la proteína se detenga de manera prematura, dando lugar a una proteína truncada hacia el carboxilo terminal (117 kDa), denominada PPII truncada (PPII^{*}). La PPII^{*} es incapaz de inactivar al TRH, e inhibe la actividad de la PPII^C de manera dependiente de dosis en ensayos de cotransfección en células C6 y COS-7. Ensayos de *Western blot* muestran que en lisados de células COS-7 en las que se sobre-expresó a ambas isoformas, se detecta una banda que corresponde al tamaño intermedio para homodímeros PPII^C-PPII^C y PPII^{*}-PPII^{*}. Por lo anterior, se ha propuesto que la PPII^{*} inhibe la actividad de la PPII^C como una dominante negativa a través de la formación de heterodímeros no funcionales PPII^C-PPII^{*}. Concordante con lo observado en cultivo, se observó que en tejidos con baja actividad de PPII, hay una mayor expresión del mRNA de la PPII^{*} que el de la PPII^C. Asimismo, observamos que durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central, la actividad de la PPII aumenta cuando el mRNA de la PPII^{*} se expresa en niveles menores que el de la PPII^C (día embrionario 19- día del nacimiento). En conjunto, estos datos concuerdan con la hipótesis de que la PPII^{*} actúa como dominante negativa de la PPII^C, y apoyan a una posible función *in vivo*. Sin embargo, a la fecha no se ha realizado una demostración contundente de ello.

El presente trabajo se centró en dos ensayos encaminados a demostrar el papel de dominante negativa de la PPII^{*}: la sobreexpresión y la disminución de la expresión (siRNAs) de la PPII^{*}. Para esto utilizamos dos tipos de células que expresan a los dos mRNAs y a la actividad de la PPII. En un primer contexto neuronal, que fue la línea de neuroepiteloma SK-N-MC, logramos disminuir la actividad de la PPII al sobreexpresar a la PPII^{*}, demostrando que la expresión de la PPII^{*} es capaz de regular negativamente la actividad endógena de la PPII.

Como segundo contexto neuronal, escogimos al cultivo primario hipotalámico fetal de rata, en el que realizamos cinéticas de 1 a 8 días en cultivo, y ensayos de interferencia de RNA. De manera

sumamente interesante, en las cinéticas de cultivo reproducimos lo que previamente habíamos observado durante el desarrollo del SNC: que los niveles de actividad mas altos de PPII se detectan cuando los niveles de expresión de PPII* son mas bajos que los de la PPII^C, apuntando a una posible regulación de la actividad de la PPII determinada por el balance en la expresión entre la PPII^C y PPII*. En los ensayos de interferencia de RNA contra la PPII*, las limitaciones técnicas que tuvimos para transfectar eficientemente a las células primarias hipotalámicas nos impidieron obtener resultados concluyentes. No obstante, con una eficiencia de transfección del 12% y una concentración de los siRNAs de 33 nM, logramos observar que el mRNA de la PPII* tiende a disminuir, y la actividad de la PPII tiende a aumentar.

Ya que el objetivo central de este proyecto en nuestro grupo es demostrar la funcionalidad de la PPII* como dominante negativa de la PPII^C *in vivo*, realizamos ensayos de RNA de interferencia en cerebro de rata. Sin embargo, por limitaciones técnicas que tuvimos para evaluar la eficiencia de transfección, no pudimos obtener resultados concluyentes. No obstante, con 25 pmolas de siRNAs inyectadas en el ventrículo derecho del cerebro de ratas adultas, logramos observar una tendencia de la actividad de la PPII a aumentar en el Hipocampo anterior y el Septum, zonas cercanas a la inyección, mas no en el Hipocampo posterior, una zona mas lejana a esta inyección.

En resumen, podemos concluir que nuestros datos apoyan el papel de la PPII* como dominante negativa de la PPII^C en un contexto neuronal. Sin embargo, las limitaciones técnicas para transfectar los siRNAs en neuronas de rata tendrán que ser superadas para obtener resultados concluyentes en los ensayos de RNA de interferencia.

Aunque lo encontrado en este estudio no es una demostración *in vivo* del papel de la PPII* como dominante negativa de la PPII^C, es un antecedente relevante para posteriores demostraciones *in vivo*, tales como la generación de un ratón transgénico en el que se sobreexpresa a la PPII* o uno en el que se encuentre apagada la expresión de ésta.

5. INTRODUCCIÓN

5.1 La regulación de la expresión génica en el Sistema Nervioso Central

La gran heterogeneidad molecular y celular que existe dentro del Sistema Nervioso Central (SNC) permite llevar a cabo las complejas y sofisticadas tareas que lo definen ⁽¹⁾. Entre las moléculas que participan en el funcionamiento del SNC se encuentran las proteínas, cuya formación no sólo depende de la activación de los genes que las codifican, sino también de las modificaciones a las que son sujetos los transcritos primarios de esos genes, y más aún, del extenso procesamiento al que son sujetas las proteínas antes de llegar a su destino final dentro de la célula ⁽²⁾. A la serie de mecanismos a la que es sujeta la expresión de un gen se le denomina regulación de la expresión génica, y si bien, los mecanismos que regulan esta expresión son comunes para muchos otros tipos celulares distintos a las neuronas, es en el SNC en donde por su complejidad, se llevan a cabo de manera más extensa ⁽²⁾.

El principal nivel de regulación en la expresión de un gen lo constituye el nivel transcripcional, en el cual se determina que gen será activado y en que magnitud se llevara a cabo dicha activación ⁽³⁾. Entre las moléculas que median este tipo de regulación se encuentran los factores de transcripción, los cuales son proteínas que se unen en secuencias específicas de los genes como las de las regiones promotoras (e.g., *TATA box* e *Inr* ⁽³⁾). Las secuencias promotoras marcan el lugar en donde se va a reclutar el complejo de inicio de la transcripción (e.g., TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIH y RNA polimerasa II ⁽⁴⁾), y de esta manera, en donde va a comenzar la transcripción del gen en RNA ⁽³⁾. Sin embargo, muchos genes, como los que se expresan en el SNC, presentan múltiples promotores ⁽⁵⁾ (e.g., NRSF ⁽⁶⁾). Lo anterior implica que dentro de un mismo gen pueden haber diferentes sitios de inicio de la transcripción, y por lo tanto, diferentes transcritos primarios (pre-mRNAs), que pueden diferir en la secuencia del marco abierto de lectura (ORF), o en la región no traducida en 5' (5'-UTR), lo cual potencialmente permite generar proteínas con propiedades distintas (e.g., isoformas de p53 ⁽⁷⁾) o generar mRNAs con traducibilidades distintas (e.g., mRNAs del receptor α folato ⁽⁸⁾), respectivamente.

Mientras que el DNA va siendo transcrito en pre-mRNA, este es sujeto a numerosos procesos que modificarán su secuencia, y/o su estabilidad ⁽⁹⁾. Ejemplos de estos procesos cotranscripcionales son: la adición de la cola de poli-Adeninas en el extremo 3' ⁽¹⁰⁾ y la adición del cap de 7-metilguanosina en el extremo 5' ⁽¹¹⁾, los cuales regulan la estabilidad del mRNA y su traducibilidad.

Así por ejemplo, la poliadenilación en el extremo 3' consiste en un corte cerca del extremo 3' entre una secuencia AAUAAA y una secuencia rica en GU, y la adición de hasta 250 adeninas al nuevo extremo por la poli-A-polimerasa ⁽¹⁰⁾. Esta señal promueve la terminación de la transcripción mediada por la RNA polimerasa II ⁽¹²⁾, el transporte del núcleo hacia el citoplasma ⁽¹³⁾, y confiere estabilidad al mRNA contra degradación por nucleasas ⁽¹⁰⁾. Además de ello, existen genes con múltiples señales de poliadenilación que son usadas dependiendo del contexto celular ⁽¹⁴⁾, y de manera interesante, se presentan con mayor frecuencia en genes que se expresan en el SNC ⁽¹⁵⁾. La relevancia de tener múltiples señales radica en que pueden generarse múltiples mRNAs con distinta traducibilidad, lo cual resulta determinante en la concentración final de proteínas dentro de la célula.

Por otra parte, está la edición del RNA, la cual consiste en un cambio de una base por otra (e.g., deaminación de Citosina para convertirla en Uridina, o deaminación de Adenina para convertirla en Inosina ⁽¹⁶⁾), o bien, la eliminación ⁽¹⁷⁾ o inserción ⁽¹⁸⁾ de nucleótidos. Esta modificación ocurre con frecuencia en mRNAs del SNC ⁽¹⁹⁾, y su relevancia radica en que al modificar la secuencia, puede provocar cambios en el patrón de *splicing* ⁽²⁰⁾ y/o el marco abierto de lectura y por lo tanto, cambiar los sitios de inicio y término de la traducción, así como también los aminoácidos que serán traducidos a partir del mRNA ⁽²¹⁾ generando proteínas con propiedades distintas (e.g., receptores de kainato con distinta afinidad por calcio) ⁽²²⁾.

Otro proceso es el *splicing*, el cual se lleva a cabo de manera cotranscripcional en el núcleo por el *spliceosome*, un conjunto de proteínas y snRNAs (RNAs nucleares pequeños) que catalizan la remoción de intrones (*splicing* canónico) o la remoción de segmentos de intrones, exones o segmentos de exones (*splicing* alternativo), dando lugar a mRNAs con secuencias distintas ⁽²³⁾. Este proceso se discutirá a mayor detalle mas adelante; sin embargo, resulta importante destacar que por su potencialidad de generar múltiples mRNAs que pueden traducirse en múltiples proteínas,

tiene un gran peso en la generación de la diversidad proteica que se requiere para la formación y funcionamiento del SNC, que es en donde se lleva a cabo con mayor frecuencia ⁽²⁴⁾.

Posteriormente, sí el mRNA es lo suficientemente estable para ser exportado hacia el citoplasma y traducirse en proteína, la proteína pasa por modificaciones post-traduccionales ⁽²⁵⁾ que influyen en su estabilidad (e.g., N-glicosilaciones ⁽²⁶⁾), localización (e.g., O-glicosilaciones ⁽²⁶⁾) y actividad (e.g., fosforilaciones ⁽²⁷⁾ y glicosilaciones ⁽²⁸⁾). Ya que las proteínas pueden ser sujetas a una o varias modificaciones en múltiples sitios, la variedad de proteínas producidas a partir de un mismo gen se expande exponencialmente ⁽²⁹⁾, y ello, dentro del SNC, tiene un papel fundamental en la generación de la gran cantidad de proteínas que se requieren para llevar a cabo y modular sus funciones ⁽²⁾.

5.2 El *splicing* como mecanismo de regulación de la expresión génica en el SNC

De los mecanismos anteriormente descritos, un proceso de sumo interés e importancia dentro del SNC es el *splicing*. Ésto, ya que cuando se lleva a cabo de manera alternativa, permite generar múltiples mRNAs que varían en secuencia y estabilidad, y que pueden o no ser traducidos en proteínas. Al traducirse esos mRNAs, diversifican los tipos de proteínas que pueden formarse a partir de un solo gen ⁽³⁰⁾, y ello, dentro del SNC es relevante pues contribuye de manera amplia a la generación de la gran diversidad proteica que se requiere para su funcionamiento ⁽²⁴⁾. Como ejemplos ampliamente documentados de genes que generan una gran diversidad de proteínas por *splicing* alternativo, están las múltiples isoformas de neurexinas ⁽³¹⁾ o de la sintasas de óxido nítrico ⁽³²⁾. Más adelante se ampliarán estos ejemplos.

Cabe destacar en este punto que este proceso resulta determinante en los niveles finales de una proteína *funcional* dentro de la célula, puesto que al recurrir al *splicing* alternativo se generan otros mRNAs que aún cuando no se traduzcan, pudieran competir con el mRNA que genera la proteína *funcional* por emplear la maquinaria de *splicing* ⁽³³⁾, modulando de manera indirecta la cantidad de proteína *funcional* que podría haberse traducido si se hubiera formado un solo mRNA (Figura 1).

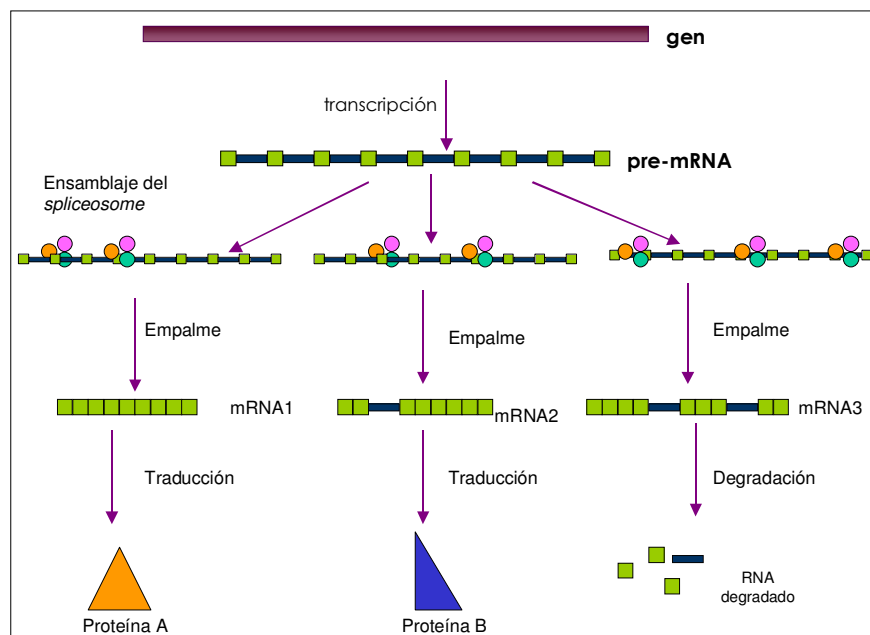


Figura 1. La formación de otros mRNAs por *splicing* alternativo modula la cantidad de proteína funcional que se forma dentro de la célula. A través del *splicing* alternativo, pueden formarse otros mRNAs distintos al que solo presenta los exones empalmados (mRNA1) que pueden presentar exones y/o intrones empalmados (mRNAs 2 y 3). Los mRNAs originados pueden traducirse en proteínas distintas a la proteína *funcional* o ser blanco de degradación. En cualquiera de los casos, la formación de los mRNAs 2 y 3 modula de manera indirecta la cantidad de proteína *funcional* que hay dentro de la célula, pues compiten con el mRNA1 por emplear la maquinaria del *spliceosome*.

5.3 El *splicing* canónico o *bona fide*

El *splicing* canónico consiste en la remoción de intrones y la ligación de exones, para dar lugar a un mRNA en el que sólo se hallan empalmados los exones ⁽²³⁾. El proceso se lleva a cabo por ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) y proteínas accesorias del *spliceosome* (SF1 y las subunidades de 35 kDA y 65 kDA de U2AF), las cuales reconocen los límites exón-intrón, y catalizan dos reacciones secuenciales de trans-esterificación que remueven intrones y ligan exones (Figura 2) ⁽²³⁾. Para ello, se requieren de elementos exónicos e intrónicos en *cis* que promuevan la identificación correcta de los límites exón-intrón, como el punto de ramificación y el *track* de polipirimidinas (Figura 2A) ⁽²³⁾, así como también, secuencias en los límites de los intrones. En el 95-99% de los casos, las secuencias que promueven la escisión de un intrón son GU en 5' (al inicio del intrón) y AG en 3' (al final del intrón) ⁽³⁴⁾.

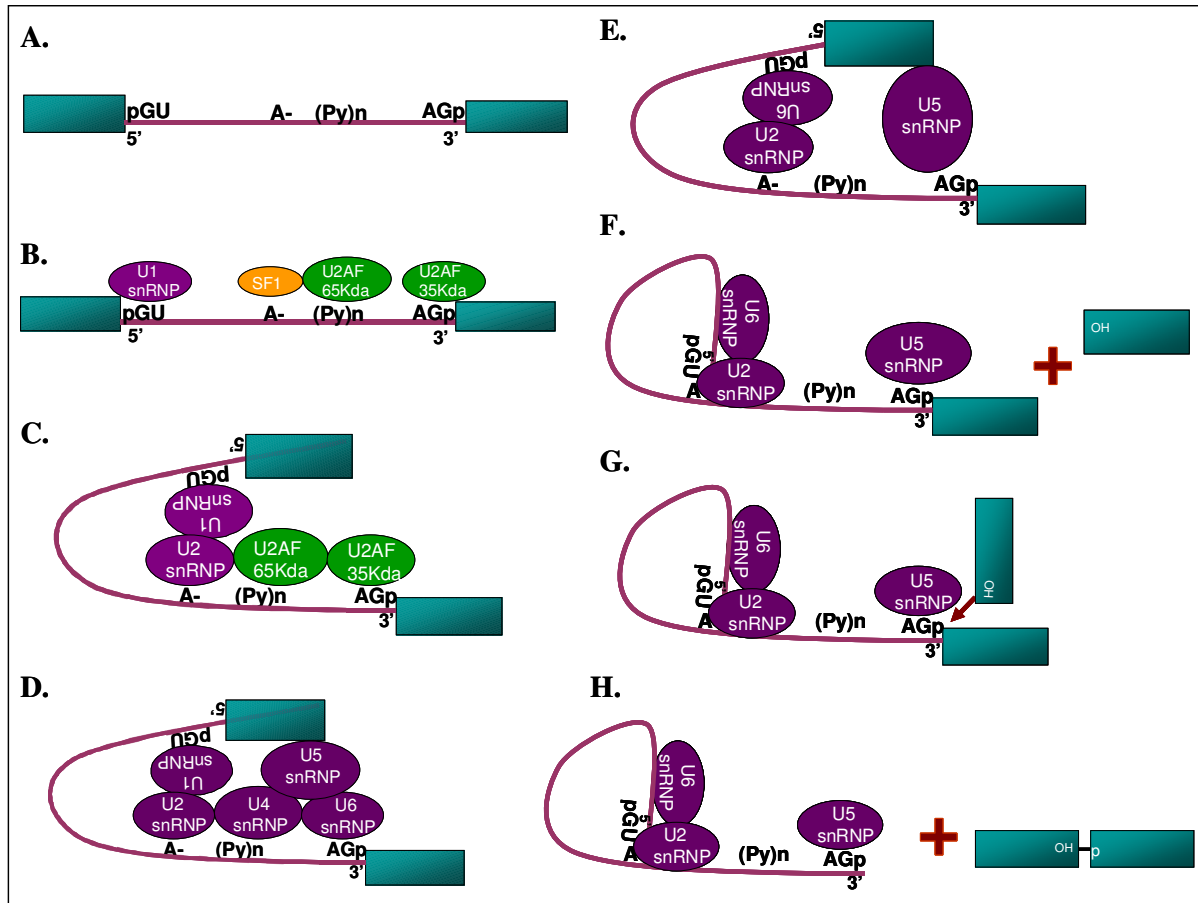


Figura 2. La maquinaria molecular y el proceso de *splicing*¹. **A.** Los elementos intrónicos que definen la escisión de un intrón y la ligación de dos exones son GU en el extremo 5' (pGU), el punto de ramificación (A), el *track* de polipirimidinas ((Py)n) y AG en el extremo 3' (AGp) **B.** Formación del complejo E: temprano o de compromiso. Las subunidades de 35 y 65 kDa de U2AF, U1 snRNP y SF1 se unen en los elementos de reconocimiento en el intrón descritos en A. **C.** Formación del complejo A o posterior. A través de interacciones RNA-RNA, U2snRNP sustituye a SF1 en el punto de ramificación, y a través de interacciones proteína-proteína con U1snRNP, facilita el acercamiento del punto de ramificación con el extremo 5' del intrón. **D.** Formación del complejo B. Las snRNPs U4, U5 y U6 se unen al complejo, desplazando a las subunidades de U2AF. **E.** Formación del complejo C o catalítico. La snRNP U6 sustituye a U1 snRNP en el extremo 5' del intrón, y la U4 snRNP se pierde del complejo. **F.** El complejo C cataliza la primera reacción de transesterificación, la cual consiste en el ataque de los nucleótidos GU en el extremo 5' del intrón en una adenina del punto de ramificación, dando lugar al desplazamiento del exón que estaba unido a la GU, ahora con un extremo OH reactivo y a la formación de la estructura de *lariat* en el intrón. **G.** La segunda reacción de transesterificación es catalizada por el complejo C. Esta reacción inicia con el ataque del extremo OH reactivo del exón desplazado al AG del intrón. **H.** La segunda reacción de transesterificación da lugar a la unión de los dos exones y a la liberación del intrón, aún en forma de *lariat*.

¹ La Figura de esta página está basada en el proceso de *splicing* descrito en Black, D. 2003. Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. *Annual Reviews of Biochemistry*. 72: 291-336 y Kalnina, Z., Zayakin, P., Silina, K. & Line, A. 2005. Alterations of pre-mRNA splicing in Cancer. *Genes, chromosomes and cancer*. 42: 342-357.

5.4 Secuencias y proteínas auxiliares del *splicing*

Además de las proteínas del *spliceosome* y de las secuencias de reconocimiento en los límites intrón-exón, existen otras secuencias intrónicas y exónicas que reclutan a proteínas auxiliares que estimulan o estabilizan el ensamblaje del *spliceosome* y promueven la remoción de intrones (*Enhancers* del *splicing* de exones; ESEs, Silenciadores del *splicing* de intrones; ISSs), o bien, que inhiben dicho ensamblaje y promueven el reconocimiento de sitios alternativos de *splicing* (Silenciadores del *splicing* de exones; ESSs, *Enhancers* del *splicing* de intrones; ISEs) ⁽³⁵⁾. La participación de todos esos factores es esencial para determinar el patrón de *splicing* final para un mRNA determinado.

Entre las proteínas más comunes que se unen a ESEs, están las SR. Estas proteínas presentan uno o dos dominios de unión a RNA (RRM; motivos de reconocimiento a RNA) y un dominio RS en el C-terminal, enriquecidos de serinas y argininas ⁽³⁵⁾, los cuales, dependiendo de su estado de fosforilación, regulan la actividad de las proteínas SR. Una de las maneras en la que estimulan el *splicing* de exones es que fortalecen la unión de U2AF al extremo 3' del intrón, y evitan que moléculas represoras del *splicing* se unan a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de *splicing* ⁽³⁶⁾. Por otro lado, entre las proteínas más comunes que se unen a ESSs están las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs) ⁽³⁵⁾. La más estudiada es la A1 hnRNP, la cual contiene dos dominios RNP-cs de unión a RNA y un dominio auxiliar rico en glicinas. Una de las maneras en que inhibe el *splicing*, es que al unirse a ESSs evita que las proteínas SR se unan o bien, interfiere directamente con el ensamblaje del *spliceosome* ⁽³⁷⁾.

Otra proteína sumamente estudiada es la Proteína de Unión al *Track* de Polipirimidinas (PTB o hnRNP 1) la cual, como su nombre indica, se une al *track* de polipirimidina de los intrones, y reprime la escisión de intrones ⁽³⁵⁾. Una de las maneras en que lleva a cabo esa represión es compitiendo con U2AF por la unión al *track* de polipirimidinas ⁽³⁸⁾.

5.5 El *splicing* alternativo

Muchos pre-mRNAs no solo maduran en mRNAs con los exones empalmados (*splicing* canónico), sino que también pueden madurar en una amplia diversidad de mRNAs (*splicing* alternativo), que de tener la estabilidad suficiente, se traducen en proteínas. 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 ⁽³⁵⁾. El tener una amplia diversidad de mRNAs a partir de un gen, potencialmente permite a los organismos tener una amplia diversidad proteómica ⁽³⁰⁾. Como ejemplo extremo de ello, está el caso del gen DSCAM de *Drosophila melanogaster*, el cual puede originar 38016 proteínas distintas, doblando el número de genes predichos en su genoma ⁽³⁹⁾.

En los eucariotas superiores, el *splicing* alternativo se lleva a cabo con frecuencia en genes que se expresan en el SNC, siendo blanco de este mecanismo al menos 30% de los genes que específicamente se expresan en neuronas ⁽²⁴⁾. Tan sólo en los humanos, que presentan en el 95 % de sus genes una regulación a través de *splicing* alternativo ⁽⁴⁰⁾, la mayor parte de los genes sujetos a este tipo de regulación se expresan preferencialmente a nivel de SNC ⁽²⁴⁾. Muchos de estos genes están involucrados en el desarrollo y la regeneración del SNC, e incluyen isoformas de factores de crecimiento (e.g., PDGF ⁽⁴¹⁾) y sus receptores (e.g., receptor 1 de FGF ⁽⁴²⁾), así como moléculas de adhesión celular (e.g., neurexinas ⁽³¹⁾ y NCAM ⁽⁴³⁾), canales iónicos (e.g., Piccolo ⁽⁴⁴⁾), receptores a neurotransmisores (e.g., GABA ⁽⁴⁵⁾), factores de transcripción (e.g., Laf4 ⁽⁴⁶⁾) y peptidasas (e.g., Carboxipeptidasa A ⁽⁴⁷⁾).

5.6 Regulación del *splicing* alternativo

Las decisiones de *splicing* están determinadas por la conservación en la secuencia en los sitios de *splicing*, por la abundancia y combinación de proteínas del *spliceosome* en sus estados activos e inactivos, y la presencia de proteínas reguladoras específicas a cada tipo de tejido ⁽⁴⁸⁾. Entre las señales que regulan la selección de sitios de *splicing*, se han identificado a señales depolarizadoras ⁽⁴⁹⁾, hormonas ⁽⁵⁰⁾, citocinas ⁽⁵¹⁾, proteínas cinasas ⁽⁵²⁾, micro-RNAs ⁽⁵³⁾, *riboswitches* ⁽⁵⁴⁾ y factores de crecimiento ⁽⁵⁵⁾, y se ha observado expresión diferencial de isoformas de mRNA en diferentes etapas de desarrollo ^(46, 56, 57), tipos celulares ⁽⁵⁸⁾, estados fisiológicos (e.g., salud o enfermedad ^(59, 60)) y etapas del ciclo celular ⁽⁶¹⁾. De manera general, estas señales regulan el *splicing* alternativo a través de modificaciones en el estado de fosforilación, localización intracelular y síntesis de proteínas del *spliceosome*, proteínas auxiliares de *splicing* y de proteínas reguladoras específicas de cada tejido ⁽⁶²⁾. Así por ejemplo, existen factores particulares de *splicing* en sistema nervioso, tales como el homólogo neural a PTB (nPTB) ⁽⁶³⁾, NAPOR1 ⁽⁶⁴⁾, Nova-1 ⁽⁶⁵⁾ y Nova-2 ⁽⁶⁶⁾.

5.7 Papel de las isoformas de mRNA originadas por *splicing* alternativo

Las isoformas de mRNA que logran ser traducidas, dan lugar a la formación de proteínas con múltiples localizaciones (e.g. formas membranales y solubles ^(67, 68)) y funciones. Esas funciones pueden ser antagónicas ^(57, 69-74) o bien, ser la misma función pero realizada con eficiencia distinta respecto a la que se traduce a partir de un mRNA madurado por *splicing* canónico ⁽⁴²⁾.

Como ejemplo de un gen que da lugar a proteínas con localizaciones distintas está el del Receptor al Factor de Crecimiento de Fibroblastos 3 III (FGFR3III), el cual origina tres isoformas de mRNA, la b, c y S. Las formas b y c dan lugar a proteínas membranales que funcionan como receptores del FGF, en tanto la forma S da lugar a una proteína soluble, la FGFR3IIIS, cuya expresión evita el arresto en el crecimiento celular que lleva a cabo la forma c, y es mayormente expresada en células tumorigénicas ⁽⁶⁸⁾.

Como ejemplo de un gen que da lugar a proteínas con funciones antagónicas, está el de la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP 2 de *Drosophila* (dCREB2), el cual origina dos isoformas de mRNA, la dCREB2a y la dCREB2b. La forma 2a actúa como un activador transcripcional, en tanto que la forma 2b tiene una función antagónica, y reprime la transcripción ⁽⁷³⁾. CREB está involucrada en la memoria a largo plazo (LTM), y se ha observado que al generar moscas transgénicas que sobreexpresan a la forma activadora dCREB2a, la LTM incrementa ⁽⁷⁴⁾.

Otro comportamiento sumamente interesante entre las proteínas que actúan antagónicamente es el de dominante negativa (En el apartado siguiente se define de manera amplia este concepto). Como ejemplo de lo anterior está el gen *dNOS* de *D. melanogaster* el cual presenta múltiples isoformas de mRNA que se expresan de manera diferencial durante el desarrollo del SNC ⁽⁵⁷⁾. Estas isoformas de mRNA codifican para sintetas de óxido nítrico (NO), y de estas, únicamente una, la dNOS1, es capaz de sintetizar NO, requiriendo de la homodimerización para realizar dicha función ⁽³²⁾. El resto de las isoformas codifican para proteínas truncadas, y una de ellas, la dNOS4, inhibe la actividad de la dNOS1 *in vitro* e *in vivo*. Ello se ha determinado a través de ensayos enzimáticos en extractos de células y en extractos de cabezas de moscas transgénicas en las que se sobreexpresó a la dNOS4, observando para ambos casos, una inhibición dosis-dependiente de la actividad de la dNOS-1. Además, en las mismas moscas transgénicas, se ha observado que la

sobreexpresión de dNOS4 afecta la formación de estructuras como omátidas y quetas durante el desarrollo (puesto que se impide la síntesis de NO, un señalizador de la formación de esas estructuras durante el desarrollo de *D. melanogaster*). Aunado a lo anterior, se ha sugerido que la dNOS4 forma heterodímeros con dNOS1 *in vitro* e *in vivo*, pues se ha observado interacción entre dNOS1 y dNOS4 en extractos de células en las que se sobreexpresan simultáneamente, y en extractos de cabezas de moscas transgénicas que sobreexpresan dNOS4. Por lo anterior, se ha propuesto como mecanismo de acción la heterodimerización no funcional (57).

5.8 Las proteínas dominantes negativas

De manera endógena, las células sintetizan proteínas o fragmentos de proteínas que le permiten modular la actividad de las proteínas funcionales ya sintetizadas en la célula. Estas proteínas o fragmentos de proteínas modulan la actividad de proteínas funcionales al dimerizar/multimerizar con estas e inhibir que lleven a cabo su actividad (57, 71, 72), o al competir con la proteína funcional por la unión a sustratos, ligandos o cofactores (70). Además, al expresarse en cantidades mayores que la proteína funcional, inhiben su función de manera dosis dependiente (57, 71, 72).

Para los casos en los que se forman dímeros/multímeros, la actividad se inhibe porque la conformación tridimensional no es la ideal para reconocer al ligando (71), porque el dominio de activación (e.g., un sitio que requiera de fosforilación) no puede ser activado (75), o bien, porque localizan a la proteína funcional a un lugar distinto en la célula al que requiere para llevar a cabo su función (e.g., que los residuos que señalizan la retención en retículo no puedan ser enmascarados y el oligómero sea retenido en el retículo endoplásmico en lugar de ser exportado hacia membrana plasmática) (76).

Por la capacidad de estas proteínas de interactuar con la proteína funcional o con el ligando/sustrato, pero no poder llevar cabo la catálisis o transducir la señal en la célula (i.e., por carecer o tener alterados los residuos que le permitan hacerlo) (57, 72, 76), y además, inhibir la función de la proteína funcional de manera dosis dependiente (57, 71, 72), se les denomina dominantes negativas.

La manera en la que una dominante negativa se origina es que el mRNA que la codifica se encuentra mutado en residuos del ORF, dando lugar a una proteína truncada o con residuos alterados que resultan importantes para llevar a cabo su actividad (76). O bien, el mRNA se origina por *splicing* alternativo y presenta codones de *stop* prematuros que truncan la traducción de la proteína (57), o presenta nuevos codones, que al traducirse en aminoácidos, hacen que la proteína originada adquiera una conformación tridimensional distinta que le permita interactuar con el ligando o el sustrato, pero no llevar a cabo su función (77).

Como un ejemplo interesante de una dominante negativa natural que puede unirse al sustrato pero no transducir la señal, está el fragmento soluble del receptor 2 de Apo (ApoER2). El receptor de ApoER2 es un receptor transmembranal de Reelin, y su unión provoca la fosforilación de una molécula unida en el dominio intracelular de ApoER2: Dab1. Ese evento resulta indispensable para transducir señales al interior de la célula que guiarán a las neuronas a su posición correcta (78). De manera endógena, se generan múltiples isoformas con diferentes dominios intracelulares y de unión a ligando. Una de ellas se expresa en el cerebro de embriones de ratón y codifica para una variante con 4 dominios de unión a ligando y una inserción de 13 aminoácidos en un sitio consenso de corte por Furin en el C-terminal (79). *In vitro*, se ha observado que el corte por Furin en esa variante tiene lugar, y da origen a un fragmento de receptor soluble con cuatro dominios de unión a ligando. Ese fragmento soluble actúa como dominante negativa de ApoER2, pues al sobreexpresarlo, se bloquea la interacción de Reelin con el receptor funcional ApoER2 y se evita la fosforilación de Dab-1, inhibiendo de esta manera la señalización inducida por Reelin a través de ApoER2 (70).

Otro ejemplo interesante de una proteína dominante negativa que inhibe la actividad de la proteína funcional a través de heterodimerización no funcional, es la variante truncada del receptor a la hormona liberadora de la hormona de crecimiento humana (GHRH). Este receptor está acoplado a proteínas G (80), y transduce su señal al interior celular a través de la vía del cAMP, teniendo como blanco final la activación del gen de la hormona de crecimiento y el de la GHRH. Por *splicing* alternativo, se origina una variante truncada que al cotransfectarse con el receptor completo, inhibe de manera dependiente de dosis la liberación de cAMP. Ya que en ensayos de coimmunoprecipitación, se observa que tanto la proteína truncada como la completa interactúan, que la proteína truncada no inhibe el transporte de la proteína completa hacia la membrana

plasmática, y que la proteína truncada une a GHRH en menores niveles que la completa, se ha propuesto como mecanismo de acción a la heterodimerización no funcional ⁽⁷¹⁾.

Existen casos en los que la alta expresión de dominantes negativas está asociada a patologías. Como ejemplo interesante, está el gen de la hormona de crecimiento, el cual, por *splicing* canónico, origina una hormona de 22 kDa, cuya expresión está asociada a un desarrollo normal de la glándula pituitaria y a que los organismos alcancen una estatura normal. Sin embargo, debido a mutaciones en sitios donadores y aceptores de *splicing*, así como en elementos *enhancers* necesarios para promover el *splicing* canónico, se promueve el *splicing* alternativo, generando formas truncadas. Una de esas formas es de 17.5 kDa, y su expresión excesiva está asociada a la aparición de la Deficiencia de tipo II en la hormona de crecimiento (IGHDII), cuya severidad se cree que está asociada a la cantidad de la forma truncada que es producida ⁽⁸¹⁾. Además, actúa como una dominante negativa de la forma de 22 kDa, evitando su secreción ⁽⁸²⁾. En este sentido, una manera de rescatar el fenotipo de individuos sanos, es apagar la expresión de la forma truncada. Para tal fin, se generaron ratones transgénicos en los que se sobreexpresó un shRNA (*short hairpin* RNA) dirigido únicamente contra la forma truncada. Al cruzar a estos ratones transgénicos con ratones con la IGHDI, se logró rescatar el fenotipo en los ratones heterocigos, los cuales alcanzaron una estatura normal, y una glándula pituitaria normal, demostrando así que la forma de 17.5 kDa es una dominante negativa *in vivo* ⁽⁸³⁾.

6. ANTECEDENTES

6.1 El gen de la Piroglutamil Peptidasa II: Un gen con múltiples mRNAs

El gen de la Piroglutamil Peptidasa II (PPII) se encuentra en el cromosoma 7 de la rata, y se transcribe en un pre-mRNA compuesto de más de 400,000 pares de bases, organizados en 19 exones y 18 intrones ⁽⁸⁴⁾. A través de estudios por *Northern blot*, se sabe que existen varios transcritos poliadenilados de la PPII. 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 el mecanismo que se ha propuesto para explicar el origen de esos transcritos es el *splicing* alternativo ⁽⁸⁵⁾.

De esos mRNAs, el primero que se clonó consta de 6000 nucleótidos agrupados como 19 exones, que se traducen en una proteína capaz de hidrolizar a la hormona liberadora de tirotropina (TRH) ⁽⁸⁵⁾, un péptido con múltiples funciones que se discutirán en el apartado siguiente. Esta proteína consta de 1025 aminoácidos ⁽⁸⁵⁾ y se hará referencia a ella como la PPII completa (PPII^C). A la actividad enzimática que presenta la PPII^C se le denomina de manera general actividad de PPII, y a la fecha, la PPII^C es la única isoforma que se sabe con esta actividad. En el texto, a toda actividad enzimática endógena en donde participe la PPII^C se le encontrará como actividad de PPII. A la actividad enzimática atribuible únicamente a la sobreexpresión de la PPII^C se le encontrará como actividad de PPII^C.

Un segundo mRNA fue clonado. Este consta de los 19 exones más un segmento adicional de 87 nucleótidos, que corresponden al intrón 14. La traducción de este mRNA da lugar a una proteína truncada de 831 aminoácidos, sin actividad hidrolítica frente al TRH y que presumiblemente actúa como dominante negativa de la PPII^C ⁽⁸⁶⁾. Se hará referencia a esta proteína como la PPII truncada (PPII^{*}).

6.2 La hormona liberadora de tirotropina

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es un tripéptido con la estructura pGlu-His-Pro-NH₂, que presenta las funciones de hormona y neurotransmisor ⁽⁸⁷⁾.

Como hormona, su función se encuentra ampliamente documentada. Se sabe que se sintetiza en varias regiones del hipotálamo, pero en mayor proporción en el núcleo paraventricular (NPV) ⁽⁸⁸⁾, de donde en respuesta a estímulos neuronales y señales hipofisiotrópicas, es liberado a la Eminencia Media (EM) y transportado hacia la glándula pituitaria anterior (adenohipófisis) a través del sistema portal hipofisiario. Una vez que el TRH llega a la adenohipófisis, se une a su receptor (TRH-R1) y causa la liberación de prolactina y tirotrópina (TSH). Esta última, a su vez, estimula la síntesis y secreción de tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) de la glándula tiroidea ⁽⁸⁹⁾.

Sin embargo, esta bien documentado también que el TRH no se expresa solo en el hipotálamo, sino que también lo hace en otros órganos tales como páncreas ⁽⁹⁰⁾, intestino ⁽⁹¹⁾, corazón, testículos ⁽⁹²⁾ y piel ⁽⁹³⁾, así como también en otras regiones del cerebro, tales como tallo cerebral, cerebelo, amígdala, bulbo olfatorio, corteza y la región septohipocampal ^(94, 95, 96), por lo cual se ha propuesto que el TRH tiene un rol adicional al de hormona hipofisiotrópica, y que en el sistema nervioso pudiera actuar como un neuromodulador ⁽⁹⁴⁾. En este sentido, se han inyectado TRH o análogos de éste en diversas regiones del cerebro, e intravenosamente, y se han encontrado efectos restauradores de la homeostasis ⁽⁹⁷⁾, tales como la reducción de la narcosis y de la hipotermia inducida por etanol ⁽⁹⁸⁾ y barbitúricos ⁽⁹⁹⁾, reducción de la conducta depresiva ⁽¹⁰⁰⁾, reducción de convulsiones en pacientes con epilepsia ⁽¹⁰¹⁾, reducción de déficits neurológicos en ratas con el septum dañado ⁽¹⁰²⁾, y reducción del déficit motoneural en ratas a las que se les daña la espina dorsal ⁽¹⁰³⁾. Además, la reducción en su expresión se ha asociado a un decremento en la tasa cardíaca y presión sanguínea en ratas hipertensas ⁽¹⁰⁴⁾, y a la reducción de la tasa metabólica y cardíaca que ocurre durante la restricción calórica ⁽¹⁰⁵⁾.

Sin embargo, la mayor parte de las respuestas que el TRH provoca son transitorias y de corta duración. Ello implica que los receptores para TRH (TRH-R1 y/o TRH-R2) pierden sensibilidad a este ⁽¹⁰⁶⁾, o bien, que el péptido es inactivado en el medio extracelular ⁽¹⁰⁷⁾. Se sabe que en el SNC ambos fenómenos ocurren, no obstante, las evidencias apuntan a que la inactivación en el medio extracelular mediada por la PPIIC es el mecanismo principal a través del cual se termina la señal del TRH ⁽¹⁰⁷⁾. Consistente con lo anterior, los análogos del TRH resistentes a degradación presentan efectos más potentes y de mayor duración ⁽¹⁰⁸⁾.

6.3 La actividad enzimática de la Piroglutamil Peptidasa II completa

La PPII^C (EC 3.4.19.6) es una metalopeptidasa dependiente de zinc ⁽¹⁰⁹⁾, clasificada dentro la familia M1 del clan MA ⁽¹¹⁰⁾. En la literatura, se puede hallar referida como Piroglutamil Aminopeptidasa II o Piroglutamil Peptidasa II. Por su función también se le conoce también como ectoenzima degradadora de TRH (TRH-DE) o enzima degradadora de TRH unida a membrana ^(110, 111).

Las peptidasas de la familia M1 presentan en su sitio activo al motivo His-Glu-Xaa-Xaa-His ('HEXXH') y a un residuo de glutamina (E) separado por 18 aminoácidos hacia el C-terminal. Este residuo constituye, junto con los dos residuos de histidina en el sitio activo, a los ligandos de Zinc. Como característica adicional de la familia M1, se encuentra también localizado en el sitio activo, el motivo de exopeptidasa: Gly-X-Met-Glu-Asn, en el que X puede ser Ala o Gly ⁽¹¹⁰⁾.

Los miembros que constituyen a esta familia son en su mayoría aminopeptidasas, las cuales hidrolizan el enlace peptídico en el N-terminal en una amplia diversidad de péptidos ⁽¹¹⁰⁾. A diferencia de otros miembros de su familia, la PPII^C es una omegapeptidasa ⁽¹¹²⁾ (pues su sustrato biológico tiene un pGlu en el N-Terminal) cuya especificidad se restringe a la degradación de péptidos con estructuras muy similares a la del TRH.

Con la excepción de pGlu-Phe-Pro-NH₂ y de peptidos semejantes al TRH con el residuo de His reemplazado por aminoácidos de tamaño moderado y sin carga ⁽¹¹³⁾, la PPII^C 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 ⁽¹¹¹⁾. En comparación con el TRH, casi todos los análogos de TRH y derivados de tripéptidos probados (e.g., 3-metil His-TRH, TRH ácido, TRH metilamida, Glp-His-pyrrolidina) son hidrolizados considerablemente mas lento o no son hidrolizados, indicando la estrecha especificidad de la enzima ^(108, 114). Por otra parte, la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LH-RH), que contiene la secuencia pGlu-His, inhibe efectivamente la degradación de TRH, pero no es hidrolizada por la PPII^C ⁽¹¹⁵⁾. Ni el péptido similar a TRH: pGlu-Glu-Pro-NH₂, ni los péptidos como la neurotensina, gastrina o bombesina, son hidrolizados por la PPII^C ⁽¹¹⁵⁾. Estos requerimientos estructurales la hacen una de la neuropeptidasas más específicas descritas ⁽¹¹⁶⁾.

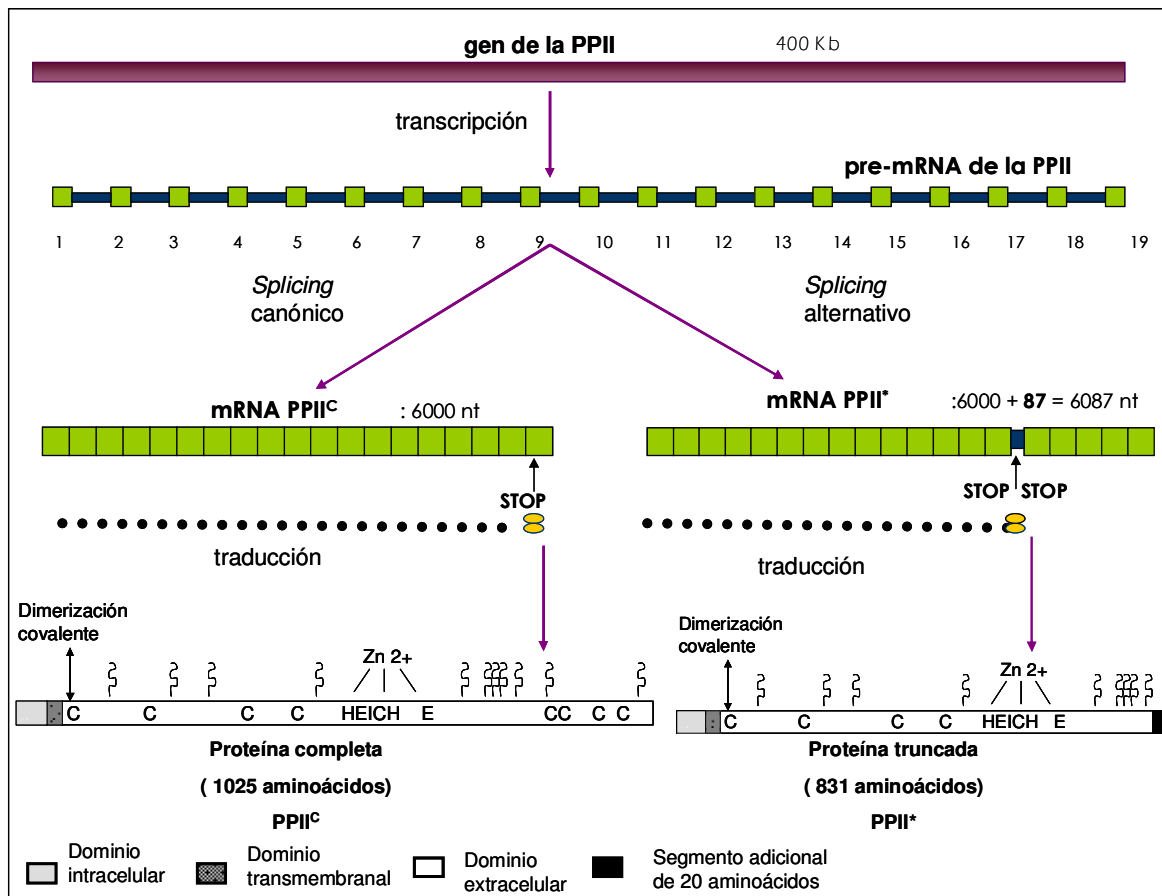


Figura 3. Origen y estructuras de la PPII completa y la PPII truncada². El gen de la PPII en la rata está compuesto por más de 400 kb, que se transcriben en un pre-mRNA organizado en 18 intrones y 19 exones. Ese pre-mRNA madura por *splicing* canónico en un mRNA que conserva los 19 exones, y se traduce en una proteína de 1025 aminoácidos con la capacidad de hidrolizar al TRH (PPII^C). Por *splicing* alternativo, ese pre-mRNA madura en un mRNA con los 19 exones y un segmento de 87 nucleótidos del intrón 14 insertado entre los exones 14 y 15. Ese segmento de intrón lleva dos codones de STOP en fase con el ORF, lo cual hace que se detenga la traducción prematuramente, y se origine una proteína truncada incapaz de hidrolizar al TRH (PPII^{*}), con un segmento adicional de 20 aminoácidos traducidos a partir de los codones del intrón que preceden a los dos codones de STOP. En las proteínas: C= Cisteínas; HEICH E: sitio activo; ζ : sitio de glicosilación;

² La figura de esta página está basada en la organización del gen reportada en Ensembl (www.ensembl.org), en los datos publicados en 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 y en 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.

La PPII^C 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) ⁽¹¹⁷⁾, con una localización probablemente postsináptica, pues colocaliza con receptores del TRH en las células blanco de TRH ⁽¹¹⁸⁾, y no se encuentra del lado presináptico ⁽¹¹⁹⁾. Esas características, aunadas a su restringida especificidad, y que al inhibirla, haya una mayor recuperación de TRH en rebanadas de cerebro ⁽¹²⁰⁾, son evidencias que apuntan a que la inactivación mediada por la PPII^C es el mecanismo principal a través del cual se termina la señal del TRH ⁽¹⁰⁷⁾.

6.4 Estructura de la Piroglutamil Peptidasa II completa

La PPII^C es una proteína fuertemente unida a la membrana plasmática, modificada post-traduccionalmente por glicosilaciones que al removerse no afectan de manera significativa la actividad de la enzima ⁽¹²¹⁾. Al clonar el cDNA de la PPII^C a partir de RNA de cerebro y glándula pituitaria de rata, se predijo a través de un algoritmo de hidropatía, que la estructura de la PPII^C era la de 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. Asimismo, se predijo un dominio intracelular corto, y la presencia de un residuo de treonina que potencialmente podría ser un sitio de fosforilación por la proteína cinasa C (PKC). Su dominio transmembranal se encuentra muy cerca del extremo amino terminal, y está compuesto por 22 aminoácidos. Su dominio extracelular es muy largo, encontrándose dentro de éste al sitio activo y a la secuencia consenso de las metalopeptidasas dependientes de Zinc, con el residuo de ácido glutámico (uno de los ligandos del Zinc) separado del motivo que contiene los otros ligandos del Zinc por 18 aminoácidos ⁽⁸⁵⁾. Asimismo, hay una secuencia consenso para sulfatación por tirosina (aminoácido 381) y 12 posibles sitios de N-glicosilación ⁽⁸⁵⁾, además de las cisteínas 174, 279, 338, 444, 823, 830, 859 y 895 fundamentales para la actividad de la enzima (con un posible papel estructural) y para poder dimerizar covalentemente ⁽¹²²⁾ (Figura 3).

A través de la solubilización con tripsina y la separación de los fragmentos en SDS/PAGE en condiciones reductoras, se detectó una banda de 116,000 Da, y al separar la proteína solubilizada con tripsina por cromatografía de filtración en gel, se detectó una sola banda de 230,000 Da,

sugiriendo que la enzima está compuesta de dos subunidades idénticas ⁽¹²¹⁾. Por otra parte, a través de mutaciones puntuales se determinó que la PPII^C se encuentra como un homodímero unido covalentemente a través del residuo 68 de cisteína (en el dominio extracelular); no obstante, en el mismo estudio se demostró que la actividad de la enzima no se ve abatida al mutar el residuo 68 de cisteína ya que sólo se reduce en un 20 % su actividad enzimática, demostrando entonces que el residuo 68 de cisteína no es fundamental para la actividad de la enzima pero sí para la dimerización covalente ⁽¹²²⁾. Sin embargo, otras observaciones apuntan a que la homodimerización pudiera ocurrir a través de otros residuos en el dominio extracelular ⁽¹²³⁾.

Por otro lado, predicciones teóricas apoyadas con datos experimentales (e.g., mutaciones puntuales) han permitido determinar residuos fundamentales para la actividad enzimática y la especificidad de la enzima ^(112, 124). Aún más, a partir de esos datos y de la estructura de una enzima de la familia de la PPII^C con la que comparte el 32 % de homología en secuencia (i.e., Aminopeptidasa N), se ha predicho un modelo teórico que explica la especificidad de la enzima ⁽¹¹²⁾. De esta manera, además de los residuos de cisteína fundamentales para la actividad de la enzima y la dimerización covalente mencionados anteriormente, se han determinado que los residuos de glutamato 408 y 442, tirosina 528 e histidina 507 están involucrados en la catálisis ⁽¹²⁴⁾, que el residuo 464 de glutamato es un posible residuo de coordinación de Zinc ⁽¹²⁴⁾, y que los residuos de serina 269, lisina 463 y glutamato 408 son fundamentales para la estrecha especificidad de la enzima, proponiéndose como modelo la formación de un puente salino entre la lisina 463 y el glutamato 408, el cual interacciona con la serina 269, y esta interacción resulta determinante para la omega especificidad de la PPII^C ⁽¹¹²⁾.

6.5 Distribución de la actividad enzimática de la PPII

La actividad enzimática de la PPII se halla presente en niveles bajos en la 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 ^(125, 126). Aún dentro del SNC, los niveles de actividad son diferentes dependiendo de la región estudiada, y del tipo celular. Así, en membranas extraídas a partir de el bulbo olfatorio, la corteza y el hipocampo, se detectan los niveles mayores de actividad de PPII en comparación con membranas extraídas a partir de otras regiones como el hipotálamo o el tallo cerebral, que presentan niveles medianos y bajos de actividad respectivamente ⁽¹²⁷⁾. Por otra parte, en cultivos de células hipotalámicas o corticales de cerebro de feto de ratón, al

inhibir la proliferación de células no neuronales, se observan niveles mayores de actividad enzimática de PPII en comparación con cultivos en los que no se inhibe la proliferación, apuntando a que la actividad de la PPII se halla de manera predominante en células neuronales ⁽¹²⁸⁾.

6.6 Regulación de la expresión y actividad de la Piroglutamil Peptidasa II

Hasta el momento, se tiene evidencias sobre la regulación de la actividad de la PPII a nivel de adenohipófisis, en donde sus niveles de mRNA y de actividad enzimática son regulados positivamente en respuesta a la hormona tiroidea triyodotironina (T3) ⁽¹²⁹⁻¹³⁴⁾. Ello se sabe con base en estudios en los que se ha inyectado T3 en ratas, y determinado la actividad enzimática en extractos membranales de adenohipófisis ⁽¹²⁹⁾, 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* ⁽¹³¹⁾. Se han observado efectos opuestos en extractos membranales de adenohipófisis de ratas a las que se les provoca hipotiroidismo por inyección de propiltiouracilo (PTU) ^(129, 133).

Por otro lado, los niveles séricos de hormonas sexuales modulan los niveles del mRNA y de la 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 -estradiol (E₂) ^(134, 135). 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 ⁽¹³⁶⁾. Asimismo, se sabe que la actividad de la PPII varía durante el ciclo estral, encontrándose los niveles más bajos en el día diestro 2 ⁽¹³⁷⁾ 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 ⁽¹³⁸⁾.

Un modulador importante de la actividad de la PPII lo constituye el propio TRH, el cual regula negativamente la actividad enzimática a través de la activación de los receptores de TRH ⁽¹³⁹⁾.

Por otra parte, estudios llevados a cabo en la adenohipófisis mostraron que la PPII se regula durante el desarrollo. El estudio se llevó a cabo desde el día P0 (post-natal 0), 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 detectaron en P22, y disminuyeron hacia la etapa adulta, alcanzando niveles ligeramente más altos que en el día P8 ⁽¹⁴⁰⁾.

Se han llevado a cabo varios 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 ^(131, 132). 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) ⁽¹⁴¹⁾, la inyección aguda de etanol ⁽¹⁴²⁾ y el entrenamiento en el laberinto de Morris (un modelo de aprendizaje) ⁽¹⁴³⁾, así como durante el desarrollo ^(140, 144). Para el caso del *kindling* amigdalino, se ha encontrado que en la etapa II, la actividad de la PPII se ve regulada positivamente en regiones epileptogénicas, tales como amígdala y corteza frontal. Asimismo, se ha observado que estos cambios están asociados con cambios en los niveles de mRNA de la PPII^C ⁽¹⁴¹⁾. 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, el hipotálamo, el hipocampo y la amígdala ⁽¹⁴²⁾.

Por otra parte, estudios llevados a cabo en algunas zonas del SNC mostraron que la actividad de la PPII se regula durante el desarrollo. 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 ⁽¹⁴⁰⁾. 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 ⁽¹⁴⁰⁾.

En continuidad con lo anterior, recientemente determinamos la actividad enzimática de la PPII durante el desarrollo del SNC de la rata. El estudio lo llevamos a cabo en cabezas de embriones de rata (E14-E18) y cerebros completos de ratas de edades embrionarias (E19-E21), postnatales (P0, P7, P14, P21, P30) y adultas (3 y 5 meses). Concordante con los patrones

observados anteriormente ⁽¹⁴⁰⁾, encontramos los niveles de actividad más bajos en las etapas embrionarias (E14-18) y adultas, y los picos máximos de actividad en las etapas postnatales P0 y P7 ⁽¹⁴⁴⁾.

6.7 La Piroglutamil Peptidasa II truncada

Recientemente se caracterizó en nuestro grupo 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*) ⁽⁸⁶⁾. Esta secuencia es idéntica a la de la PPII^C desde el extremo 5' hasta el nucleótido 2534, en donde se encuentra una inserción de 87 nucleótidos correspondiente a los primeros 87 nucleótidos del intrón 14 del pre-mRNA. Después de la inserción, desde el nucleótido 2521 (correspondiente al nucleótido 2535 del cDNA de la PPII^C) hasta el extremo 3', la secuencia es idéntica a la de la PPII^C. El segmento insertado 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 ⁽⁸⁶⁾. (Ver figura 3).

6.8 Estructura de la Piroglutamil Peptidasa II truncada

La PPII* es una proteína truncada hacia el extremo carboxilo terminal, con los dominios intracelular, transmembranal y catalítico 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, entre los que se encuentran cuatro cisteínas ⁽⁸⁶⁾, que por mutaciones dirigidas se han determinado como fundamentales para la actividad hidrolítica de la enzima ⁽¹²²⁾. Asimismo, carece de dos posibles sitios de N-glicosilación. De manera interesante, presenta el sitio catalítico 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 3) ⁽⁸⁶⁾.

6.9 La PPII* como dominante negativa de la PPII^C: antecedentes en cultivo

El cDNA de la PPII* está clonado en vectores de expresión pCDNA con y sin etiqueta de Histidinas, y se han expresado en células de riñón de mono, COS-7 o de glioma de rata, C6 ⁽⁸⁶⁾. Ninguna de estas líneas celulares presenta de manera endógena actividad de PPII^C ⁽¹⁴⁵⁾. En ensayos enzimáticos llevados a cabo en membranas de estas células, la PPII* expresada no presentó actividad hidrolítica frente al TRH (i.e., actividad de PPII); sin embargo, al cotransfectarla con vectores de expresión para la PPII^C, inhibió la actividad hidrolítica de la PPII^C frente al TRH conforme se aumentó la relación de vectores PPII*/PPII^C, es decir, de manera dosis dependiente ⁽⁸⁶⁾ (Figura 4). A través de ensayos de *Western blot* en condiciones no reductoras y utilizando anticuerpos contra la etiqueta de histidinas de los vectores, se observó en extractos de las células cotransfectadas, que la señal para los posibles homodímeros de PPII^C disminuyó, y en cambio apareció una banda de menor peso molecular. Ese peso fue intermedio entre el esperado para los homodímeros PPII^C-PPII^C y PPII*-PPII*, al parecer, un heterodímero PPII^C-PPII*. Aún más, la señal de este posible heterodímero aumentó de manera proporcional a la relación de vectores PPII*/PPII^C ⁽⁸⁶⁾ (Figura 4).

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 ⁽⁸⁶⁾. Es decir, 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 ⁽⁸⁶⁾.

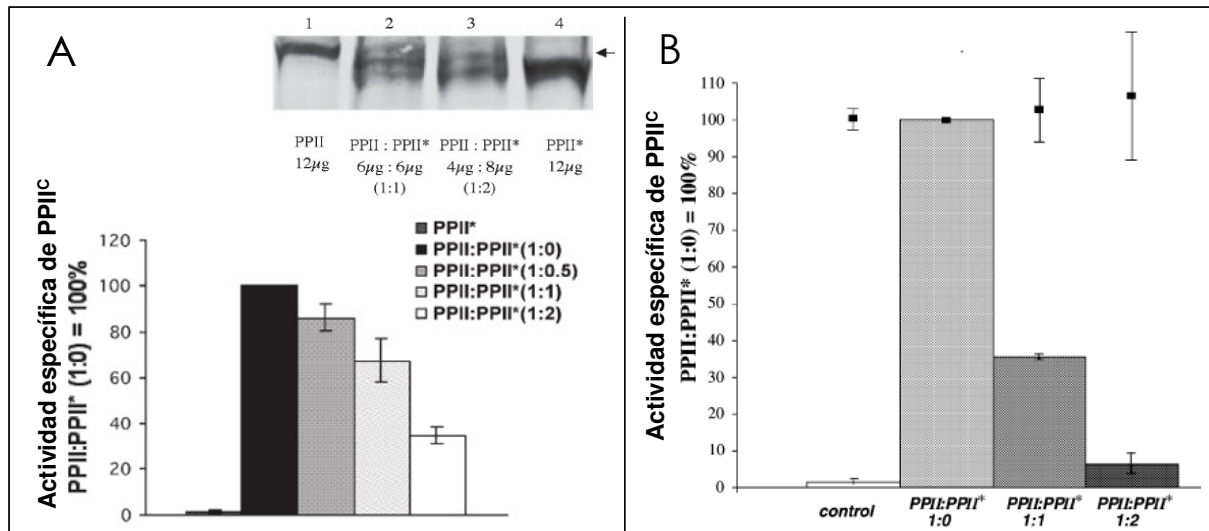


Figura 4. La PPII* carece de actividad enzimática frente a TRH e inhibe la actividad hidrolítica de la PPII^C frente al TRH de manera dosis dependiente ³. Los cDNAs de la PPII^C y PPII* se clonaron en un vector de expresión pcDNA o pcDNA/hisA, y fueron transfectados en la línea celular COS-7. **A.** En la parte inferior, puede observarse que las células que están transfectadas sólo con el vector pcDNA/hisA-PPII* (PPII*) carecen de actividad enzimática frente al TRH, y que al cotransfectar este vector con el pcDNA/hisA-PPII^C (PPII), la actividad de la PPII^C disminuye cuando la relación PPII*:PPII^C es mayor. En la parte superior, se muestra un ensayo de *Western blot*, empleando un anticuerpo antihistidinas en membranas de las células transfectadas. En el carril 1 se muestra un posible homodímero PPII^C:PPII^C y en el carril 4 un posible homodímero PPII*:PPII*. En los carriles 2 y 3 se muestra una tercera banda con un peso intermedio entre la de homodímeros PPII^C:PPII^C y PPII*:PPII*, la cual se ha propuesto como un heterodímero PPII^C:PPII*. **B.** Puede observarse que las células transfectadas con el vector pcDNA/PPII^C (PPII) presentan actividad hidrolítica frente al TRH. Al ser cotransfectadas con el vector pcDNA/PPII* (PPII*), la actividad enzimática de la PPII^C disminuye de manera dependiente de dosis. La PPII* solo inhibe la actividad de la PPII^C, y como prueba de ello, se muestra en las barras de error que la actividad de otra enzima de la familia M1, la Aminopeptidasa N, no disminuye al expresar a la PPII*.

Si bien la PPII* presenta un segmento de 20 aminoácidos adicionales hacia el extremo carboxilo terminal, a este segmento no se le atribuye la carencia de actividad hidrolítica frente al TRH, ya que al transfectar vectores que codifican para una PPII truncada sin la extensión o con un dominio extracelular más largo que el de la PPII* en células de glioma C6, y llevar a cabo ensayos enzimáticos en membranas de estas células, se observa ausencia de actividad enzimática. Se propuso entonces que el dominio extracelular entero es necesario para que la enzima presente actividad hidrolítica ⁽⁸⁶⁾. Concordante con ello, se sabe que en otros miembros de la familia M1,

³ Figuras tomadas de 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. El nombre del eje de las "y" fue cambiado en ambas gráficas por Actividad específica de PPII^C.

tales como la Aminopeptidasa A, el dominio extracelular entero es necesario para que lleve a cabo la actividad enzimática ⁽¹⁴⁶⁾, y que ese dominio actúa como una chaperona necesaria para la correcta expresión y doblamiento de la enzima ⁽¹⁴⁷⁾.

6.10 La PPII* como dominante negativa de la PPII^C: antecedentes *in vivo*

Como antecedente *in vivo* de que la PPII* actúa como dominante negativa de la PPII^C, se tiene que en órganos con baja actividad de PPII (riñón, corazón, bazo, hígado y pulmón), la expresión del mRNA de PPII* es mayor que la del mRNA 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 la del mRNA de la PPII* (Figura 5 A) ^(86, 148).

De acuerdo con estas observaciones, recientemente observamos que en una ventana de tiempo durante el desarrollo del SNC, la actividad de la PPII es inversamente proporcional al cociente entre los niveles del mRNA de la PPII* y los del mRNA de la PPII^C. En base a esos datos, propusimos que el balance en la expresión entre la PPII^C y la PPII* determina los niveles de actividad de la PPII durante el desarrollo del SNC (Figura 5 B) ⁽¹⁴⁴⁾, y apoyan un posible papel *in vivo* de la PPII* como regulador negativo de la actividad de la PPII^C.

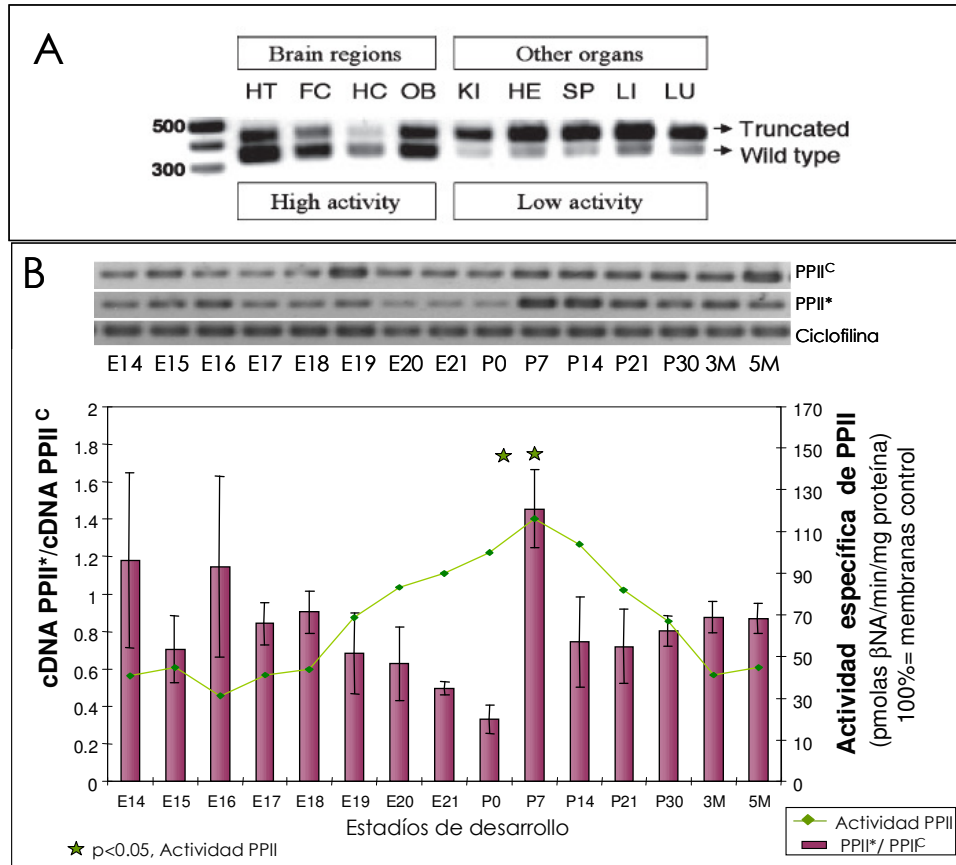


Figura 5. El cociente de mRNAs PP1I^{*}/PP1I^C es mayor en órganos con baja actividad de PP1I^C, y es menor en estadios de desarrollo con alta actividad de PP1I^C. **A.** Se muestra que la expresión del mRNA de la PP1I^{*} es mayor que la de la PP1I^C en órganos que presentan baja actividad de PP1I, tales como el riñón (KI), el corazón (HE), el bazo (SP), el hígado (LI) y el pulmón (LU), mientras que en regiones del cerebro con mayor actividad de PP1I tales como el Hipotálamo (HT), la Corteza Frontal (FC), el Hipocampo (HC) y el Bulbo Olfatorio (OB), el mRNA de la PP1I^C tiende a expresarse mas que el de la PP1I^{*}. **B.** Se muestra que el cociente de mRNAs PP1I^{*}/PP1I^C cambia de manera inversamente proporcional a la actividad de la PP1I durante toda la ontogenia del SNC, a excepción del estadio de desarrollo P7.

⁴ Figura A tomada de 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. Figura B tomada de Juárez Contreras, K.E. 2006. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

7. HIPÓTESIS

En base a que la PPII* inhibe la actividad de la PPII^C en ensayos de cotransfección *in vitro* ⁽⁸⁶⁾, a que durante el desarrollo del SNC, la actividad de la PPII de la rata cambia de manera inversamente proporcional al cociente de expresión de los mRNAs PPII*/ PPII^C ⁽¹⁴⁴⁾, y a que el cociente de mRNAs PPII*/ PPII^C es mayor en órganos con baja actividad de la PPII que en órganos con alta actividad ^(86, 148), proponemos que la PPII* funciona *in vivo* como una dominante negativa de la PPII^C.

8. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si la expresión de la PPII* regula negativamente la actividad de la PPII en un contexto neuronal,

Objetivos específicos

1. Determinar si la sobreexpresión de la PPII* regula de manera negativa la actividad endógena de PPII en células derivadas de la línea celular SK-N-MC.
2. Determinar si inhibiendo la expresión de la PPII* por RNAi en cultivos primarios de hipotálamo, se incrementa la actividad de PPII.

9. JUSTIFICACIÓN

La PPII* es una variante natural del gen de la PPII, cuyo papel propuesto es el de inhibir a la PPIIC como una dominante negativa ⁽⁸⁶⁾. De resultar cierto, este estudio permitirá profundizar en el conocimiento de los mecanismos que participan en la regulación de la actividad de la PPII. Aún más, como inhibidor natural de la PPIIC, podría potenciar los múltiples efectos terapéuticos que se le han atribuido al TRH ⁽⁹⁷⁻¹⁰⁵⁾, los cuales se ven limitados por la acción de la PPIIC.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

10.1 Cultivo de las células SK-N-MC

La línea de neuroepiteloma humano SK-N-MC (ATCC ₍₁₄₉₎; # cat. HTB10) fue cultivada en presencia de medio DMEM (*Gibco*) con 10% suero fetal bovino (FBS; *Terracelli*), antibiótico-antimicótico 0.005 % (*Gibco*) y glutamina (2mM) a 37 ° C y 5% CO₂.

Para expandir a la línea celular, se sembraron 500,000 células en cajas de 100 mm, y se mantuvieron aproximadamente una semana en cultivo, cambiando el medio una o dos veces por semana hasta que fuera el momento óptimo para replaquear las células (ver apartado 6.2). Para el caso de las cinéticas de 1, 2, 3 y 4 días *in vitro*, sembramos 200,000 células en pozos de 16.5 mm, en tanto que para el caso de las transfecciones, sembramos 150,000 células en pozos de 16.5 mm y 600,000 células en cajas de 35 mm.

10.2 Pase de la línea celular SK-N-MC

Una vez que las células de las cajas de 100 mm se encontraban al 90-95 % de confluencia, se retiró el medio y se agregaron 3 ml de PBS 1X a 37 ° C. Se retiró el PBS, se adicionaron 3 ml de Tripsina-EDTA (*Gibco*), y se mantuvieron 5 minutos a 37° C. Transcurrido ese tiempo, se pasó la mezcla de células con tripsina-EDTA a un tubo con 2 ml de medio con suero (suplementado como arriba se describe). La mezcla se centrifugó a 450 g por 5 minutos a 20 ° C. Una vez concluida la centrifugación, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en medio con suero. Con 10 µl de la resuspensión celular se realizó el conteo celular en la cámara de Neubauer a través del método de exclusión de tripano ₍₁₅₀₎. De acuerdo con dicho conteo, se sembraron 500,000 células en platos de 100 mm, y a los cuatro días post-siembra el medio fue reemplazado por nuevo medio. Una vez que las células se hallaban en 95% de confluencia (aproximadamente a los siete días después de la siembra), las células fueron replaqueadas o congeladas en presencia de DMSO (ver apartado 6.3). Este número de replaqueos (pases) se mantuvo dentro del rango recomendado por ATCC: menos de 20 pases ₍₁₄₆₎. Cabe mencionar que el número de células que se obtienen de platos cultivados bajo estas condiciones son de 7-10.5 x 10⁶ células (cuando están al 95% de confluencia), lo cual depende ampliamente de que al momento se resembrar a las células, se muevan los platos varias veces hacia los lados (nunca en círculos) antes de introducirlos a la incubadora, así como también de que antes

de inactivar la tripsina con el medio con suero, se asegure una buena dispersión de células con la pipeta.

10.3 Criopreservación de la línea celular SK-N-MC

Despegamos las células del plato tal como se describe en el punto anterior. Una vez que se inactivó a la tripsina con el medio con suero, se tomó una alícuota de 10 μ l para realizar el conteo celular por el método de exclusión de azul de tripano. Mientras que se realizó dicho conteo, la mezcla se centrifugó a 450 g por 5 minutos a 20 ° C. Una vez concluida la centrifugación, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 500 μ l de FBS por cada 2×10^6 células. En otro tubo se preparó DMSO al 16 % en FBS, y a la resuspensión celular se agregaron 500 μ l de esta mezcla por cada 2×10^6 células, de manera que la concentración final de DMSO resultara al 8%. El tubo que contenía a las células y al medio de criopreservación fue mezclado por inversión, y se tomaron alícuotas de 1 ml (2×10^6 células) que fueron colocadas en tubos para congelar células (*Corning*). Los tubos se introdujeron a un ultracongelador a -80 ° C, en el que las células se congelaron lentamente. Transcurridas 24 a 72 horas, transferimos los viales de células congeladas a un tanque de nitrógeno líquido en donde se mantuvieron hasta una nueva descongelación.

10.4 Descongelación de la línea celular SK-N-MC

Los viales de células se extrajeron del tanque de nitrógeno líquido en hielo seco, se rociaron con etanol, y dentro de la campana de flujo laminar, se descongelaron casi por completo (hasta quedar un trozo pequeño de hielo) calentando suavemente los tubos con las manos. Inmediatamente vertimos su contenido en tubos con 5 ml de medio con suero a 37 ° C. El contenido de los tubos se mezcló por inversión suave, y se centrifugó de inmediato a 450 g por 5 minutos a 20 ° C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en medio con suero, para después sembrarla en una caja de 100 mm.

10.5 Sobreexpresión de la PPII* en las células SK-N-MC

Los ensayos de sobreexpresión en la línea celular SK-N-MC se realizaron empleando Polietilenimina, de acuerdo al protocolo descrito previamente ⁽¹⁵¹⁾ con algunas modificaciones. El DNA plasmídico que se empleó para sobreexpresar a la PPII* fue el pCDNA 3.1/HisA/PPII*. Como control se empleó el pCDNA 3.1/HisA (Invitrogen). Y para evaluar la eficiencia de transfección, se empleo el p-IRES-hrGFP-1a (Stratagene) o el pDsRed2-N1 (Clontech) (Ver mapas en apéndice).

Para emplear la Polietilenimina, ésta se preparó tomando 8 mg de Polietilenimina ramificada (solución al 50%; 600-1000 kDa; Fluka) y llevándola a 9 ml con agua estéril. El pH se ajustó a 6.9 con HCl 0.2 N. La solución se completó a 10 ml y se pasó por un filtro de 0.2 μm . Con esta polietilenimina preparada (PEI) fue con la que se realizaron las mezclas de transfección. Para realizar las transfecciones, de 12 a 16 horas después de haber sembrado las células, éstas fueron deprivadas de suero, manteniéndolas únicamente en medio DMEM –sin antibiótico ni glutamina suplementada-. En el caso de la transfección de las células en los platos de 35 mm (600,000 células), se prepararon 8 μg de DNA en 50 μl de NaCl 150 mM (tubo 1), y en otro tubo, se prepararon 24 μl de PEI en NaCl 150 mM en un volumen final de 50 μl (tubo 2). Cada tubo se mezcló por separado en vortex, y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos. Se adicionó el contenido del tubo 2 al tubo 1, se mezclaron en vortex, y se mantuvieron a temperatura ambiente por 10 minutos más. Transcurrido ese tiempo, se adicionaron 900 μl de medio DMEM, y el medio de las células fue remplazado por 1 ml de esta nueva mezcla. Las células se mantuvieron en presencia de la mezcla de transfección por 4 horas a 37 ° C y 5 % de CO₂. Posteriormente se retiró la mezcla de transfección, y las células se mantuvieron en medio con suero por 24, 48 o 72 horas, para después realizar la cosecha o fijación de fluorescencia.

Para el caso de las células sembradas en los pozos de 16.5 mm, se trasfectaron preparando 1.5 μg de DNA en 20 μl de NaCl 150 Mm (tubo 1) y 4.5 μl de solución PEI en NaCl 150 mM en un volumen final de 20 μl (tubo 2). El resto del protocolo es como se describe arriba, excepto que la mezcla final se completa a 400 μl con medio DMEM, y con esta mezcla se reemplaza al medio de los pozos.

10.6 Cosecha de células.

Para cosechar a las células, se retiró por completo el medio de cultivo, y se agregó y retiró PBS 1X a 37°C dos veces, para inmediatamente congelar sobre hielo seco. Las células cosechadas se almacenaron a -80° C hasta su posterior uso.

10.7 Evaluación de la eficiencia de transfección en las células

Para cuantificar la eficiencia de transfección, transfectamos a las células SK-N-MC con el vector p-IRES-hrGFP, en tanto que las células primarias hipotalámicas fueron transfectadas con el sc-Control siRNA-A-fluorescein. Cuarenta y ocho horas posteriores a la transfección, se fijó la fluorescencia, y los niveles de fluorescencia fueron determinados por medio de citometría de flujo.

Para fijar la fluorescencia, se empleó Paraformaldehído al 2% como se realizó previamente ⁽¹⁵²⁾. Para ello, se retiró el medio de los pozos de 16.5 mm y se lavó con 500 µl de PBS 1X a 37°C. Después se retiró el PBS y se adicionaron 500 µl de Tripsina-EDTA. Se realizó una incubación por 5 minutos a 37°C, y después se inactivó la tripsinización con 250 µl de medio con suero. Se realizó una centrifugación a 450 g por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue desechado y la pastilla resuspendida en 500 µl de PBS 1X. Se realizó una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones, y la pastilla se resuspendió en 250 µl de PBS 1X y 250 µl de Paraformaldehído al 4 %. Se incubó por 15 minutos en hielo, mezclando por inversión cada 5 minutos. Posteriormente se realizó una centrifugación por 3 minutos y la pastilla se resuspendió en 500 µl de PBS 1X. Se centrifugó de nuevo por 3 minutos, y se resuspendió la pastilla en 200 µl de PBS 1X. El tubo fue cubierto con aluminio y almacenado a 4° C hasta realizar la determinación en el citómetro de flujo. El programa empleado para determinar la fluorescencia fue el Cell Quest y los datos se analizaron en el programa FlowJo.

10.8 Producción de los vectores para transfectar a las células SK-N-MC

Para producir los vectores que se emplearon en las transfecciones de las células SK-N-MC, se mezclaron 20 ng de DNA (purificado por columnas Qiagen para DNA plasmídico) de cada uno de los vectores con 50 μ l de bacterias competentes DH5 α , y se incubaron por 15 minutos a 4° C. Posteriormente, las bacterias fueron transformadas con el DNA por choque térmico, incubándolas 45 segundos a 42°C, seguido de 5 minutos a 4°C. Entonces se agregó 1 ml de medio Luria Betani (LB; ver apéndice) y las bacterias transformadas se mantuvieron 1 hora a 37°C en agitación constante. Transcurrido ese tiempo, se plaquearon 10, 20 y 50 μ l de las bacterias transformadas en placas de LB-agar con ampicilina (pCDNA3.1/HisA (Invitrogen), pCDNA3.1/HisA/PPII*; pIRES-hrGFP-1a (Stratagene)) o kanamicina (pDsRed2-N1 (Clontech)), y se dejaron crecer 12-16 horas a 37° C. Se seleccionaron colonias aisladas de las placas con agar, se inocularon en un volumen de 5 ml de medio LB con kanamicina o ampicilina, y se incubaron a 37°C en agitación constante por 12 horas.

Posteriormente, a partir de 1 ml de los inóculos, se extrajo el DNA plasmídico a través del protocolo de lisis alcalina. De manera breve, para cada uno de los inóculos, se centrifugó 1 ml del cultivo a 13,800 g por 3 minutos. El sobrenadante fue descartado, y la pastilla fue resuspendida en 100 μ l de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl pH 8 25 mM, EDTA 10 mM, RNAasa 10 μ g/ml). Entonces se adicionaron 200 μ l de solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1 %) e inmediatamente se mezcló invirtiendo el tubo varias veces hasta obtener una solución viscosa. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 2.5 minutos, y entonces se adicionaron 150 μ l de solución III (acetato de potasio 3 M y ácido acético 11.5%), y se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo varias veces. Las muestras se mantuvieron en hielo por 5 minutos, y posteriormente se centrifugaron a 13,800 g por 3 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo estéril. Posteriormente se agregaron 120 μ l de acetato de amonio 10 M, y se mezcló por inversión. Después, se adicionaron 600 μ l de isopropanol y se mezcló por inversión. Entonces se centrifugó a 13,800 g por 3 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el tubo permaneció de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente para secar la pastilla. La pastilla fue resuspendida con agua grado miliQ, y se congeló a -20°C, tomando antes una alícuota de 2 μ l. Con la alícuota de 2

μl se determinó la concentración de DNA haciendo una dilución 1:100 y leyendo la absorbancia a 260 nm (Biofotómetro, *Eppendorf*). La concentración se estimó de acuerdo a la siguiente fórmula [DNA]= absorbancia 260 nm x 0.05 x factor de dilución.

Se tomó el volumen suficiente para tener 2 o 3 μg de DNA, y con ello se realizaron las digestiones diagnósticas (ver apéndice). De acuerdo con las digestiones, se seleccionó una de las colonias que presentó el patrón de restricción esperado para cada uno de los vectores, y cada una se inoculó (100-200 μl) en un volumen de 100 ml de medio LB en presencia de kanamicina o ampicilina. Los cultivos se incubaron en agitación constante por 12 horas a 37°C. Se tomaron los 100 ml del cultivo y se extrajo DNA plasmídico con el kit MidiPrep de Qiagen (de la manera descrita por el fabricante).

10.9 Criopreservación de las bacterias transformadas con plásmidos

A partir de un cultivo de una colonia positiva de bacterias crecidas toda la noche, se tomó un inóculo y se plaqueó en una placa de LB-agar con el antibiótico de resistencia adecuado. La placa se mantuvo 12-16 horas a 37°C, y se seleccionó a una de las colonias. La colonia seleccionada se inóculo en 5 ml de medio LB con el antibiótico de resistencia, y se mantuvo a 37° C en agitación constante por 12 horas. Se tomaron 700 μl del cultivo y se mezclaron por inversión con 300 μl de glicerol (esterilizado por autoclave). Inmediatamente, las bacterias se congelaron en hielo seco, y los viales se almacenaron hasta su uso a -80° C.

10.10 Cultivo primario de células hipotalámicas fetales de rata

El cultivo primario se realizó a través del método descrito previamente ⁽¹⁵³⁾. Brevemente, alrededor de las 3 pm, se disectaron hipotálamos de embriones de 17 días de gestación (figura 6), los cuales fueron colocados uno a uno en 1 ml de solución Hanks a 37 °C (Fosfato de Sodio 0.00075 M, Fosfato de Potasio 0.000408 M, Cloruro de Sodio 0.1368 M, Glucosa 0.005549 M, y Cloruro de Potasio 0.005365 M), teniendo de 8 a 15 hipotálamos por cada ml de solución. Una vez que los

hipotálamos se encontraban en el fondo del tubo, se retiró la solución Hanks, y se agregó otro ml de solución. Entonces, se cortaron los hipotálamos con tijeras, procurando la mayor disgregación del tejido. Una vez que el tejido disgregado estuvo en el fondo del tubo, se volvió a hacer otro lavado con solución Hanks.

Posteriormente, a un tubo con 2 ml de DNasa I-Tripsina III a 37 ° C (0.56 mg de DNasa I y 0.5 mg de Tripsina III en 2 ml solución de Hanks), se transfirieron los hipotálamos cortados, y se incubaron a 37°C en agitación constante por 15 minutos, asegurándose de agitar manualmente el tubo cada 5 minutos. Al finalizar los 15 minutos de incubación, se agregaron 200 µl de suero fetal bovino (FBS; *Terracelli*) y 200 µl de DNasa I (1mg/ml de solución Hanks), procurando aplicar fuerza al hacerlo y evitando que se formaran burbujas. Entonces, la mezcla fue transferida a un tubo de 15 ml, y se centrifugó a 450 g a 20 ° C por 5 minutos. El sobrenadante fue desechado y la pastilla de células se resuspendió en medio DMEM suplementado (10% FBS, 0.25 % glucosa (*Sigma*), glutamina 2 mM (*Sigma*), 3.3 mg/ml insulina (*Sigma*) y antibiótico-antimicótico 0.005 % (*Gibco*)). La cantidad de DMEM en la que se resuspendieron las células fue de 100 µl por cada hipotálamo disectado. Posteriormente, las células fueron dispersadas mecánicamente, pasando las células por 3 pipetas Pasteur de diferentes diámetros ⁵. Una vez dispersas las células, se centrifugaron a 450 g a 20°C por 5 minutos. El sobrenadante fue desechado y las células se resuspendieron en 5 ml de medio suplementado si la cantidad de hipotálamos colectado era de 1 a 15, o 10 ml si la cantidad de hipotálamos eran mas de 15. Posteriormente, se determinó el número de células vivas en una cámara de Neubauer a través del método de exclusión de azul de tripano. De acuerdo al conteo celular y al tratamiento a realizar (ver más adelante), se sembraron 125,000 o 200,000 o 600,000 células en pozos de 16.5 mm tratados con poli-D-lisina (ver abajo). El volumen de los pozos se completo a 500 µl con DMEM suplementado y se mantuvo a 37 °C y 7 % de CO².

Para tratar a los pozos con poli-D-lisina, al menos dos horas previas a la siembra, se recubrieron los pozos con 500 µl de poli-D-lisina (0.003 mg/ml). Justo antes de la siembra, se retiró la poli-D-lisina y se realizaron dos lavados con solución PBS 1X, de manera que inmediatamente al retirar al PBS 1X se sembraran las células.

⁵ Para tener pipetas Pasteur de diferentes diámetros (e.g. de diámetros mas pequeños que una pipeta normal), se pasa la pipeta Pasteur por encima de un mechero, dándole vueltas todo el tiempo, hasta obtener el diámetro deseado.

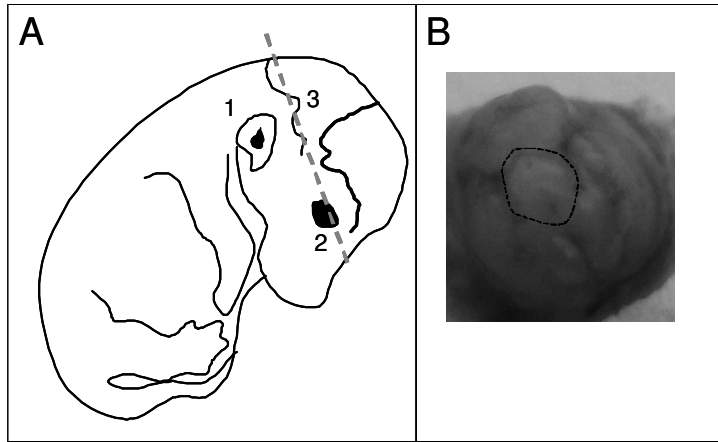


Figura 6. Disección de hipotálamos de embriones de 17 días de gestación de rata. **A.** Se coloca al embrión de manera que el ojo (2) quede como si fuera el centro de un reloj, y la oreja (1), en posición de las 11 horas. Se coloca una pinza en estos dos puntos, y con una navaja de bisturí se realiza un corte que pase entre el ojo, y una vena muy visible que se observa arriba de la oreja (3). El corte se realiza con suavidad y firmeza, teniendo cuidado de ir eliminando las meninges al momento de realizar el corte. **B.** La parte superior que resulta del corte es como aquí se muestra. La estructura al centro, rodeada aquí por una línea negra, es el hipotálamo. Se realizan cortes pequeños con unas tijeras finas alrededor de dicha estructura, y se extrae con ayuda de unas pinzas.

10.11 Cultivos de células hipotalámicas mantenidos de 1 a 8 días

Se sembraron 200,000 células y 600,000 células hipotalámicas en pozos de 16.5 mm en presencia de medio DMEM suplementado con suero y se mantuvieron a 37 °C y 7 % de CO₂ de 1 a 8 días. Se realizó un cambio de medio a los 4 días (en el cual se agregó citosina β-D Arabinofuranosica (Ara C)) y otro a los 6 días.

Para realizar el cambio de medio a los 4 días, se retiraron 250 µl de medio, y se adicionaron 300 µl de medio DMEM suplementado y con 0.17 µg de Ara C por cada 100,000 células.

Al sexto día de cambio de medio, se retiraron 250 µl de medio, y se adicionaron 300 µl de medio DMEM suplementado.

Los pozos en los que se sembraron 200,000 células se emplearon después para extraer RNA. Se emplearon 2 pozos por cada muestra (para tener >2 µg de RNA total). Los pozos en los que se sembraron 600,000 células se emplearon después para extraer membranas y determinar actividad de PPII. Se emplearon 8 pozos para las muestras de 2 DIV, y 5 pozos para las muestras de 5 DIV y 8 DIV (para tener >50 µg de proteína total).

10.12 Ensayos de interferencia con siRNAs en cultivos primarios hipotalámicos

Para interferir la expresión de la PPII* en cultivos hipotalámicos, se emplearon los siRNAs diseñados en el algoritmo de *Dharmacon* (154): siRNA-PPII*A y siRNA-PPII*B (Figura 7). Como control negativo, transfectamos en los ensayos el *Non targeting siRNA # 1* de Dharmacon: 5'-UAGCGACUAAACACAUCAA-3' (sentido) 3'-AUCGCUGAUUUGUGUAGUU-5' (antisentido), y el *Control siRNA-A* de Santa Cruz Biotechnology 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3' (sentido) 3'-AAGAGGCUUGCACAGUGCA-5' (antisentido). Como control para evaluar la eficiencia de transfección empleamos el *Control siRNA-A- fluorescein* de Santa Cruz Biotechnology 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3' (sentido) 3'-AAGAGGCUUGCACAGUGCA-5' (antisentido) con fluoresceína acoplada.

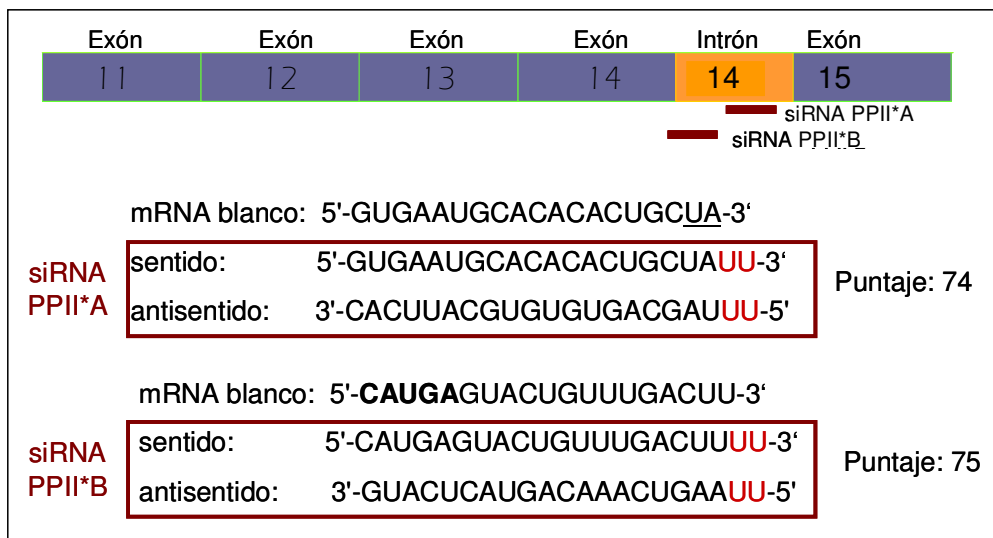


Figura 7. siRNAs diseñados para interferir la expresión de la PPII* en la rata. Se diseñó un par de siRNAs para interferir la expresión de la PPII*, empleando como estrategia que la secuencia tuviera como blanco solo nucleótidos del intrón 14 (siRNA-PPII*A), o nucleótidos del intrón 14 y algunos nucleótidos del exón 14 (siRNA-PPII*B). Arriba se muestran esquematizadas las regiones blanco de los siRNAs. Abajo se muestran las secuencias blanco de los mRNAs, las secuencias de los siRNAs diseñadas y a un lado, el porcentaje de criterios que las secuencias cumplen para funcionar eficientemente como siRNAs (puntaje) proveídos por el algoritmo de Dharmacon. La secuencia **UA** en el mRNA blanco para el siRNA-PPII*A corresponde a dos nucleótidos del primer codón prematuro de STOP en el mRNA de la PPII*. La secuencia **CAUGA** en el mRNA blanco para el siRNA-PPII*B corresponde a los nucleótidos del exón 14 que están en el límite con el intrón 14. Las UU señaladas en rojo, son modificaciones adicionales por Dharmacon.

Los siRNAs se transfectaron en los cultivos hipotalámicos empleando el *Neurofactor kit for primary mammalian cells* (Amaya), PEI, Lipofectamina 2000 o el agente transfectante de Santa Cruz.

La transfección empleando Amaya, se realizó de la manera recomendada por el fabricante ⁽¹⁵⁵⁾. De manera breve, una vez obtenidas las células hipotalámicas y realizado el conteo celular, se tomaron 5×10^6 células y se centrifugaron a 450 g por 5 minutos a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 100 μ l de la solución de transfección proveída por el fabricante, y el volumen necesario para tener los siRNAs a 640 o 1280 nM. Todo se llevó inmediatamente a una cubeta proveída por el fabricante, y se transfectó empleando el programa O-05. Inmediatamente las células fueron llevadas a 1 ml de medio Advanced DMEM (*Gibco*) suplementado (10% FBS, 0.25 % glucosa (*Sigma*), glutamina 3 mM (*Sigma*), 3.3 mg/ml insulina (*Sigma*) y antibiótico-antimicótico 0.005 % (*Gibco*) y se sembraron a una densidad de 1×10^6 células en platos de 60 mm o 200,000 células en pozos de 16.5 mm. La cosecha se realizó a las 48 y 72 horas.

La transfección empleando Lipofectamina 2000 se realizó de la manera sugerida por el fabricante ⁽¹⁵⁶⁾, empleando 1 μ l de Lipofectamina 2000 por cada 20 picomolas de siRNA. Sembramos 125,000 células en pozos de 16.5 mm, y 24 horas posterior a la siembra, se retiró el medio suplementado y se lavó dos veces con medio suplementado sin suero (0.25 % glucosa (*Sigma*), glutamina 2 mM (*Sigma*), 3.3 mg/ml insulina (*Sigma*) y antibiótico-antimicótico 0.005 % (*Gibco*)), dejando al final del segundo lavado, 400 μ l de medio. Posteriormente, se preparó la mezcla de transfección de la siguiente manera: en tubos estériles de 1.5 ml (tubo 1) se prepararon a los siRNAs (8.25 a 100 picomolas en 50 μ l de medio suplementado sin suero) y en tubos de polipropileno de 5 ml (tubo 2) se preparó a la Lipofectamina (la cantidad necesaria de Lipofectamina en 50 μ l de medio suplementado sin suero). Una vez transcurridos 5 minutos de preparada la lipofectamina, el contenido del tubo 1 se pasó al tubo 2, se mezclaron con vortex y la mezcla se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los 100 μ l de la mezcla de transfección se agregaron a cada pozo, de manera que la concentración final de los siRNAs en cada uno de los pozos fuera de 8.25- 100 nM. Entonces las células fueron incubadas a 7% de CO₂ y 37°C por cuatro horas, para después retirar la mezcla de transfección y agregar medio suplementado con suero en cada pozo. La cosecha se realizó a las 24, 48 y 72 horas. La fijación de la fluorescencia se realizó a las 48 horas.

Para realizar la transfección empleando polietilamina (PEI), se preparó el PEI como arriba se describe, empleando 0.402 μl de PEI por cada 10 picomolas de ácido nucleico ^(157, 158). Sembramos 125,000 células en pozos de 16.5 mm, y 24 horas posterior a la siembra, lavamos los pozos 1 vez con medio suplementado sin suero. Para preparar las mezclas de transfección, preparamos 5-20 picomolas de siRNA en 25 μl de NaCl 150 mM, e incubamos por 10 minutos a temperatura ambiente. Paralelamente, preparamos la cantidad de PEI necesaria para la cantidad de siRNA a transfectar en 25 μl de NaCl 150 mM e incubamos por 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, adicionamos la mezcla de PEI a la mezcla de siRNA, mezclamos en vortex e incubamos por 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese lapso, adicionamos 450 μl medio suplementado sin suero a las mezclas. Retiramos el medio de los pozos, y adicionamos 500 μl de la mezcla de transfección a cada pozo. Entonces las células fueron incubadas a 7% de CO₂ y 37° C por cuatro horas, para después retirar la mezcla de transfección y agregar medio suplementado con suero en cada pozo. La cosecha se realizó a las 24, 48 y 72 horas. La fijación de la fluorescencia se realizó a las 48 horas.

La transfección empleando el agente transfectante de Santa Cruz se realizó de la manera recomendada por el fabricante ⁽¹⁵⁹⁾. Se emplearon 2 μl del agente transfectante por cada 30 pmolas de siRNA. Sembramos 125,000 células en pozos de 16.5 mm, y 24 horas posterior a la siembra, lavamos los pozos 1 vez con medio suplementado sin suero. Para preparar las mezclas, en un tubo estéril de 1.5 ml, se prepararon a los siRNAs (10 a 20 picomolas en 50 μl de medio suplementado sin suero) y en otro tubo, se preparó la cantidad necesaria del agente transfectante en 50 μl de medio suplementado sin suero. Después, la solución con el siRNA se adicionó a la del transfectante, y se mezclaron suavemente con la pipeta, y se mantuvo de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente. Después de ello, el volumen se completó a 500 μl con medio suplementado sin suero, de manera que la concentración fuera de 8.25 a 33 nM. El medio se retiró de los pozos, y se adicionó esta mezcla de transfección. Entonces, las células fueron incubadas a 7% de CO₂ y 37°C por cinco horas, para después adicionar medio suplementado con el doble de suero en cada pozo. Las células se mantuvieron en la incubadora por 18 horas más, y entonces se retiró la mezcla y se reemplazó por medio suplementado con suero. La fijación de la fluorescencia se realizó 48 horas posterior a ello.

10.13 Ensayos de interferencia con siRNAs en cerebros de ratas

El siRNA PPII*A se inyectó intracerebroventricularmente en cerebros de ratas de la cepa Wistar empleando el agente transfectante de Santa Cruz. Como control negativo, se empleó el *Control siRNA-A* de Santa Cruz Biotechnonology. Como control de transfección, se empleó el *Control siRNA-A-fluorescein* de Santa Cruz Biotechnonology.

Para ello, individuos machos (*Rattus Norvegicus*) de la cepa Wistar fueron mantenidos en condiciones controladas de luz –oscuridad (12 por 12 horas), con agua y alimento *ad libitum* por dos meses, al alcanzar un peso que oscila entre 280 y 350 g.

Las ratas fueron anestesiadas entre las 9 y las 16 horas con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) intramuscularmente. Entonces, la cabeza de cada rata fue inmovilizada en un aparato estereotáxico (MD-3000, Bioanalytical Instruments) introduciendo en ángulo recto una barra en cada uno de los oídos y fijando los dientes incisivos a un soporte en el mismo plano.

Se realizó un corte a lo largo de la cabeza desde la altura del ojo y hasta la mitad del oído con una navaja para bisturí. Se retiró la piel pegada al cráneo con una espátula, y se limpió el cráneo con cotonetes hasta que el bregma fuera visible. Se localizó una cánula con el aparato estereotáxico en las siguientes coordenadas respecto al bregma: 0.8 mm posterior y 1.5 mm lateral derecho. Se hizo un orificio de un diámetro mayor al de la cánula con un taladro, y la cánula se introdujo 4.75 mm dorso-ventral con respecto al cráneo ⁽¹⁶⁰⁾. Asimismo, se taladraron dos orificios más de diámetro más pequeño, ambos lejanos al orificio de la cánula y lejanos entre si. En esos orificios se introdujeron dos tornillos, y tanto los tornillos como la cánula fueron fijados al cráneo con cemento dental.

Posterior a ello, las ratas se mantuvieron aisladas en cajas con alimento y agua *ad libitum*, y condiciones controladas de luz-oscuridad (doce por doce horas) por 5-7 días. Durante esos días, cada una de las ratas fue manipulada tres o cuatro veces, envolviendo a la rata en un trapo y cubriéndole los ojos por uno o dos minutos, de manera que la rata se acostumbrara a la manipulación y se facilitara la inyección el día del experimento.

El día del experimento, se tomó a cada una de las ratas y se llevó a un cuarto oscuro con luz roja. Cada uno de los siRNAs fue preparado de acuerdo a las condiciones empleadas previamente ⁽¹⁶¹⁾: 25 pmolas de siRNA en 5 µl de agua estéril y 5 µl de agente transfectante, transcurriendo

entre 15 y 35 minutos de preparación previo a la inyección en el cerebro. Cada una de las ratas fue envuelta en un trapo y se realizó una inyección de 10 μ l en el ventrículo derecho a una velocidad de 2.5 μ l por minuto.

Después de la inyección, se colocó de nuevo la tapa de la cánula, y la rata fue devuelta a su caja, y mantenida por 48 horas más en las condiciones descritas antes. Transcurrido ese lapso, las ratas fueron decapitadas, y sus cerebros extraídos y congelados sobre hielo seco en el caso de la transfección de los siRNAs control A Santa Cruz y siRNA PPII* A. Los cerebros se mantuvieron a -80 C hasta su uso.

Para el caso de las ratas en las que se transfectó el siRNA control A Santa Cruz-*fluorescein*, transcurridas 24 horas después de la inyección, las ratas fueron inyectadas letalmente con fentobarbital. Una vez que se encontraron anestesiadas, sus extremidades fueron sujetas con agujas sobre una tabla, y se realizó un corte en el pecho hasta visualizar el corazón. Se realizó un corte en el ventrículo derecho y se introdujo una aguja redondeada por la que se estaba bombeando PBS 1X (pH 7.4, temperatura ambiente). Esta aguja se empujó hasta introducirla en la arteria pulmonar, y una vez ahí, se sujeto con una pinza. Inmediatamente se realizó un corte en la aurícula izquierda. El bombeo se mantuvo por 2 minutos, a una velocidad de 10 ml/minuto. Transcurrido ese tiempo, se comenzó a bombear paraformaldehído al 4% en PBS 1X. El bombeo se realizó a la misma velocidad por un lapso de 18 minutos. Transcurrido ese tiempo, la rata fue decapitada, y el cerebro extraído y colocado en paraformaldehído al 4 %. Los cerebros se mantuvieron en paraformaldehído por 24 horas a 4° C. Posterior a ello, los cerebros se pasaron por PBS 1X dos veces. Después de ello, los cerebros fueron crioprotegidos colocándolos en 30 ml de sacarosa al 30% preparada en PBS 1X. Se mantuvieron en agitación constante por dos días a 4°C hasta que la sacarosa hubiera difundido dentro de los cerebros (los cerebros se van al fondo del tubo en el que se colocan). Entonces cada uno de los cerebros se colocó en un molde de aluminio, en donde se colocó *tissue tek* hasta que el cerebro quedara completamente sumergido. El cerebro se congeló en este molde a -20° C y fue almacenado ahí hasta su uso.

10.14 Visualización de fluoresceína en los cerebros de ratas

Los cerebros previamente fijados en paraformaldehído fueron rebanados en un criostato en rebanadas de 20 μm a una temperatura entre -14 y -16 °C en la penumbra. Las rebanadas fueron colocadas en laminas recubiertas con gelatina y almacenadas a -20° C en la oscuridad.

Para observarlas al microscopio, las rebanadas fueron montadas en glicerol al 50% preparado en PBS 1X. Inmediatamente se realizó la visualización en un microscopio de fluorescencia con ayuda del programa Mercaptor.

10.15 Disección de regiones de cerebros de ratas

A partir de los cerebros almacenados a -80° C y con base a las coordenadas y referencias anatómicas reportadas en el atlas de Palkovitz ⁽¹⁶²⁾, se disectaron mediante cortes manuales las siguientes regiones: Septum, Hipocampo anterior e Hipocampo posterior. Cada uno de los tejidos fue colocado en un tubo estéril de 1.5 ml y almacenado a -80° C hasta su posterior uso

10.16 Extracción de RNA total

A partir de las células cosechadas, se extrajo RNA total siguiendo el método descrito previamente ⁽¹⁶³⁾. Brevemente, se agregaron 400 μl de solución D por cada 250,000-400,000 células (4M tiocinato de guanidina, 25 mM. citrato de sodio pH 7, 0.5 % sarcosil, 0.1 M β -mercaptoetanol), y se raspó con el émbolo de una jeringa estéril. El raspado fue transferido a un tubo estéril de 1.5 ml, y se mantuvo a 4°C. Se precipitaron sales y proteínas agregando 40 μl de acetato de sodio (2M, pH 4), 400 μl de fenol (pH 8) y 90 μl de cloroformo-isoamilalcohol (49:1), mezclando en el vortex después de agregar cada reactivo. Las muestras se incubaron por 15 minutos a 4°C y se centrifugaron a 14000 g por 17 minutos, a 4° C. Se recuperó la fase acuosa superior, y el RNA se precipitó con 450 μl de isopropanol, mezclando en vortex e incubando 30 minutos en hielo seco humedecido con etanol. Después de ese tiempo, las muestras se descongelaron a 4° C, y se llevó a cabo una segunda centrifugación a 14000 g, por 22 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 de 12 a 72 horas a -20°C. Posteriormente, las muestras se descongelaron a

4°C, se mezclaron en vortex y se centrifugaron a 14000 g, por 22 minutos, a 4°C. Se desecharon aproximadamente 550 µl del sobrenadante, y la pastilla se centrifugó a 14000 g por 22 minutos a 4°C con 400 µl de etanol al 70%. Todo el sobrenadante fue desechado, y los tubos permanecieron invertidos de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso de etanol de las pastillas. Las pastillas fueron resuspendidas en agua estéril tridestilada tratada con Dietilpircarbonato (Agua con DEPC), y se tomó una alícuota de 2 µl. Con la alícuota de 2 µl, se determinó la concentración de RNA haciendo una dilución 1:100, y leyendo la absorbancia a 260 nm (Biofotometro, *Eppendorf*). La concentración se estimó de acuerdo a la siguiente fórmula $[\text{RNA}] = \text{absorbancia } 260\text{nm} \times 0.04 \times \text{factor de dilución}$. La lectura de las muestras también se llevó a cabo a 280 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 µg de RNA de cada una de las muestras, que fueron congeladas inmediatamente a -80°C hasta su uso.

10.17 Electroforesis desnaturalizante para RNA

Para visualizar a las subunidades 18 S y 28 S ribosomales del RNA, se separaron por electroforesis 2 µg de RNA en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

Para ello, en material esterilizado por calor y/o lavado con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%, 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 °C, se agregó formaldehído al 37% (2.2% del volumen final del gel).

Todas las muestras se llevaron al mismo volumen final con agua tratada con DEPC. De acuerdo con ese volumen final, se adicionaron cuatro volúmenes de *buffer de carga para RNA* (ver preparación en apéndice). Las muestras se desnaturalizaron calentándolas a 65°C por 5 minutos. Posteriormente se incubaron 5 minutos a 4°C e inmediatamente se cargaron en los pozos del gel, y se separaron a 100 V por 1 hora en buffer MAE 1X, pH 7, con recirculación constante del *buffer*. Las muestras fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV.

10.18 Transcripción Reversa

La transcripción reversa (RT) se llevó a cabo de la manera previamente descrita ⁽¹⁶⁴⁾, 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 ditioneitol (DTT, *Invitrogen*; 0.1M), 0.6 µl de dNTPs (*Invitrogen*; 10 mM) y 0.5 µl de transcriptasa reversa (RT M-MLV, *Invitrogen*; 200 unidades/µl). Brevemente, 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. 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.

10.19 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo empleando 2 o 3 µl de cDNA en un volumen final de reacción de 25 µl, con 17.5 o 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).

Se emplearon 2 µl de cDNA para amplificar ciclofilina y G3PDH, y 3 µl de cDNA para amplificar PPIIC, PPII* y TRH.

Los oligonucleótidos para amplificar el mRNA de ciclofilina de rata fueron los empleados previamente ⁽¹⁶⁵⁾: CycS: 5'-GGGGAGAAAGGATTTGGCTA-3' y CycAS: 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 casos fueron: 24 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°C por 7 minutos.

Para amplificar al mRNA de la PPII* de rata, empleamos los oligonucleótidos empleados previamente ^(86, 144) PPII*up: 5'-GTGCAGGCCTGATTGATGATG-3' y PPII*down: 5'-GCAGTGTGTGCATTCACACAG-3', a una concentración de 25 pmol/μl. El producto generado es de 339 p.b. Las condiciones de la PCR para todos los casos fueron: 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° C por 7 minutos.

Para amplificar al mRNA de la PPII^C de rata, empleamos los oligonucleótidos empleados previamente ⁽¹⁴⁴⁾: PPII^Cup: 5' TCAATCAAACCTGGCTACTTCA 3' y PPII^Cdown: 5' CCCTCCGTAGCTCTTCATGT 3' a una concentración de 25 pmol/μl. El producto generado es de 399 p.b. Las condiciones de la PCR para todos los casos fueron: 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° C por 7 minutos.

Para amplificar al mRNA del TRH de rata, empleamos los oligonucleótidos empleados previamente ⁽¹⁶⁰⁾: TRHup: 5' CCCTGGATGGAGTCTGATGT3' y TRHdown 5' GACAGCTAGTGAAGGGAACAGG 3' a una concentración de 25 pmol/μl. El producto generado es de 356 p.b. Las condiciones de PCR para todos los casos fueron: 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° C por 7 minutos.

Para amplificar sólo al mRNA de la PPII^C de humano, diseñamos los oligonucleótidos hPPIIup: 5'-GCTGGGGAACATCAATCAAAC-3' y hPPII^Cdown: 5'-CTGAGTTCTTCATGTTGGTAGG -3' y los empleamos a una concentración de 25 pmol/μl. El producto generado es de 408 p.b. Determinamos las condiciones óptimas de amplificación realizando un gradiente de temperaturas desde 56 hasta 64°C en cDNA de células SK-N-MC mantenidas 4 días en cultivo, y posteriormente amplificamos a 57 °C a 25, 27, 29, 32, 33 y 35 ciclos en cDNA de células SK-N-MC mantenidas por 1 y 4 días en cultivo. Las condiciones de PCR que determinamos adecuadas fueron: un paso inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 29 ciclos que consistieron en 95° C por 45 segundos de desnaturalización, 57° 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 únicamente al mRNA de la PPII* diseñamos los oligonucleótidos humanPPII*UP1: 5'-GCTGGGGAACATCAATCAAAA-3' y humanPPII*DOWN: 5'-CAGCTCTAGGGGTAAAGAAGAGG-3'. El producto generado es de 440 p.b. Determinamos las condiciones óptimas de amplificación realizando un gradiente de temperaturas desde 59 hasta 66 °C en cDNA de células SK-N-MC mantenidas 4 días en cultivo, y posteriormente amplificamos a 61 °C a 25, 27, 29, 32, 33 y 35 ciclos en cDNA de células SK-N-MC mantenidas por 1 y 4 días en cultivo. Las condiciones de PCR que determinamos como adecuadas fueron: un paso inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 29 ciclos que consistieron en 95° C por 45 segundos de desnaturalización, 61° 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 al mRNA de la Gliceraldehído-3 Fosfato deshidrogenasa (G3PDH) humana empleamos un juego de oligonucleótidos cuyas secuencias fueron proporcionadas por el Dr. Gustavo Pedraza: humanoG3PDHup: 5'-TGAAGGTAGGAGTCAACGGATTTGGT-3' y humanoG3PDHdown: 5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'. El producto generado es de 973 p.b. Para determinar las condiciones óptimas de amplificación realizamos un gradiente de temperaturas a 59, 60, 61 y 62 °C seguido de una amplificación a 18, 20, 22 y 24 ciclos en cDNA de células SK-N-MC mantenidas 2 días *in vitro*. Las condiciones de PCR que determinamos como óptimas fueron: un paso inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 20 ciclos que consistieron en 95° C por 45 segundos de desnaturalización, 61° 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.

10.20 Electroforesis para productos de PCR

Los productos de PCR se separaron por electroforesis 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 separaron 0.5 µg de marcador de 100 p.b. (100 p.b. DNA ladder; *New England Biolabs*). Para visualizar a los cDNAs de la PPII^C (rata o humano), PPII* (rata o humano), TRH, y G3PDH humana 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 cianol, 30% de Glicerol en agua). Para el caso de la ciclofilina o de la G3PDH de rata, tomamos 5 μ l de los productos de PCR y los llevamos a un volumen de 12 μ l con 5 μ l de agua y 2 μ l 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 concentración de los productos se llevó a cabo usando el programa *Multi-Analyst* (*Biorad*).

10.21 Obtención de membranas celulares

La obtención de membranas se llevó a cabo a través del método previamente empleado con algunas modificaciones ⁽¹⁶⁷⁾. Brevemente, este consistió en cosechar a las células y congelarlas a -80°C . Las membranas se extrajeron empleando *buffer* fosfatos de sodio (50mM, pH 7.5; ver apéndice) con PMSF a 0.3 μ M, 0.1 mg/ml de DNAsa I, Pepstatina a 1 μ M, Yodoacetamida a 1 mM y MgCl_2 a 2.5 mM, usando un émbolo de jeringa de 1 ml para pozos de 15.6 mm o 3 ml para cajas de 35 o 60 mm. Se rasparon 4 (5-8 DIV) u 8 pozos (1-4 DIV) de 15.6 mm (600,000 células por pozo) por cada condición, empleando por cada pozo 300 μ L de *buffer* fosfatos, o bien 1 ml para 600,000-1000000 células por caja de 35 mm, o 1500000-2000000 por caja de 60 mm. Sonicamos por 3 segundos. Los lisados celulares se transfirieron a tubos de 3 ml, y entonces, se llevó a cabo una centrifugación a 125,000 g por 45 minutos a 4°C . Las pastillas fueron resuspendidas en 200-250 μ l de *buffer* fosfatos de sodio sí se iban a emplear para realizar ensayos enzimáticos para la PPII, o 50 μ l de *buffer* fosfatos de sodio con inhibidores de proteasas (PMSF a 0.3 μ M, Pepstatina a 1 μ M y Yodoacetamida a 1 mM) sí los extractos se iban a emplear para detectar la expresión de proteínas por medio de *Western blot*.

Para el caso de la extracción de membranas de las regiones del cerebro, empleamos *buffer* fosfatos de sodio con PMSF a 0.3 μ M, Pepstatina a 1 μ M y Yodoacetamida a 1 mM. Adicionamos 300 μ l a Septum e hipocampo anterior, y 400 μ l a corteza frontal e hipocampo posterior. Sonicamos el tejido por 3 segundos. Centrifugamos a 17,000 g como se empleó previamente ⁽¹⁴⁰⁾. Resuspendimos las pastillas en 500-800 μ l de *buffer* fosfatos de sodio.

10.22 Ensayo para cuantificar proteína

Para cuantificar la proteína en membranas de células se empleó el método de Bradford ⁽¹⁶⁸⁾. Brevemente, este consistió en tomar 2-3 μl de muestra, completar a 100 μl con buffer fosfatos, adicionar 700 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 10-20 minutos a temperatura ambiente (25°C) 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

10.23 Ensayo enzimático para la piroglutamil peptidasa II

El ensayo para medir la actividad enzimática de la PPII fue modificado del empleado previamente ⁽⁸⁶⁾. Brevemente, este consistió en agregar en tubos de 0.6 ml, 5 μl de bacitracina y N-etilmaleimida (10 mM; ver preparación en apéndice), 20 μl de DAPIV (Dipeptidil Peptidasa IV; 2 miliunidades de enzima), el volumen de membranas suficiente para tener de 50 a 80 μg de proteína, llevando a un volumen final de 250 μl con *buffer* fosfatos de sodio. Se incubaron las muestras por 10 minutos a 37°C con agitación suave para posteriormente agregar 10 μl de TRH β -naftilamida (10 mM). Incubamos las muestras por tres horas, y tomamos alícuotas de 50 μl de cada muestra a los 0, 60, 120 y 180 minutos (Ver figura 8). Para detener la reacción en las alícuotas, se agregaron 50 μl de metanol absoluto a 4°C, y posteriormente el volumen se completo a 400 μl con solución 1:1 de *buffer* fosfatos de sodio- metanol, mantenido a 4°C.

Las muestras se almacenaron a -20°C, por 12 - 72 horas, o bien, se mantuvieron a 4°C para leer la fluorescencia unas horas después. Las muestras se descongelaron, y se centrifugaron a 13,800 g por 3 minutos a temperatura ambiente (modelo 5415, *Eppendorf*). Entonces se tomaron 350 μl de los sobrenadantes, y se determinó la β -naftilamida (βNA) liberada a 335 nm de excitación, y 410 nm de emisión en un espectrofluorómetro (modelo L550B, *Perkin Elmer*), leyendo de manera paralela una curva patrón de 0 a 200 pmolas de β -naftilamida (ver preparación en apéndice).

En este punto es importante mencionar que para determinar actividad en los cultivos primarios hipotalámicos, la cantidad mínima de proteína a emplear es de 60 μg , de manera que no se corra el riesgo de estar en el límite mínimo de detección de actividad de la PPII. Para el caso de la línea SK-N-MC, la actividad de PPII es lo suficientemente alta como para emplear 50 μg de proteína y no correr el riesgo de estar en el límite mínimo de detección. De la misma manera, para el caso de las regiones de cerebros de rata empleadas en este trabajo.

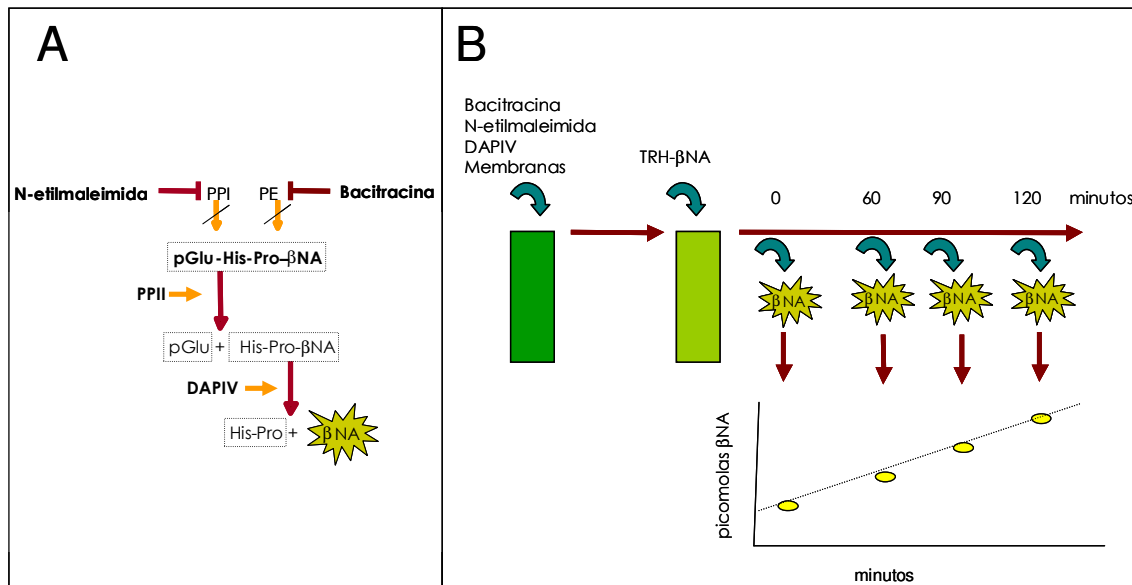


Figura 8. Ensayo enzimático para la PPII. **A.** La base de este ensayo consiste en que la PPII^C hidroliza al TRH- β Naftilamida (TRH- β NA: pGlu-His-Pro- β NA) en pGLU e His-Pro- β NA. Una vez que la PPII^C ha actuado, la DAPIV corta entre Pro y β NA, y esta última puede ser detectada entonces en un espectrofluorómetro. Ya que la enzima Piroglutamil Peptidasa I (PPI) corta el mismo enlace que la PPII^C, y la Prolil Endopeptidasa (PE) puede separar a la β NA del TRH- β NA, se emplean inhibidores para estas enzimas (N-etilmaleimida para la PPI, y Bacitracina para la PE). **B.** El ensayo comienza incubando las proteínas de membrana a 37 ° C en presencia de N-etilmaleimida, Bacitracina y DAP-IV. Una vez transcurridos 10 minutos de incubación, se agrega el TRH- β NA y se deja incubando en agitación suave a 37°C por 2 horas. Se toman alícuotas a los 0, 60, 90 y 120 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 cuantifican las picomolas de β NA en un espectrofluorómetro, se grafican contra el tiempo (minutos), y se obtiene la pendiente de la recta. Se realiza un cociente de la pendiente entre la cantidad de proteína empleada (mg), y así se obtiene la actividad específica de PPII, que se expresa como: picomolas de β -naftilamida/ minuto/mg de proteína.

10.24 *Western blot* para detectar proteínas con cola de histidinas

Los extractos membranales para este ensayo se obtuvieron como se especifica en el apartado 9.21 a partir de células SKNMC transfectadas por 48 horas con los vectores pCDNA3.1/HisA y pCDNA3.1/HisA/PPII*.

La separación de proteínas se realizó en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 7 % (ver preparación en el apéndice). Para ello, todas las muestras (25 µg de membranas) se llevaron a un volumen final de 20 µl y se les adicionó 4 µl de buffer de carga 6X (ver preparación en apéndice). Las muestras se hirvieron 5 minutos y se mantuvieron a 4° C cinco minutos más, para cargar inmediatamente en el gel. La separación de las muestras en el gel se llevó a cabo a 100 V empleando buffer de corrida (50.07 mM Trizma, 380.08 mM Glicina, 6.93 mM SDS). Una vez concluida la corrida del gel, este fue transferido a una membrana de PVDF (Inmobilon P) empleando buffer de transferencia (25.01 mM Trizma, 192.22 mM Glicina, 0.346 mM SDS y 20% metanol) a 0.2 Amp por 2 horas a temperatura ambiente. Una vez detenida la transferencia, se tiñó la membrana con rojo de Ponceau (Ponceau S al 0.1 % en ácido acético al 1%) y se destiñó con agua destilada. La membrana se bloqueó en TBS-T (20.406 mM Tris-HCl, pH 7.4; 149.99 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) con leche descremada al 5% por 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-hististinas acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma) se empleó a una dilución de 1:1000 en TBS-T con BSA al 3 %. Posteriormente la membrana se lavó tres veces con TBS-T por 10 minutos. La membrana se incubó con los sustratos para la fosfatasa alcalina: 50 µl de NBT (*Nitro blue tetrazolium chloride*) y 35 µl de BCIP (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*) en 10 ml de *buffer B* (ver preparación en apéndice) en la oscuridad hasta que se revelaran las bandas.

11. RESULTADOS

Parte 1.- Sobreexpresión de la PPII*

Para poderle atribuir una función a una molécula, dos ensayos que resultan esenciales son la expresión y la eliminación de esta. Previamente en nuestro grupo se postuló a la PPII* de rata como dominante negativa de la PPII^C, ya que al sobreexpresarla, se logró disminuir la actividad de la PPII^C de manera dependiente de dosis ⁽⁸⁶⁾. Sin embargo, al haberse realizado esos ensayos en células que de manera endógena no expresan actividad de PPII (COS-7 y C6) ⁽¹⁴⁵⁾, se consideró que el realizar estos ensayos en células que si lo hicieran, permitirían aproximarse más al papel funcional de la PPII* en la naturaleza.

En el presente estudio, comenzamos trabajando con las células SK-N-MC, un neuroepiteloma humano en el que previamente se había encontrado actividad de PPII ⁽¹⁶⁹⁾.

Empleando la misma estrategia que se utilizó previamente para amplificar a las formas PPII^C y PPII* de rata ⁽¹⁴⁴⁾, diseñamos dos juegos de oligos para amplificar a sus contrapartes en humano (Figura 9 A). Logramos amplificar a ambas formas a partir del cDNA de las células SK-N-MC, y la identidad de estos productos de PCR fue corroborada a través de un análisis de secuenciación. Al realizar un gradiente de temperatura (Figuras 9 B y C) y amplificación a diferente número de ciclos (Figuras 9 D y E), determinamos que la temperatura de alineamiento óptima para amplificar a los mRNAs de la PPII* y PPII^C es de 61 ° C y 57 ° C respectivamente, en tanto que a 29 ciclos de amplificación, no hay saturación, y se pueden detectar las señales de ambos mRNAs.

Ya que para todo ensayo de PCR, se requiere de un control interno de amplificación, también determinamos las condiciones óptimas de amplificación para un juego de oligonucleótidos que amplifican al mRNA de la G3PDH (Figura 10). Encontramos que en cDNA de las células SK-N-MC, dichas condiciones son 61 ° C de temperatura de alineamiento y 20 ciclos de amplificación.

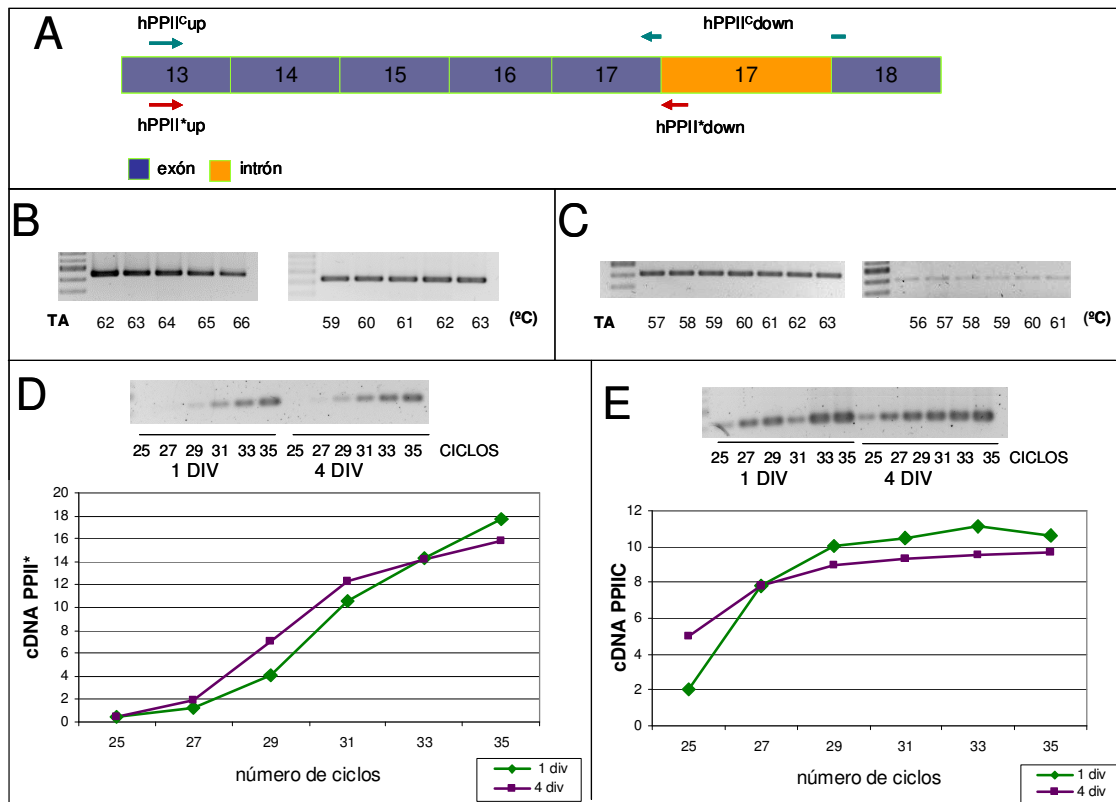


Figura 9. Determinación de las condiciones para amplificar a los mRNAs de las PPII^C y PPII* humanas. A. Se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos para amplificar a los mRNAs de la PPII^C y PPII*. Para amplificar al mRNA de la PPII^C, el oligonucleótido antisentido hibrida con la unión de los exones 17 y 18, en tanto que para amplificar al mRNA de la PPII*, el oligo antisentido hibrida cerca del inicio del intrón 17. B y C. Se realizaron gradientes de temperatura de alineamiento (TA) para amplificar a los mRNAs de la PPII* y PPII^C, encontrándose para el primero, una temperatura ideal de 61 ° C (B) y para el segundo, una temperatura ideal de 57 ° C (C). D y E. A las temperaturas de alineamiento determinadas como ideales, se realizaron amplificaciones a diferente número de ciclos en cDNA de células SK-N-MC mantenidas 1 y 4 días en cultivo (div). Lo que se encontró, es que para ambos mRNAs no hay saturación y es posible detectar la señal a 29 ciclos de amplificación.

Las fotos y gráficas mostradas son experimentos realizados una sola vez

Una vez determinadas dichas condiciones, mantuvimos a las células de 1 a 4 días en cultivo para posteriormente determinar expresión de los mRNAs PPII^C y PPII*, así como actividad de PPII (Figura 11). Lo que encontramos fue que las células presentan actividad de PPII a los 1 y 4 días de cultivo, sin cambios significativos. Asimismo, encontramos que expresan a los mRNAs PPII^C y PPII* en niveles constantes durante los 4 días de cultivo, y que el mRNA de la PPII^C se expresa siempre mucho más que el de la PPII* ($p < 0.01$).

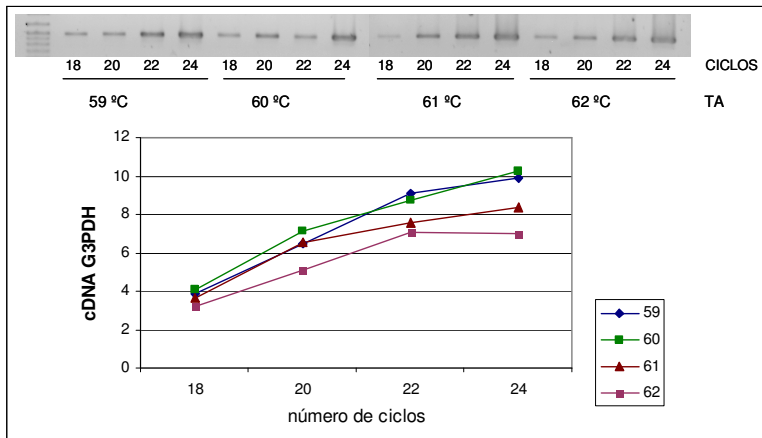


Figura 10. Determinación de las condiciones para amplificar al mRNA de la G3PDH humana. Se realizó un gradiente de temperatura de alineamiento (TA) y amplificación a diferente número de ciclos, encontrándose que a 61 ° C de TA y 20 ciclos de amplificación es posible detectar la señal sin saturación.

La foto y gráfica mostradas es un experimento realizado una sola vez

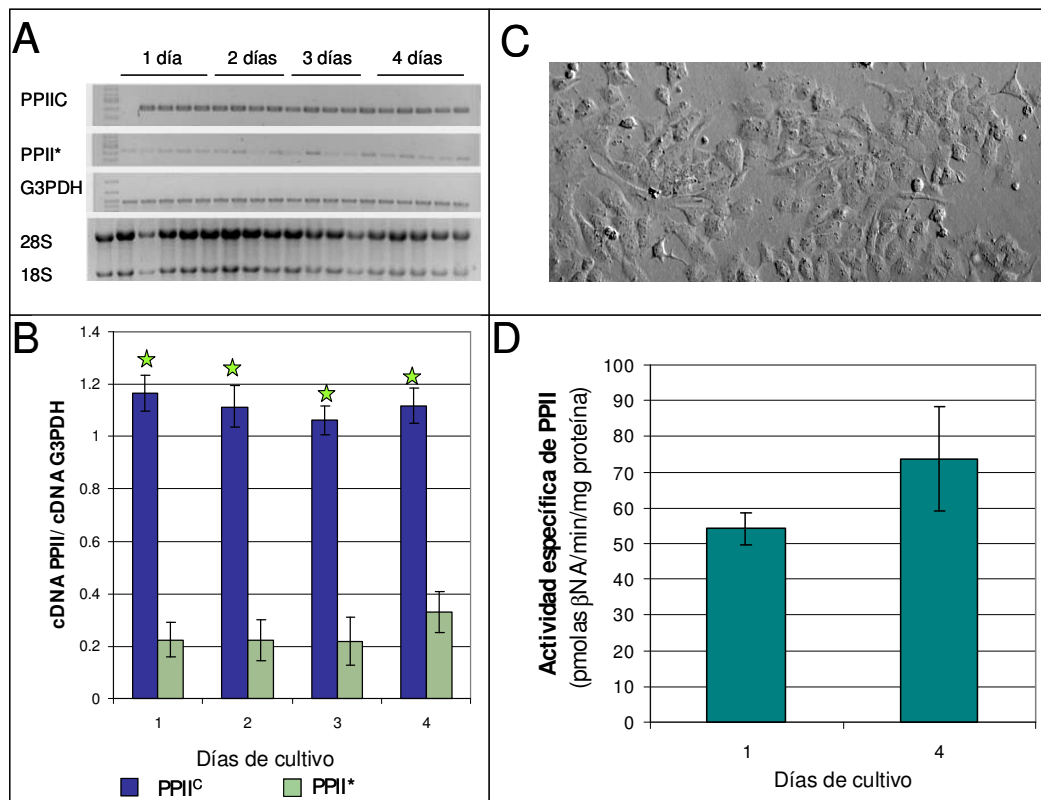


Figura 11. Las células SK-N-MC son un sistema ideal para sobreexpresar a la PPII*. A y B. Se amplificaron los mRNAs de la PPII^C y PPII* en células SK-N-MC mantenidas de 1 a 4 días en cultivo. Como control se amplificó al mRNA de la G3PDH. A. Se muestra un gel representativo de los productos de PCR separados en un gel, así como las subunidades ribosomales 28 y 18 S. B. Se graficó la señal de los mRNAs de la PPII corregida con la señal de la G3PDH. Se observa que durante los 4 días de cultivo, el mRNA de la PPII^C se expresa más que el de la PPII* ($p < 0.01$; $n = 3$). C. Fotografía representativa de células SK-NM-C mantenidas por 4 días en cultivo D. Las células SK-N-MC presentan niveles altos de actividad de PPII a los 1 y 4 días de cultivo.

Los resultados se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm SE.

Procedimos a realizar los ensayos de sobreexpresión de la PPII*, y encontramos que ésta tiene un efecto inhibitor sobre la actividad endógena de PPII ($p < 0.05$) en esta línea celular (Figura 12B). Corroboramos que este efecto se debe a la sobreexpresión de la PPII* pues detectamos su señal por *Western blot* empleando un anticuerpo anti-histidinas (Figura 12A). De manera paralela, sobreexpresamos a los vectores pDs-red2-N1 (Figura 12 C) y pIREShrGFP en estas células, encontrando una eficiencia de transfección del 37% (Figura 12 D).

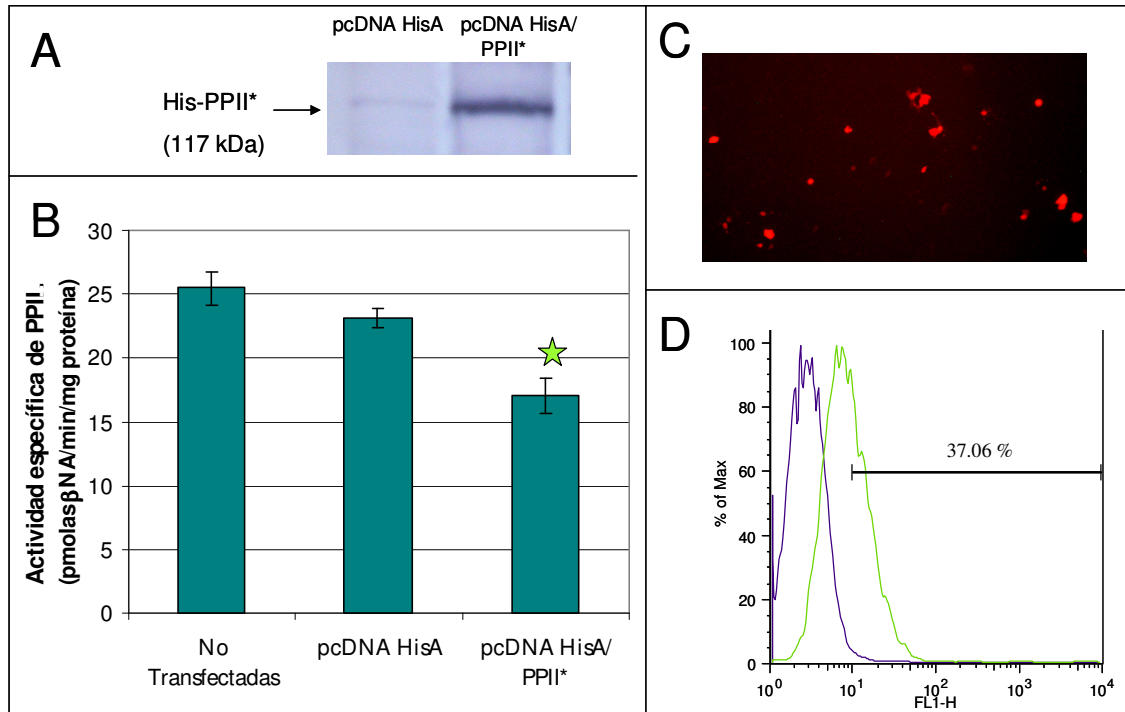


Figura 12. La sobreexpresión de la PPII* disminuye la actividad de la PPII en las células SK-N-MC.

A. Se sobreexpresó a la PPII* con una etiqueta de histidinas en las células SK-N-MC (pcDNA HisA/PPII*), y con un anticuerpo anti-histidinas se corroboró su expresión en extractos de estas células. Como control se emplearon extractos de células en las que se sobreexpresó al vector vacío (pcDNA HisA). **B.** 24 horas post-transfección, la sobreexpresión de la PPII* disminuyó la actividad de la PPII (★ $p < 0.05$ pcDNA HisA/PPII* vs pcDNA HisA; pcDNA HisA/PPII* vs No transfectadas). **C.** Fotografía representativa de las células SK-N-MC transfectadas con el vector pDsRed2-N1. **D.** Se estimó una eficiencia de transfección del 37.06% al pasar por el citómetro de flujo a las células SK-N-MC transfectadas con el vector pIRES-hr-GFP.

Los resultados se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm SE.

Parte 2.- Interferencia con la expresión de la PPII*

Una vez que vimos que la sobreexpresión de la PPII* fue capaz de regular negativamente la actividad de la PPII en un contexto neuronal, quisimos ver si interfiriendo la expresión de la PPII*, la actividad de la PPII aumentaba.

Como contexto para realizar estos ensayos, escogimos al cultivo primario hipotálamico. Esto por tres razones principales: 1) por la amplia experiencia que se tiene en nuestro grupo en cuanto a su realización, 2) porque el hipotálamo en desarrollo presenta actividad de PPII⁽¹⁴⁰⁾ y expresión de los mRNAs de PPII^C y PPII^{*}⁽¹⁷⁰⁾, y 3) porque previamente se ha demostrado que resultados obtenido durante el desarrollo del cultivo reproducen lo observado *in vivo* durante el desarrollo del hipotálamo (e.g. expresión del TRH)⁽¹⁶⁴⁾, lo que nos hizo pensar que este resultaría un buen sistema.

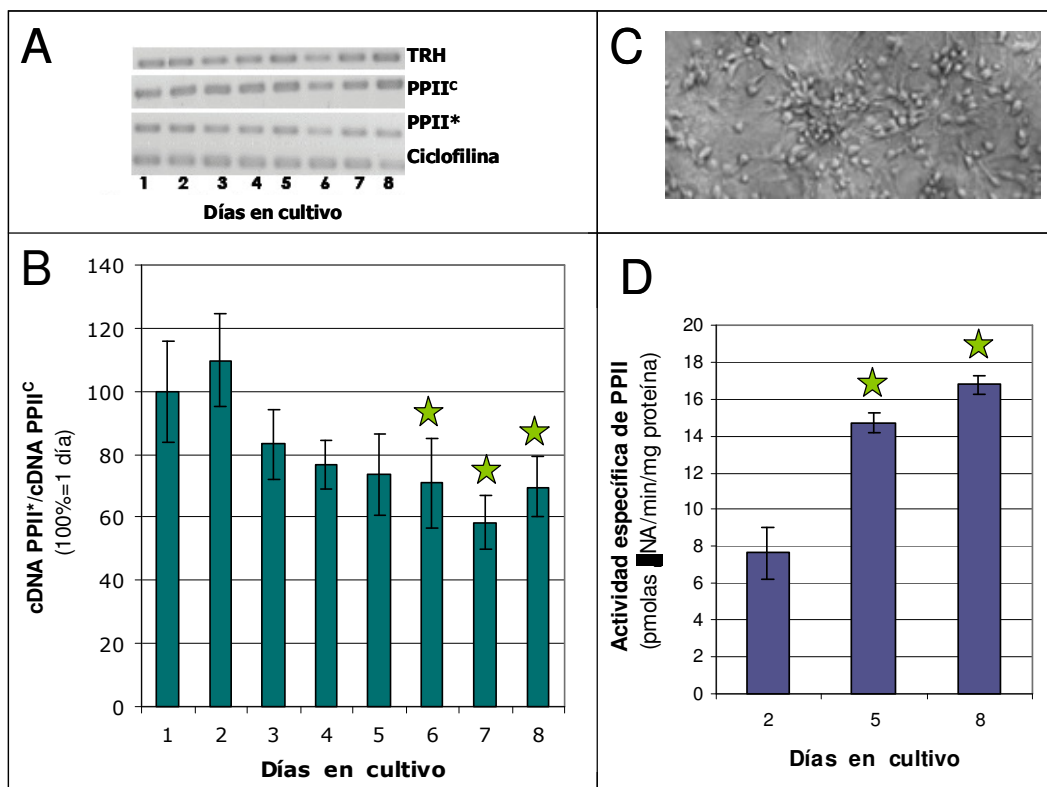


Figura 13. La expresión del mRNA de PPII* correlaciona de manera negativa con los cambios en la actividad de la PPII en el cultivo hipotalámico. A y B. Se amplificó a los mRNAs de la PPII^C, PPII^{*} y TRH en cDNA de células primarias hipotalámicas mantenidas de 1 a 8 días en cultivo. Como control se amplificó al mRNA de la ciclofilina. **A.** Se muestra un gel representativo de los productos amplificados. **B.** Se muestra el cociente de la señal de la PPII^{*} entre la de la PPII^C. Dicho cociente disminuye a partir de los 6 días de cultivo ($p < 0.05$; 2 días vs. 6, 7 y 8 días; $n = 3$). **C.** Fotografía representativa de las células hipotalámicas mantenidas en cultivo. **D.** La actividad de la PPII aumenta a los 5 y 8 días de cultivo ($p < 0.05$; 2 días vs. 5 y 8 días; $n = 3$).

Los resultados se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm SE.

Lo primero que hicimos, fue realizar cinéticas en las que mantuvimos a las células de 1 a 8 días en cultivo, para determinar expresión de los mRNAs de PPII^C y PPII^{*}, así como actividad de PPII (Figura 13). Observamos que ambos mRNAs se expresan durante todo el tiempo del cultivo, y con paralelismo en su expresión. Al determinar la relación de expresión del mRNA de la PPII^{*} respecto al de la PPII^C (cDNA PPII^{*}/cDNA PPII^C), observamos que dicha relación disminuye de manera inversa al comportamiento de la actividad, mostrando los niveles mas bajos ($p < 0.05$; 6, 7 y 8 días en cultivo) cuando la actividad es la mas alta ($p < 0.05$; 5 y 8 días en cultivo).

Como estrategia de interferencia, decidimos emplear RNAs de interferencia pequeños (siRNAs). Para ello diseñamos en el algoritmo de *Dharmacon* dos siRNAs que estuvieran dirigidos contra el segmento del intrón 14 que está presente en el mRNA de la PPII^{*} (ver ubicación en figura 7).

Ya que los cultivos primarios neuronales son difíciles de transfectar, empleamos el *kit* para transfectar cultivos primarios de neuronas de mamífero de *Amara*, kits con los que se sabe que se obtiene una eficiencia de transfección más alta que con otros sistemas de transfección. Se determinó en nuestro grupo que el programa O-05 de *Amara* con el kit para transfectar neuronas primarias de mamífero, es el mas eficiente para el cultivo hipotalámico (>50%) y en el que las células hipotalámicas sufren menos daño ⁽¹⁷¹⁾. Entonces transfectamos células con los dos siRNAs para la PPII^{*} 1280 nM (concentración dentro del rango recomendado por *Amara*), y determinamos los cambios en la expresión de los dos mRNAs a las 48 y 72 horas post-transfección.

Lo que encontramos en un primer experimento es que la expresión del mRNA de la PPII^{*} disminuyó en aproximadamente un 50% a las 48 y 72 horas (Figura 14).

Repetimos el ensayo de interferencia de la PPII^{*} y cosechamos solo a las 72 horas. Como en el primer experimento, observamos una disminución en aproximadamente el 50% del mRNA de la PPII^{*}. Sin embargo, al determinar la expresión de los mRNAs de la PPII^C y TRH observamos disminuciones en el mismo grado que para el mRNA de la PPII^{*}. Extrajimos membranas y determinamos actividad enzimática de PPII. Cabe destacar que el rendimiento de proteína fue muy bajo tanto para las células transfectadas con el NT-siRNA como para las transfectadas con los PPII^{*}-siRNAs respecto al que normalmente se obtiene de células hipotalámicas en cultivo. Al determinar actividad enzimática, ésta resultó muy baja en las células transfectadas con el NT-

siRNA (2.6 pmolas β NA/min/mg proteína), e indetectable en las células transfectadas con los PPII*siRNAs.

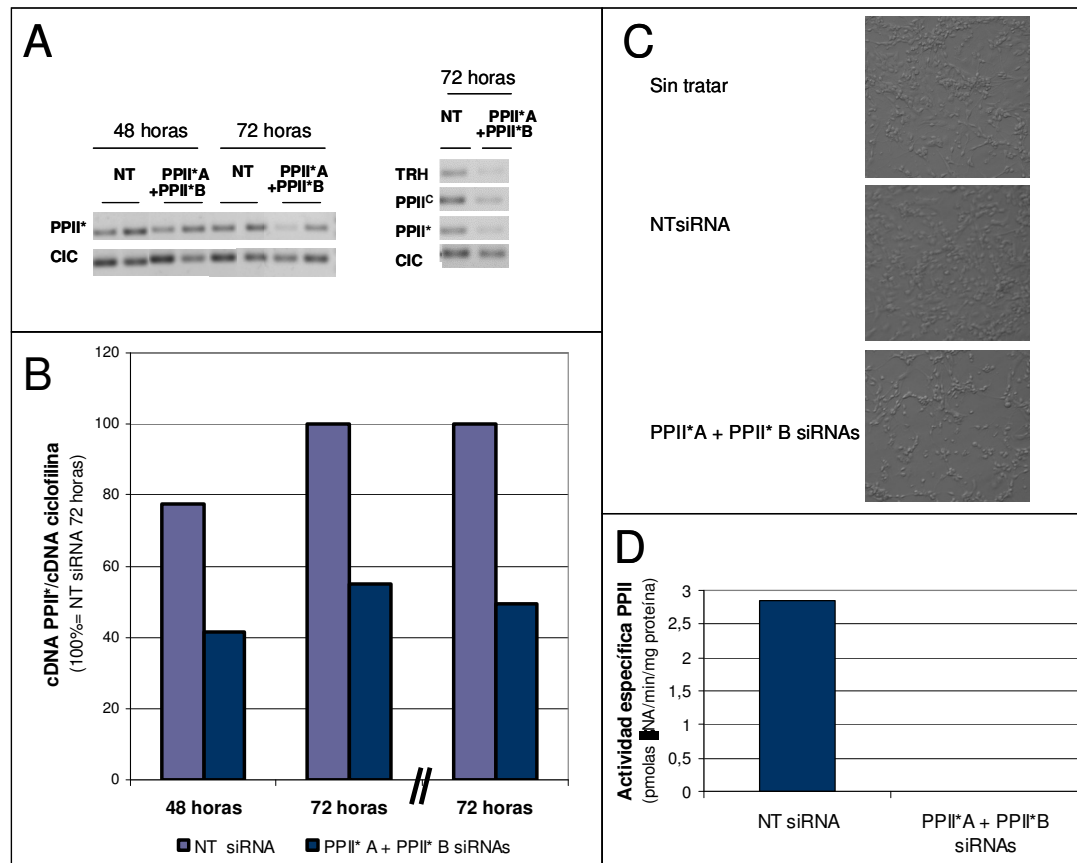


Figura 14. La transfección de siRNAs contra la PPII* a 1280 nM empleando Amaxa provoca la disminución de la expresión del mRNA de la PPII*, pero también la pérdida de la actividad de PPII. Se transfectaron los siRNAs PPII*A y PPII* B en células primarias hipotalámicas a través del sistema Amaxa. Se determinaron los efectos sobre la expresión del mRNA de la PPII* y actividad de PPII^C. **A.** Se muestran los productos de PCR de dos experimentos independientes separados por electroforesis en geles de agarosa. Nótese que en el segundo experimento, en donde se amplificaron también a los mRNAs del TRH y la PPII^C, la señal de estos mRNAs disminuyó en el mismo grado que el de la PPII*. **B.** Se graficó la señal del mRNA de la PPII* corregida con la señal del mRNA de la ciclofilina de los productos mostrados en A. Nótese que en ambos experimentos (separados por dos líneas sobre el eje de las x), la expresión del mRNA de la PPII* disminuyó en un 50% aproximadamente. **C.** Fotografías representativas de las células en cultivo a las 72 horas post-transfección. **D.** Se determinó la actividad de PPII a las 72 horas post-transfección. La actividad de la PPII fue baja en las células transfectadas con el NT-siRNA pero resultó indetectable en las células transfectadas con los los siRNAs contra la PPII*.

Las fotos y gráficas mostradas son experimentos realizados una sola vez

Ya que habíamos obtenido un bajo rendimiento de proteína, efectos inespecíficos sobre la expresión de los mRNAs, y además, vimos una recuperación lenta de las células transfectadas con los siRNAs, supusimos que los efectos que habíamos visto se debían o bien al sistema de transfección, o a que la dosis de siRNAs empleada fue alta. Ya que contábamos con pocos reactivos para seguir transfectando células de esta manera, y que existen otros transfectantes con los que se han introducido con éxito los siRNAs, tales como la Polietilenimina (153, 154) y la Lipofectamina (172, 173) (esto último en neuronas primarias), decidimos probar suerte con estos transfectantes, pues contábamos con ellos en nuestro laboratorio.

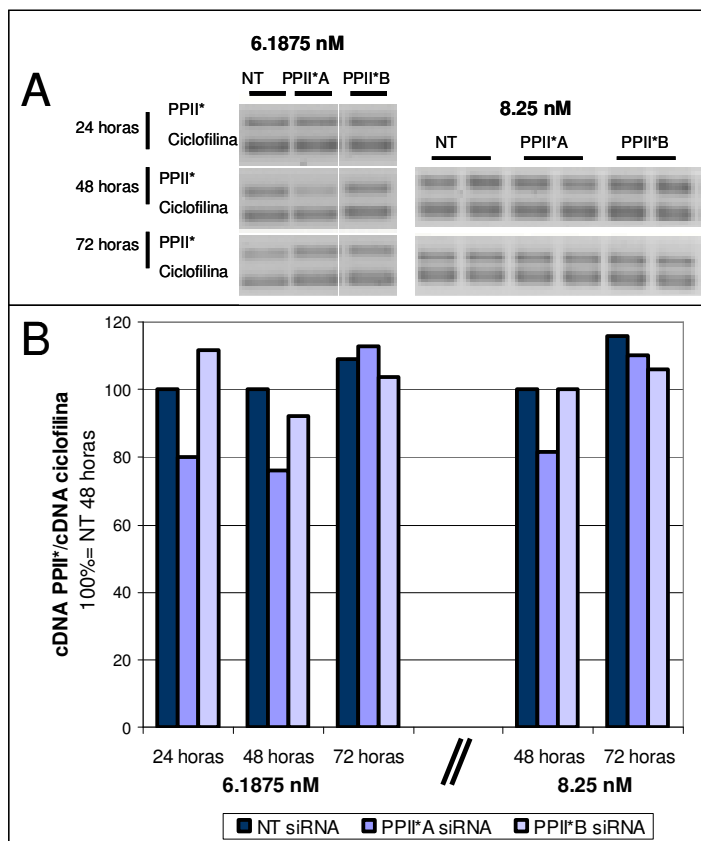


Figura 15. La expresión del mRNA de la PPII* disminuyó al transfectar al siRNA A con PEI, mas no al transfectar al siRNA B. Se transfectaron los siRNAs A y B a las concentraciones de 6.1875 nM y 8.25 nM empleando PEI, y se determino la expresión del mRNA a los tiempos mostrados en la figura. **A.** Se muestran los productos de PCR de la PPII* y ciclofilina separados en un gel de agarosa. **B.** Se graficó la señal de la PPII* corregida con la señal de ciclofilina. Notese que en ambas concentraciones, se observa una disminución del 20% de la expresión del mRNA de la PPII* empleando el siRNA A.

Los datos que se muestran son dos experimentos independientes. Para el caso de 8.25 nM se muestra el promedio de los duplicados del experimento. Como 100% para ambos experimentos, se consideró la expresión del mRNA de la PPII* en las células transfectadas con el NT-siRNA a las 48 horas.

De sumo interés para nosotros resultó que la Polietilenimina (PEI) estuviera siendo reportada como agente de transfección, pues con este transfectante, nuestro grupo ha reportado una eficiencia de transfección de DNA en células hipotalámicas de hasta 17 % ⁽¹⁵¹⁾. Realizamos un par de experimentos empleando este agente y los dos siRNAs contra la PPII* a 6.1875 y 8.25 nM (Figura 15). Lo que observamos es que a las dos concentraciones empleadas, la expresión del mRNA de la PPII* disminuyó al emplear el siRNA PPII*A mas no el siRNA PPII*B. Ya que observamos que la expresión del mRNA de la PPII* en los controles (PEI o NT-siRNA) era muy distinta a la expresión del mRNA de PPII* en células no tratadas (datos no mostrados), decidimos probar suerte con la Lipofectamina 2000.

Para realizar los experimentos con Lipofectamina 2000, decidimos trabajar también con los siRNAs por separado. Sin embargo, por la limitada cantidad de células con las que contamos para realizar estos experimentos, y que empleando PEI solo habíamos observado efecto con uno de los siRNAs, nos enfocamos al siRNA A. Comenzamos trabajando con dosis cercanas al límite recomendado (e.g., 100 nM): 66 y 100 nM, a las que observamos incrementos en la expresión del mRNA de la PPII* empleando el NT-siRNA, e incrementos mayores al emplear el PPII*A-siRNA (datos no mostrados). Más aún, también observamos incrementos en grado similar en la expresión de los mRNAs de la PPII^C y TRH (datos no mostrados).

Decidimos trabajar con dosis más bajas, y entonces realizamos experimentos a 8.25 nM, 16.5 nM y 33 nM. Empleando las dos concentraciones más bajas, encontramos eficiencias de transfección muy bajas (<1%) y no encontramos efectos sobre la expresión de los mRNAs ni sobre la actividad de la PPII^C (datos no mostrados).

A la concentración de 33 nM, obtuvimos una eficiencia de transfección del 12.84 % (Figura 16). Concordante con una eficiencia de transfección más alta, observamos que tanto a las 24, como a las 48 horas, se observa una tendencia del mRNA de la PPII* a disminuir cuando se transfecta al siRNA PPII*A. Asimismo, se observa que tanto a las 48 como a las 72 horas, la actividad de la PPII tiende a aumentar cuando se transfecta al siRNA PPII*A. Sin embargo, ninguno de esos efectos resultó ser significativo.

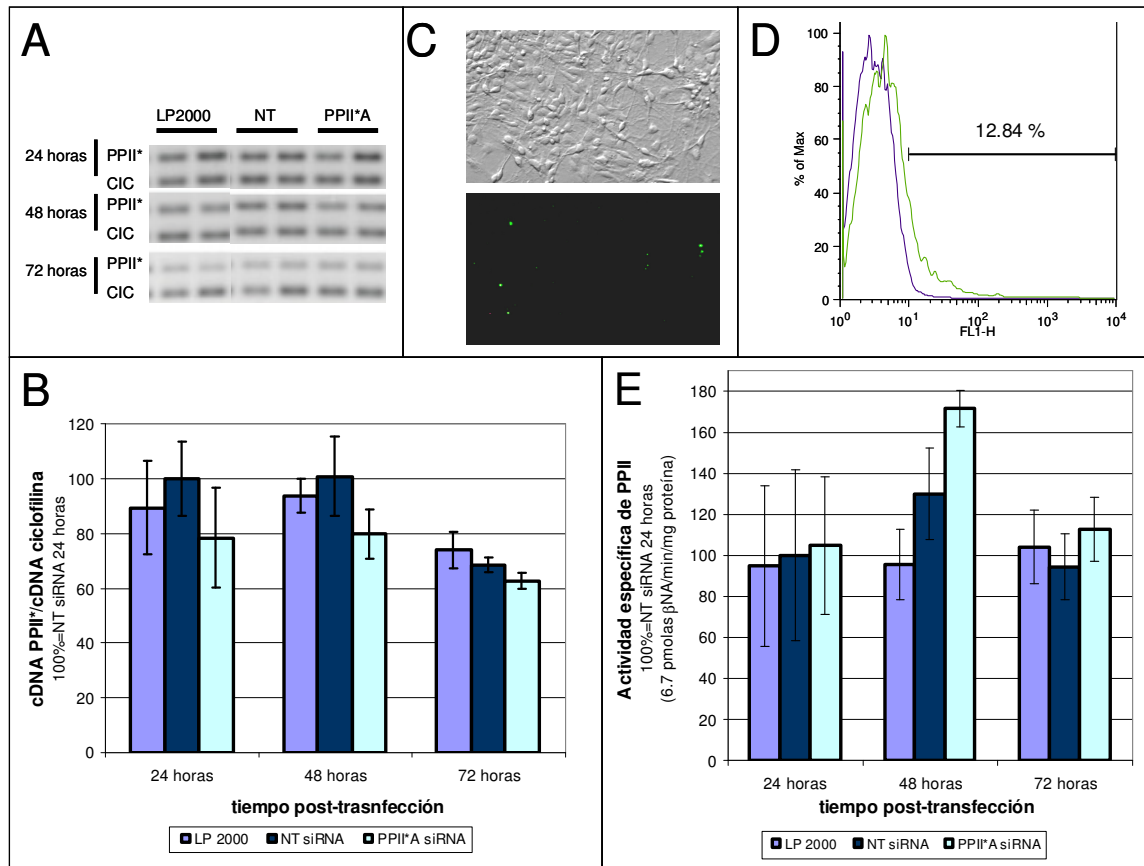


Figura 16. La transfección del siRNA PPII*A tiende a disminuir la expresión del mRNA de la PPII* y a aumentar la actividad de la PPII. Se transfectó al siRNA PPII*A A 33 nM en células primarias hipotalámicas y se monitoreo el efecto sobre la expresión del mRNA de la PPII* y actividad de PPII a las 24, 48 y 72 horas. De manera paralela se transfectó un siRNA irrelevante con fluoresceína acoplada (NT-siRNA-fluoresceína) para determinar la eficiencia de transfección por citometría de flujo. **A.** Gel representativo en el que se separaron los productos de PCR de la PPII* y Ciclofilina (CIC). **B.** Se graficó la señal de la PPII* corregida con la señal de la Ciclofilina. Nótese que tanto a las 24 como a las 48 horas la expresión de la PPII* tiende a disminuir cuando las células son transfectadas con el siRNA PPII*A. **C.** Fotografía representativa de las células transfectadas con el NT-siRNA-fluoresceína a las 48 horas. Arriba: campo claro, 40X. Abajo: Campo fluorescente, 40X. **D.** Gráfica obtenida al pasar las células transfectadas con el NT-siRNA-fluoresceína por el citómetro de flujo. Se detectó una eficiencia de transfección del 12.84%. **E.** La actividad de la PPII tiende a aumentar a las 48 y 72 horas en células transfectadas con el siRNA PPII*A.

En las gráficas se muestra el promedio de tres experimentos independientes \pm SE.

De manera paralela a la realización de los experimentos con Lipofectamina, surgió una publicación en la que se logró transfectar *in vivo* en cerebros de ratas un siRNA contra la Metalopeptidasa-9 (MMP-9), cuya expresión está asociada con el aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y de edema cerebral observado después de la isquemia. De manera interesante, además de lograr una buena transfección de los siRNAs y una disminución de la

expresión de la MMP-9, se consiguió el efecto terapéutico observado: disminución del edema cerebral y de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica después de la isquemia ⁽¹⁶¹⁾.

Ya que el objetivo central de este proyecto es demostrar la funcionalidad de la PPII* *in vivo*, quisimos emplear la misma estrategia utilizada en la publicación mencionada: la inyección intracerebroventricular de los siRNAs envueltos en el agente transfectante liposomal de Santa Cruz. Lo que encontramos es que la actividad de la PPII tiende a aumentar en el Hipocampo anterior y el Septum, que son zonas cercanas a la inyección, más no en el Hipocampo posterior, que es una zona más lejana. Sin embargo, los efectos no resultaron significativos (Figura 17). Asimismo transfectamos un siRNA acoplado a fluoresceína (NT-siRNA-fluoresceína) de la misma manera; sin embargo, al observar la fluorescencia al microscopio, observamos muchas zonas con autofluorescencia, y solo algunos grupos de células en septum e hipocampo anterior en donde se observaba mayor fluorescencia. No podemos concluir si no hubo una buena transfección, o si un error técnico no nos permitió observar la fluorescencia.

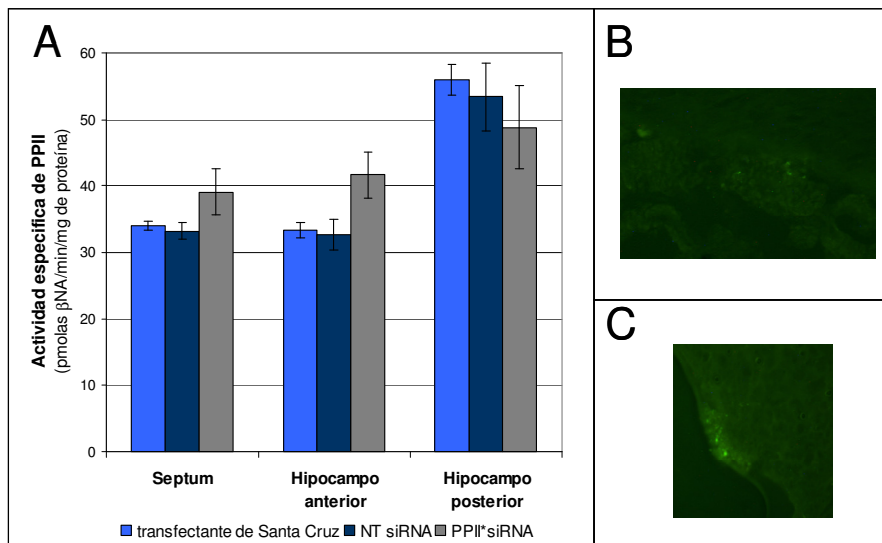


Figura 17. La transfección del siRNA PPII*A intracerebroventricularmente, tiende a incrementar la actividad de la PPII en Septum e Hipocampo anterior, más no en Hipocampo posterior. Se inyectaron 25 pmolas del siRNA PPII*A a través de una cánula insertada en el ventrículo derecho de cerebros de rata macho. Las ratas fueron sacrificadas 48 horas después y sus cerebros disectados. **A.** Se determinó la actividad de PPII en los Septums, Hipocampos anteriores y posteriores disectados de los cerebros de ratas. Nótese que la actividad de la PPII tiende a aumentar en las regiones (Septum e Hipocampo anterior) cercanas a la inyección del siRNA PPII*A. Esta tendencia no se observa en el Hipocampo posterior. **B.** Fotografía de una zona del Hipocampo anterior de un cerebro en el que se inyectó al NT-siRNA fluoresceína. **C.** Fotografía de una zona del Septum de un cerebro en el que se inyectó al NT-siRNA fluoresceína

En la gráfica se muestra el promedio de actividad específica de PPII en 4-6 ratas \pm SE.

12. DISCUSIÓN

Para el adecuado funcionamiento de los organismos, la célula genera proteínas que cumplen con funciones como canales iónicos, receptores, peptidasas, factores de transcripción, entre otras. A esas proteínas se les conoce como silvestres o funcionales. Sin embargo, para contrarrestar la actividad de esas proteínas funcionales, muchas veces la célula recurre a la producción de moléculas que actúen como dominantes negativas ^(65-67, 69-71). Esas dominantes negativas son producto de *splicing* alternativo o de mutaciones en el gen. El balance en la expresión entre las moléculas funcionales y las dominantes negativas es de suma importancia en los niveles de actividad que habrá de la proteína funcional durante el desarrollo de los organismos ⁽⁵⁷⁾, o en el desarrollo de enfermedades ^(81,82). Así por ejemplo, en el caso de la deficiencia de la hormona de crecimiento de tipo II (IGHDII), se ha propuesto que la intensidad con que se manifiesta dicha deficiencia (e.g. el daño en la glándula pituitaria) está relacionada con los niveles de expresión de la forma dominante negativa de la hormona de crecimiento ⁽¹⁷⁴⁾. Así también, se ha asociado a algunos tipos de cáncer humano, la expresión de moléculas truncadas de p73 que actúan como dominantes negativas de Tap73 y p53, dos moléculas reguladoras del ciclo celular ⁽¹⁷⁵⁾. Se ha observado que la expresión de estas moléculas truncadas induce la supervivencia celular aún en respuesta a drogas anti-tumorales ⁽¹⁷⁶⁾.

Para el caso del gen de la PPII, hasta el momento se han identificado dos isoformas (117 y 145 kDa). La forma de 145 kDa es la forma completa (PPII^C) y es la encargada de inactivar al TRH en el espacio extracelular ⁽¹⁰⁷⁾, e incluso a la acción de la PPII^C se le ha atribuido el que los efectos terapéuticos del TRH sean transitorios y de duración corta ⁽¹⁷⁷⁾. Por otro lado, la contraparte truncada de la PPII^C: la PPII* (117 kDa), ha sido postulada como una dominante negativa de la PPII^C ⁽¹¹²⁾ y por lo tanto, como un posible potenciador de los efectos del TRH. Sin embargo, previo al presente estudio, pocas eran las evidencias que apuntaban a que la PPII* desempeñara ese papel *in vivo*.

El objetivo del presente estudio fue aportar evidencias que apoyaran el papel propuesto de la PPII*. Para ello, nos centramos en dos ensayos que son esenciales para poderle atribuir una función a una molécula: la sobreexpresión y la disminución de la expresión (siRNA). Para esto

escogimos dos tipos de células con fenotipos neuronales que expresan de manera endógena a los mRNAs PPII^C y PPII*, así como actividad de PPII.

El ensayo de la sobreexpresión de la PPII* en células SK-NM-C disminuyó en un grado importante la actividad endógena de la PPII, indicando que la PPII* es capaz de regular de manera negativa la actividad de la PPII en un contexto neuronal. Un segundo contexto neuronal con el que trabajamos fue el cultivo primario hipotalámico, en dónde realizamos cinéticas de cultivos de 1-8 días, así como ensayos de RNA de interferencia. De manera sumamente interesante, los resultados de las cinéticas fueron muy similares a lo que obtuvimos previamente durante el desarrollo del SNC de la rata ⁽¹⁴⁴⁾, que la actividad enzimática correlaciona de manera negativa con la expresión de la PPII*, y que es el balance en la expresión (PPII*/PPII^C) lo que parece ser determinante en la actividad enzimática de la PPII. Múltiples ejemplos existen que apoyan el balance en la expresión de dos isoformas en la determinación de una función ^(176, 178-180). Un ejemplo lo constituyen las formas larga y corta de How, dos moléculas con funciones antagónicas, cuya expresión es regulada durante el desarrollo ⁽¹⁷⁹⁾, de manera que el balance en la expresión de estas formas resulta determinante en los niveles de expresión del factor de transcripción Stripe, y consecuentemente, en la diferenciación adecuada de las células del tendón en *D.melanogaster* ^(179, 180).

Estos resultados nos parecieron muy prometedores, pues como en los resultados *in vivo* en el SNC ⁽¹⁴⁴⁾, parece que durante el desarrollo del cultivo hipotalámico, la PPII* también juega un papel importante en la regulación de la actividad de la PPII. Más aún, esta reproducción de los resultados obtenidos *in vivo*, valida al cultivo primario como un excelente sistema para poder realizar ensayos de RNA de interferencia de la PPII*, y potencialmente, extrapolar los resultados obtenidos a un contexto *in vivo*.

Es bien sabido que los cultivos primarios neuronales son difíciles de transfectar, y en el caso del cultivo hipotalámico, la eficiencia más alta de transfección empleando DNA plasmídico ha sido del 17% empleando Polietilenimina ⁽¹⁵¹⁾. Por ello, comenzamos trabajando con otro sistema, que ha resultado exitoso en la transfección de células difíciles de transfectar, Amaxa. Empleando este sistema logramos transfectar a las células en más de un 50 % y disminuir la expresión del mRNA de la PPII* en más de un 50% en dos experimentos independientes; sin embargo, al determinar la actividad enzimática, esta resultó indetectable. Este efecto no esperado lo atribuimos a que la transfección de los siRNAs con este sistema tuvo efectos sobre la viabilidad celular, pues la

cantidad de proteína obtenida en estos cultivos fue muy pobre, comparada con lo que normalmente obtenemos de células mantenidas en cultivo por un número similar de días. Además, al menos en uno de los experimentos observamos una disminución de los mRNAs de PPII^C y TRH en el mismo grado que la observada para el mRNA de la PPII*, lo cual podría indicar efectos inespecíficos. Estos efectos podrían atribuirse a un sistema no adecuado de transfección o dosis inadecuada de siRNAs. Desconocemos si el sistema de transfección por sí solo tiene algún efecto no deseado sobre la viabilidad en este tipo de células. Para saberlo, hubiéramos requerido de incluir otro control, uno en el que se les diera el choque a las células en presencia del *buffer*, pero que no se les transfectara ningún siRNA, y los resultados de ese control, compararlos contra células a las que no se les diera ese choque. En cuanto a la dosis, empleamos dosis dentro del rango recomendado por el Amaxa, sin embargo, un número considerable de reportes han evidenciado efectos inespecíficos de los siRNAs, aún cuando se empleen las dosis recomendadas por el fabricante ^(181, 182). Una alternativa es probar dosis menores de siRNAs. Poco es lo que se puede concluir de estos experimentos realizados con el sistema Amaxa, y es evidente que habría que reconsiderar las condiciones y dosis de transfección antes de continuar trabajando con este sistema, incluyendo los controles arriba sugeridos. Sin embargo, en base a estos experimentos, es evidente que el sistema Amaxa repercute en la viabilidad de las células hipotalámicas primarias por lo que decidimos probar otros transfectantes (Polietilenimina y la Lipofectamina 2000) los cuales han sido descritos como útiles para transfectar siRNAs en células neuronales ^(157, 158, 172, 173).

En experimentos preliminares utilizando la Polietilenimina como transfectante observamos una disminución en la expresión del mRNA de la PPII* al transfectar uno de los siRNAs (siRNA A), por lo cual nos enfocamos al siRNA A. Con la Lipofectamina 2000, usando un siRNA fluorescente a una concentración de 33 nM, obtuvimos una eficiencia de transfección del 12% y usando un control de siRNA a la misma concentración, observamos efectos mínimos sobre la expresión del mRNA de la PPII* o la actividad de la PPII. Sin embargo, a pesar de que la interferencia de la PPII* con el siRNA A resultó en una tendencia a disminuir los niveles del mRNA de la PPII* así como a aumentar la actividad de la PPII, estos efectos no fueron significativos. Pensamos que la baja eficiencia de transfección fue la causa de que los efectos no hayan sido lo suficientemente fuertes para ser significativos ⁽¹⁸³⁾. Varias alternativas podrían ayudar a mejorar esa evaluación. Por ejemplo, cotransfectar a los cultivos primarios hipotalámicos con un siRNA fluorescente, o tener al siRNA de la PPII* con un fluoróforo acoplado. Lo anterior nos

permitiría separar a las células transfectadas por citometría de flujo, y sólo en esas células evaluar el efecto de la inhibición de la expresión de la PPII*. Aunque esa puede ser una estrategia útil ⁽¹⁸³⁾, en nuestro caso nos vemos limitados por la cantidad de células que podemos obtener de los embriones de una o dos ratas gestantes (e.g. 20×10^6 células), que es el número de ratas con el que podemos contar el día de realización de cultivo, y la alta cantidad de células que se requiere para poder obtener una buena cantidad de proteína que permita realizar el ensayo enzimático (e.g. 1×10^6 células; $50 \mu\text{g}$ de proteína). Es evidente que para poder evaluar el efecto de la interferencia en la expresión de la PPII*, requerimos de encontrar un método de transfección que permita transfectar con una alta eficiencia a las células hipotalámicas y que sea poco tóxico, como por ejemplo, el péptido Penetratin-1⁽¹⁸⁹⁾ o un lentivirus ⁽¹⁹⁰⁾.

Ya que el objetivo central de este proyecto es demostrar la funcionalidad de la PPII* *in vivo*, y que en paralelo a la realización de este trabajo, surgió una publicación prometedora, en la que empleando el transfectante de Santa Cruz, lograron la interferencia con una eficiencia de transfección alta en el cerebro ⁽¹⁶¹⁾, quisimos probar con el siRNA A contra la PPII* empleando la misma estrategia experimental. Lo que observamos fue que al inyectar en el ventrículo derecho de cerebros de ratas adultas al siRNA A, la actividad de la PPII tiende a aumentar en el Hipocampo anterior y el Septum, más no en el Hipocampo posterior. Sin embargo, los efectos en estos casos tampoco son significativos. Al evaluar la eficiencia de transfección en cerebros de ratas en las que se inyectó a un siRNA control con un fluoróforo acoplado, se observó mucha autofluorescencia, lo cual dificultó la evaluación de la eficiencia de transfección, aunque se observaron poblaciones de células más fluorescentes que la autofluorescencia en el Hipocampo anterior y el Septum.

El hecho de que hayamos observado las tendencias esperadas en las zonas cercanas a la inyección del siRNA y en donde observamos subpoblaciones de células fluorescentes, y no en una zona mas lejana a la inyección, como lo es el hipocampo posterior, nos hace suponer que quizá si hubo transfección de los siRNAs y eso provocó que la actividad de la PPII tendiera a aumentar en estas regiones. Sin embargo, ya que no tenemos una idea muy clara de que tan eficiente se transfectaron las células, caben dos posibilidades. Una de ellas es que la eficiencia de transfección haya sido baja para lograr un efecto significativo. La otra posibilidad es que en efecto los siRNAs si se estén transfectando con una eficiencia similar a la reportada empleando la misma estrategia ⁽¹⁶¹⁾, pero dado que el siRNA A no cumple con las propiedades de un siRNA eficiente ⁽¹⁸⁴⁾, el efecto no resulta lo suficientemente fuerte para ser significativo. Así por ejemplo, carece de una U en la

posición 10 y una G o C en la posición 11, propiedades que se han descrito como importantes para la funcionalidad de los siRNAs ^(184, 185) y que están relacionadas con el sitio de corte de RISC en el mRNA blanco ^(186, 187). Una solución cuando se tienen siRNAs no muy eficientes, es transfectar varios siRNAs juntos ⁽¹⁸⁸⁾. En nuestro caso, contamos con dos siRNAs contra la PPII* que presentan un porcentaje similar de deficiencias en su secuencia, pero que quizá podrían resultar más eficientes si se transfectaran juntos. En este punto, resulta importante destacar que contamos con una región limitada en la que se pueden diseñar siRNAs contra la PPII* (e.g. los primeros 87 nucleótidos del intrón 14) y estos dos siRNAs con los que contamos son los que presentaron un porcentaje mayor de propiedades adecuadas para funcionar como tales. Incluso, resulta también importante destacar, que el diseño de siRNAs solo fue posible en el algoritmo de Dharmacon, pues en otros algoritmos como el de Ambion o Invitrogen, esta región resultó inadecuada para el diseño de siRNAs. Por ello, antes de continuar realizando experimentos, resultará importante determinar si estos siRNAs son capaces de disminuir la señal de la PPII*. Para tal fin, actualmente en nuestro grupo se están realizando experimentos en los que se transfectan a los siRNAs contra la PPII* en células 293-T en las que se sobreexpresa a la PPII*. En extractos de estas células se determinará por ensayos de *Western blot* (con un anti-histidinas) si hay disminución en la señal de la PPII*.

En resumen, podemos concluir que nuestros datos apoyan el papel de la PPII* como regulador negativo de la actividad de PPII en un contexto neuronal. Sin embargo, las limitaciones técnicas que tuvimos para transfectar los siRNAs en las neuronas de rata, nos impidieron obtener resultados concluyentes. De esto, lo que resulta claro, es que antes de continuar realizando experimentos en células neuronales, es necesario identificar sistemas y condiciones de transfección que aseguren la introducción de los siRNAs a las células. Y aunque lo observado en este estudio no es una demostración *in vivo* del papel de la PPII* como dominante negativa de la PPII^C, es un antecedente relevante para posteriores demostraciones *in vivo*, tales como la generación de un ratón transgénico en el que se sobreexpresa a la PPII* bajo un promotor neuronal o bien, un ratón nulo para la expresión tejido específica de la PPII*.

13. RESUMEN DE RESULTADOS

- ✓ Las células SK-N-MC tienen una mayor expresión del mRNA de la PPII^C respecto al de la PPII*.
- ✓ La sobreexpresión de la PPII* regula negativamente la actividad de la PPII en cultivos de las células SK-N-MC
- ✓ En cultivos primarios hipotalámicos mantenidos en cultivo de 1 a 8 días, el aumento en la actividad de la PPII correlaciona con una menor expresión del mRNA de la PPII* respecto al de la PPII^C.
- ✓ La interferencia de la expresión de la PPII* en cultivos primarios hipotalámicos tiende a disminuir la expresión del mRNA de la PPII* y a aumentar la actividad de la PPII.
- ✓ La interferencia de la expresión de la PPII* empleando siRNA inyectado intracerebroventricularmente tiende a aumentar la actividad de la PPII en el Hipocampo anterior y el Septum

14. CONCLUSIONES

- ✓ En conjunto, nuestros datos apuntan a que la PPII* actúa como un regulador negativo de la actividad de la PPII *in vivo* (e.g. como una dominante negativa de la PPII^C) y constituyen un antecedente relevante para posteriores demostraciones *in vivo* (e.g., un ratón transgénico en el que se sobreexpresa a la PPII* o uno en el que se encuentre apagada la expresión de esta)
- ✓ Es indispensable encontrar una estrategia de transfección que permita una eficiencia alta y que no sea tóxica para los cultivos primarios hipotalámicos, así como asegurarse de que la estrategia empleada para inyectar a los siRNAs en el cerebro de las ratas sea eficiente, para poder obtener resultados concluyentes.

15. PERSPECTIVAS

- ✓ Transfectar en células primarias hipotalámicas únicamente al siRNA B y/o a los siRNAs A y B para la PPII* juntos a 33 nM empleando Lipofectamina 2000.
- ✓ Probar otros métodos de transfección para las células primarias hipotalámicas que tengan una mayor eficiencia y menores efectos tóxicos que los empleados en este estudio como el péptido Penetrin-1 o un Lentivirus.
- ✓ Inyectar únicamente al siRNA B y/o a los siRNAs A y B para la PPII* juntos intracerebroventricularmente en cerebros de rata
- ✓ Determinar si la interferencia de la PPII* potencia los efectos de la PPII^C en un paradigma en el que se sepa que el TRH puede tener efectos terapéuticos, como la disminución del tiempo de narcosis provocada por el etanol.

16. A P E N D I C E

I. VECTORES DE EXPRESIÓN

A) Sobre los vectores para expresar a la PPII^C y PPII*

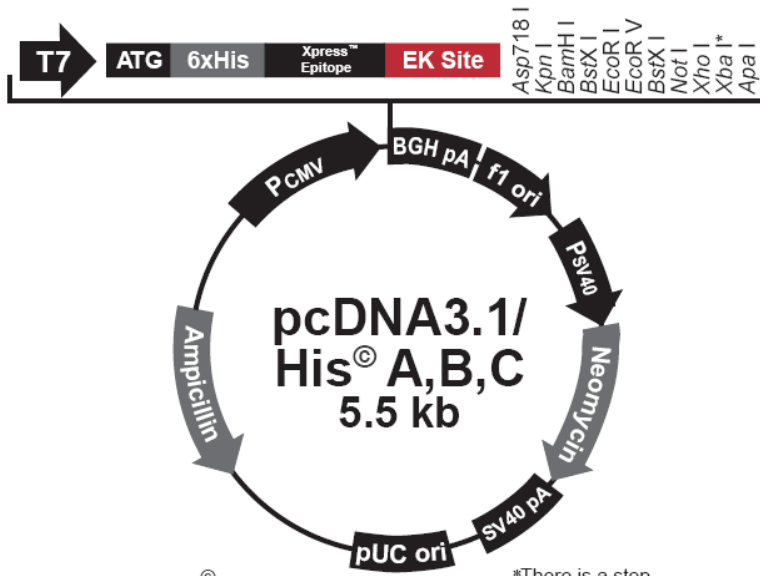
En 1994, se clonó la secuencia de la PPII, a la que nosotros llamamos PPII^C. La secuencia fue de 6000 pares de bases y se reportó en: Schauder, B., Schomburg, L., Köhrle, J. & Bauer, K. 1994. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 9534-9538

La región del marco abierto de lectura, que va del nucleótido 73 al 3173 se clonó en el vector pcDNA 3.1 His A (*Invitrogen*; ver figura en la siguiente página) adicionando un sitio *Not-I* del lado 5' y un sitio *Xba-I* del lado 3' El fragmento clonado es de 3090 p.b.

Realizando un mapa de restricción de esta secuencia en el programa CCL Workbench, además encontramos que el cDNA de la PPII^C no presenta sitios de restricción para las enzimas *Asp7181*, *Kpn-I*, *Apa-I* y *Xho-I*.

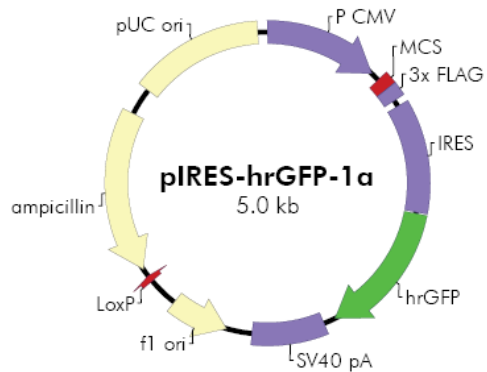
Al realizar la clonación arriba descrita (e.g. con *Not-I* y *Xba-I*), además se clonó otro cDNA de 3173 p.b., idéntico en toda la secuencia a la de la PPII^C, excepto en la unión de los exones 14 y 15, en donde presenta insertos 87 nucleótidos correspondientes a los primeros nucleótidos del intrón 14. La descripción de esta clona está reportada en: 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.

Realizando un mapa de restricción de esta secuencia en el programa CCL Workbench, además encontramos que el cDNA de la PPII* no presenta sitios de restricción para las enzimas *Asp7181*, *Kpn-I*, *Apa-I* y *Xho-I*. También es importante mencionar, que a lado del sitio *Xba-I*, hay un sitio adicional para *Not-I*.

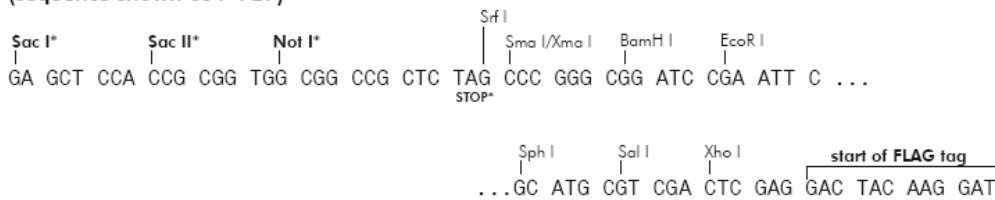


Vector de expresión pcDNA 3.1 HisA de *Invitrogen*.

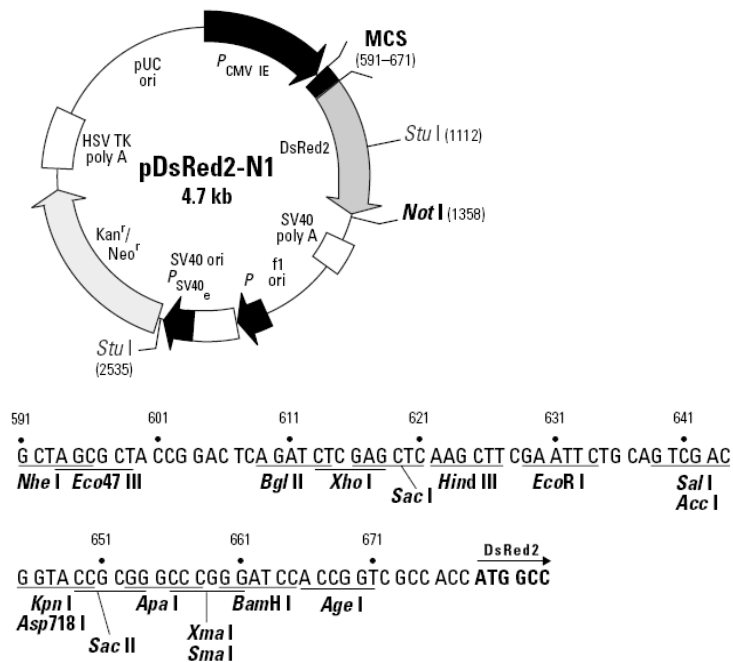
B) Sobre los vectores para expresar genes reporteros



pIRES-hrGFP-1α Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 651–727)



Vector de expresión pIRES-hrGFP-1a de *Invitrogen*.



Vector de expresión pDsRed2-N1 de *Stratagene*

II. Preparación de algunas de las soluciones empleadas en este estudio

GEL DESNATURALIZANTE PARA RNA

Buffer de carga para RNA

	Para 4 ml	12 ml
55 % de formamida desionizada	2.2 ml	6.6
8 % de formaldehído al 37 %	0.8	2.4
5 % de MAE 10X	0.5	1.5
4% de glicerol al 80 %	0.4	1.2
1% de azul de bromofenol al 2%	0.1	0.3
0.1 % de bromuro de etidio		

Se almacena a -20°C para emplearse en un plazo máximo de 3 meses.

WESTERN BLOT

Resolving gel buffer

	100 ml
Tris-base	18.17 g
SDS	0.4 g
pH= 8.9	
Filtrar y almacenar a 4°C	

Stacking gel buffer

	100 ml
Tris-base	6.055 g
SDS	0.4 g
pH= 6.8	
Filtrar y almacenar a 4°C	

Acrilamida al 40%

	100 ml
Acrilamida	38.9 g
Bisacrilamida	1.1 g
Filtrar y almacenar a 4°C protegida de la luz.	

Persulfato de amonio 10% (APS)

0.1 g en 1 ml de agua.
*Preparar justo antes o unas horas antes de ocuparlo.

Buffer B

100 mM Tris HCl; pH 9.5
100 mM NaCl
5 mM MgCl_2

Buffer de carga con SDS

	10 ml 6X
4X Tris/SDS pH 6.8	7 ml
Glicerol	3 ml
SDS	1 g
β -mercaptoetanol o DTT	1.2 ml o 0.93 g
Azul de bromofenol	≥ 10 mg

4X Tris/SDS pH 6.8

	100 ml
Tris base	6.05 g
SDS	0.4 g
Disolver en 40 ml, ajustar pH con HCl 1M, aforar a 100 ml y filtrar con $0.45\ \mu\text{m}$. Almacenar a 4°C	

*Si se añade el β -mercaptoetanol, se almacena a -20°C .
Sino, a temperatura ambiente, y entonces, al momento de usarlo se agregan $6\ \mu\text{l}$ de β -mercaptoetanol por cada $50\ \mu\text{l}$.

Preparación del gel de acrilamida/bisacrilamida

- 1) Alinear con etanol los peines y separadores a emplear, para constatar que sean del mismo grosor. Limpiarlos con etanol
- 2) Limpiar perfectamente los vidrios con etanol justo antes de ensamblarlos en el molde.
- 3) Ensamblar los vidrios con los separadores en el molde. Verter agua bidestilada con una piceta dentro del molde formado con los vidrios, para verificar que los vidrios estén perfectamente ensamblados y no vaya a haber derrames de acrilamida. Retirar el agua, e introducir un pedazo de papel filtro limpio para quitar el exceso de agua.
- 4) Poner el peine limpio dentro de los vidrios, y pintar una marca un centímetro debajo del final del peine.
- 5) Preparar el *Resolving* gel de acuerdo al porcentaje deseado:

Para 2 geles de 1.5 mm:

	7%	8%	10%	12%	12.5 %	15%
Agua (ml)	11.68	11.17	10.15	9.13	8.88	5.2
<i>Resolving buffer</i> (ml)	5.12	5.12	5.12	5.12	5.12	5.12
Acrilamida (ml)	3.55	4.06	5.12	6.10	6.35	7.62
APS 10% (ml)	117.18	117.18	117.18	117.18	117.18	117.18
TEMED (ml)	8.75	8.75	8.75	8.75	8.75	8.75

- 6) Verter inmediatamente la mezcla dentro de los vidrios, hasta la marca mencionada en el inciso 4. Colocar unas gotas de agua por encima del gel. Dejar polimerizar (aproximadamente 30 minutos).

- 7) Preparar el *stacking* gel:

Para 2 geles de 1.5 mm (justo):

Agua (ml)	5.2
<i>Resolving buffer</i> (ml)	2
Acrilamida (ml)	0.8
APS 10% (μ l)	150
TEMED (μ l)	5.6

- 8) Verter inmediatamente la mezcla dentro de los vidrios hasta el tope. Colocar inmediatamente los peines. Dejar polimerizar (aproximadamente 30 minutos).

Preparación de las muestras

- 1) Emplear de 20 a 50 μg de proteína, llevando todas las muestras a 20 μl .
- 2) Agregar 4 μl del buffer de carga con SDS.
- 3) Centrifugar 3 segundos a 13,000 rpm en una centrifuga de mesa
- 4) Colocar las muestras en agua hirviendo por 5 minutos
- 5) Colocar las muestras en hielo por 5 minutos.
- 6) Cargar inmediatamente en el gel o almacenar a -20°C hasta hacerlo.

ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA PPII

Inhibidores Bacitracina / N-etilmaleimida 10 mM

En 10 ml de buffer fosfatos 50 Mm, pH 7.5, se adicionan 0.1422 g de Bacitracina y 0.0125 g de N-etilmaleimida. Se mezclan bajo agitación constante. Se hacen alicuotas de 120 μl de los inhibidores y se congelan de inmediato hasta su uso en el ensayo enzimático.

* Una vez descongelados, sólo se pueden usar por 3-4 horas a temperatura ambiente, pues son inestables preparados en solución.

*No se pueden volver a congelar.

β -Naftilamida

La β -Naftilamida se disuelve en metanol a una concentración de 10^{-2} M.

*La preparación se realiza en la oscuridad, y no se necesita de emplear agitación magnética. Con invertir el tubo en el que se prepare la solución, basta.

*La solución se almacena en la oscuridad, y cuando se va a realizar una curva patrón, se toman 10 μl , y se realiza una disolución a 10^{-4} M, y luego una disolución a 10^{-5} M

Con la solución a 10^{-5} M se realiza la curva patrón:

0 pmolas = 400 ml buffer fosfatos: metanol (1:1)

50 pmolas = 5 ml bNA 10^{-5} M + 395 ml buffer fosfatos: metanol (1:1)

100 pmolas = 10 ml bNA 10^{-5} M + 390 ml buffer fosfatos: metanol (1:1)

200 pmolas = 20 ml bNA 10^{-5} M + 380 ml buffer fosfatos: metanol (1:1)

CRECIMIENTO DE BACTERIAS TRANSFORMADAS

Medio LB

Bacto Triptona 10 g
Bacto yeast extract 5 g
NaCl 10 g

Ajustar el pH a 7 con NaOH y completar a 1L
Esterilizar por autoclave

17. REFERENCIAS

1. Koch, C. & Laurent, G. 1999. Complexity and the Nervous System. *Science*. 284: 96-98
2. Muotri, A.R. & Gage, F.H. 2006. Generation of neuronal variability and complexity. *Nature*. 441: 1087-1093
3. Lee, I.L. & Young, A.R. 2000. Transcription of eukaryotic protein coding genes. *Annual Reviews of Genetics*. 34:77-137
4. Thomas, M. & Chiang, Ch. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 41: 105-178
5. Ayoubi, T.A. & Van De Ven, W.J. 1996. Regulation of gene expresión by alternative promoters. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 10: 453-460
6. Koenigsberger, C., Chicca II, J., Amoureux, M-C., Edelman, G.M. & Jones, F.S. 2000. Differential regulation by multiple promoters of the gene encoding the neuron-restrictive silencer factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(5):2291-2296
7. Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray- Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K. & Lane, D.P. 2005. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes and Development*. 19: 2122-2137
8. Roberts, S.J., Chung, K-N., Nachmanoff, K. & Elwood, P.C. 1997. Tissue specific promoters of the α human folate receptor gene yield transcripts with divergent 5' leader sequences and different translational efficiencies. *Biochemical Journal*. 326 (Parte 2): 439-447
9. Soller, M. 2006. Pre-messenger RNA processing and its regulation: a genomic perspective. *Cellular & Molecular Life Sciences*. 63: 796-819
10. Colgam, D.F. & Manley, J.L. 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes & Development*. 11: 2755-2766
11. Newbury, S.F. 2006. Control of mRNA stability in eukaryotes. *Biochemical Society Transactions*. 34 (parte 1): 30-34
12. Connelly, S. & Manley, J. 1998. A functional polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes & Development*. 2: 440-452
13. Huang, Y. & Carmichael, G.G. 1996. Role of Polyadenylation in Nucleocytoplasmic Transport of mRNA. *Molecular and Cellular Biology*. 16: 1534-1542
14. Edwalds-Gilbert, G., Veraldi, K.L. & Milccarek, C. 1997. Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Research*. 25:2547-2561
15. Zhang, H., Lee, J.Y. & Tian, B. 2005. Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biology*. 6: R100
16. Keegan, L.p., Gallo, A. & O'Connell, M.A. 2001. The many roles of an RNA editor. *Nature Reviews Genetics*. 2: 869-878
17. Cruz-Reyes J, Sollner-Webb B. 1996. Trypanosome U-deletional RNA editing involves guide RNA-directed endonuclease cleavage, terminal U exonuclease, and RNA ligase activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93 (17):8901-8906
18. Brown LM, Burbach BJ, McKenzie BA, Connell GJ. 1999. A cis-acting A-U sequence element induces kinetoplastid U-insertions. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 6295- 6304
19. Paul, M.S. & Bass, B.L. 1998. Inosine exists in mRNA at tissue specific levels and is most abundant in brain mRNA. *The EMBO Journal*. 17: 1120-1127
20. Rueter SM, Dawson TR, Emeson RB. 1999. Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature*. 399:75-80
21. Gott, J. 2000. Functions and mechanisms of RNA editing. *Annual Reviews of Genetics*. 34:499-531
22. Köhler, M., Burnashev, N. & Seeburg, P.H. 1993. Determinants of Ca^{2+} permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: Diversity by RNA editing. *Neuron*. 3: 491-500
23. Black, D. 2003. Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. *Annual Reviews of Biochemistry*. 72: 291-336
24. Lipscombe, D. 2005. Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Current Opinion in Neurobiology*. 15: 358-363
25. Cooper, G. 2000. Protein Synthesis, Processing, and Regulation. en Cooper, G. *The Cell: A molecular approach*. 2 ed. Sinauer Associates. USA.
26. Spiro, R.G. 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*. 12: 43R-53R
27. Hengge, A. 2002. Phosphoryl transfer reactions. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons. 1-7
28. Haines N & Irvine KD. 2003. Glycosylation regulates Notch signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4:786-797.

29. Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S. & Gatto, Jr, G.J. 2005. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome modifications. *Angewandte Chemie International Edition*. 44: 7342-7372
30. Stetefeld, J. & Ruegg, M. 2005. Structural and functional diversity generated by alternative mRNA splicing. *Trends in Biochemical Sciences*. 30: 515-520
31. Rowen, L., Young, J., Birditt, B., Kaur, A., Madan, A., Philipps, D.L., Qin, S., Minx, P., Wilson, R.K., Hood, L. & Graveley, B.R. 2002. Analysis of the human neurexin genes: alternative splicing and the generation of protein diversity. *Genomics*. 79: 587-597
32. Stasiv, Y., Regulski, M., Kuzin, B., Tully, T. & Enikolopov, G. 2001. The Drosophila Nitric-oxide Synthase gene (dNOS) encodes a family of proteins that can modulate NOS activity by acting as dominant negative regulators. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 42241-42251.
33. Lewis, B.P., Green, R.E. & Brenner, S.E. 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100:189-192
34. Burset, M., Seledstov, I.A. & Solovyev, V.V. 2000. Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Research*. 28: 4364-4375.
35. Matlin, A., Clark, F. & Smith, C. 2005. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature reviews molecular cell biology*. 386:398
36. Graveley, B. 2000. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*. 6: 1197-1211
37. Cáceres, J.F., Stamm, S., Helfman, D.M. & Krainer, A.R. 1994. Regulation of Alternative Splicing *in vivo* by Overexpression of Antagonistic Splicing Factors. *Science*. 265: 1706-1709
38. Sharma, S., Falick, A.M. & Black, D.L. 2005. Polypyrimidine Tract Binding Protein Blocks the 5' Splice Site-Dependent Assembly of U2AF and the Prespliceosomal E Complex. *Molecular Cell*. 19: 485-496.
39. Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E. & Zipursky, S.L. 2000. Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*. 101: 671-684
40. Pan, Q., Shai, O., Misquitta, C., Zhang, W., Saltzman, A.L., Mohammad, N., Babak, T., Siu, H., Hughes, T.R., Morris, Q.D., Frey, B.J. & Blencowe, B.J. 2004. Revealing global regulatory features of mammalian alternative splicing using a quantitative microarray platform. *Molecular Cell*. 16: 929-941
41. Matoskova, B., Roorsman, f., Sveenson, V. & Betsholtz, C. 1989. Alternative splicing of the Platelet-Derived Growth Factor A chain transcript occurs in normal as well as tumour cells and is conserved among mammalian species. *Molecular and Cellular Biology*. 9: 3148-3150
42. Werner, S., Duan, D-S., De Vries, C., Peters, K.G., Johnson, D.E. & Williams, L.T. 1992. Differential Splicing in the Extracellular Region of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Generates Receptor Variants with Different Ligand-Binding Specificities. *Molecular and Cellular Biology*. 12: 82-88
43. Barthels, D., Vopper, G., Boned, A., Cremer, H. & Wille, W. 1992. High degree of NCAM diversity generated by alternative RNA splicing in brain muscle. *European Journal of Neuroscience*. 4: 327-
44. García, J., Gerber, S.H., Sugita, S., Südhof, T.C. & Rizo, J. 2004. A conformational switch in the Piccolo C2A domain regulated by alternative splicing. *Nature structural & molecular biology*. 11: 45-53
45. Schwarz, D., Barry, G., Eliasof, S.D., Petroski, R.E., Conlon, P.J. & Maki, R.A. 2000. Characterization of γ -Aminobutyric acid receptor GABA_{B(1e)}, and GABA_{B(1)} splice variants encoding a truncated receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 32174-32181
46. 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
47. Normant, E., Gros, C. & Schwartz, J-C. 1995. Carboxipeptidase A isoforms produced by distinct genes or alternative splicing in brain and other extrapancreatic tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 20543-20549
48. Stamm, S. 2002. Signals and their transduction pathways regulation alternative splicing: a new dimension of the human genome. *Human Molecular Genetics*. 11: 2409-2416
49. Xie, J. & Black, D.L. 2001. A CaMK IV responsive RNA element mediates depolarization-induced alternative splicing of ion channels. *Nature*. 410 :936-939.
50. Xie, J. & McCobb, D.P. 1998. Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones. *Science*. 289: 443-436
51. McKay N. G., Hunter D. J., Haites N. E. and Power D. A. 1994. Regulation of Alternative Splicing of the Fibronectin III CS Domain by Cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 199: 1005-1011
52. Duncan, P.I., Stojdl, D.F., Marius, R.M. & Bell, J.C. 1997. *In vivo* regulation of alternative pre-mRNA splicing by the CLK-1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*. 17: 5996-6001
53. Boutz, P.L., Chawla, G., Stoilov, P. & Black, D.L. 2007. MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes & Development*. 21: 71-84

54. Cheah, M.T., Wachter, A., Sudarsan, N. & Breaker, R. 2007. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature*. 447: 497-501
55. Han, F., Gilbert, J.R., Harrison, G., Adams, C.S., Freeman, T., Tao, Z., Zaka, R., Liang, H., Williams, C., Tuan, R.S., Norton, P.A. & Hickok, N.J. 2007. Transforming Growth Factor β 1 regulates fibronectin isoform expression and splicing factor SRp40 expression during ATDC5 chondrogenic maturation. *Experimental Cell Research*. 313(8): 1518-1532.
56. Zeng, Z., Sharpe, C., Simons, P. & Górecki, D. 2006. The expression and alternative splicing of alpha-neurexins during *Xenopus* development. *International Journal of Developmental Biology*. 50: 39
57. 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
58. Raahman, L., Bliskovski, V., Reinhold, W. & Zajac-Kaye, M. 2002. Alternative splicing of Brain Specific PTB defines a tissue-specific isoform pattern that predicts distinct functional roles. *Genomics*. 80: 245-249
59. Nissim-Rafina, M. & Kerem, B. 2005. The splicing machinery is a genetic modifier of disease severity. *Trends in genetics*. 21: 480-483
60. Kalnina, Z., Zayakin, P., Silina, K. & Line, A. 2005. Alterations of pre-mRNA splicing in Cancer. *Genes, chromosomes and cancer*. 42: 342-357.
61. Jumaa, H., Guénet, J.L. & Nielsen, J. 1997. Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*. 17: 3116-3124
62. Shin, C. & Manley, J. 2004. Cell Signaling and the control of pre-mRNA splicing. *Nature reviews molecular cell biology*. 5: 727-738
63. Ashiya, M. & Grabowski, P.J. 1997. A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart. *RNA*. 3: 996-1015
64. Zhang, W., Liu, H., Han, K. & Grabowski, P.J. 2002. Region-specific alternative splicing in the nervous system: implications for regulation by the RNA-binding protein NAPOR. *RNA*. 8: 671-685.
65. Jensen, K.B., Dredge, B.K., Stefani, G., Zhong, R., Buckanovich, R.J. Okano, H.J. Yang, Y.L.Y. & Darnell, R.B. 2000. Nova-1 Regulates Neuron-Specific Alternative Splicing and Is Essential for Neuronal Viability. *Neuron*. 25: 359-371
66. Yang, Y.Y.L., Yin, G.L.Y. & Darnell, R.B. 1998. The neuronal RNA-binding protein Nova-2 is implicated as the autoantigen targeted in POMA patients with dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95:13254-13259
67. Ushkaryov, Y.A. & Südhof, T.C. 1993. Neurexin IIIa: Extensive alternative splicing generates membrane-bound and soluble forms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90: 6410-6414
68. Sturia, L.M., Merrick, A.E. & Burchill, S.A. 2003. FGFR3IIIS: a novel soluble FGFR3 spliced variant that modulates growth is frequently expressed in tumour cells. *British Journal of Cancer*. 89: 1276-1284
69. Foulkes, N.S., Mellstrom, B., Benusiglio, E. & Sassone-Corsi, P. 1991. Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to transcriptional activator. *Nature*. 335: 80-84
70. Koch, S., Strasser, V., Hauser, C., Fasching, D., Brandes, C., Bajari, T.M., Schneider, W.J. & Nimpf, J. 2002. A secreted soluble form of ApoE receptor 2 acts as a dominant negative receptor and inhibits Reelin signaling. *The EMBO Journal*. 21: 5996-6004
71. McElvaine, A.T. & Mayo, K.E. 2006. A dominant-negative human growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor splice variant inhibits GHRH binding. *Endocrinology*: 147:1884-1894
72. Kitayama, S., Ikeda, T., Mitsuhashi, C., Sato, T., Morita, K. & Dohi, T. 1999. Dominant negative isoform of rat norepinephrine transporter produced by alternative RNA splicing. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 10731-10736
73. Walker, W., Girardet, C. & Habener, J.F. 1996. Alternative Exon Splicing Controls a Translational Switch from Activator to Repressor Isoforms of Transcription Factor CREB during Spermatogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 271:20145-21050
74. Yin, J.C.P., Del Vecchio, M., Zhou, H. & Tully, T. 1995. CREB as a memory modulator: induced expression of dCREB2 activator isoform enhances Long-Term Memory in *Drosophila*. *Cell*. 81: 107-115
75. Li, S. & Koromilas, A.E. 2001. Dominant Negative function by an alternatively spliced form of the Interferon-inducible Protein Kinase PKR. *The Journal of Biological Chemistry*. 17: 13881-13890
76. Brothers, S.P., Cornea, A., Janovick, J.A. & Conn, P.M. 2004. Human loss-of-function gonadotropin-releasing hormone receptor mutants retain wild-type receptors in the endoplasmic reticulum: molecular basis of the dominant negative effect. *Molecular endocrinology*. 18: 1787-1797

77. Miller, T.L., Goodfrey, P.A., Dealmedia, V.I. & Mayo, K.E. 1999. The rat growth hormone-releasing hormone receptor gene: structure, regulation and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology*. 140: 4152-4165
78. Rice, D.S. & Curran, T. 2001. Role of the reelin signaling pathway in central nervous development. *Annual Review of Neuroscience*. 24: 1005-1039
79. Brandes, C., Kahr, L., Stockinger, W., Herz, J., Schneider, W.J. & Nimpf, J. 2001. Alternative splicing in the ligand binding domain of mouse ApoE receptor-2 produces receptor variants binding reelin but not α 2-macroglobulin. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 22160-22169
80. Mayo, K.E. 1992. Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Molecular Endocrinology*. 61: 1734-1744
81. Millar, D., Lewis, M., Horan, M., Newsway, V., Easter, T., Gregory, J., Fryklund, L., Norin, M., Crowne, E., Davies, S., Edwards, P., Kirk, J., Waldron, K., Smith, P., Phillips, J., Scanlon, M., Krawczak, M., Cooper, D. & Procter, A. 2003. Novel mutations of the growth hormone 1 (GH1) gene disclosed by modulation of the clinical selection criteria for individuals with short stature. *Human Mutation*. 21: 424-440
82. Hayashi, Y., Yamamoto, M., Ohmori, S., Kamijo, T., Ogawa, M & Seo, H. 1999. Inhibition of growth hormone (GH) secretion by a mutant GH-I gene product in neuroendocrine cells containing secretory granules: an implication for isolated GH deficiency inherited in an autosomal dominant manner. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 84: 2134-2139
83. Shariat, N., Ryther, R.C., Phillips, J.A., Robinson, I.C. & Patton, J.G. 2008. Rescue of Pituitary function in a mouse model of Isolated Growth Hormone deficiency type II by RNA interference. *Endocrinology*. 149(2): 580-586
84. Ensembl URL: www.ensembl.org
85. Schauder, B., Schomburg, L., Köhrle, J. & Bauer, K. 1994. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 9534-9538
86. Chávez-Gutiérrez, 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.
87. O'Leary, R. & O'Connor, B. 1995. Thyrotropin-Releasing Hormone. *Journal of Neurochemistry*. 65(3): 953-960
88. Lechan, R.M. & Toni, R. 1992. Thyrotropin-releasing hormone neuronal systems in the central nervous system. In: Nemeroff, C.B. (ed) *Neuroendocrinology*. pp. 279-329 CRC Press, Boca Raton, FL
89. Fink, G., Koch, Y., Ben-Aroya, N. 1993. TRH in hypophysial portal blood: Characteristics of release and relationship to thyrotropin and prolactin secretion. En: Griffiths, E.C. & Bennett, G.W. eds. *Thyrotropin Releasing Hormone*. Pp. 127-144. Raven press, New York .
90. Martino, E., Lernmark, A., Seo, H., Steiner, D.F. & Refetoff, S. 1978. High concentration of thyrotropin-releasing hormone in pancreatic islets. *Proceedures of the National Academy of Sciences*. 75: 4265-4267
91. Leppaluoto, J., Koivusalo, F. & Kraama, R. 1978. Thyrotropin-releasing factor: distribution in neural and gastrointestinal tissues. *Acta Physiologica Scandinavica*. 104: 175-179
92. Wilber, J.F., Feng, P., Li, Q.L. & Shi, Z.X. 1996. The thyrotropin-releasing hormone gene Differential regulation, expression, and function in hypothalamus and two unexpected extrahypothalamic loci, the heart and testis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 7(3):93-100
93. Jackson, I.M. & Reichlin, S. 1977. Thyrotropin-releasing hormone: abundance in the skin of the frog, *Rana pipiens*. *Science*. 198: 414-415
94. Jackson, I.M. & Reichlin, S. 1974. Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH): Distribution in Hypothalamic and Extrahypothalamic Brain Tissues of Mammalian and Submammalian Chordates. *Endocrinology*. 95: 854-862
95. Lechan, R.M., Wu, P. & Jackson, I.M. 1987 Immunocytochemical distribution in rat brain of putative peptides derived from thyrotropin-releasing hormone prohormone. *Endocrinology*. 121(5):1879-91.
96. Segerson, T.P., Hoefler, H., Childers, H., Wolfe, H.J., Wu, P., Jackson, I.M. & Lechan, R.M. 1987. Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain in situ hybridization. *Endocrinology*. 121(1):98-107
97. Gary, K.A., Sevarino, K.A., Yarbrough, G.G., Prange Jr A.J. & Winokur, A. 2003. The Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Hypothesis of Homeostatic Regulation: Implications for TRH-Based Therapeutics. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 305: 410-416
98. Breese, G.R., Cott, J.M., Cooper, B.R., Prange, A.J. Jr. & Lipton, M.A.. 1974. Antagonism of ethanol narcosis by thyrotropin releasing hormone. *Life Sciences*, 14(6): 1053-1063
99. Breese, G.R., Cott, J.M., Cooper, B.R., Prange, A.J. Jr., Lipton, M.A. & Plotnikoff, N.P.. 1975. Effects of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on the actions of pentobarbital and other centrally acting drugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 193(1):11-22

100. Lloyd, R.L., Pekary, A.E., Sattin, A. & Amundson, T. 2001. Antidepressant effects of thyrotropin-releasing hormone analogues using a rodent model of depression. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 70(1):15-22.
101. Matsumoto, A., Kumagai, T., Takeuchi, T., Miyazaki, S. & Watanabe, K. 1987. Clinical effects of thyrotropin-releasing hormone for severe epilepsy in childhood: a comparative study with ACTH therapy. *Epilepsia*. 28(1):49-55
102. Horita, A., Carino, M.A., Zabawska, J. & Lai, H. 1989. TRH analog MK-771 reverses neurochemical and learning deficits in medial septal-lesioned rats. *Peptides*. 10(1):121-4
103. Faden, A.I. 1989. TRH Analog YM-14673 improves outcome following traumatic brain and spinal cord injury in rats: dose-response studies. *Brain Research*. 486: 228-235
104. García S.I., Alvarez, A.L., Porto, P.I., Garfunkel, V.M., Finkielman, S. & Pirola, C.J. 2001. Antisense inhibition of thyrotropin-releasing hormone reduces arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 37(Parte 2):365-70
105. Knight, W.D., Swoap, S.J., Parsons, A.D. & Overton, J.M. 2006. Central thyrotropin-releasing hormone infusion opposes cardiovascular and metabolic suppression during caloric restriction. *Neuroendocrinology*. 83(2):69-76.
106. Stocca, G. & Nistri, A. 1995. Enhancement of NMDA receptor mediated synaptic potentials of rat hippocampal neurons in vitro by thyrotropin releasing hormone. *Neuroscience letters*. 184: 9-12
107. 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
108. Metcalf G. 1982. Regulatory peptides as a source of new drugs—the clinical prospects for analogues of TRH which are resistant to metabolic degradation. *Brain Research*. 257(3):389-408.
109. Czekay, G. & Bauer, K. 1993. Identification of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme as a metallopeptidase. *Biochemical Journal*. 290:921-926
110. MEROPS, The peptidase database. URL: <http://merops.sanger.ac.uk>
111. 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*. Bath, Inglaterra
112. Chávez-Gutierrez, L., Matta-Camacho, E., Osuna, J., Horjales, E., Joseph-Bravo, P., Maigret, B. & Charli, J.-L. 2006. Homology modeling and site-directed mutagenesis of Pyroglutamyl Peptidase II. Insights into omega-versus aminopeptidase specificity in the M1 family. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 18581-18590
113. Kelly, J.A., Slator, G.R., Tipton, K.F., Williams, C.H. & Bauer, K. 2000. Kinetic investigation of the specificity of porcine brain Thyrotropin releasing Hormone-degrading Ecto-enzyme for Thyrotropin-releasing hormone like peptides. *The Journal of Biological Chemistry*. 275:16746-16751
114. Elmore, M.A., Griffiths, E.C., O'Connor, B. & O'Cuinn, G. 1990. Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides*. 15(1):31-6.
115. Gallagher, S. P. & O'Connor, B. 1998. A study of a highly specific pyroglutamyl aminopeptidase type-II from the membrane fraction of bovine brain. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 30: 115-133
116. Wilk, S. 1986. Neuropeptide-specific peptidases: does brain contain a specific TRH degrading enzyme? *Life Sciences*. 39: 1487-1492
117. 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*. 13:237-242.
118. 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
119. 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
120. 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
121. Bauer, K. 1994. Purification and characterization of the thyrotropin releasing hormone degrading ectoenzyme. *European Journal of Biochemistry*. 224: 387-396
122. 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. *European Journal of Biochemistry*. 267: 2617-2623
123. Chavez-Gutierrez, L. Datos no publicados
124. Papadopoulos, T., Kelly, J.A. & Bauer, K. 2001. Mutational analysis of the Thyrotropin-Releasing Hormone-Degrading Ecto-enzyme. Similarities and Differences with other members of the M1 family of the Aminopeptidases and Thermolysin. *Biochemistry*. 40: 9347-935

125. 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
126. 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
127. 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.
128. Cruz, C., Charli, J-L., Vargas, M.A. & Joseph-Bravo, P. 1991. Neuronal localization of Pyroglutamate Aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. *Journal of Neurochemistry*. 56: 1594-1601
129. Bauer, K. 1987. Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature*. 330 : 375-377
130. 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.
131. Bauer, K., Carmeliet, P., Schulz, M., Baes, M. & Denef, 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: 1224-1233
132. 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
133. 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: 3480-3485
134. Bauer, K. 1988. Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone-degrading ectoenzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie*. 70: 69
135. Schomburg, L. & Bauer, K. 1995. Regulation of the adenohypophyseal thyrotropin releasing hormone degrading ectoenzyme by estradiol. *Endocrinology*. 138: 3587
136. 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: 267-272
137. 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
138. 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
139. Vargas, M.A., Joseph-Bravo, P. & Charli, J. 1994. Thyrotropin-Releasing Hormone downregulates Pyroglutamyl Aminopeptidase II activity in adenohypophyseal cells. *Neuroendocrinology*. 60: 323-330
140. Vargas, M.A., Herrera, J., Uribe, R.M., Charli, J. & Joseph-Bravo, P. 1992. Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohypophysis and pancreas. *Developmental Brain Research*. 66: 251-256.
141. 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 diferencialmente regula la expresión de los elementos involucrados en la transmisión de TRH. *Neurochemistry International*. 48: 31-42
142. 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
143. Aguilar-Valles, A., Sánchez, E., de Gortari, P., García-Vázquez, A.I., Ramírez-Amaya, V., Bermúdez-Rattoni, F., Joseph-Bravo, P. 2007. The expression of TRH, its receptors and degrading enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze. *Neurochemistry International*. 50 404-417.
144. Juárez Contreras, K.E. 2006. Estudio correlativo sobre la actividad de la Piroglutamil Aminopeptidasa II (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 de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
145. Vargas, M.A. Comunicación personal.
146. Ofner, L.D. & Hooper, N.M. 2002. The C-terminal domain, but not the interchain disulphide, is required for the activity and intracellular trafficking of aminopeptidase A. *Biochemical Journal*. 362: 191-197.
147. Rozenfeld, R., Muller, L., El Messari, S. & Llorens-Cortés, C. 2004. The C-terminal domain of aminopeptidase A is an intramolecular chaperone required for the correct folding, cell surface expression and activity of this monozinc aminopeptidase. *Journal of Biological Chemistry*. 279(41):43285-43295

148. Juárez Contreras, K. E. Datos no publicados.
149. ATCC URL: <http://www.atcc.org>
150. Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
151. Guerra-Crespo, M., Charli, J.L., Rosales-garcia, V.H., Pedraza-Alva, G. & Pérez-Martínez, L. 2003. Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons. *Journal of Neuroscience Methods*. 127:179-192
152. Pedraza-Alva, G. Comunicación personal
153. Pérez-Martínez, L., Carreón-Rodríguez, A., González-Alzati, M.E., Morales, C., Charli, J.L. & Joseph-Bravo, P. 1998. Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: Interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology*. 68: 345-354
154. Dharmacon. URL: <http://www.dharmacon.com>
155. Amaxa Biosystems. URL: <http://www.amaxa.com/kitsforprimarycells.html>
156. Invitrogen URL: <http://www.invitrogen.com>
157. Urban-Klein, B., Perth, S., Abuharbeid, S., Czubayko, F.. & Aigner, A. 2005. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyehylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene therapy*. 12:461-466
158. RNA interferente-mediated gene silencing of Pleiotrophin through Polyethylenimine-complexed small interfering RNAs in vivo exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts. *Human Gene therapy*. 17:751-766
159. Santa Cruz Biotechnologu. URL: <http://www.scbt.com>
160. Paxinos, G. & Watson, C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2a edición. *Academic Press Inc. USA*
161. Hu, Qin; Chen, Chunhua; Yan, Junhao; Yang, Xiaomei; Shi, Xianzhong; Zhao, Jing; Lei, Jiliang; Yang, Lei; Wang, Ke; Chen, Lin; Huang, Yunhong; Han, Jingyan; Zhang, John H; & Zhou, Changman. 2009. Therapeutic application of gene silencing MMP-9 in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia rat model. *Experimental Neurology*. 216(1): 35-46
162. Palkovits, M. & Brownstein, M.J. 1988. Maps & guide to microdissection of the rat brain. *Elsevier*, New York.
163. Chomczynski,P. & Sacchi,N. 1987. Single-Step Method of RNA isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. 162: 156-159.
164. 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
165. 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
166. Lechan, R.M., Wu, P., Jackson, I.M., Wolf, H., Cooperman, S., Mandel, G. & Goodman, R.H.. 1986. Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science*. 231: 159-161
167. 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 adenohypophyseal cells. *Neuropeptides*. 34: 83-88
168. Bradford, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976.
169. Chávez-Gutierrez, L. datos no publicados
170. Juárez Contreras, K. E. Datos no publicados.
171. Martínez-Armenta, M. Datos no publicados
172. Yan, Q.S., Feng, M-J. & Yan, S-E. 2007. RNA interference-mediated inhibition of brain-derived neurotrophic factor expresión increases cocaine's cytotoxicity in cultured cells. *Neuroscience letters*. 414: 165-169
173. Kao, S-C., Krichevsky, A., Kosik, K.S. & Tsai, L-H. 2004. BACE 1 supresion by RNA interference in primary cortical neurons. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 1942-1949
174. Ryther, R.C.C., McGuinness, L.m., Phillips III, J.A., Moseley, C. T., Magoulas, C.B., Robinson, I.C.A.F. & Patton, J.G. 2003. Disruption of exon definition produces a dominant-negative growth hormone isoform that causes somoatotroph death and IGHDI. *Human Genetics*. 113: 140-148
175. Zaika, A.I., Slade, N., Erster, S.H. 2002. ΔNp73, a dominant negative inhibitor of wild type p53 and Tap73 is upregulated in human tumors. *Journal of Experimental Medicine*. 196:765-780
176. Concin, N., Hofstetter, G., Berger, A., Gehmacher, A., Reimer, D., Watrowski, R., Tong, D., Schuster, E., Hefler, L., Heim, K., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Moll, U.M., Zeimet, A.G. & Zeillinger, R.2005. Clinical relevance of dominant negative p73 isoforms for responsiveness to chemotherapy and survival in ovarian cancer: Evidence for a crucial p53-p73 cross-talk in vivo. *Clinical Cancer Research*. 11(23):8372-8383
177. Kelly, J.A. 1995. Thyrotropin-Releasing Hormone:basis and potential for its therapeutic use. *Essays in Biochemistry Issues*. 30: 133-149

178. Wang, E., Dimova, N., Sperle, K., Huang, Z., Lock, L., McCulloch, M.C., Edgar, J.M., Hobson, G.M. & Cambi, F. 2008. Deletion of a splicing enhancer disrupts PLP1/DM20 ratio and myelin stability. *Experimental Neurology*. 214(2): 322-330
179. Nabel-Rosen, H., Dorevitch, N., Reuveny, A. & Volk, T. 1999. The balance between two isoforms of the Drosophila RNA-Binding protein How controls tendon cell differentiation. *Molecular Cell*. 4: 573-584
180. Nabel-Rosen, H., Volohonsky, G., Reuveny, A., Zaidel-Bar, R. & Volk, T. 2002. Two isoforms of the Drosophila RNA binding protein, How, act in opposing directions to regulate tendon cell differentiation. *Developmental Cell*. 2: 183-193
181. Fedorov, Y., Anderson, E.M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., Leake, D., Marschall, W.S. & Khvorova, A. 2006. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA*. 12: 1188-1196
182. Scacheri, P.C., Rozenblatt-Rozen, O., Caplen, N.J., Wolfsberg, T.G., Umayam, L., Lee, J.C., Hughes, C.M., Shanmugam, K.S., Bhattacharjee, A., Meyerson, M. & Collins, F.S. 2004. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(7): 1892-1897
183. Yu, J-Y., Wang, T-W., Vojtek, A.B., Parent, J.M. & Turner, D.L. 2005. Use of Short Hairpin RNA expression vectors to study mammalian neural development. *Methods in Enzymology*. 392: 186-199
184. Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S. & Khvorova, A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology*. 22(3): 326-330
185. Jagla, B., Aulner, N., Kelly, P.D., Song, D., Volchuk, A., Zatorski, A., Shum, D., Mayer, T., De Angelis, D.A., Querfelli, O., Rutishauser, U. & Rothman, J.E. 2005. Sequence characteristics of functional siRNAs. *RNA*. 11:864-872
186. Donis-Keller, H. 1979. Site specific enzymatic cleavage of RNA. *Nucleic Acids Research*. 7: 179-192
187. Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila Melanogaster embryo lysate. *The EMBO Journal*. 20: 6877-6888
188. Aigner, A. 2006. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs. *Journal of Biotechnology*. 124: 12-25
189. Jakobsson, J. & Lundberg, C. 2006. Lentiviral Vectors for Use in the Central Nervous System. *Molecular Therapy*. 13(3):484-493