



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MECANISMOS MOLECULARES QUE REGULAN EL ESTABLECIMIENTO Y
MANTENIMIENTO DEL FENOTIPO TRHERGICO DEL HIPOTÁLAMO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

JUAN CARLOS PÉREZ MONTER

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

<i>a. Agradecimientos</i>	i
<i>b. Dedicatoria</i>	iii
<i>c. Resumen</i>	iv
<i>d. Abstract</i>	vi
1. Introducción	01
<i>1.1 Desarrollo embrionario</i>	01
<i>1.2 Inducción del tejido neural</i>	04
<i>1.2.1 Identidad de las moléculas inductoras</i>	05
<i>1.2.1.1 Morfógenos</i>	05
<i>1.2.1.2 Factores de transcripción</i>	12
<i>1.3 Regulación de la neurogénesis durante el desarrollo embrionario</i>	16
<i>1.3.1 Regionalización del sistema nervioso</i>	22
<i>1.4 Diferenciación neuronal</i>	23
<i>1.4.1 Establecimiento y maduración</i>	25
<i>1.4.2 Mecanismos de especificación neuronal</i>	29
<i>1.4.2.1 Cascadas de factores de transcripción</i>	29
<i>1.4.2.2 Mecanismos epigenéticos de especificación neuronal</i>	33
<i>1.4.2.3 Mecanismos no transcripcionales que controlan neurogénesis</i>	35
2. Antecedentes	38
<i>2.1 El hipotálamo, origen y desarrollo</i>	38
<i>2.1.1 La hormona liberadora de tirotrópina (TRH)</i>	47
<i>2.1.2 Regulación de la diferenciación de las neuronas TRHérgicas del hipotálamo</i>	48
3. Justificación	52
<i>3.1 Transcriptoma de las neuronas TRHérgicas</i>	52
<i>3.2 El factor de transcripción 4 similar a Krüppel (Klf4)</i>	55
4. Hipotesis	59
5. Objetivos	59
6. Materiales y métodos	60

6.1	<i>Ensayo de retardo electroforético (EMSA)</i>	60
6.1.1	<i>Extractos nucleares</i>	60
6.1.2	<i>Marcaje de oligonucleótidos</i>	61
6.1.3	<i>Ensayos de interacción</i>	62
6.1.4	<i>Ensayos de competencia</i>	63
6.2	<i>Cultivo primario de hipotálamo</i>	63
6.2.1	<i>Disección y siembra</i>	63
6.2.2	<i>Transfección y ensayo de luciferasa</i>	64
6.3	<i>Inmunoprecipitación y Western Blott</i>	66
6.4	<i>Reacción de transcripción reversa y reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR)</i>	67
6.4.1	<i>Extracción de RNA total</i>	67
6.4.2	<i>Transcripción reversa (RT)</i>	69
6.4.3	<i>Reacción en cadena de polimerasa (PCR)</i>	69
6.5	<i>Inmunoprecipitación de cromatina</i>	70
6.5.1	<i>Obtención y fragmentación de cromatina soluble</i>	70
6.5.2	<i>Inmunoprecipitación</i>	72
6.5.3	<i>PCR</i>	73
6.6	<i>Determinación de genotipo y ensayo de permeabilidad</i>	74
6.6.1	<i>Extracción de DNA genómico</i>	74
6.6.2	<i>PCR</i>	75
6.6.3	<i>Ensayo de permeabilidad</i>	76
6.7	<i>PCR cuantitativa (qPCR)</i>	76
6.8	<i>Radioinmunoensayo (RIA)</i>	78
6.8.1	<i>Extracción del TRH</i>	78
6.8.2	<i>Curva estándar de TRH</i>	78

6.8.3 Estándar interno de hipotálamo	79
6.8.4 Determinación de la concentración de TRH	84
7. Resultados	
7.1 Identificación de elementos potenciales para la unión de factores tipo Kriippel en la región promotora del gen de TRH	81
7.2 KLF4 reconoce y une a los elementos de respuesta en la región promotora del gen de TRH durante el desarrollo del hipotálamo	84
7.3 Los factores de transcripción Klf4 y Sp1 regulan de manera cooperativa la actividad del promotor del gen de TRH	92
7.4 Los factores Klf4 y Sp1 interaccionan físicamente in vivo	102
7.5 Los factores Klf4 y Sp1 se unen al promotor del gen de TRH in vivo	103
7.6 Klf4 es necesario para la expresión temprana del gen de TRH in vivo	107
8. Discusión	113
8.1 Diferenciación del fenotipo neuronal durante el desarrollo embrionario	113
8.2 Diferenciación de fenotipos neuronales hipotalámicos y el papel del factor de transcripción KLF4	114
9. Conclusiones	124
10. Perspectivas	125
11. Apéndice A, figuras suplementarias 1 y 2	129
12. Apéndice B, “The Krüppel-like factor 4 controls biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone during hypothalamus development”	132
13. Referencias	140

a. Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Instituto de Biotecnología, en el laboratorio de Neurobiología a cargo del Dr. Jean Louis Charli Casalonga, a quien agradezco su disposición para aceptarme en su grupo de trabajo desde que inicié mi carrera en la ciencia dentro de la UNAM. En este laboratorio, también trabajan muchas de las personas que contribuyeron de manera importante a la realización de muchos de los experimentos que se presentan en este trabajo. De antemano me disculpo por aquellos que de manera inconsciente he omitido. A continuación algunos de ellos:

A Miguel Cisneros por su apoyo en la obtención de datos de los experimentos de radioinmunoensayo; Rosa Ma. Uribe por su asesoría técnica en el análisis de datos; Fidelia Romero por su apoyo en la parte técnica en la preparación de reactivos; especialmente a Manuel Villa por su disposición para proveer de material necesario en las labores cotidianas del laboratorio y por su apoyo en el sacrificio de algunos de los animales utilizados en este trabajo.

A Elizabeth Mata, Sergio González, Marcela Ramírez, Rubén Blancas, y demás personal del bioterio, quienes mantuvieron a los animales en las mejores condiciones posibles.

A los miembros del grupo de trabajo del Dr. Félix Recillas, especialmente a Mayra Furlan por su paciencia en la preparación de los experimentos de ChIp y a Georgina Guerrero por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

Agradezco también el apoyo brindado por el Dr. Alfredo Varela y la Dra. Amaya Miquelajauregi, tanto en la discusión como en la preparación de resultados para este trabajo.

Agradecimiento especial para la Dra. Marina Battaglia por todo su apoyo y consejos para poder realizar muchos experimentos y análisis de los datos derivados.

A los Drs. C.C. Tseng de la Universidad de Boston, EUA; G. Suske de la Phillips Universität, Alemania; G. Owens de Virginia University, EUA; J. Segre, de NIH, EUA., por la donación de reactivos y animales para el análisis *in vitro* e *in vivo*.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo mensual otorgado durante todo el período del programa de doctorado y por el donativo al proyecto con el número 61208, 42605, así como a DGAPA-UNAM por el apoyo número IN224909.

A todas las personas que contribuyeron con su tiempo y donación de reactivos o préstamo de equipo para poder realizar muchos de los experimentos aquí presentados.

Por último, a la Dra. Leonor Pérez, por haber depositado su confianza y apoyo en mí, para que pudiese llevar a cabo todo este trabajo bajo su asesoría y por ofrecerme su amistad y comprensión.

b. Dedicatoria

Bajé al mercado
y traje
tomates diarios aguacero
endivias y envidias
gambas grupas y amenes
harina monosílabos jerez
instantáneas estornudos arroz
alcachofas y gritos
rarísimos silencios
página en blanco
aquí te dejo todo
haz lo que quieras
espabílate
o por lo menos organízate
yo me echaré una siesta
ojala me despiertes
con algo original
y sugestivo
para que yo lo firme

Benedetti, Preguntas al azar

Al hombre que me cedió su boleto para que yo pudiese emprender el viaje en el barco que representa mi vida.

Cuernavaca, México. Enero 2011

c. Resumen

La diferenciación neuronal es un proceso altamente regulado. Uno de los mecanismos que permiten a los precursores neurales diferenciarse hacia algún fenotipo específico es la expresión de genes proneurales. De éstos, los factores de transcripción (FT) juegan un papel relevante. En el hipotálamo de murinos los precursores neuronales completan su división entre los días embrionarios (E)10.5 y E15.5. El hipotálamo regula la homeóstasis corporal a través del sistema endocrino del organismo, controlando las funciones secretoras de la glándula hipófisis. Mediante la producción de péptidos con actividad de tipo hormonal, el hipotálamo controla diversos procesos como la lactancia, el gasto energético, el crecimiento y la reproducción, entre otros. La hormona liberadora de tirotrópina (TRH), es reconocida por su papel regulador sobre la síntesis y la liberación de prolactina y tirotrópina en la adenohipófisis. Datos previos de nuestro laboratorio demuestran que el gen de TRH se regula durante el desarrollo tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta regulación es resultado de múltiples estímulos, los cuales inducen distintas vías de transducción intracelular. Con la finalidad de obtener una información más amplia acerca de los factores que pudiesen estar mediando el establecimiento y/o el mantenimiento del fenotipo TRHérgico hipotalámico, recientemente en nuestro laboratorio fue posible enriquecer una población de neuronas de TRH mediante el uso de citometría de flujo. A partir de las células TRH+ purificadas, se obtuvo el transcriptoma parcial de estas neuronas, utilizando la metodología de los microarreglos de ADN. El análisis de los datos de este transcriptoma mostró que algunos transcritos que codifican FTs se encuentran enriquecidos. En el presente trabajo mostramos que la expresión de uno de ellos, el factor 4 similar a Krüppel (Klf4), es regulado durante el desarrollo del hipotálamo. En hipotálamo de rata,

el RNAm de Klf4 es detectable desde el día embrionario (E) 15 alcanzando un máximo al día postnatal (P) 7 y disminuyendo en adulto. Por otro lado, el análisis de la región promotora del gen de TRH mostró que existen cuatro posibles elementos de respuesta a factores tipo Klf, dos de los cuales están altamente conservados en humano, rata y ratón. Experimentos de retardo electroforético e inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), muestran que dos miembros de la familia de factores tipo Klf, reconocen y se unen los elementos de respuesta, Klf4 y Sp1, tanto *in vitro* como *in vivo*. Determinamos que dicha unión es necesaria para regular la tasa transcripcional del gen de TRH; específicamente, que los dos primeros elementos son esenciales para el control basal de la expresión, a través de un mecanismo sinérgico mediado por la interacción física entre Klf4 y Sp1. Además, existe un mecanismo de relevo ocupacional en el promotor de ambos factores dependiente de la etapa de desarrollo, en la que Sp1, predomina en el período embrionario y Klf4 en la etapa adulta. De manera interesante, la expresión del RNAm de TRH se reduce significativamente en los ratones Klf4^{-/-} y consecuentemente los niveles del péptido maduro reflejan esta reducción en la etapa embrionaria. No obstante, en la etapa neonatal los niveles del RNAm así como del péptido se recuperan parcialmente en los ratones Klf4^{-/-}, alcanzando niveles similares al de los ratones Klf4^{+/+}, indicando que existe un mecanismo de compensación en la regulación de la tasa transcripcional. Proponemos que en etapas embrionarias, Klf4, junto con Sp1 promueven la expresión del gen, contribuyendo así al proceso de diferenciación terminal del fenotipo TRHérgico, mientras que en etapas post-natales, ambos factores pueden ser dispensables en la consolidación y en cambio forman parte de un conjunto de factores que contribuyen al mantenimiento del fenotipo.

d. Abstract

Embryonic neurogenesis is controlled by the activation of genetic programs triggered by extrinsic and intrinsic signals. Several transcription factors play important roles during rodent hypothalamic neurogenesis, but how they regulate the appearance of neuronal phenotypes in the hypothalamus is poorly understood. Here we demonstrated that Krüppel-like factor 4 (Klf4), is expressed in the rat hypothalamus during embryonic development. Klf4 regulates TRH expression by binding two conserved CACCC and GC motifs present on the TRH gene promoter in a cooperative manner with Sp1, both in vitro and in vivo. Accordingly, TRH gene expression was down-regulated during embryonic hypothalamic development in the Klf4 knock-out mice, resulting in diminished bioactive peptide production. Conversely, at the neonatal stage, the TRH transcript levels are recovered, although a delay in peptide production persists. Thus, our results indicate that Klf4 plays a key role during neuronal maturation of the hypothalamic TRH phenotype during early developmental stages.

1. Introducción

1.1 Desarrollo embrionario

El desarrollo de los organismos multicelulares varía de forma sustancial de acuerdo al organismo en cuestión, sin embargo existen características comunes. Los embriones surgen por efecto de la fusión del material genético de dos células germinales o gametos durante la fertilización. Una vez que ha ocurrido la fertilización se forma el cigoto, que sufre una serie de divisiones mitóticas que originan a las células conocidas como blastómeros, los cuales tienen la capacidad de formar las diversas capas de células que originan órganos y tejidos. Los blastómeros originan una masa de celular conocida como blástula o blastocisto, el cual es sujeto de un proceso dinámico de cambios conocido como gastrulación. En los mamíferos, la gastrulación tiene características particulares, como el proceso de compactación, en el que las células en división forman un conglomerado conocido como blastocisto el cual está rodeado por una capa de células externas. Estas células externas originan una estructura llamada trofoblasto (o trofotodermo), que por sí mismo no produce tejido embrionario, sino de sostén para el mismo, como la placenta y el corion (Bianchi et al., 1993). Por otro lado, la segregación de las células que yacen debajo del trofotodermo, llamadas masa celular interna (ICM), genera dos capas de células, el epiblasto y el hipoblasto. El primero, origina las tres capas embrionarias, el ectodermo, el endodermo y el mesodermo; mientras que el segundo origina tejido de sostén (Figura 1) (Gilbert, 2006). Las células que constituyen a la ICM, atraviesan por un proceso de modificación por efecto del proceso de gastrulación, lo que resulta en la formación de las tres capas embrionarias, que darán origen a su vez, a los órganos y tejidos en el organismo

adulto. Para que este proceso se lleve a cabo de manera correcta es necesario que se establezca una polaridad. La polaridad del embrión es importante en cuanto a que permite el establecimiento de los ejes axiales, (antero-posterior, dorso-ventral y latero-medial). La formación de dichos ejes es un evento que permite la posterior maduración del embrión.

Se sabe que las distintas etapas del desarrollo embrionario presentan similitudes entre organismos vertebrados e invertebrados. Específicamente algunas se pueden apreciar en cuanto a la derivación del tejido neural. La primera es que el tejido nervioso se deriva de la capa embrionaria ectodermal en todos los organismos triploblásticos (con tres capas germinales), incluidos los humanos.

La derivación de tejido neural se ha descrito en gran detalle en varios organismos

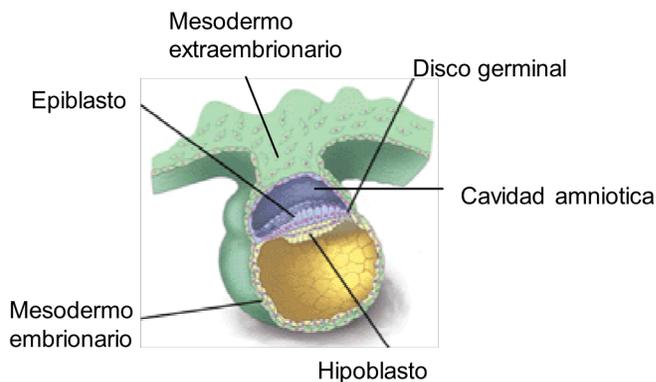


Figura 1. División temprana del embrión de ratón. Se puede apreciar un esquema del blastocisto de mamíferos previo a la implantación, en donde aparecen la masa celular interna que dará origen a todo el organismo. Una vez que la gastrulación ha iniciado, se pueden apreciar las capas celulares conocidas como epiblasto e hipoblasto; ambos derivan de la segregación de la masa celular interna y participan en la formación del endodermo y mesodermo, en el primer caso, y de tejido extraembrionario, en el segundo. Tomado de: Gilbert SF., 2006. *Developmental Biology*, 8a ed., Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, EUA.; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/genetics_cell.html.

usados como modelos, entre los que destacan *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio* así como *Mus musculus* o *Rattus norvegicus*. En la mayoría de estos organismos el ectodermo origina dos tipos de tejidos, la piel y el sistema nervioso. En cada organismo la posición del ectodermo define la posición final del sistema nervioso. Por ejemplo, en *D. melanogaster*, poco antes del proceso de gastrulación, los dos segmentos

del ectodermo neural en la parte ventro-lateral se fusionan como consecuencia de la invaginación del mesodermo (surco ventral). Tiempo después, durante la gastrulación, la región neurogénica del ectodermo queda posicionada en la parte ventral del embrión, por lo que en la mosca el sistema nervioso es ventral y no dorsal como ocurre en los vertebrados, incluido el humano.

En el nematodo *C. elegans*, las células llamadas AB, originan por división la mayor parte de la hipodermis y el sistema nervioso. Durante la gastrulación, la progenie de las células AB se dirige hacia la parte externa del embrión y al igual que en *D. melanogaster*, la parte ventro-lateral del embrión se caracteriza por la formación de precursores neurales que originan la región central del sistema nervioso, mientras que parte de la hipodermis lateral origina la región periférica del mismo (Sanes DH., 2006).

Una vez que inicia el proceso de gastrulación, la parte dorsal del ectodermo origina un epitelio con características únicas conocido como placa neural. La placa neural es sujeta a múltiples estímulos que inducen la formación del tubo neural y de una estructura conocida como notocorda, esta última se extiende a lo largo de la línea media del embrión, abarcando la parte media-anterior hasta la zona más posterior del mismo (Purves D., 2004). La notocorda induce la polarización del tubo neural estableciendo el eje dorso-ventral mediante la producción de factores difusibles que ejercen un efecto de acción parácrina. Algunos de los factores difusibles son el morfógeno *Sonic hedgehog* (*Shh*), producido y liberado por las células de la notocorda. Se sabe que *Shh* induce la formación de una estructura en la parte ventral del tubo neural llamada placa de piso (“*floor plate*”) (Ruiz i Altaba et al., 2002; Shirasaki and Pfaff, 2002). Por otro lado, la parte más dorsal del tubo neural adquiere propiedades distintas por la acción de factores que pertenecen a la familia

del factor transformante beta (TGF β), proteína morfogénica de hueso 4 (BMP4), BMP7, *dorsalina* y *activina*; esta parte dorsal es conocida como la placa del techo (“*roof plate*”) (Liem et al., 1995; Liem et al., 1997; Liem et al., 2000; Ruiz i Altaba et al., 2003; Liu and Niswander, 2005). Las células indiferenciadas que se encuentran en el tubo neural responden a estos factores activando o reprimiendo la expresión de genes que les otorgan identidad regional, lo que posteriormente se reflejara en la formación del cerebro adulto, así como de la espina dorsal.

1.2 Inducción del tejido neural

El sistema nervioso en mamíferos, vertebrados e invertebrados, consiste principalmente de cuatro tipos de células: las neuronas, los oligodendrocitos, los astrocitos y las células endodiales (Sanes DH., 2006). Todas ellas son generadas de la progresión del ectodermo a través de varios pasos esenciales que requieren de la integración de múltiples señales inductoras y represoras, a lo largo de los ejes dorso-ventral y antero-posterior, que controlan la expresión de diversos genes mediante la activación de diversas vías de señalización (Stern, 2001). Estos pasos básicos son: la inducción, la especificación y la diferenciación. El primero se relaciona con la capacidad de las células del ectodermo para comprometerse como precursores neuronales al ser expuestas a la combinación correcta de señales. La especificación se refiere a la incapacidad de los precursores para responder a señales que reprimen el compromiso hacia un fenotipo neuronal, es decir, el microambiente no tiene un efecto neto sobre su compromiso de identidad, sino sólo en su maduración.

Por último, el proceso de diferenciación se refiere al hecho de que los precursores neuronales abandonan el ciclo celular para activar los programas génicos que les permiten adquirir el fenotipo de neuronas post-mitóticas, las cuales establecerán conexiones con otras neuronas, formando redes neurales funcionales.

1.2.1 Identidad de las moléculas inductoras

1.2.1.1 Morfógenos

Una vez que se ha formado la notocorda en la parte ventral del embrión en desarrollo, el desarrollo morfológico y funcional del sistema nervioso en mamíferos, depende de la generación de diversos tipos de neuronas o células gliales, así como de su disposición espacial final. Estos dos procesos son regulados principalmente, al menos en las etapas tempranas, por la distribución gradual de moléculas señalizadoras llamadas morfógenos. Entre los morfógenos más conocidos cuya actividad parece ser crucial para la determinación de diversos fenotipos neuronales tanto en invertebrados como en vertebrados destacan el ácido retinoico (RA), *sonic hedgehog* (Shh), *decapentaplegic* (dpp), el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), *Wingless*, TGF β , así como *Wnt* (Sanchez-Camacho et al., 2005; Kutejova et al., 2009). El modelo más aceptado por el cual los morfógenos ejercen su acción es el del establecimiento de un gradiente, en el que las células responden directamente a distintas concentraciones del morfógeno. El resultado neto de este gradiente es la generación de dominios discretos de expresión de genes blanco. Aunado a este fenómeno de expresión dependiente de la dosis, también existe un evento que relaciona la aparición de los dominios de expresión de genes blanco, con la etapa de desarrollo del embrión. En esta, la posición y tamaños relativos de los dominios, cambian conforme avanza el desarrollo. Por

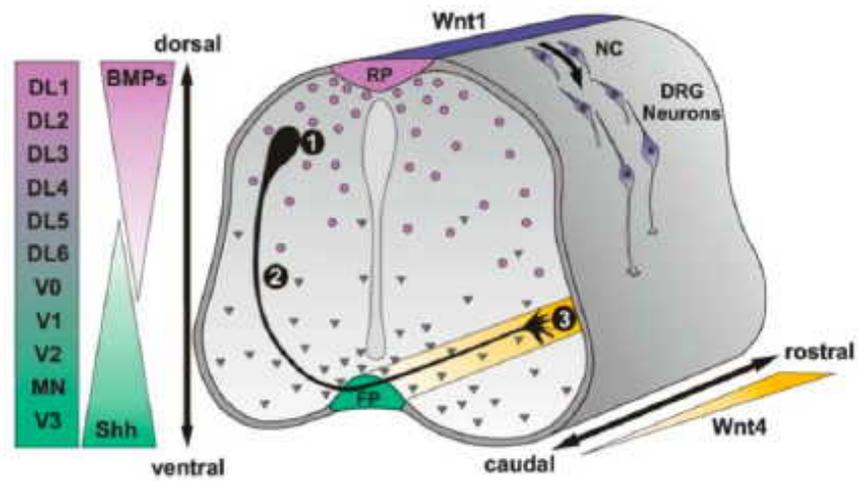
ejemplo, se sabe que el factor *Nkx2.2*, un factor transcripcional que sirve como marcador de progenitores del tubo neural que adoptarán el fenotipo interneuronal en la región ventral llamada V3, requiere de altas concentraciones de *Shh* para iniciar su expresión; mientras que el factor *Olig2*, que define a los progenitores que dan origen a las motoneuronas en la parte más dorsal, responde a concentraciones bajas de *Shh* y altas concentraciones de *Wnt1* (Figura 2) (Dessaud et al., 2008).

Por otro lado, los FGFs son una familia de factores que comprende alrededor de 23 miembros, algunos de los cuales existen en distintas isoformas; los FGFs controlan procesos de proliferación y diferenciación. Por ejemplo, FGF8 participa activamente en la capacidad inductora de una pequeña región del tubo neural llamada el organizador y que es similar al organizador de *X. laevis*. Este organizador se localiza en la frontera entre el cerebro posterior y el cerebro medio de los vertebrados mamíferos como el ratón (revisado en (Irving and Mason, 2000; Wilson and Edlund, 2001). Se sabe que FGF8 en conjunto con el morfógeno *Wnt1*, es crucial en la formación de la región que origina al cerebro medio y al cerebelo, ya que ratones mutantes para la expresión de cualquiera de éstos factores, presentan defectos en la formación de dichas estructuras; uno de los principales genes blanco afectados por la delección de *Wnt1* y/o FGF8 es *engrailed (en1)*, un factor de transcripción que se expresa en la frontera que delimita al mesencéfalo del metencéfalo). Los genes que codifican para *en1* y *wingless* (homólogo de *Wnt1*), fueron descritos inicialmente en mutantes de *D. melanogaster*, en las cuales se identificaron alteraciones durante etapas tempranas del desarrollo de la larva, específicamente en el proceso de segmentación (Meyers et al., 1998). Recientemente, en un estudio realizado utilizando moscas mutantes para la vía de señalización de *wingless*, se determinó que la actividad de

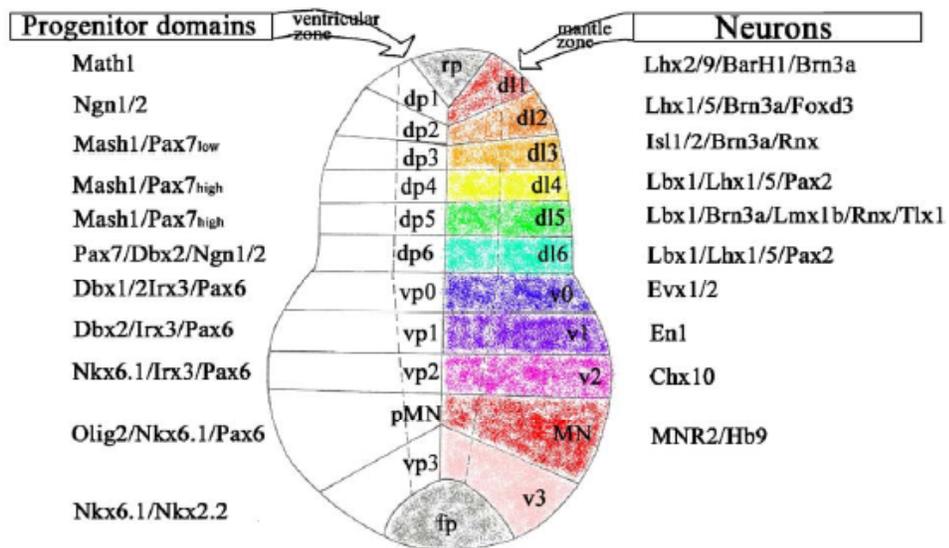
este morfógeno es crucial para la etapa de migración de los neuroblastos o precursores neurales en la parte ventral del embrión y que la expresión de los factores de transcripción *Cut* y *Zfh1*, ambos relacionados con la expresión de genes que controlan el proceso migratorio, disminuye significativamente (Bhat, 2007).

Otras señales que destacan por su papel en el proceso de neuralización del ectodermo se han identificado en la mayoría de las especies mencionadas. Entre ellas

A



B



destaca *Noggin*, una molécula que fue identificada en embriones de *X. laevis* y que se expresa desde la etapa de la gastrulación en la parte dorsal del blastoporo (Zimmerman et al., 1996) (Sanes DH., 2006). El papel de esta molécula está vinculado estrechamente con la inducción de genes neurales tanto en *X. laevis* como en *M. Musculus* y *H. Sapiens*, en etapas embrionarias así como en etapas adultas (Valenzuela et al., 1995). De forma similar, otra molécula llamada *Cordina*, al igual que *Noggin* también es producida en el blastoporo en el período en el que ocurre la inducción del ectodermo hacia tejido neural en *X. laevis* (Piccolo et al., 1996). *Cordina* es un gen relacionado estructuralmente con el gen *sog* (*short gastrulation*), descrito en *Drosophila melanogaster*; se sabe que *Cordina* se expresa además en el mesodermo dorsal, particularmente en la notocorda; mientras que *sog* se expresa en la región ventrolateral del embrión de *D. melanogaster* que da origen a la espina nerviosa. Mutaciones que afectan la expresión de ambos genes en cualquiera de ambos organismos, provocan alteraciones en el establecimiento del eje dorso-ventral, así como defectos en la inducción del ectodermo neural. Mediante experimentos de microinyección de mRNAs, se ha establecido que de *sog* y su homólogo *Cordina* promueven el desarrollo

Figura 2. Esquemas que ilustra las regiones o dominios que contribuyen a polarizar el tubo neural. **A)** Se muestran los gradientes formados por los morfógenos sonic hedgehog (Shh) y las proteínas morfógenas de hueso (BMPs), a lo largo del eje dorso-ventral; el primero es producido principalmente por la placa de piso (Fp), mientras que las BMPs son secretadas por las células de la placa del techo (RP). Los números refieren al proceso de migración de los axones de la comisura en la que el efecto ejercido por los gradientes de BMP (1) y Shh (2), guían al axón hacia la parte rostral en donde el factor Wnt4 (que también contribuye a la polarización del tubo neural a lo largo del eje rostro-caudal) (3), contribuye a su posicionamiento dentro del cerebro. Por otro lado, el gradiente formado por el factor Wnt1, contribuye a la migración de las células de la cresta neural hacia la zona ventral del tubo en donde adquieren el fenotipo de neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal (DRG). **B)** Diagrama que muestra la regionalización de varios tipos de neuronas dorsales (dl1 a dl6) y 5 tipos de neuronas ventrales (vp0 a v3) y motoneuronas (Mn), en el tubo neural en desarrollo. En la parte izquierda de la figura se indican los genes y las proteínas que se expresan en los dominios de cada grupo de neuronas (en la zona ventricular, cerca de la línea media), en las distintas regiones dorso-ventrales. En la parte de la derecha se indican los genes y las proteínas usadas para identificar la zona en donde las neuronas inician su diferenciación. Tomado de: Wilson L. & Maden M., 2005. Dev Biol 282: 1; scienceblogs.com/.../basics_sonic_hedgehog.php.

ventral en *D. melanogaster* y el dorsal en *X. laevis*. En *D. melanogaster*, *sog* ejerce un efecto antagónico sobre la actividad dorsalizante de *dpp*, el homólogo de BMP4 en vertebrados. BMP4 a su vez, se expresa en la región ventral de *X. laevis* en donde promueve el desarrollo ventral; en este sentido, se ha observado que *dpp* es capaz de inducir desarrollo ventral en *X. laevis*; interesantemente, la expresión ectópica de *sog*, inhibe el efecto ventralizante de *dpp*, indicando que existe un mecanismo de inhibición evolutivamente conservado en el desarrollo de las regiones ventral y dorsal de vertebrados e invertebrados (Holley et al., 1995).

Otro factor llamado folistatina, el cual es secretado por el organizador o blastoporo en *X. laevis*, inhibe la actividad de un factor que pertenece a la familia de TGF β , la *activina* (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1994). La activina normalmente inhibe la formación del tejido neural a partir del ectodermo. En condiciones no inhibitorias, la *activina* induce a las células responsivas a convertirse o comprometerse, en células epidermales (Gilbert, 2006), por lo que se ha propuesto que el compromiso hacia el linaje neural es el camino intrínseco o por defecto, de las células del ectodermo, siendo la actividad de *Noggin*, *Cordina* y *Folistatina*, esenciales en dicho proceso, ya que su actividad impide la actividad de moléculas inductoras de fenotipos epiteliales distintos al neural (Sanes DH., 2006).

Los BMPs forman parte de la superfamilia de citocinas tipo TGF β . Durante el desarrollo del sistema nervioso los BMPs tienen papeles relevantes, ya que promueven el aspecto dorsal de varios precursores neurales, así como la proliferación y la regulación del fenotipo final de varias células. Se sabe que los receptores para los BMPs se expresan en el cerebro en desarrollo del ratón desde el día E12 (Zhang et al., 1998a), y la activación de los mismos tiene como principal efecto la inhibición de la proliferación de los precursores

neurales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Gross et al., 1996) (Nakashima et al., 2001) (Mathieu et al., 2008). Adicionalmente, se sabe que los BMPs, además de inhibir la proliferación de los precursores neurales, también promueven la formación de células astrogiales, o la diferenciación de precursores neurales en cultivos derivados de corteza de embriones de rata (Mabie et al., 1999).

Otro morfógeno cuya actividad es determinante durante el desarrollo embrionario de vertebrados e invertebrados, es la vía de señalización activada por *Hedgehog* (*Hh*). En *D. melanogaster* esta vía de señalización consiste principalmente en la producción del factor de transcripción *Cubitus interruptus* (*Ci*), el cual, en ausencia de *Hh*, permanece en el citoplasma en estado fosforilado, lo que promueve la unión a un componente del complejo de ubiquitin-ligasa E3, llamado *Slimb*; esta interacción favorece el procesamiento de *Ci* en un fragmento llamado *CiR* que carece de su dominio de activación. *Hh* se une al receptor transmembranal llamado *patched* (*Ptc*), se abate la inhibición que éste ejerce sobre el receptor llamado *Smoothed* (*Smo*), lo que permite la defosforilación de *Ci*. Esta defosforilación impide entonces la formación de *CiR*, por lo que entonces *Ci* activo se transloca hacia el núcleo, en donde induce la expresión de los genes blanco, entre los que se encuentran *dpp*, *Ptc*, *en*, *colier* e *iroquois* (Hooper and Scott, 2005) (Simpson et al., 2009). En vertebrados, la vía de *Hh* es más diversa en cuanto al número de genes; por ejemplo, existen tres tipos de genes *Hh*, *sonic*, *Indian*, y *desert*; dos genes *Ptc*, *Ptc1* y *Ptc2*, y tres genes homólogos de *Ci*, *Gli1*, *Gli2* y *Gli3*. La expresión de estos genes varía de acuerdo al tejido y al período de desarrollo del organismo. *Hh* funciona como un morfógeno a diferentes concentraciones, induciendo que las células receptoras que activamente translucen la señal, adopten distintos fenotipos; este tipo de respuesta genera patrones de

polarización de las células, como aquellas de la región dorsal o ventral, en el caso del tubo neural, específicamente induciendo el proceso de diferenciación de las células de la placa del piso, entre las que se encuentran neuronas motoras e interneuronas (Hooper and Scott, 2005) (Simpson et al., 2009) (Kutejova et al., 2009). La eliminación de la actividad de *Shh* por medio de recombinación homóloga, provoca defectos en el establecimiento y mantenimiento de estructuras como la propia notocorda, y la placa del piso, además de que los animales homocigos sufren problemas como ausencia en la formación de primordios distales que dan origen a las extremidades, formación de un solo ojo (ciclopía), ausencia de células ventrales dentro del tubo neural y ausencia de la espina dorsal, así como la mayoría de las costillas, indicando que *Shh* es un morfógeno crucial para el desarrollo no sólo del sistema nervioso, sino de varios tipos de tejidos en etapas embrionarias (Chiang et al., 1996). Adicionalmente, se ha demostrado que en etapas postnatales la actividad de *Shh* es necesaria para la generación, mantenimiento y migración de células troncales en la zona ventricular del giro dentado en el hipocampo o del ventrículo lateral. La presencia de estructuras ciliares en las células troncales cerebrales de embriones y ratones adultos se ha relacionado con la capacidad de diferenciación hacia fenotipos neurales, ya que dichas estructuras poseen buena parte de las moléculas que censan la actividad de *Shh*, como *Smo*, *Ptc* y los factores *Gli*. Ratones que tienen problemas en la formación de dichos cilios, presentan defectos en la proliferación y establecimiento de precursores de neuronas granulares de hipocampo (Han et al., 2008). Además, la ausencia de actividad de *Smo* en embriones de ratón, impacta directamente en la sobrevivencia de las células tipo B (células troncales) y C (células de amplificación transitoria) del ventrículo lateral, así como en el proceso de migración hacia su destino final, el bulbo olfatorio, en ratones adultos (Balordi

and Fishell, 2007). Evidencia adicional indica que la actividad de *Shh* en conjunto con la actividad de *Nodal* son esenciales para determinar a las neuronas que conformarán a la región anterodorsal del hipotálamo en ratones (Mathieu et al., 2002).

1.2.1.2 Factores de transcripción

En *D. melanogaster*, la producción de los precursores neurales inicia con el proceso de delaminación, el cual consiste en el agrandamiento de ciertas células de la región neurogénica del ectodermo, las cuales se mueven al interior del embrión, en donde se transforman en neuroblastos o precursores neurales, los cuales se dividen para formar las células madre ganglionares (GMCs) (Brody and Odenwald, 2005). Cada GMC tiene la capacidad para formar un par de neuronas o de células gliales. El tipo de neurona o célula glial generada depende principalmente de la posición de cada neuroblasto a lo largo del eje antero-posterior y dorso-ventral y de la expresión de genes proneurales, involucrados en la adquisición de un fenotipo específico por parte de cada neuroblasto. El conjunto de genes proneurales en su mayoría codifican para factores de transcripción, e incluye a los genes de segmentación *pdm1/2*, *castor (cas)*, *hunchback (hb)* y *kruppel (kr)*, éstos dos últimos se sabe que son necesarios para la generación de motoneuronas a partir de los neuroblastos derivados de las GMCs (Isshiki et al., 2001). Además, existen otros factores de transcripción conocidos como de tipo hélice-vuelta-hélice básica (*bHLH*), tales como que también se ha demostrado que contribuyen a la formación del ectodermo, el inicio del desarrollo de linajes neuronales, así como la formación de progenitores comprometidos a diferenciar en neuronas maduras (Bertrand et al., 2002).

Originalmente, el estudio de los genes proneurales de tipo *bHLH*, se inició mediante el análisis de mutantes de *D. melanogaster* que carecían de órganos sensoriales debido a mutaciones inducidas o espontáneas. El análisis molecular de dichas mutantes llevó a la identificación y aislamiento de genes proneurales de esta clase como *achaete (ac)*, *scute (sc)*, *letal of scute (lsc)*, *asense (ase)*, así como *atonal (ato)* (Bertrand et al., 2002).

Los factores de transcripción tipo *bHLH*, presentan alta similitud de secuencia entre ellos, así como con otros factores especialmente en la región de unión al DNA, con aquella de los factores como el oncogen *myc*, el gen determinante del sexo, *daughterless (da)* y el gen determinante del músculo, *MyoD* (Bertrand et al., 2002). Se sabe que la mayoría de los genes del complejo *achaete-scute (asc)* se expresa en el ectodermo, antes de cualquier señal que comprometa a las células a un fenotipo neural, lo que sugiere que su actividad es necesaria desde etapas tempranas para inducir compromiso neural. La regulación de los genes blanco por parte de los factores transcripcionales tipo *bHLH* inicia a través de la unión a secuencias específicas en la región promotora, conocidas como cajas E. Algunos genes proneurales en vertebrados, poseen cajas E en su secuencia promotora, así como un gen que codifica una proteína llamada Delta (Bertrand et al., 2002).

Delta es el ligando del receptor membranal llamado *Notch* (Shi and Stanley, 2006). Se sabe que *Delta* es transportado del citoplasma a la membrana, por algunos progenitores neurales para unirse a su receptor en la célula vecina, lo que inicia una cascada de señalización que culmina con la inhibición en la capacidad para adquirir el fenotipo neural de la célula que expresa el receptor. Interesantemente, dicha efecto involucra la inhibición directa de genes tipo *bHLH* a través de la expresión de genes como los del complejo *enhancer of split (Espl)* (Yoon and Gaiano, 2005).

Genes homólogos de *asc* y *ato* han sido descritos también en vertebrados, entre estos destacan los homólogos de *asc* en ratón (*Mash1*), el de pollo (*Cash1*), el del pez cebra (*Zash1*) y el de *Xenopus* (*Xash1*), así como algunos que son especie-específicos como *Mash2* en mamíferos, *Xash3* en *Xenopus laevis*, y *Cash4* en pollo (Bertrand et al., 2002). De los genes relacionados con *ato*, destacan *Math1* y *Math5*, por su alta homología con el dominio *bHLH*; mientras que *Neurogenina* (*Ngn*), *NeuroD* y *Olig*, aunque con diferencias específicas en sus dominios *bHLH*, también guardan cierta similitud con *ato* (Bertrand et al., 2002).

La actividad de los genes *Mash1* y *Ngn2* se ha relacionado directamente con la generación de fenotipos neurales; por ejemplo, en precursores neurales de corteza, la actividad en conjunto de ambos factores es esencial para que dichos precursores adopten el aspecto neuronal, ya que ratones mutantes para la expresión de *Mash1* y *Ngn2*, presentan una proliferación excesiva y prematura de fenotipos gliales, especialmente del tipo astrocítico, indicando que ambos factores están involucrados en el proceso de restricción de linaje glial y promoción del neural (Nieto et al., 2001). Datos adicionales indican que el factor *Mash1* también participa en la generación de neuronas del bulbo olfatorio en el ratón, además de regular la cinética de diferenciación de neuronas de la retina; especialmente de bastones y células horizontales (Kageyama, 1997).

El gen *Hes1* también es miembro de la familia de factores tipo *bHLH*, es homólogo de los genes *hairy* y *enhancer of split* de *D. melanogaster*, y se sabe que su función principal, a diferencia de otros miembros de la familia, es inhibir la transcripción de sus genes blanco a través de dos mecanismos principales; a) la unión directa a secuencias en DNA llamadas cajas N (CACNAG), o b) formando heterodímeros no funcionales con otros

factores tipo *bHLH* durante el desarrollo del sistema nervioso. La expresión del gen *Hes1* se restringe a las paredes del lumen del tubo neural en etapas tempranas del desarrollo, mientras que en etapas posteriores, en las zonas ventriculares como la pared del tercer ventrículo, donde residen los progenitores neurales; datos experimentales obtenidos *in vivo* indican que la expresión constitutiva de *Hes1* en los progenitores de dichas zonas, impide su migración hacia las capas externas, inhibiendo además la expresión de genes usados como marcadores de fenotipos neuronales o gliales maduros, por lo que se propone que *Hes1* es un regulador negativo del proceso neurogénico (Kageyama, 1997).

Durante la etapa de inducción neuronal de los progenitores, la expresión de los genes *bHLH*, depende de la actividad de algunos morfógenos como *Noggin*, *Cordina*, *Folistatina* y FGF; aunque también se ha demostrado que éstos últimos activan otro tipo de genes llamados genes tipo *Sox* (genes relacionados con el gen determinante de testículos, *Sry*). Los genes *Sox* codifican diversos factores de transcripción cuyo dominio de unión a DNA es conocido como grupo de alta movilidad (*HMG*) y su actividad ha sido relacionada con la capacidad proliferativa y el inicio de programas de diferenciación de los precursores neurales. Estudios hechos en *D. melanogaster* y en *X. laevis*, indican que los genes *Sox* participan en el compromiso de las células ectodermales para adquirir el compromiso hacia el linaje neuronal (Pevny and Placzek, 2005). En *Xenopus* la actividad de *Cordina* y BMP regula positivamente la expresión de uno de los miembros de la familia *Sox*, el gen *Sox2*; mientras que en *Drosophila*, la actividad tanto de *Cordina*, *dpp* y de *sog*, regula positivamente la expresión del gen *SoxB1* (también llamado *SoxNeuro*) (Pevny and Placzek, 2005). En mamíferos la actividad de *Sox2*, es esencial para el progreso de la neurogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*, particularmente para la generación de neuronas de

tipo GABAérgico, en la zona de las eminencias ganglionares responsables de generar ciertos fenotipos neuronales de la corteza cerebral en *M. musculus* (Cavallaro et al., 2008).

1.3 Regulación de la neurogénesis durante el desarrollo embrionario

En los organismos amniotes el establecimiento de la notocorda en la parte ventral del ectodermo neural, tiene como consecuencia la formación del eje principal y la determinación de la posición del sistema nervioso en el embrión; sin embargo, desde el punto de vista fisiológico, la formación de esta estructura, es fundamental para los procesos subsecuentes que permiten la activación del proceso de neurogénesis.

La neurogénesis se puede definir como un conjunto de eventos de naturaleza genética que involucran la activación e inactivación de genes que regulan por un lado la salida del ciclo celular, logrando que el precursor neuronal adquiera capacidad para responder a señales pro-fenotípicas, y por el otro, que dicho precursor inicie la migración de su lugar de origen hasta su blanco final, en donde deberá establecer las conexiones apropiadas para poder ser funcional.

Una vez que se forma la notocorda, ésta envía señales inductivas como la mediada por Shh, hacia el ectodermo neural, lo que provoca que las células neuroectodermales se comprometan hacia precursores neuronales, en un proceso conocido como neurulación (Colas and Schoenwolf, 2001). El ectodermo neural se transforma entonces en el epitelio neural llamado placa neural; los extremos de la placa neural a través de un movimiento de invaginación conforman una nueva estructura llamada tubo neural, del que se derivan el cerebro propiamente dicho y la espina dorsal (Lumsden and Krumlauf, 1996). Cabe mencionar que no todas las células del tubo neural se transforman en precursores

neuronales, ya que en la parte ventral del mismo un pequeño grupo de células adquiere un fenotipo diferente bajo la influencia del morfógeno *Shh*, la placa del piso (Dodd et al., 1998) mientras que en la parte dorsal, un segundo grupo de células responsivas a factores difusibles como FGF, *Wnt* y TGF β , genera poco después del cerrado del tubo neural, la placa del techo (Lee and Jessell, 1999). Las células de la placa del techo se sabe que producen y liberan factores como los de la familia de TGF β (BMP4, BMP7, BMP5, *dorsalina* y *activina*), las cuales controlan en gran parte la determinación del fenotipo neuronal de los precursores neuronales de la zona dorsal (Lee et al., 2000); mientras que las células de la placa del piso, a través de la producción y liberación de *Shh*, influyen a los precursores de la zona ventral (Figura 2) (Wilson and Maden, 2005).

La exposición a estos factores en distintas concentraciones provoca que los precursores a lo largo del eje dorso-ventral respondan activando la expresión de distintos genes que codifican factores de transcripción, los cuales les otorgan una identidad definida (Wilson and Maden, 2005).

Algunos de esos genes que se activan en respuesta a estos gradientes, corresponden a factores de transcripción llamados homeóticos (*homeodomain*), los cuales se han conservado a lo largo de la escala filogenética (Deschamps, 2007). Descritos inicialmente en *D. melanogaster*, los genes homeóticos se arreglan en grupos en el cromosoma número 3 de este organismo; siendo en total ocho genes que se organizan en dos complejos principales, *antennapedia* (*ant*) y *bithorax* (*bx*) (Akin and Nazarali, 2005). Los genes que constituyen esta familia codifican proteínas con alta similitud en 180 nucleótidos que codifican un motivo de 60 residuos de aminoácidos conocidos como “*homeodominio*”; estructuralmente, este dominio está constituido por tres alfa-hélices, lo que le confiere

propiedades de unión al DNA, así como la capacidad para interactuar físicamente con otras proteínas, incrementando así su afinidad por la unión al DNA (Holland and Takahashi, 2005) (Akin and Nazarali, 2005).

El análisis de diversos fenotipos de *D. melanogaster* mutantes para la expresión de genes de tipo homeótico como *ultrabithorax (ubx)* o *ant*, permitió observar que los individuos afectados presentan la aparición de un par extra de alas, así como la transformación de una pata en una antena, respectivamente; indicando que la actividad de los factores homeóticos es esencial para otorgar identidad regional en el eje antero-posterior (Pearson et al., 2005). En *D. melanogaster*, el eje antero-posterior del embrión también es regulado temprano en el desarrollo gracias a la acción de los genes maternos *gap*, *pair-rule* y *segment polarity*, como resultado del control en la expresión de algunos genes *Hox* (ver más adelante).

Por otro lado, algunos de los factores homeóticos que controlan el aspecto de las regiones dorso-ventrales del sistema nervioso de *D. melanogaster*, también incluye a genes de tipo homeodominio, entre los que destacan *vnd (ventral nerve cord defective)*, *ind (intermediate neuroblast defective)* y *msh (muscle segment homeobox)*, entre otros (Zhao et al., 2007) (McDonald et al., 1998).

En los mamíferos vertebrados como el ratón y el humano, existen genes homólogos de los genes homeóticos, los cuales son llamados genes *Hox*. Los genes *Hox* en mamíferos se arreglan en grupos igual que en *D. melanogaster*, sin embargo como resultado de un

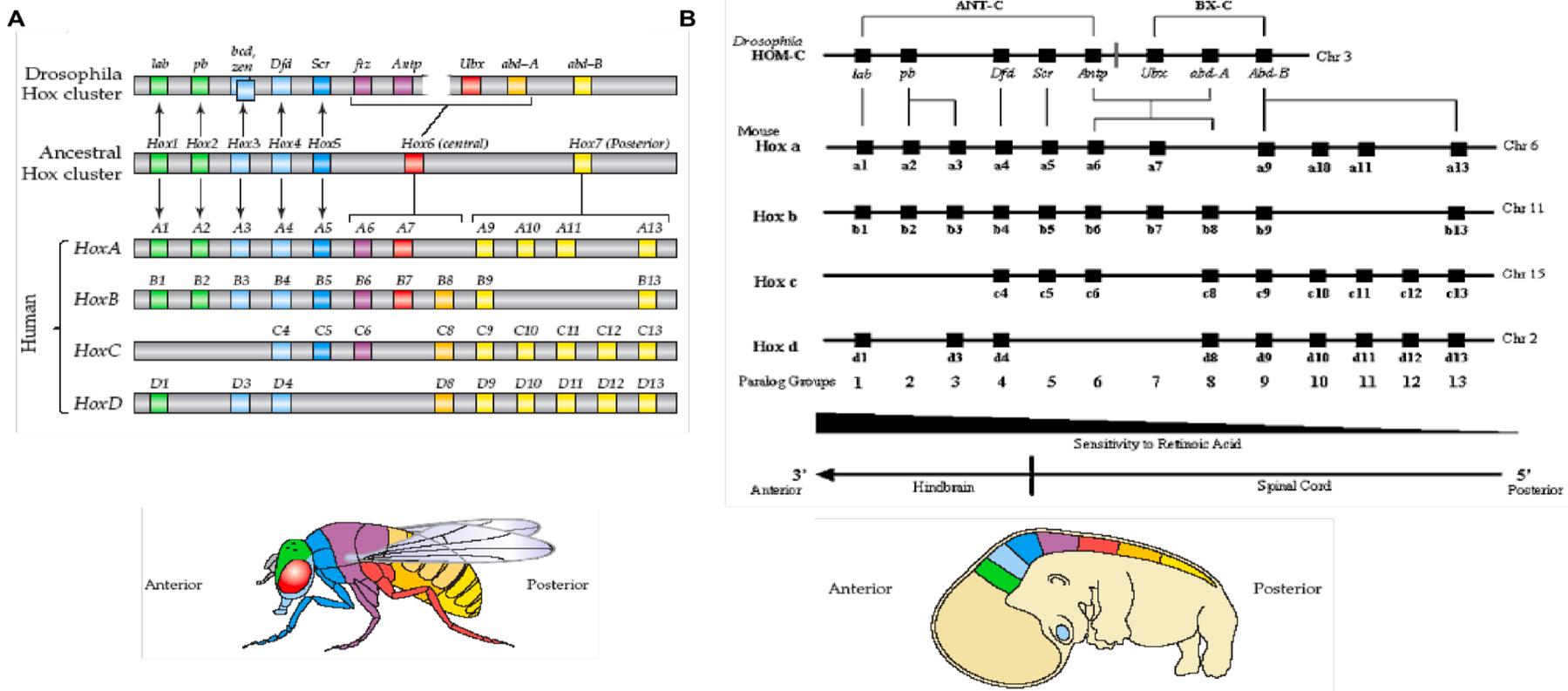


Figura 3. Segmentación y regionalización de los embriones de *Drosophila* y humano. **A)** Los genes de segmentación en la mosca llamados genes homeóticos y los homólogos en humano y en ratón (**B**), llamados genes Hox. Los genes Hox, se han duplicado dos veces tanto en humanos como en el ratón, lo que ha creado cuatro grupos independientes, llamados HoxA, HoxB, HoxC y HoxD; cada uno ubicado en cromosomas independientes. Como puede observarse, las regiones de expresión de los genes homeóticos en la mosca y el humano tienen patrones similares en el eje antero-posterior. **B)** Se muestra el arreglo de los genes Hox en ratón. Al igual que en la mosca y el humano la expresión de los genes Hox muestra un patrón de expresión relacionado con la posición del gene dentro del grupo, siendo los genes que están cerca del extremo 3', expresados en la parte más anterior, mientras que los que están cerca del extremo 5', se expresan en la zona posterior del embrión. Se indica también la susceptibilidad de los genes a la acción del ácido retinoico. HOM-C, complejo homeótico; Chr, cromosoma; ANT-C, antennapedia; BX-C, Bithorax; lab, labial; pb, proboscipedia; Dfd, deformed; Scr, sex comb reduced; Abd-B, abdominal B. Tomado de: Purves D., et al., 2004. Neuroscience, 3a Ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA. EUA.; Akin, ZN., Nazarali, AJ., 2005. Cel Mol Neurobiol 25: 697.

génica, existen cuatro grupos de genes nombrados A, B, C y D (Figura 3) (Holland and Takahashi, 2005) (Glover, 2001). La actividad de los productos de éstos genes durante el desarrollo del sistema nervioso en ratón, controla el aspecto regional a lo largo del eje antero-posterior, principalmente en respuesta al efecto ejercido por un gradiente de concentración del ácido retinoico (RA) (un derivado de la vitamina A). Los precursores neurales responden a esta morfógeno a través de receptores específicos llamados receptores de RA (RAR). (Deschamps, 2007; Eagleson and Theisen, 2008). Entre los blancos conocidos de los genes *Hox* durante el desarrollo del sistema nervioso en ratón destacan otros genes *Hox* como *Hoxb4*, *Hoxb5*, *Hoxb1* y *Hoxb2*, aunque también se ha reportado que el inhibidor de la serina proteasa 3 (*SPI3*), una enzima involucrada en el desarrollo del SNC, es blanco directo del gen *Hoxb5* (Safaei, 1997).

Un aspecto importante de los genes homeóticos en *D. Melanogaster* es que establecen dominios discretos de expresión a lo largo del eje antero-posterior del organismo, dividiendo al embrión en tres segmentos principales, la cabeza, el tórax y el abdomen (Figura 3) (Urbach and Technau, 2004). Dichos patrones de expresión también se observan durante las etapas tempranas del establecimiento de los precursores neurales en organismos vertebrados mamíferos como el ratón o el humano, entre otros (Figura 3) (Carroll, 1995) (Sanes DH., 2006). En base a dichos patrones de expresión se han establecido modelos en los cuales la regionalización antero-posterior del sistema nervioso de vertebrados, está dividido en segmentos denominados neurómeros que, en la parte más anterior del tubo neural, se conocen como prosómeros (P) (Rubenstein et al., 1994). Los prosómeros están agrupados en dos subdivisiones principales, el diencéfalo (que incluye los prosómeros 1 a 3) y el prosencéfalo (prosómeros 4 a 6), numerados de la región más caudal

a la más rostral (Figura 4) (Rubenstein et al., 1994) (Puelles and Rubenstein, 2003). Cada prosomero se establece de acuerdo al tipo de gen que se expresa en él, permitiendo la aparición de distintos tipos de neuronas en cada dominio de expresión, hecho que va ligado estrechamente a la respuesta de cada precursor neuronal a diversas moléculas tanto inductoras como represoras.

Por otra parte, al igual que los prosomeros del cerebro anterior en formación, el cerebro posterior también es regionalizado por efecto de la actividad de algunos genes *Hox*. En el cerebro posterior, los genes homeóticos forman patrones de expresión conocidos como rombomeros (Glover, 2001). Se sabe que la expresión de algunos genes homeóticos precede a la formación de los rombomeros y cada rombo mero origina un subgrupo específico de neuronas motoras que controlan diferentes músculos de la cabeza o la determinación de la espina dorsal en vertebrados (Glover, 2001).

El análisis de ratones mutantes para la expresión de ciertos genes *Hox* ha permitido establecer que su expresión es importante en la formación de circuitos de neuronas específicas de cada rombo mero; por ejemplo, ratones mutantes para la expresión del gen *Hox1* que se expresa en el cerebro posterior, presentan alteraciones en la formación de circuitos neurales que determinan al rombomero 3, sugiriendo que la actividad de los genes *Hox* es necesaria para la selección del tipo de circuito neural que adoptan los rombomeros (del Toro et al., 2001).

La expresión de los genes homeóticos guarda estricta relación con el período de desarrollo embrionario y no es suficiente para determinar el fenotipo final de los precursores neurales, sino que su expresión discreta en diversas zonas o regiones del tubo, contribuye a la activación de diversos programas genéticos, que eventualmente producirán

regiones cerebrales completamente diferenciadas, con el número apropiado de neuronas y células gliales.

1.3.1 Regionalización del sistema nervioso

Durante el proceso de desarrollo embrionario, una proporción importante de células posteriores del tubo neural dan origen a la espina dorsal; mientras que otras, en la parte más rostral, se dividen hasta generar una vesícula que se agranda y alarga para dar origen a tres estructuras fundamentales en el desarrollo del sistema nervioso, las vesículas primarias: el prosencéfalo, también llamado cerebro anterior; el mesencéfalo o cerebro medio y el romboencéfalo, o cerebro posterior (Figura 5) (Purves D., 2004). El prosencéfalo origina a

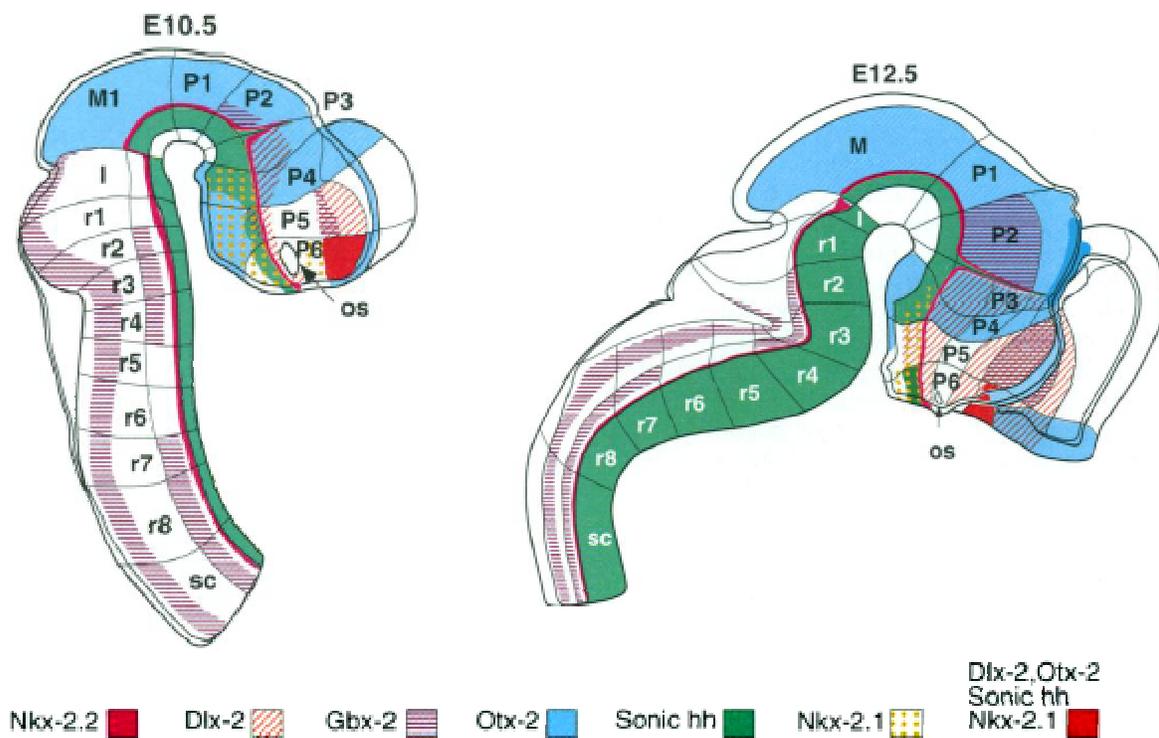


Figura 4. Esquemas representativos de la expresión de seis genes en el tubo neural de embriones de ratón de 10.5 y 12.5 días de gestación. Se indican los límites transversales y longitudinales por líneas negras. A lo largo del eje rostro-caudal se puede observar el patrón de expresión de los genes indicados en los segmentos llamados prosómeros (P), los cuales se forman en la parte anterior del embrión y son numerados de lo más caudal a lo más rostral. En la región de transición marcada por el mesencéfalo (M), se puede observar la formación de los segmentos llamados rombómeros (r). Sc, espina dorsal; os, tallo óptico. Tomado de Rubenstein JLR., et al., 1994. Science 266: 578.

los dos hemisferios cerebrales (izquierdo y derecho), mientras que el mesencéfalo da origen a las neuronas que conectan la parte anterior con la parte posterior del cerebro; por último, el romboencéfalo origina el tallo cerebral, una región que se fusiona con la parte más anterior de la espina dorsal (Figura 4) (Purves D., 2004). Una vez formadas, y conforme avanza el desarrollo, estas tres vesículas se subdividen en otras cinco vesículas, originándose el telencéfalo y el diencefalo, los cuales originan los bulbos olfatorios y el hipocampo, por un lado y el tálamo, hipotálamo y vesículas ópticas, por el otro (Hatten, 1999). El cerebro medio permanece básicamente sin cambios anatómicos, mientras que el cerebro posterior se divide además en dos vesículas, el metencéfalo y el mielencéfalo, las cuales originan al cerebelo y la médula espinal, respectivamente (Hatten, 1999).

1.4 Diferenciación neuronal

Una vez que el tubo neural se ha desarrollado y se han formado las regiones anterior y posterior, así como las vesículas primarias y secundarias, los diversos programas de diferenciación de neuronas y glia, inician su activación. Los precursores neurales de ratón y humano se localizan principalmente en una zona específica del tubo neural, la parte más interna, cerca del lumen, llamada zona ventricular o endodivisional, que se caracteriza por su alta tasa de proliferación (Rao, 2006). Se sabe que algunas de las células precursoras extienden prolongaciones radiales hacia la zona externa (pial) del tubo neural; a dichas células se les conoce como glia radial, en parte debido a la expresión de marcadores específicos de glia como la proteína ácida fibrilar de glia (GFAP) y el transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST). Durante la etapa embrionaria, la zona ventricular origina principalmente neuronas y glia radial, mientras que en las etapas perinatales y postnatales tanto de ratón como de humano, se generan principalmente células

gliales como los astrocitos y los oligodendrocitos (Rao, 2006). Las células que se encuentran en esa zona se caracterizan por su patrón de división asimétrico, ya que pueden originar células comprometidas a linaje neural con capacidad proliferativa o generar neuroblastos específicos para una región particular, ya sea en el eje dorso-ventral o antero-posterior, en donde posteriormente activan programas específicos de diferenciación (Rao, 2006).

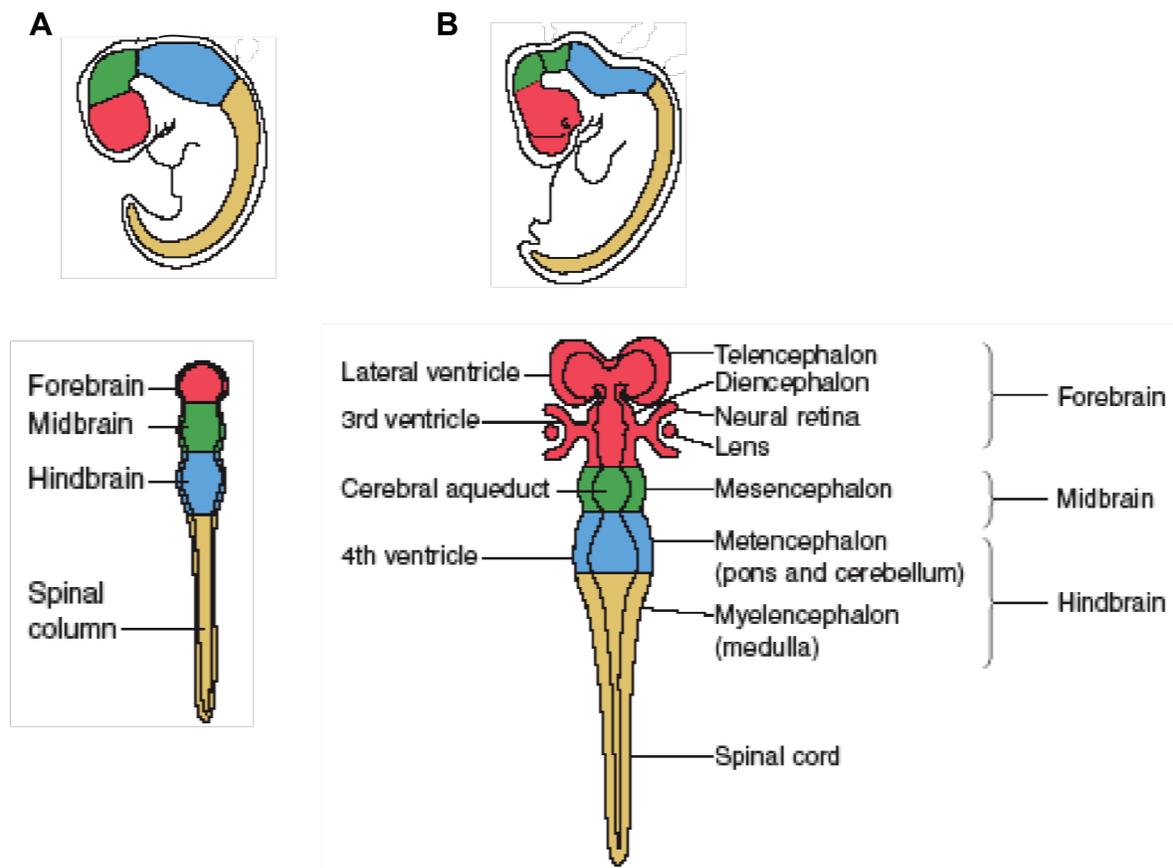


Figura 5. El cerebro y espina dorsal de los vertebrados se originan a partir del tubo neural. En esta figura se esquematizan las vistas sagitales (panel superior) y dorsales (panel inferior). **A)** Las tres divisiones primarias del tubo neural el cerebro anterior (*forebrain*), el cerebro medio (*midbrain*) y cerebro posterior, aparecen en color rojo, verde y azul, respectivamente; se indica también la región correspondiente a la espina dorsal (*spinal column*). **B)** Conforme avanza el desarrollo, las vesículas primarias se subdividen para formar estructuras más definidas, el cerebro anterior origina el telencéfalo, el diencefalo, la retina y las corneas. El cerebro medio se transforma en el mesencefalo y acueducto cerebral, una región que permite la comunicación entre el cerebro anterior y el posterior. Por otro lado, el cerebro posterior, se subdivide en el metencéfalo y el mielencéfalo, que a su vez originan al cerebelo y la medula espinal, respectivamente. Se indican el tercer y cuarto ventrículo. Tomado de: Sanes, DH., Reh TA. & Harris WA., 2006. *Development of the Nervous System 2a*. Ed. Elsevier Academic Press. San Diego CA, EUA.

1.4.1 Establecimiento y maduración

Se ha determinado que una vez que han salido del ciclo celular, los precursores neurales abandonan la zona ventricular e inician la migración hacia su destino final dentro del sistema nervioso, pasando por la zona del manto y después hacia la zona marginal (Figura 6). La ventana de tiempo específico en el que cada precursor neural es generado, es importante desde el punto de vista del fenotípico, ya que de esto depende por ejemplo, la morfología funcional de las diversas capas de regiones cerebrales como la corteza, el cerebelo o el hipocampo así como el desarrollo de núcleos de neuronas con conexiones específicas que caracterizan a cada capa en estas regiones (Hatten, 1999).

El proceso de la regulación del número de células que salen de la zona ventricular a lo largo del tubo neural, conforme avanza el desarrollo, depende en gran medida de la capacidad de cada uno de los precursores para censar las señales externas que actúan como mitógenos, promoviendo su permanencia dentro del ciclo celular, o bien, de inhibidores mitóticos que inducen la salida del mismo, indicando a la célula el momento en que debe activar aquellos genes relacionados con la adquisición de un fenotipo particular.

En el nematodo *C. elegans* por ejemplo, el número de neuronas que constituyen el sistema nervioso de un adulto es determinado principalmente por el patrón de división de las células AB (Figura Suplementaria 1), así como el número de células que mueren por apoptosis; en este nematodo la neurogénesis, a diferencia de los vertebrados (recordemos el caso de *Notch* y su ligando *Delta*), no es completamente dependiente de la interacción célula-célula, sino de propiedades intrínsecas de linaje, las cuales son determinadas por programas genéticos específicos (Schmidt et al., 1997). En *D. melanogaster* ocurre algo similar, ya que los precursores neurales se delaminan del ectodermo neural en ondas

sucesivas y se organizan en columnas y filas, originando cada uno de ellos alrededor de 5 GMCs, cada GMC a su vez genera dos neuronas en cada división, hasta completar el número total encontrado en el organismo adulto (Figura Suplementaria 2) (Urbach and Technau, 2004).

En contraste, la diversidad de neuronas en organismos vertebrados como el ratón o el humano, depende en gran medida del microambiente que crean las moléculas liberadas al medio por la notocorda, la placa de piso y la placa de techo en etapas tempranas, ya que

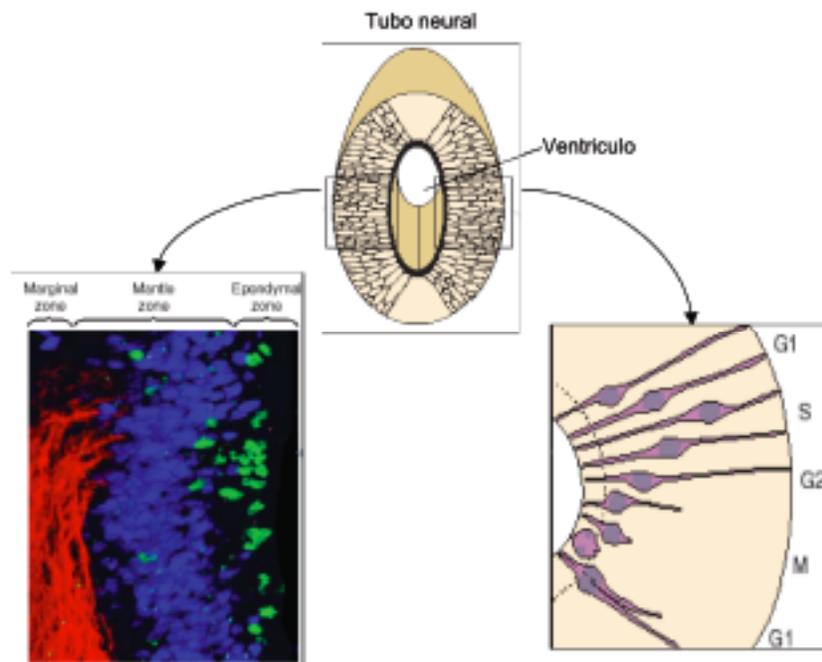


Figura 13. El proceso de neurogénesis en el tubo neural. En la parte superior se muestra un esquema representando un corte transversal del tubo neural del pollo. El recuadro de la derecha muestra las distintas capas de células que transitan por diversas etapas del ciclo celular, en donde las células mitóticamente activas se encuentran en la zona endodimal o ventricular (cerca del ventrículo y marcadas con un anticuerpo vs el análogo de nucleótido Bromo-deoxi-uridina (BrdU), en verde; una vez que las células abandonan el ciclo, migran de forma radial hacia la zona del manto en donde inician los programas genéticos que les permiten adquirir el fenotipo neural (en azul se muestra la señal de inmunofluorescencia de la proteína específica de neuronas neurofilamento); mientras que en la zona marginal se encuentran la mayoría de las neuronas postmitóticas; por otro lado, el recuadro de la izquierda, muestra un esquema que representa los movimientos de las células progenitoras (llamado movimiento nuclear intercinético), en el tubo neural. Tomado de: Sanes, DH., Reh TA. & Harris WA., 2006. Development of the Nervous System 2a. Ed. Elsevier Academic Press. San Diego CA, EUA.

muchos de los progenitores del tubo neural tienen la capacidad de generar tanto neuronas como células gliales consecuencia del efecto ejercido por dichas moléculas. Algunas de las moléculas implicadas en este proceso ya se han mencionado, entre ellas encontramos al factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), los cuales se unen a receptores específicos tipo tirosina-cinasa (TKs); ambos factores juegan un papel crítico durante el desarrollo del sistema nervioso, induciendo la proliferación celular a través de la activación de vías de señalización que activan genes como los que codifican a las proteínas llamadas ciclinas. Las ciclinas se cuentan entre las proteínas más conservadas en organismos vertebrados e invertebrados y su actividad correlaciona directamente con el control del progreso del ciclo celular (Ohnuma and Harris, 2003; Murray, 2004; Wolgemuth, 2008).

En general, las ciclinas se asocian con otra clase de proteínas llamadas cinasas dependientes de ciclinas (*Cdk*), que se expresan generalmente de forma constante a lo largo de todas las etapas ciclo celular (Satyanarayana and Kaldis, 2009). Funcionalmente, las *Cdks* se han clasificado en dos grupos principales, las que controlan la transición de una fase a otra del ciclo celular (tales como *Cdk4* y *Cdk6*), y las que regulan la actividad transcripcional de genes específicos (como *Cdk8* y *Cdk9*) (Wesierska-Gadek and Krystof, 2009).

Se ha demostrado que ratones nulos para la expresión de la cinasa *Cdk5* por ejemplo, durante el proceso de diferenciación de progenitores neurales de corteza al día E16, presentan disminución en la expresión de la proteína asociada a microtubulos tipo 2a (*Map2a*), un marcador de neuronas maduras; mientras que un marcador de células proliferativas, como el antígeno nuclear de células en proliferación (*PCNA*), mantiene su

expresión basal, sugiriendo que la cinasa *Cdk5* es esencial para la salida del ciclo celular, así como para iniciar el programa de diferenciación de los progenitores neurales cerca de la zona ventricular (Cicero and Herrup, 2005). Por lo tanto, las vías de transducción activadas por los morfógenos, así como los mecanismos genéticos que permiten responder a ellas, capacita a los progenitores para mantener un equilibrio entre su estado proliferativo y no diferenciado o la salida del ciclo celular, así como del encendido de genes que permitirán generar diversos fenotipos neuronales (Lee and Jessell, 1999).

En párrafos anteriores se mencionó que los pasos iniciales en el proceso del establecimiento de los ejes antero-posterior y dorso-ventral, incluyen la expresión de genes que delimitan al cerebro anterior, el cerebro medio, así como el cerebelo y la espina dorsal (Rubenstein et al., 1998). Esta regionalización está relacionada con la generación de grupos de neuronas que adquieren fenotipos ventrales o dorsales, así como anteriores o posteriores. Al respecto se sabe que estos eventos ocurren de manera localizada; es decir, gracias al efecto ejercido por el microambiente, los progenitores originan neuronas maduras que se especificarán como corticales o subcorticales, transformando así la morfología del sistema nervioso en regiones con células dorsales que forman grupos organizados en forma laminar, mientras que las neuronas ventrales presentan arreglos en grupos compactos llamados núcleos (Hatten, 1999). Este proceso de agrupación es claramente observable en las regiones del prosencéfalo que da origen a la corteza cerebral y el metencéfalo, que origina a su vez al cerebelo, durante el desarrollo de vertebrados como el ratón y el humano (Rakic, 2009).

Para el caso específico del cerebelo, se ha reportado que una de las capas de neuronas que lo constituyen, es determinada por la actividad del factor transcripcional

Math1, ya que ratones nulos para la expresión de este factor carecen de la capa de neuronas granulares, evidenciando el papel esencial que juegan los factores de transcripción en la neurogénesis embrionaria (Ben-Arie et al., 1997).

La formación de estas capas de neuronas es el primer paso en la formación de dichas regiones, mientras que la generación de glia ocurre principalmente en etapas postnatales, completando la red funcional de neuronas en la etapa adulta (Rakic, 2009). Evidencias sobre los mecanismos moleculares que controlan la transición entre la generación de neuronas hacia el proceso que genera fenotipos gliales, indican que la regulación negativa en la expresión de genes proneurales como el factor de transcripción proneural neurogenina (*Ngn*, un factor tipo bHLH) y la activación de genes gliogénicos como los factores nucleares 1A (*NF1A*) y *NF1B* en la espina dorsal del pollo y en cultivo de progenitores corticales, es determinante para incrementar el número de células gliales en relación con la de neuronas en etapas peri- y postnatales (Okano and Temple, 2009).

1.4.2 Mecanismos de especificación neuronal

1.4.2.1 Cascadas de factores de transcripción

Las neuronas son un grupo de células que constituyen un grupo enorme de fenotipos, la mayoría de los cuales adquiere su fenotipo maduro en función de la posición final que tendrá dentro del sistema nervioso, además de su fisiología, así como de la conectividad que establece con otras neuronas. Durante el desarrollo, los progenitores neuronales son influenciados por las moléculas difusibles del ambiente que activan receptores membranales involucrados en la transducción de vías de señalización como el

receptor tipo tirosina cinasa (*RTK*), o bien por contacto célula-célula como el caso de *Notch* y *Delta*, así como de proteínas de la matriz extracelular, como citotactina, molécula de adhesión celular N (*N-CAM*), algunas integrinas y moléculas como las caderinas o los receptores a efrina (*Eph*), o la proteína *pcp-2*, cuyo producto modula la señalización mediada por proteínas G en células de Purkinje (Akin and Nazarali, 2005) (Hatten, 1999) (Yoon and Gaiano, 2005). Todas estas moléculas en conjunto afectan la expresión de genes que guían el aspecto, el patrón de crecimiento de extensiones en el soma de la neuronas, como las dendritas y los axones, así como las conexiones apropiadas que le permitan consolidarse como neuronas maduras.

De manera general el fenotipo final de una neurona comprende la adquisición de características que son comunes a las de otras neuronas como la expresión de ciertos tipos de proteínas de citoesqueleto los cuales están estrechamente relacionados con los sistemas de transporte y excreción tanto en axones como en dendritas; además, características que le son únicas, como la dirección en la que proyectan sus axones para alcanzar su blanco o el tipo de molécula(s) que usará(n) para comunicarse con sus células blanco, ya sea de naturaleza inhibitoria o excitatoria. Adicionalmente, la transmisión de mensajes mediante el uso de mensajeros químicos o neurotransmisores requiere de la expresión coordinada de un conjunto de genes especiales que codifiquen las enzimas necesarias para producir dichas moléculas. Por lo tanto, uno de los primeros eventos en el proceso de diferenciación que debe tomar un precursor neural, es que tipo de enzimas relacionadas con la síntesis de un neurotransmisor específico serán producidas. La expresión de receptores específicos para dichos neurotransmisores deberá también coordinarse con la expresión de dichas enzimas.

En general se propone que neuronas que producen o utilizan un determinado neurotransmisor común, se originan a partir del mismo tipo de precursor dentro del tubo neural. Sin embargo, esta es una excepción de la regla, es decir, puede ocurrir que el mismo neurotransmisor sea producido por neuronas con un origen distinto (Purves D., 2004). Por ejemplo, las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental o de la sustancia negra compacta y aquellas de la zona ventral del hipotálamo sintetizan un neurotransmisor común, la dopamina, cuya producción depende de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) (Gale and Li, 2008) (Jo and Chua, 2009), no obstante, neuronas juxtaglomerulares de la región que corresponde al bulbo olfatorio, también producen TH y por tanto, dopamina (Jo and Chua, 2009) (Kosaka et al., 1987; Kosaka and Kosaka, 2009); sin embargo, los tres tipos de neuronas tienen un origen distinto. Evidencia experimental más reciente indica que algunas neuronas de la corteza sintetizan el neurotransmisor ácido gaba-amino-butírico (GABA) al igual que lo hacen las neuronas juxtaglomerulares del bulbo olfatorio en el ratón (Diaz and Gleeson, 2009) (Kosaka and Kosaka, 2009), corroborando la idea de que neuronas con orígenes distintos pueden sintetizar y utilizar neurotransmisores comunes para llevar a cabo sus funciones fisiológicas. Lo anterior plantea la interrogante de cómo neuronas con distintos orígenes dentro del tubo neural, regulan la expresión de un conjunto de genes que son determinantes en su fenotipo.

Algunas neuronas que sintetizan el neurotransmisor dopamina y/o serotonina, han sido estudiadas desde el punto de vista molecular para determinar que tipo de genes son activados para alcanzar su madurez y se sabe que diversos factores de transcripción son esenciales para coordinar la generación de ambos fenotipos. Específicamente, se ha determinado que las neuronas de la médula espinal que utilizan el neurotransmisor

noradrenalina (derivado de la dopamina), se originan principalmente de los precursores neurales de la cresta neural, poco después de que han salido del ciclo celular, la activación de la vía de señalización activada por BMP, induce la expresión del factor *Mash1*, que en conjunto con los factores de transcripción *Phox2a* y *Phox2b* (de la familia homeodominio), activan al gen *dHand*, el cual permite a estas neuronas iniciar la expresión de las enzimas necesarias para la síntesis de dopamina, TH y noradrenalina, dopamina β-hidroxilasa (DBH) (Goridis and Rohrer, 2002). Así mismo, evidencia de que estos factores de transcripción puedan activar de manera directa la expresión de gen de la enzima TH, ha sido reportada sólo en casos de expresión transitoria *in vitro* (Goridis and Rohrer, 2002).

De manera similar, las neuronas del metencéfalo que sintetizan el neurotransmisor noradrenalina y que se agrupan en el núcleo llamado *Locus coeruleus (LC)*, se especifican utilizando los mismos factores de transcripción, *Mash1*, *Phox2a* y *Phox2b*; sin embargo, los factores son expresados y ejercen sus funciones de manera distinta, *Mash1-Phox2a-Phox2b*, se expresan en esa secuencia, activando la expresión del factor *Rnx/Tlx3* en lugar de activar al gen *dHand* (Goridis and Rohrer, 2002) (Smidt and Burbach, 2007). Así mismo, los precursores neurales que han adquirido el compromiso hacia neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, requieren de la expresión y la actividad en cascada de los factores de transcripción *Lmx1*, *Nurr1* y *Pitx3* (Goridis and Rohrer, 2002).

Por otra parte, se ha demostrado que la expresión de los genes *Mash1* y *Ngn2* en progenitores del cerebro anterior, es indispensable para la generación de neuronas que utilizan los neurotransmisores GABA y glutamato, respectivamente (Berninger et al., 2007) (Parras et al., 2002), mientras que la expresión de *Ngn2* en los precursores de espina dorsal permite la generación de neuronas motoras (Guillemot, 2007).

En otras regiones, como la retina del ojo en desarrollo en mamíferos, las combinaciones de distintos factores de transcripción en los precursores que originan las distintas capas de neuronas han sido identificados y se sabe que la generación de neuronas ganglionares, es especificada por efecto de la expresión de los factores *Math5* y *Pax6*, mientras que la generación de neuronas amácrinas, bipolares, y de Müller, que se encuentran en la capa nuclear interna, es resultado de la expresión de varios factores transcripcionales entre ellos *NeuroD/Math3/Pax6/Six3*, para especificar las neuronas amácrinas; *Mash1/Math2/Chx10* (bipolares), *Hes1/Hes5/Hes2.2/Rax*, para las neuronas de Müller; mientras que las neuronas de la capa más externa que captan la luz, los conos y los bastones, es determinada por la expresión y actividad de factores como *NeuroD/Mash1/Crx/Otx* (Hatakeyama et al., 2004; Hatakeyama and Kageyama, 2004).

1.4.2.2 Mecanismos epigenéticos de especificación neuronal

Por otro lado, existe otro mecanismo de control que se basa en la modificación covalente de algunas proteínas, siendo este proceso resultado de la actividad de diversas enzimas cuya expresión también se observa en el SNC. Algunas de las modificaciones postraduccionales más comunes y mejor estudiadas son aquellas que involucran a las histonas, las cuales son sustrato de un grupo de enzimas que catalizan la reacción de agregación de grupos acetilo o metilo. Se ha observado que la acetilación y metilación de las histonas juega un papel relevante en el proceso de diferenciación neuronal (Jiang et al., 2008). A este tipo de modificaciones que no involucran cambios en la secuencia del DNA, en conjunto se les conoce como modificaciones epigenéticas.

Las modificaciones postraduccionales a que son sujetas las histonas, ya sea acetilación o metilación resultan en dos efectos principales, la activación o la represión en la expresión de los genes blanco, afectando tanto la accesibilidad como la capacidad de reclutamiento de proteínas reguladoras hacia y sobre el DNA (Hsieh and Gage, 2005). Estudios pioneros realizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, describieron por primera vez un complejo llamado “*switching defective/sucrose nonfermenting*” o *SWI/SNF*, el cual contiene un conjunto de proteínas de diversa función; una de esas proteínas tiene actividad enzimática dependiente de la hidrólisis del *adenosin-trifosfato* (ATP), y su función es necesaria para modificar postraduccionamente a las histonas de aproximadamente el 6% del genoma total de este organismo (Sudarsanam et al., 2000). Es importante destacar el hecho de que la acetilación o metilación son modificaciones postraduccionales que afectan de manera directa la expresión de los genes (Muotri and Gage, 2006).

En mamíferos el fenómeno de epigénesis también regula la transcripción de múltiples genes. En *M. musculus* se han identificado dos genes homólogos de *SNF*, llamados *Brg1* y *Brm*, que forman parte de un complejo mayor denominado *BAF* (*Brg/Brm associated factor*), así como otras proteínas llamadas *SNF5/BAF47* y *SWI3/BAF155*, que a su vez forman parte de un complejo superior llamado *mSWI/SNF* (Wang et al., 1996). Se ha determinado que la combinación de las diversas proteínas en el complejo *mSWI/SNF*, especialmente aquellas del tipo *BAF*, juega un papel importante en el proceso de neurogénesis. Las subunidades *BAF45a*, *BAF53a* y *BAF60c*, forman parte del complejo que está presente únicamente en los precursores neuronales (llamado *npBAF*); durante la diferenciación de dichos precursores, la expresión de *BAF45a* y *BAF53a* disminuye a

niveles en los que no forman más parte del complejo principal, por lo que su posición dentro del complejo es sustituida por los homólogos *BAF45b* y *BAF53b*, lo que resulta en la formación de un complejo conocido como *nBAF*, el cual es específico de neuronas post-mitóticas (Yoo and Crabtree, 2009); la interferencia en el proceso de relevo de dichas subunidades durante la transición de precursores neuronales hacia neuronas maduras, ocasiona severos daños al proceso de diferenciación, por lo que se propone que este mecanismo es fundamental para el proceso de neurogénesis (Yoo and Crabtree, 2009).

Se puede concluir a partir de lo anterior, que la cooperatividad entre diversos moléculas como los morfógenos, los factores transcripcionales, así como del efecto de las modificaciones postraduccionales sobre las histonas, es necesaria para el establecimiento de diversos programas que conllevan a la diferenciación y la adquisición de un fenotipo o de fenotipos particulares del SNC. Las diversas vías de señalización que participan activamente en el control de la expresión de estos factores es todavía motivo de estudio por parte de diversos grupos de trabajo.

1.4.2.3 Mecanismos no transcripcionales que controlan neurogénesis

Diversos sustratos pueden ser blancos potenciales de mecanismos de control durante el proceso de neurogénesis del sistema nervioso. Ya se ha mencionado el que ejercen los factores difusibles como los morfógenos, así como las cascadas de factores transcripciones; sin embargo, existen otros niveles de regulación. Por ejemplo, el RNA puede ser blanco de varios tipos de procesamiento como el *splicing* alternativo, degradación dependiente de la longitud de su fragmento de poli-A, o la inhibición o degradación mediada por microRNAs (ver más adelante).

Por una parte, el fenómeno de splicing alternativo ocurre muy frecuentemente en la regulación de genes del SNC (Lipscombe, 2005), sobre todo en aquellos RNAm's que codifican proteínas que regulan la excitación de la neurona, como receptores para neurotransmisores, canales iónicos (necesarios para establecer un gradiente eléctrico), así como algunos factores de transcripción. (Muotri and Gage, 2006). Una de las moléculas involucradas en el control del fenómeno de splicing durante el período de transición de los precursores neuronales hacia fenotipos maduros, es la proteína heteronuclear de unión a RNA llamada *PTBPI*. Se ha observado que *PTBPI* regula los niveles del RNAm de otra proteína llamada *PTBP* neuronal (*nPTB*) en la línea celular P19, y su actividad es fundamental para la expresión de la proteína *MAP2*, un marcador de neuronas maduras (Makeyev et al., 2007). La disminución de la expresión de *PTBPI*, es necesaria para la acumulación del RNAm de *nPTB* durante el período de transición de precursores neuronales hacia el fenotipo neuronal.

Otra clase de regulación del proceso de neurogénesis que ha surgido recientemente como resultado del descubrimiento de moléculas pequeñas de RNA, llamadas microRNA (miRNA), depende principalmente de la vida media o de la estabilidad de los UNAM dentro del citosol de la célula. El descubrimiento de los RNAs pequeños ha contribuido a entender la diversidad de opciones que tiene el sistema nervioso para generar neuronas maduras a lo largo del desarrollo. Básicamente, los miRNAs son moléculas no codificantes de entre 18 y 23 nucleótidos que actúan como reguladores post-transcripcionales de la expresión de diversos genes (Moazed, 2009). La función de los miRNAs se lleva a cabo mediante la unión a regiones específicas en el extremo 3'UTR de los RNAm; esta unión tiene como resultado la inhibición de la traducción de dicho mensajero y en ciertos casos la

degradación del mismo (Kosik, 2006). De forma interesante, este sistema de control de expresión génica está altamente conservado en plantas y animales (vertebrados e invertebrados) (Winter et al., 2009). Se sabe por ejemplo, que los primeros miRNAs identificados, *lin-4* y *let-7*, se encontraron en el nematodo *C. Elegans*; ambos miRNAs se expresan en estadios específicos del estado larvario en este organismo, controlando la expresión de genes que activan programas de diferenciación o la disposición espacial dentro del organismo, de distintas células (Kosik, 2006) (Wienholds and Plasterk, 2005). Por ejemplo, se sabe que dos clases de neuronas sensoriales de este organismo adquieren su fenotipo final por efecto de la actividad de los miRNAs, *lisy-6* y *miR-273*, los cuales regulan la traducción de los mRNAs que codifican a los factores de transcripción de tipo homeótico *cog-1* y *zinc-finger die-1 (DIE1)*; controlando los niveles de expresión de ambos factores, el efecto final es de la determinación de la posición izquierda o derecha de dichas neuronas (Gao, 2008).

En *D. melanogaster*, *Danio rerio*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*, se ha observado que la diferenciación neuronal también es regulada por algunos miRNAs. Específicamente se ha determinado que tanto *miR-9a* como *miR-124a*, están altamente conservados en estos organismos y que la expresión de ambos se restringe básicamente al tejido nervioso, contribuyendo de manera importante a la diferenciación neuronal (Kosik, 2006). De hecho el *miR-124a* es el microRNA más abundante en el cerebro de la mayoría de estos organismos, y en el ratón se expresa principalmente en precursores postmitóticos así como en neuronas maduras (Krichevsky et al., 2003). Datos experimentales indican el gen tipo bHLH, *Hes1* es blanco de *miR-124a* y que éste último es regulado por el factor de transcripción silenciador de neuronas, también llamado *NRSF/REST*; normalmente

NRSF/REST inhibe la transcripción de *miR-124a* en los precursores neuronales y células no neurales, mientras que en neuronas en proceso de diferenciación o fenotípicamente maduras, este factor de transcripción no está presente en el locus de *miR-124a* (Gao, 2008) (Erson and Petty, 2008) (John et al., 2004). Evidencia adicional indica que el *miR-124a* estimula la diferenciación neuronal a través de la regulación del RNAm que codifica a la proteína *PTBPI* (Makeyev et al., 2007).

Adicionalmente, se ha demostrado que otros procesos relacionados directamente con el proceso de diferenciación neuronal como el direccionamiento axonal, la muerte celular programada, así como el establecimiento de sinapsis funcionales, también son blancos directos de regulación mediada por varios miRNAs (Esquela-Kerscher and Slack, 2006; Kosik, 2006; Corbin et al., 2009).

2. Antecedentes

2.1 El hipotálamo, origen y desarrollo

El mantenimiento de la homeostasis corporal representa un componente importante en la adaptación biológica de los mamíferos vertebrados. Esta regulación homeostática depende en gran parte de la capacidad para interpretar e integrar un amplio rango de estímulos que describen el estado general del organismo y de su entorno inmediato. Como resultado de la información recibida, grupos de neuronas en distintas regiones del cerebro responden a través de señales sinápticas y humorales, lo cual resulta en modificaciones fisiológicas y de conducta como el gasto energético, el ciclo de vigilia y sueño, la temperatura corporal, el flujo sanguíneo, las respuestas a distintos tipos de estrés, así como la reproducción, entre otras (Williams et al., 2000). En mamíferos, el fenómeno

homeostático es controlado por el sistema neuroendócrino, en el cual, el sistema nervioso y el endócrino están relacionados física y funcionalmente por el hipotálamo (Michaud, 2001).

El hipotálamo ocupa la parte ventral del diencéfalo a ambos lados del tercer ventrículo; se encuentra inmediatamente encima de la hipófisis y ventral al tálamo, formando las paredes y el piso del tercer ventrículo (Purves D., 2004) (Figura 7A). Debido a su posición ventro-medial, el hipotálamo integra información de varias regiones del

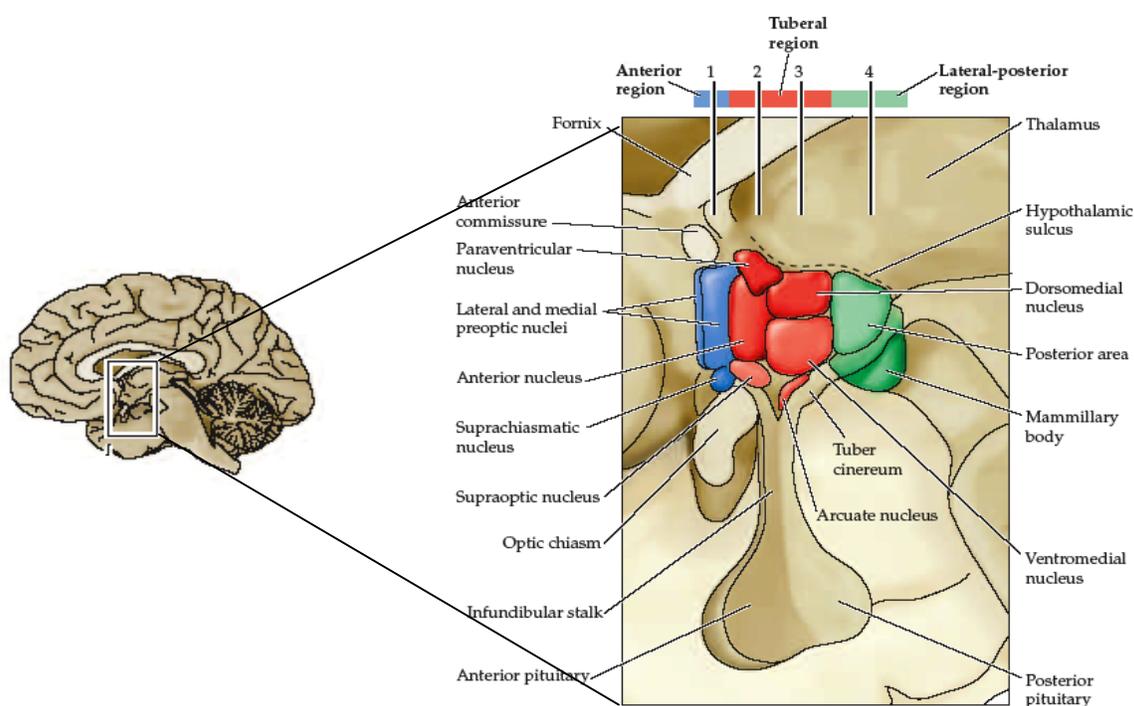


Figura 7A. Esquema que ilustra la posición y estructura del hipotálamo en humanos. Anatómicamente se localiza en la base del cerebro anterior rodeado por el quiasma óptico en la parte más rostral y por el tegmentum del cerebro medio en la parte más caudal; forma el piso y las paredes ventrales del tercer ventrículo, además de continuarse con la estructura llamada tallo infundibular, que esta constituido por los axones de ciertas neuronas del hipotálamo que se conectan directamente con la parte posterior de la pituitaria. Estructuralmente, el hipotálamo está constituido por grupos de neuronas, llamados núcleos, los cuales se clasifican en tres grupos de acuerdo a su posición: los de la región anterior (en color azul), incluyen a los núcleos lateral, medial y supraquiasmático; los de la región tuberal (en color rojo), incluyen los núcleos paraventricular, anterior, dorsomedial, ventromedial, arcuato, y supraóptico; finalmente, los de la región lateral-posterior (en color verde), incluyen al área posterior y los cuerpos mamilares. Se indican además otras áreas como referencia como el tálamo, el sulco hipotalámico (una frontera entre el anterior y la parte dorsal del hipotálamo), la comisura anterior, el tuber cinereum, el quiasma óptico, así como el tallo infundibular y la glándula pituitaria (anterior y posterior). Tomado de: Purves D., et al., 2004. Neuroscience, 3a Ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA. EUA.

cerebro, como la corteza, el hipocampo y la amígdala, así como de los sistemas sensoriales periféricos como el sistema visceral (Purves D., 2004).

Estructuralmente, el hipotálamo se organiza en regiones definidas conocidas como núcleos. Estos núcleos contienen neuronas con patrones específicos y únicos de conexiones y funciones. Cada núcleo está a su vez interrelacionado con los demás y se clasifican longitudinalmente como periventricular, medial o lateral (Burbach et al., 2001) (Figura 7B). Las neuronas de los diversos núcleos controlan la función de la glándula hipófisis a través de dos sistemas neurosecretores principales: 1) el sistema magnocelular del núcleo

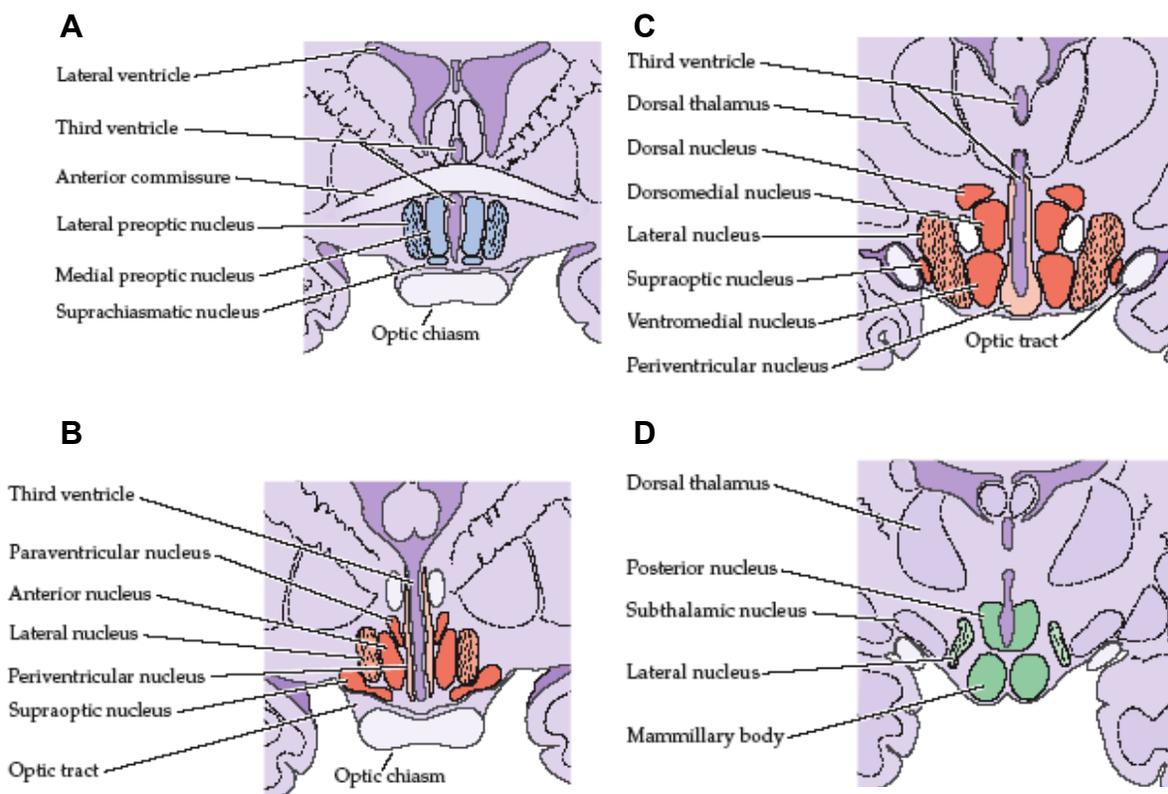


Figura 7B. Secciones coronales de cerebro a nivel del hipotálamo en donde se esquematizan las posiciones relativas de los núcleos que lo constituyen. Los de la región anterior (A), incluyen a los núcleos preópticos lateral y medial, y el supraquiasmático; los de la región tuberal (B y C), incluyen los núcleos paraventricular, anterior, lateral, periventricular, arcuato, y supraóptico, ventromedial, dorsomedial y dorsal; finalmente, los de la región lateral-posterior (D), incluyen al posterior, lateral y los cuerpos mamilares. Se indican además otras áreas de referencia como el ventrículo lateral y el tercer ventrículo, el quiasma óptico, el tálamo dorsal y el tracto óptico. Tomado de: Purves D., et al., 2004. Neuroscience, 3a Ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA. EUA.

paraventricular (NPV) y del núcleo supraóptico (NSO); y 2) el sistema parvocelular del NPV y el núcleo anterior periventricular (aPV) (Michaud, 2001). Las neuronas del sistema magnocelular sintetizan y liberan los péptidos arginina-vasopresina (AVP) y oxitocina (OT), que son transportadas a las terminales nerviosas que inervan la neurohipófisis, formando el sistema hipotálamo-neurohipofisial (Armstrong, 1985). Por otra parte, las neuronas del sistema parvocelular envían sus axones directamente hacia la eminencia media, una región irrigada por el sistema capilar portal hipofisiario, donde se liberan los péptidos hormona liberadora de tirotrópina (TRH), hormona liberadora de corticotropina (CRH) y somatostatina (SS) (Burbach et al., 2001).

Dado el papel relevante que juega el hipotálamo desde el punto de vista fisiológico en los mamíferos vertebrados, múltiples grupos de trabajo han destacado las funciones que desempeña cada uno de los núcleos neuronales que lo constituyen. En contraste, relativamente poca información y atención se ha puesto en como los diferentes grupos neuronales que constituyen a los núcleos del hipotálamo son especificados durante el desarrollo y el mecanismo(s) por el cual(es) las neuronas alcanzan su diferenciación terminal hasta lograr establecer las conexiones apropiadas.

Algunos trabajos han establecido que temprano en el desarrollo, señales inductivas derivadas del mesodermo como *Shh* y *Nodal*, así como las vías de señalización de BMPs y *Wnt*, tienen una fuerte influencia sobre la regionalización del diencefalo, ya que su inactivación por medio de recombinación homóloga, indica que son necesarias para la inducción y regionalización del hipotálamo; lo anterior es cierto tanto para el desarrollo del hipotálamo de *Mus musculus* como de *D. rerio* y *Homo sapiens* (Michaud, 2001; Wilson and Houart, 2004; Caqueret et al., 2005).

Otra fuente de señales que colaboran para regionalizar al hipotálamo durante el desarrollo embrionario, es el primordio que origina parte de la glándula pituitaria o hipófisis. Dicho primordio de células produce un factor aún no caracterizado, que regula la expresión del factor de transcripción *Hesx1*; la expresión de éste último regula el desarrollo de la región ventral del hipotálamo, en donde residen las neuronas que producen los péptidos hormona adenocorticotrópica (ACTH) y hormona estimulante de melanocitos (MSH) (Caqueret et al., 2005).

La diferenciación de las neuronas, como se ha descrito más arriba, involucra una serie de mecanismos diversos, entre los cuales destaca el papel de los factores de transcripción, lo cuales progresivamente definen los distintos fenotipos dentro del sistema nervioso. Algunas de estas cascadas de activación de factores de transcripción han sido descritas durante el período de nacimiento de las distintas neuronas que componen el hipotálamo adulto. Por ejemplo, se ha demostrado que el hipotálamo dorsal anterior, que incluye al NPV y NSO, adquiere su arquitectura morfológica por efecto de la acción de varios factores de transcripción entre ellos el factor homeótico *Otp*, así como los de tipo bHLH *Sim1* y *Arnt2* (Tobet, 2002); estos factores en conjunto pueden controlar la proliferación de los precursores neurales, la diferenciación y la migración hacia sus posiciones finales (Figura 8). Ratones nulos para la expresión de cualquiera de estos factores presentan alteraciones morfológicas que resultan en la ausencia total de neuronas que producen los péptidos arginina-vasopresina (AVP), hormona liberadora de corticotropina (CRH), oxitocina (OT), así como somatostatina (SS) y la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Michaud et al., 1998; Michaud et al., 2000) (Hosoya et al., 2001) (Keith et al., 2001) (Acampora et al., 1999) (Wang and Lufkin, 2000).

En un reporte reciente, Michaud y colaboradores, demostraron que el factor *Sim1*, participa activamente en el desarrollo de las neuronas que conforman la parte anterior o más rostral del hipotálamo, ya que los ratones mutantes para la producción de este factor muestran defectos de sobrevivencia neuronal así como alteraciones en la posición de los precursores en la zona anterior del hipotálamo (Caqueret et al., 2006). Algunos de los genes blanco de estos factores transcripcionales son los que codifican a los factores *Brn2* y *Sim2*. De hecho, se ha determinado que *Brn2* controla directamente la actividad del promotor del gen de CRH, durante la etapa de diferenciación terminal, sugiriendo que regula la diferenciación terminal de este fenotipo neuronal dentro del hipotálamo en desarrollo (Schonemann et al., 1995).

Otro factor transcripcional que tiene un papel relevante en el desarrollo de las neuronas que constituyen al núcleo hipotalámico arcuato (ARC) y el núcleo ventro-medial hipotalámico (VMN), es *Nkx2.1* (un factor de tipo homeótico), el cual se expresa en la parte ventral que origina a los dos núcleos. La actividad de *Nkx2.1* a su vez induce la expresión de otro factor homeótico llamado *Gsh1*, cuya actividad en conjunto con la de los factores *Hmx2* y *Hmx3* es esencial para la expresión del péptido hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) en el ARC (Li et al., 1996).

Por otro lado, el factor *achaete scute complex 1* (*ASCL1*) juega un papel importante en el proceso de diferenciación de las neuronas peptidérgicas del núcleo ventromedial (VMN), *ASCL1* al igual que *Otp*, regula la proliferación de los precursores neuronales de la zona periventricular del tercer ventrículo (Figura 8), que dan origen a las neuronas que expresan los péptidos proopiomelanocortina (POMC), hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con Agouti

(AGRP), del ARC y VMN (Jo and Chua, 2009). El factor esteroideogénico 1 (*SFI*), un receptor nuclear huérfano, cuya expresión se limita a la parte ventral del hipotálamo en desarrollo, específicamente en el núcleo ventromedial (VMN), es también indispensable para el proceso migratorio de las neuronas del VMN, ya que ratones nulos para la expresión de este factor generan el número normal de neuronas, sin embargo, su distribución espacial está alterada, debido principalmente a que no logran alcanzar su posición final (Jo and Chua, 2009) (Caqueret et al., 2005).

Además de la actividad de los factores de transcripción mencionados arriba durante el desarrollo o de algunos núcleos hipotalámicos, algunos genes cuya expresión se da únicamente a partir de alelos heredados del padre como “*paternally expressed gene 3*” (*Peg3*) y “*encoding neudin*” (*Ndn*) son requeridos para el desarrollo apropiado del hipotálamo en el ratón; el gen *Peg3* codifica un factor de transcripción con once dedos de zinc del tipo cisteína-cisteína/histidina-histidina (C2H2) (Kuroiwa et al., 1996), el cual se expresa en altos niveles en regiones del hipotálamo que regulan el gasto energético, y la ausencia en su expresión provoca alteraciones en el proceso de crecimiento del axón de neuronas post-mitóticas, ya que se ha demostrado que interactúa con los microtubulos que participan activamente en este proceso (Caqueret et al., 2005).

Sin embargo, hay otros factores no genéticos que actúan durante el desarrollo y que contribuyen a inducir los cambios morfológicos y fisiológicos en las neuronas postmitóticas del hipotálamo. Se ha observado que la actividad eléctrica (Nawa et al., 1994), o la composición de la matriz extracelular (Dityatev and Schachner, 2006) y factores difusibles, en particular factores tróficos (Huang and Reichardt, 2001), pueden inducir la expresión de diversos fenotipos neuronales. Por ejemplo, grupos de neuronas anatómica- y

funcionalmente segregadas del hipotálamo, que producen dopamina, responden de manera diferencial al factor neurotrófico derivado de cerebro (*BDNF*) o a la neurotrofina 3 (*NT-3*), lo que contribuye a su mantenimiento y sobrevivencia (Berg-von der Emde et al., 1995).

Adicionalmente, se ha demostrado que neuronas en cultivo derivadas de la región dorsal o ventral del hipotálamo de ratas en gestación, responden de forma opuesta al estímulo con *BDNF*; es decir, mientras las neuronas dorsales incrementan el número de extensiones y la síntesis del péptido SS, las de la parte ventral no mostraron ningún cambio morfológico ni aumento en la síntesis del mismo péptido (Loudes et al., 2000).

Estudios derivados del análisis del efecto que puede tener la actividad eléctrica sobre el desarrollo neuronal indican que en cultivos organotípicos de la corteza, la actividad eléctrica espontánea incrementa la expresión del péptido NPY, al igual que el estímulo con la citocina factor inhibitorio de leucemia (*LIF*) y las neurotrofinas *NT-4/5* incrementan el número neuronas positivas para NPY, sin afectar el número total de neuronas (Wirth et al., 1998).

Análisis extensivos en el sistema nervioso periférico (SNP), han establecido que la expresión de los neurotransmisores y neuropéptidos está regulada espacial y temporalmente durante el desarrollo y que esta expresión está influenciada por factores tróficos sintetizados por varios tipos celulares incluyendo la glia y las células blanco (Korsching, 1993). Los neuropéptidos constituyen una familia amplia de moléculas con propiedades específicas en la comunicación neuronal. En el hipotálamo ocurren diversos tipos de comunicación, tanto neuronal como humoral. Los núcleos hipotalámicos, especialmente aquellos de la parte medial como el ARC, PVN y el VMN tienen relevancia debido

principalmente, a que responden a los cambios en el balance energético, así como las respuestas del organismo a dichos cambios a través de la estimulación de la glándula hipófisis para que produzca diversas hormonas útiles en el mantenimiento del balance energético, como la hormona estimulante de tiroides (TSH) o la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), entre otras (Purves D., 2004).

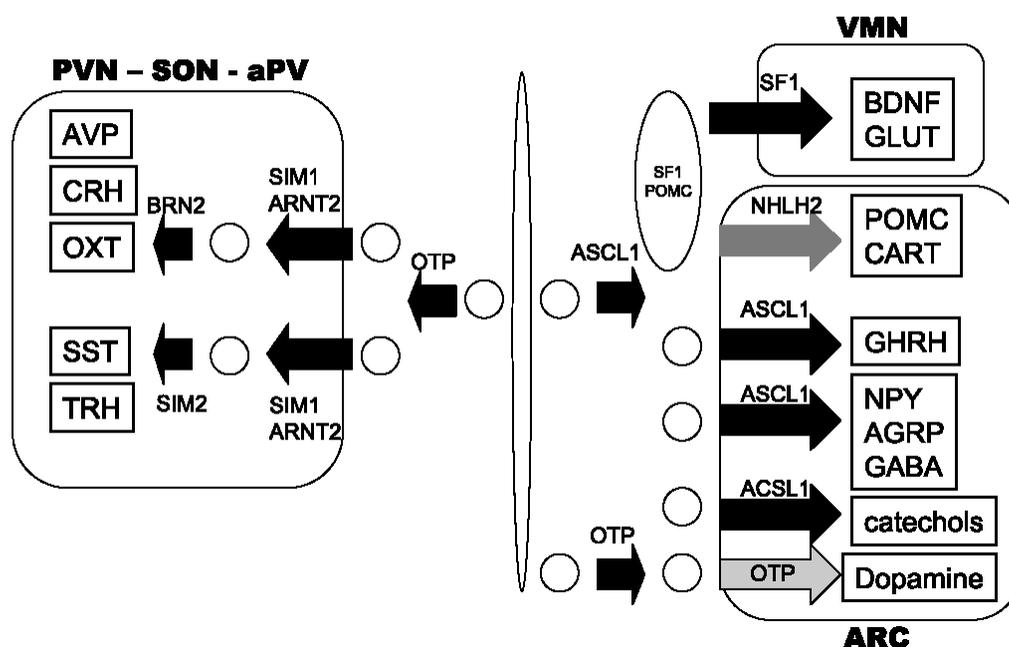


Figura 8. Factores de transcripción de las familias homeótica y bHLH, determina la proliferación y migración de los progenitores neurales hacia la región medial del hipotálamo. Los factores *orthopedia* (OTP) y *achaete-scute complex 1* (ASCL1), son necesarios para la proliferación de los progenitores en la zona adyacente a la pared del tercer ventrículo; OTP regula la proliferación de los progenitores de los núcleos paraventricular (PVN) y las neuronas dopaminérgicas del núcleo arcuato (ARC). Por otro lado, el factor ASCL1, controla la proliferación de los progenitores que originan las neuronas de neuropéptido Y (NPY), proteína relacionada con Agouti (AgRP), hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), y neuronas catecolaminérgicas del núcleo ARC. La migración de neuronas que producen BDNF del núcleo ventromedial (VMN), es controlada por el factor esteroideogénico 1 (SF-1); mientras que el factor SIM1 (homólogo del factor Single-minded de D, melanogaster) y el translocador del receptor nuclear aril-hidrocarbon (ARNT2), son necesarios para la migración de todos los precursores del PVN. El factor brain-2 (BRN2) que es necesario para el proceso de diferenciación de las neuronas de vasopresina (AVP), hormona liberadora de corticotropina (CRH) y oxitocina (OXT), junto con el factor SIM2, que a su vez es necesario para la diferenciación de las neuronas de somatostatina (SST) y hormona liberadora de tirotrópina (TRH), dependen de la actividad del heterodímero formado por los factores SIM1/ARNT2. Además, el factor llamado hélice-vuelta-hélice naciente 2 (NHLH2), es determinante en la expresión del gen proopiomelanocortina (POMC) ya que regula la síntesis de la enzima pro-hormona convertasa 1 (PC-1). SON, núcleo supraóptico; aPV, núcleo periventricular anterior; GLUT, transportador de glucosa; CART, transcrito relacionado a cocaína y anfetamina; GABA, ácido gaba-aminobutírico. Tomado de: Young-Hwan J. & Streamson C., 2009. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: 563.

2.1.1 La hormona liberadora de tirotropina (TRH)

Uno de los primeros péptidos hipotalámicos en ser purificados a partir de extractos de hipotálamo porcino, fue la hormona liberadora de tirotropina o TRH (O'Leary and O'Connor, 1995). Este péptido tiene una estructura relativamente simple, ya que sólo consta de tres residuos de aminoácido con la secuencia pGlu-His-ProNH₂ (*piroglutamil-histidil-prolina-amida*). En humanos el TRH fue clonado por vez primera en 1990 (Yamada et al., 1990) y una de las principales funciones que se le atribuyen es la de estimular la síntesis y liberación de TSH en la pituitaria anterior, en donde se une a receptores específicos de la superfamilia GPCR (*guanine protein binding coupled receptor*) (Nussenzveig, 1995), estimulando a su vez la liberación en la circulación periférica, de las hormonas tiroideas (Tri-yodotironina o T₃ y tetra-yodotironina o T₄); estableciendo así lo que se conoce como el eje tiroideo. El péptido TRH, además de regular el eje tiroideo, también puede estimular la síntesis y liberación de la hormona prolactina (PRL), que a su vez estimula la producción de leche materna; o en algunas condiciones, la hormona de crecimiento (GH); posee además propiedades inhibitorias sobre el proceso de secreción de glucocorticoides en la glándula adrenal (Yamada et al., 2003). A esta regulación de la actividad secretora de la glándula hipófisis se la conoce como hipofisiotrópica.

Posteriormente, se determinó que el TRH no sólo está presente en el hipotálamo, sino que además se encuentra en otras zonas del SNC, como el sistema límbico (hipocampo y amígdala), el bulbo olfatorio, el tálamo, el cerebelo (especialmente en las células granulares), el tallo cerebral, y la espina dorsal (Joseph-Bravo et al., 1998) (Heuer et al., 2000). El papel del TRH en zonas distintas al hipotálamo, no está completamente claro, aunque se ha propuesto que funciona como un modulador de la comunicación ejercida por

otros neurotransmisores e incluso como un neurotransmisor clásico; entre los efectos conocidos mediados por TRH fuera del hipotálamo se incluyen el aumento y descenso del tiempo de vigilia y sueño, respectivamente; así como la disminución de la narcosis inducida por alcohol y otras drogas, la mejora en el desempeño de pruebas en paradigmas de memoria y aprendizaje o la disminución de estados de ansiedad o depresión (Stevenin, 1995) (Nillni and Sevarino, 1999) (de Gortari et al., 2005; Aguilar-Valles et al., 2007) (Gutierrez-Mariscal et al., 2008).

Además del sistema nervioso, el TRH se ha identificado también en órganos periféricos como el intestino, el páncreas, la placenta, la retina, la próstata y los testículos tanto de murinos como en humanos (Griffiths EC. & Bennett, 1983) (Nillni and Sevarino, 1999) (Yamada et al., 2003) (Yano and Luo, 2004) (Satoh et al., 1992) (Lechan et al., 1986), aunque el papel fisiológico que tiene en esas regiones, aún no está completamente claro. Más aún, el péptido también se ha detectado en otros vertebrados como *D. rerio* (Diaz et al., 2002), *X. laevis* (Galas et al., 2005) y el pollo (De Groef et al., 2005) en estos organismos al igual que en murinos o humano, el papel mejor caracterizado del TRH es el de regulador del eje tiroideo.

2.1.2 Regulación de la diferenciación de las neuronas TRHérgicas del hipotálamo

La caracterización inicial del gen de TRH ha permitido determinar que su región estructural tiene una longitud aproximada de 2.6 kilobases (Kb) en *R. norvegicus* (Lechan et al., 1986) y 3.3 Kb en *H. sapiens* (Yamada et al., 1990), constituidos por tres exones interrumpidos por dos intrones. El producto transcripcional es un RNAm que contiene cinco (rata, ratón) ó seis (humano) copias de la secuencia del tripéptido (Joseph-Bravo et al., 1998) (Figura 9).

El análisis de la región 5' UTR promotora contiene múltiples elementos de respuesta a factores de transcripción, los cuales participan en la regulación de la expresión del gen de TRH. Se ha identificado respecto del sitio de inicio de la transcripción (TSS), una caja TATA a -28 pb, un elemento responsivo a glucocorticoides (GC), GRE a -119 pb, así como sitios responsivos a hormonas tiroideas (*TRE*) y a los factores de transcripción *CREB* y *AP-1* (heterodímero de las proteínas *Fos/Jun*) (Stevenin, 1995) (Joseph-Bravo et al., 1998). La hormona leptina que es sintetizada y liberada por las células adiposas, ejerce control sobre las neuronas de TRH en el hipotálamo, principalmente por la activación de la vía de señalización que activa al factor de transcripción llamado transductor y activador de la transcripción 3 (*Stat3*), el cual reconoce una secuencia específica de respuesta en la región promotora del gen aproximadamente a -141pb, y se ha determinado que dicho elemento de respuesta se conserva en el promotor del TRH en humano, rata y ratón (Harris et al., 2001), sugiriendo que juega un papel relevante en el control del gen de TRH.

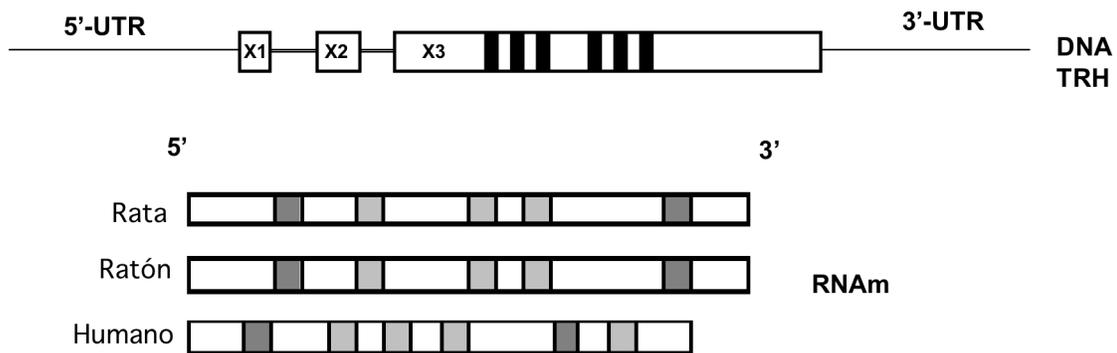


Figura 9. Esquema ilustrativo de la estructura del gen de TRH en tres especies de animales mamíferos. En la parte superior se ilustra la estructura del gen, el cual está compuesto por tres exones (representados por X1, X2 y X3), que codifican diferentes segmentos del RNAm. Tanto en ratón, rata y en humano, el exón X3, es el que codifica la mayor parte del transcrito, mientras que los exones X1 y X2, codifican parte de la secuencia que guía al péptido a la vía de procesamiento vesicular. Se indican el número de copias del tripéptido dentro del precursor. Se sabe que para el ratón y la rata son 5 y 6 para el caso del humano. Las líneas delgadas que conectan los exones representan los intrones. UTR, región no traducida. Lechan RM., et al. 1986. *Science* 231: 159; Yamada M., et al., 1990. *Mol Endocrinol* 4: 551; Joseph-Bravo P., et al., 1998. *Cell Mol Neurobiol* 18: 231

Datos previos de nuestro laboratorio demuestran que en *R. norvegicus*, el TRH se regula a lo largo del desarrollo tanto *in vivo* como *in vitro*. En este sentido, sabemos que los niveles basales tanto del RNAm como del péptido maduro en secciones de hipotálamo de ratas en desarrollo, se incrementan desde los días embrionarios (E) 17 hasta el día postnatal (P) 17; este patrón de expresión se recapitula cuando se analiza la expresión de TRH utilizando neuronas derivadas de hipotálamo en cultivo (Figura 10) (Perez-Martinez et al., 2001). Estos datos además de establecer al cultivo primario de neuronas embrionarias de hipotálamo, como modelo para estudiar el proceso de diferenciación neuronal, también indican que la expresión del gen de TRH está sujeta a regulación durante la etapa de diferenciación terminal de las neuronas de hipotálamo.

Algunos de los mecanismos moleculares que regulan la expresión del gen de TRH, durante el proceso de diferenciación del fenotipo, han sido determinados. Utilizando el modelo del cultivo primario de neuronas de ratas gestantes de E17, se determinó que el estímulo con la neurotrofina BDNF pero no el de NT-3, incrementa los niveles basales del RNAm de TRH sin alterar la viabilidad de las neuronas (Guerra-Crespo et al., 2001). Estos datos, en conjunto con evidencia obtenida por otros grupos, indican que las neuronas de hipotálamo en desarrollo dependen en parte de la actividad de las neurotrofinas para alcanzar su madurez fenotípica (Rage et al., 1999) (Loudes et al., 2000).

Con la idea de poder caracterizar de manera más concreta la(s) vía(s) por la(s) cual(es) el BDNF activa la expresión del gen de TRH, recientemente determinamos que parte de la respuesta de las neuronas hipotalámicas en cultivo al estímulo con esta neurotrofina, es mediada por la vía de señalización de las *MAPK*, implicando a esta vía de

señalización como una ruta importante en el proceso de diferenciación de las neuronas hipotalámicas de TRH (Ubieta et al., 2007).

La regulación de la expresión del gen de TRH depende en gran parte, directamente de su región promotora, la cual es blanco para la unión de varios factores de transcripción activados por las cinasas mencionadas, entre ellos *CREB*, *AP-1*, *GR* así como el receptor de las hormonas tiroideas (TR). Este último, a diferencia de los otros, se sabe que ejerce un control negativo sobre la expresión del gen de TRH de hecho, forma parte activa del mecanismo de regulación negativa ejercido por las hormonas T_3 y T_4 que disminuyen la actividad del eje tiroideo (Vella and Hollenberg, 2009) (Joseph-Bravo et al., 1998).

La regulación mediada por las hormonas tiroideas utiliza al menos cuatro isoformas de TRs nucleares codificados en dos genes, el *TR α* y el *TR β* ; la expresión de dichas isoformas es tejido-específica, siendo las isoformas *TR α 1* y *TR α 2* expresadas principalmente en músculo esquelético, en los adipocitos, el hígado y ciertas regiones del cerebro, mientras que las isoformas *TR β 1* y *TR β 2* se expresan ampliamente en cerebro y glándula pituitaria, respectivamente (Stevenin, 1995) (Zhang and Lazar, 2000) (Chiamolera and Wondisford, 2009). Dado el patrón de expresión de las isoformas de los TRs y la evidencia fisiológica sobre su papel en la regulación del eje tiroideo, en el laboratorio, recientemente se demostró utilizando el modelo de cultivo de hipotálamo de ratas de E17, que la respuesta a la T_3 en cultivos mantenidos por períodos de entre 12 y 18 días *in vitro* (DIV), muestra efectos diferenciados; es decir, al DIV12 la expresión del RNAm de TRH se incrementa de forma significativa, mientras que al DIV18, el tratamiento reduce los niveles del mismo transcrito. Interesantemente, el tratamiento del cultivo con T_3 incrementó los niveles de expresión de las isoformas *TR α 1* y *TR β 2* (Carreon-Rodriguez et al., 2009).

Estos datos en conjunto con evidencia adicional sobre el efecto de las hormonas tiroideas en la expresión del gen de TRH *in vivo* (Sugrue et al., 2010), sugieren que las hormonas tiroideas, además de regular la fisiología del eje tiroideo, también podrían participar en la consolidación del fenotipo de las neuronas de TRH en el desarrollo temprano del hipotálamo .

3. Justificación

3.1 Transcriptoma de las neuronas TRHérgicas

En el hipotálamo coexisten varios fenotipos neuronales que se agrupan en núcleos definidos (Figura 6A,B), estos núcleos están conformados de neuronas con fenotipos idénticos, aunque también pueden coexistir con fenotipos distintos. La diversidad de fenotipos dentro del hipotálamo refleja un complejo proceso de activación de programas de diferenciación, los cuales surgen como resultado de cascadas de activación de factores transcripcionales, así como de la actividad de moléculas difusibles, entre otros factores.

Sabemos que las neuronas de los diversos núcleos hipotalámicos surgen temprano en el desarrollo; específicamente, se sabe que las neuronas hipotalámicas en humanos surgen aproximadamente entre las semanas 11 a 23 (Koutcherov et al., 2003); mientras que en *M. musculus* las neuronas hipotalámicas surgen entre los días embrionarios E11 y E13 (Shimada and Nakamura, 1973) (Karim and Sloper, 1980; Caqueret et al., 2006); o entre los días E14 y E16 en *R. norvegicus* (Altman and Bayer, 1978a, b, c). Estudios adicionales realizados en *R. norvegicus* han demostrado que el tripéptido TRH se puede detectar desde el día E13 mediante experimentos de radioinmunoensayo (RIA) o mediante

inmunohistoquímica (Faivre-Bauman et al., 1978) (Okamura et al., 1991). Sin embargo, a nivel de la expresión del RNAm de TRH, datos previos indican que se puede detectar en cortes histológicos de cerebros de rata a partir del día E14 en la zona correspondiente al hipotálamo lateral, y los niveles de expresión aumentan conforme avanza el desarrollo, siendo evidente la presencia del transcrito en la mayoría de los núcleos que conforman la población de neuronas de TRH del hipotálamo, uno o dos días antes del nacimiento (Burgunder and Taylor, 1989).

Los núcleos hipotalámicos tienen orígenes comunes durante el desarrollo embrionario, sin embargo, eventualmente, conforme avanza el desarrollo, forman dominios de grupos de neuronas que son distintas entre sí. Actualmente, poco se sabe acerca de los mecanismo moleculares que permiten la segregación de dichos grupos neuronales. No obstante, existen datos que sugieren la existencia de mecanismos específicos por los cuales las neuronas hipotalámicas, específicamente las de TRH, alcanzan su diferenciación terminal, y dichos programas son activados de acuerdo a la región espacial que ocupan las neuronas dentro del hipotálamo. El control de esta regionalización esta íntimamente ligada a la actividad de los factores transcripcionales de tipo bHLH, homeóticos, así como los de tipo *POU*. No obstante, a excepción de un reporte en el cual se determinaron algunos de los genes blanco que son regulados directamente por los factores *SIMI* y *ARNT2* (Liu et al., 2003) y que pueden ser relevantes para el establecimiento de núcleos neuronales maduros, la determinación de los genes blanco de *Otp* o de *Sim2* así como la consecuencia fisiológica de la activación de dichos genes blanco sobre el proceso de diferenciación, no han sido reportados.

Con la finalidad de obtener información más amplia acerca de los factores que pudiesen estar participando en el(los) programa(s) que regulan el establecimiento y/o el mantenimiento del fenotipo TRHérgico hipotalámico, se decidió realizar un estudio más amplio de los genes que pudiesen participar en el proceso de diferenciación terminal o establecimiento de las neuronas que constituyen a los núcleos hipotalámicos, específicamente aquellas que producen el péptido TRH. Para ello se optimizó un protocolo experimental que permitiera purificar la población de neuronas de TRH de hipotálamo embrionario, el cual está basado en la utilización de la proteína verde fluorescente (GFP), como reportero (Guerra-Crespo et al., 2003).

El modelo de cultivo primario utilizado en el laboratorio fue el punto de partida para aislar de manera específica a la población de neuronas de TRH. Las neuronas en cultivo fueron transfectadas con un vector de expresión conteniendo el DNA complementario (cDNA) de la GFP bajo el control de la región promotora del gen de TRH previamente reportada como necesaria y suficiente para la expresión tejido-específica (-776pb a +84pb) (Balkan et al., 1998). Las células GFP+ se separaron por citometría de flujo (FACS). Posteriormente, las células purificadas se utilizaron para obtener el RNA total, el cual fue usado para generar un conjunto de sondas de RNA complementario (cRNA) útil para el análisis parcial del transcriptoma de éstas células.

Para corroborar que efectivamente se había logrado enriquecer mediante este proceso a las neuronas de TRH, experimentos de RT-PCR permitieron observar que marcadores neuronales y de células gliales estaban enriquecidos y disminuidos, respectivamente, en dicha población; más aún, la amplificación del RNAm de TRH mostró que éste transcrito

estaba significativamente enriquecido en la población purificada vs las células usadas como control (Guerra-Crespo M., et al. 2009. Manuscrito sometido).

Posteriormente, los cRNAs representativos obtenidos de las neuronas TRH+/GFP+ fueron usados para hibridar el microarreglo (Chip) U34-A (*Affymetrix*), que contiene las secuencias de alrededor de 9000 genes del genoma de la rata. A partir de los microarreglos analizados, se determinó que varios transcritos se encontraban enriquecidos en la población GFP+ respecto de las poblaciones control. Dentro de los transcritos que se encontraron enriquecidos en la población GFP+ se identificaron varias secuencias relacionadas con productos génicos desconocidos o aún no definidos (*EST's*), algunos factores de transcripción como *c-Fos*, *Atf3* (activating transcription factor 3), *Tieg* (TGF- β inducible early gene) o *Klf10* y *Klf4* (*Krüppel-like factor 4*), así como genes relacionados con fenotipos neuronales como el neurofilamento H, la folistatina y la internexina. (Guerra-Crespo et al., 2009. Manuscrito sometido).

3.2 El factor de transcripción 4 similar a *Krüppel* (*Klf4*)

El factor *Klf4*, también conocido como *Gklf* pertenece a una familia de factores que presentan homología con el producto del gen de segmentación *Krüppel* descrito inicialmente en *D. melanogaster* (Schuh et al., 1986). Estudios previos señalan que *Klf4* actúa como un regulador de la proliferación y de la diferenciación celular (revisado en (Bieker, 2001) (Dang et al., 2000). El efecto antiproliferativo de *Klf4* se lleva a cabo a través del control de la expresión de proteínas regulatorias del ciclo celular como el gen que codifica para el inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, *p21*, así como a las propias ciclinas (Zhang et al., 2000). También se ha relacionado la actividad de este factor con la

expresión de genes de diferenciación tardía de fenotipos epiteliales, como el gen de queratina 4 (*K4*), y la actina de músculo liso (*SM22α*) (Jenkins et al., 1998) (Adam et al., 2000).

Klf4 pertenece a la familia de factores transcripcionales de tipo “*zinc finger*” (Kaczynski et al., 2003). El motivo de unión a DNA esta constituido por tres dedos de zinc tipo C2H2 que reconocen secuencias en sus genes blanco del tipo CACCC o cajas tipo GC (Zhang et al., 1998b; Zhang and Derynck, 2000). El producto del gen *Klf4* es un polipéptido de 483 aminoácidos en cuya región N-terminal se localiza el dominio de transactivación constituido por una firma de residuos aminoácidos de tipo ácido; mientras que una señal de localización nuclear seguida del dominio de unión a DNA se localizan en el extremo carboxilo (Figura 11) (Kaczynski et al., 2003) (Shields et al., 1996) (Philipsen and Suske, 1999).

Estudios de hibridación in situ han demostrado que en *M. musculus*, el RNAm de *Klf4* se expresa de manera abundante en el tracto gastrointestinal así como en la epidermis, desde el día E10.5 (Ohnishi et al., 2000), aunque otro reporte indica que en el intestino, *Klf4* es detectable a partir del día E13, con pico máximo en E17 y E18 (Ton-That et al., 1997). En la epidermis, *Klf4* ha sido reportado como un importante regulador de la diferenciación terminal (su expresión se restringe a células epiteliales post-mitóticas). Por estudios de inactivación genética, se sabe que los ratones nulos para la expresión de *Klf4* (*Klf4*^{-/-}), mueren poco tiempo después de nacidos debido a factores atribuibles a la integridad de la barrera permeable de la piel, así como alteraciones en el epitelio lingual que impiden al ratón neonato poder succionar leche materna (Segre et al., 1999). Alteraciones morfológicas o fisiológicas a nivel del SNC no han sido reportadas en estos

ratones, por lo que su papel en el proceso de desarrollo o mantenimiento de fenotipos neuronales es poco claro.

Recientemente, se reportó que el tratamiento con agonistas de receptores tipo NMDA, en neuronas de corteza de cerebros de ratones de E15 *in vitro*, induce significativamente la expresión de *Klf4*, lo que resulta en la activación del proceso apoptótico (Zhu et al., 2009). Por el contrario, la inducción hacia la diferenciación en la línea celular PC12 (un feocromocitoma), con la neurotrofina NGF, incrementa los niveles de expresión de varios genes de respuesta temprana, entre ellos, *Klf4*, *Klf10* y *Atf3*; dicho incremento parece estar mediado por la vía de las *MAPK* y la cinasa dependiente de fosfatidil inositol-3 cinasa (*PI3K*) (Dijkmans et al., 2009), indicando que estos factores juegan un papel importante en la diferenciación celular.

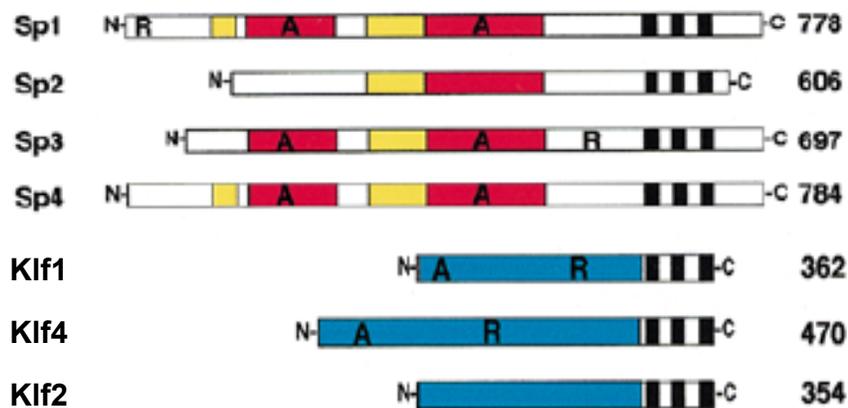


Figura 11. Esquema que ilustra algunos de los dominios identificables en la secuencia de factores de transcripción de la familia de *Klf/Sp1*. Se puede apreciar que todos los miembros contienen en el extremo carboxilo terminal (C), un dominio de unión a DNA del tipo dedos de zinc (recuadros negros), mientras que en el extremo amino terminal (N), se localizan los dominios activadores (A), o represores (R), así como regiones ricas en residuos de serina/treonina (rectángulos amarillos) o de glutamina (rectángulos rojos), los cuales les permiten establecer interacciones con otras proteínas. En cada caso se indica el número de residuos de aminoácidos que compone a cada proteína. Tomado de: Philipsen S., Suske G., 1999. *Nucleic Acids Res* 27: 2991; Bieker JJ., 2001. *JBC* 276: 34355; Suske G., 1999. *Gene* 238: 291; Kaczynski J., Cook T. & Urrutia R., 2003. *Gen Biol* 4: 206).

Datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio, indican que el RNAm de *Klf4* en hipotálamo de rata es detectable a partir del día E14, presentando un patrón de expresión que sugiere fuertemente que esta sujeto a regulación dependiente del estadio de desarrollo; destaca el hecho de que su nivel de expresión disminuye significativamente en la etapa adulta (Martínez Armenta, 2007, Tesis de Licenciatura). Adicionalmente, el análisis de la región promotora del gen de TRH de *R. norvegicus*, *M. musculus* y *H. sapiens*, permitió identificar varios sitios potenciales de unión a factores tipo *Klf* (Figura 12).

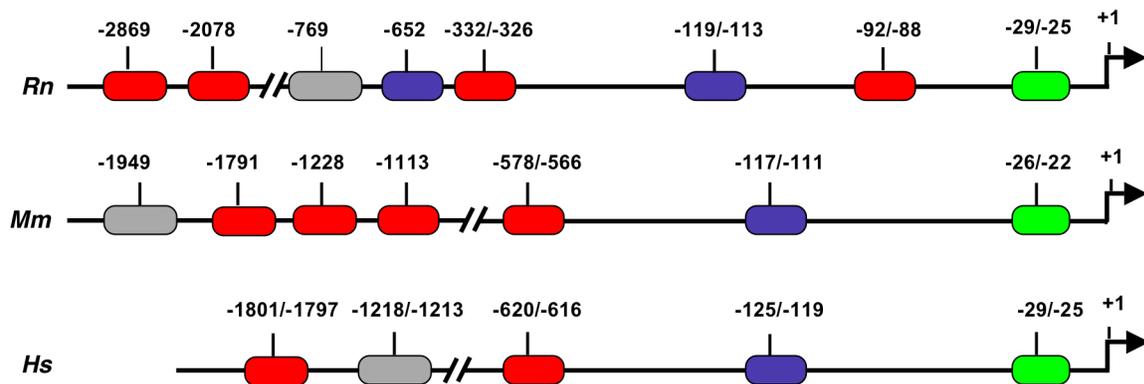


Figura 12. Diagrama de la región 5' UTR del gen de TRH de rata (*Rn*), ratón (*Mm*) y humano (*Hs*). Se indican los elementos potenciales de respuesta identificados de tipo CACCC (cajas de color rojo) y GGGCGGG (cajas de color azul), así como las cajas TATA (cajas de color verde) y el *enhancer* neuronal (caja en color gris). La posición relativa respecto del sitio de inicio de la transcripción (+1), de cada uno de los elementos, se indica con números arriba de cada elemento. Los sitios se identificaron con ayuda del software *MatInspector* de *Genomatix*. Cartharius K., et al., 2005. *Bioinformatics* 21: 2933.

4. Hipótesis

En base al análisis del transcriptoma de las neuronas TRHérgicas fetales, el patrón de expresión del RNAm de *Klf4* *in vivo* y la presencia de elementos potenciales de respuesta para factores tipo *Klf* en el promotor del gen de TRH, se propone que este factor transcripcional participa en la etapa de diferenciación terminal del fenotipo TRHérgico hipotalámico.

5. Objetivos

5.1 General

5.1.1 *Demostrar que Klf4 promueve la expresión del gen TRH durante el desarrollo del hipotálamo.*

5.2 Específicos

5.2.1 *Demostrar que Klf4 regula la expresión del gen de TRH.*

5.2.2 *Determinar si Klf4 se une al promotor del gen de TRH*

5.2.3 *Determinar si Klf4 regula la actividad transcripcional del gen de TRH*

5.2.4 *Determinar que Klf4 se une al promotor del gen de TRH durante el desarrollo del hipotálamo in vivo*

5.2.5 *Demostrar que KLF4 es necesario para la expresión de TRH hipotalámico in vivo.*

5.2.6 *Determinar la expresión del RNAm y del tripéptido de TRH en ratones *klf4*^{-/-}*

5.2.7 *Determinar el aspecto morfológico del cerebro de ratones *klf4*^{-/-}, específicamente la del hipotálamo en ratones *klf4*^{-/-}*

6. Materiales y métodos

6.1 Ensayo de retardo electroforético (EMSA)

6.1.1 Extractos nucleares

Para llevar a cabo los EMSA, se obtuvieron extractos nucleares de acuerdo con el protocolo descrito previamente (Schreiber E., et al., 1989. *Nucleic Acids Res* 17: 6419). Brevemente, tejido hipotalámico fresco (~100 mg) de distintas edades de desarrollo de la rata fueron homogeneizados en 400µl de *buffer* A (Hepes 10 mM (pH 7.6), KCl 10 mM, EDTA 100 mM, EGTA 100 mM, Espermidina 0.75 mM, Espermina 0.15 mM, mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete, Roche*), DTT 1 mM, Na₂VO₄ 1 mM), utilizando tubos Eppendorf de 1.5 ml. Después de 15 min. en hielo se agregaron 25 µl de detergente *nonidet P40* (NP40) al 10% a cada tubo. Después de aplicar agitación fuerte (vórtex) por 10 seg., los tubos se centrifugaron a 13,000 revoluciones por minuto (rpm), durante 45 seg. Se retiró el sobrenadante y a la fracción nuclear en el fondo del tubo se le agregaron 50 µl de *buffer* de lisis (NLB) (Hepes 20 mM (pH 7.6), NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete, Roche*), DTT 1 mM, Na₂VO₄ 1 mM). Las muestras fueron agitadas durante 15 min. a 4°C y posteriormente centrifugadas por 5 min. a 13,000 rpm a 4°C. La concentración de proteína en los extractos se determinó por ensayo colorimétrico con reactivo de *Bradford (Roche)*, posteriormente se almacenó a -70°C hasta su uso.

6.1.2 Marcaje de oligonucleótidos

Para realizar el marcaje de los oligonucleótidos (en adelante sondas), se utilizó 1 μ l (100 ng), de cualquier de las siguientes secuencias correspondientes a los elementos de respuesta identificados en el promotor del gen de TRH: KEM1 5'TGCCGTCAGCACCC CTGTCTT-3', GC-A 5'-GGAAAGCGGGCGGGTCCCCCG-3', KEM2 5'GCTGCCCA CACCCTGCATCTG-3' y GC-B 5'GCTTCTTTAGGGCGGGAGGCT-3'. Se agregaron 9 μ l de agua y la mezcla se hirvió durante 2 min. Después, la mezcla se colocó a 4°C por 5 min., al término de los cuales se agregó *buffer* de reacción (1X *buffer* "forward", 2.5 μ l de γ [32-P]-ATP (25 μ Ci), 10U de enzima T4-polinucleótido cinasa (PNK) y agua para volumen final de 25 μ l). La reacción se incubó durante 15 min. a 37°C. Después, la actividad de la T4-PNK se detuvo por choque de calor a 65°C durante 10 min. Pasado ese tiempo la reacción se incubó a 4°C. Se agregaron 1.2 μ l (120 ng) de la sonda complementaria y la mezcla se hirvió por 2 min. La reacción se dejó incubando a temperatura ambiente hasta que la temperatura fue menor a 40°C. Después se agregaron 25 μ l de *buffer* Tris-EDTA (TE), y la sonda fue separada del resto de los componentes de la mezcla utilizando columnas comerciales (Qiagen, *QIAquick nucleotide removal Kit*).

Posteriormente se determinó la actividad específica de acuerdo con la relación cuentas por minuto (cpm)/ μ g DNA. La determinación de las cpm se realizó con ayuda de un contador de radiaciones β (*Beckman LS 6000IC*). La actividad específica mínima aceptable para considerar aceptable el uso de la sonda, se estableció en $\geq 1 \times 10^8$ cpm/ μ g DNA.

6.1.3 Ensayos de interacción

Los ensayos de interacción DNA-proteína se llevaron a cabo utilizando 20µg de extracto nuclear y $1-1.5 \times 10^5$ cpm/µl de cualquiera de las sondas marcadas (actividad específica $\geq 1 \times 10^8$ cpm/µg DNA), 0.1 µg de DNA competidor poli-dI-dC, 1 µg de albúmina sérica bovina (BSA) (*Invitrogen*), $MgCl_2$ 5 mM, buffer de unión (NLB, descrito arriba), y agua para un volumen final de 15 µl. Las reacciones se incubaron por 20 min. a 4°C y después se les agregó 1 µl de buffer de carga. Posteriormente las muestras se cargaron en pozos de gel nativo (no desnaturalizante) hecho con poliacrilamida 6% (*Acrilamida/bis-acrilamida* 40:2) disuelta en agua y 1X *Tris-borato*-EDTA buffer (TBE), 10% persulfato de amonio y *TEMED* (*Roche*), precorrido durante 1 hrs. a 125 mAmp. en buffer TBE 0.25X. Las interacciones DNA-proteína se resolvieron a 125 mAmp a temperatura ambiente. Posteriormente, los geles fueron deshidratados por calor y vacío para poder ser expuestos a film fotográfico durante un período de 12 a 16 hrs. a -70°C.

Para llevar a cabo los ensayos de super-retardo, se utilizaron 4 µg de anticuerpo específico para *Klf4* (antisuero donado por el Dr. TC Chuang, Universidad de Boston) o para *Sp1* (sc-14027, Santa Cruz *Biotechnology*). Previo a la adición de la sonda las reacciones se incubaron junto con los anticuerpos correspondientes durante 20 min. a 4°C. Después, se agregó la sonda marcada y la reacción se incubó nuevamente a 4°C durante 20 min. Posteriormente se procedió como arriba, 1 µl de *buffer* de carga se agregó a cada reacción y éstas fueron sometidas a electroforesis en las mismas condiciones mencionadas.

6.1.4 Ensayos de competencia

Para realizar los ensayos de competencia, se utilizaron excesos molares (20, 50 o 100 veces) de cualquiera de las sondas correspondientes, las cuales fueron procesadas como se indica arriba en el protocolo de marcaje, con excepción de la adición del isótopo radioactivo. Las sondas fueron añadidas en la mezcla de reacción, previo a la incubación para fomentar la interacción DNA-proteína. Posteriormente se procedió como arriba.

6.2 Cultivo primario de hipotálamo

6.2.1 Disección y siembra

La disección del hipotálamo se realizó de acuerdo al protocolo reportado previamente (Perez-Martinez et al., 2001). Brevemente, ratas *Wistar* de 17 días de gestación fueron anestesiadas con *pentobarbital* (33 mg/Kg) de forma intraperitoneal. Los embriones fueron retirados uno a uno y con ayuda de bisturí se seccionó la cabeza diagonalmente para exponer el hipotálamo (límites anatómicos: anterior al quiasma óptico, lateral al sulco lateral y posterior al cuerpo mamilar). El hipotálamo se disecó con ayuda de microscopio estereoscópico. Al menos 10 hipotálamos fueron colectados en solución de *Hank* (NaCl 136 mM, KCl 5.3×10^{-3} M, KH_2PO_4 4×10^{-4} M, NaH_2PO_4 7.5×10^{-4} M, glucosa 5.5×10^{-3} M). Después de 2 lavados con solución de *Hank* para quitar el exceso de sangre, el tejido se trituró con tijeras y después se digirió con una mezcla de tripsina (25 mg/ml) y *deoxiribonucleasa* (DNAsa, 0.28 mg/ml) por espacio de 15 min a 37°C. Posteriormente, las células fueron dispersadas mecánicamente con 10 pases a través de pipetas *Pasteur* de diámetros decrecientes. La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm

por 5 min., y la pastilla se resuspendió en 4 o 5 ml de medio de cultivo “*Dulbecco’s modified eagle medium*” DMEM, suplementado (DMEM-S) con 10% de suero fetal bovino (SFB, *Gibco-Invitrogen*), glucosa 0.25% (*Sigma*), glutamina 2 mM, insulina 3.3 mg/ml, y antibiótico-antimicótico (50 U/ml penicilina G sódica, 50 µg/ml de sulfato de estreptomicina, 0.125 µg/ml anfotericina B (*Gibco-Invitrogen*)). La viabilidad y rendimiento se determinaron por método de exclusión de colorante azul de tripano y conteo en cámara *Newbauer*.

En platos de cultivo (*Costar*) de 15 mm de diámetro, previamente cubiertos con poli-D-lisina (peso molecular 30 – 70 kD, *Sigma*), se sembraron de 1.5 a 2 x10⁵ células en 0.5 ml de DMEM-S. Las células se mantuvieron en atmósfera de 7% CO₂ y 37°C.

6.2.2 Transfección y ensayo de luciferasa

24 hrs. después de la siembra, las células fueron transfectadas de forma transitoria de acuerdo a lo descrito (Guerra-Crespo et al., 2003). Brevemente, como transfectante se utilizó solución del polímero catiónico (8 mg) *polietil-enimina* ((PEI) (600 –1000 kD, 50% en agua)) disuelto en 10 ml de agua y pH 6.9, ajustado con HCl 0.2 N. Esta solución se esterilizó por filtración (*Millipore*, 0.22 µm). La relación PEI/DNA fue de 3:1 V/M. En tubos separados se agregó el DNA o el PEI, NaCl 150 mM y agua para 50 µl. La mezcla se agitó e incubó 10 min. a temperatura ambiente. Después, la solución del polímero se agregó a la mezcla DNA/NaCl, se agitó e incubó como antes. Posteriormente, se agregaron 100 µl de DMEM-S (sin suero), y la mezcla se agregó a las células en cultivo, las cuales se mantuvieron así por espacio de 2-3 hrs. Los plásmidos utilizados fueron: 800 ng de cualquiera de los siguientes, TRH-LUC (Balkan et al., 1998), pcDNA-GKLF (donado por

el Dr. G. Owens, Universidad de Virginia), *pN3-Sp1-FL* (donado por el Dr. G. Suske, Universidad Philips), *ΔKEM1-Luc*, *ΔKEM2-Luc*, *ΔGCA-Luc*, *ΔKEM1/ΔGCA-Luc*, y 200 ng del plásmido *pCH110* (*SV-40 β-galactosidasa*, donado por la Dra. Susana Castro, IBT-UNAM), como control de transfección.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el medio de transfección se reemplazo por medio DMEM-S fresco y las células se mantuvieron por 72 hrs. adicionales. Para realizar los ensayos de luciferasa se utilizaron las recomendaciones del kit comercial *Dual-light® system* (Applied Biosystems). Brevemente, 70μl de *buffer* de lisis (KH₂PO₄ 100 mM (pH 7.8), Tritón X-100 0.2%, DTT 0.5 mM), se agregó a los pozos previamente lavados con solución salina (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM), y las células se rasparon con ayuda de un émbolo de jeringa (1 ml). Las células de dos pozos fueron colectadas en un solo tubo para obtener suficiente material. Posteriormente, los lisados se agitaron por espacio de 15 seg. seguido de 1 min. de centrifugación a 13 mil rpm a 4°C. El sobrenadante se colectó en tubos *Eppendorf*, se determinó la concentración de proteína por método colorimétrico con reactivo de Bradford y almacenó a -70°C hasta su uso.

Para determinar la actividad de luciferasa, 10 μl de extracto de lisis, se mezclaron con 25 μl de *buffer* A. Después de 10 min. de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 100μl de *buffer* B (*Galacton-Plus/buffer* B, 1:100) y se cuantificó la actividad de luciferasa mediante el uso de un luminómetro (*Monolight® 3010*, *Pharmingen* BD). Posteriormente la reacción se incubó por 60 min. adicionales a temperatura ambiente, seguido de la adición de 100 μl de acelerador-II y la lectura de actividad del reportero β-galactosidasa, en el mismo luminómetro. La actividad reportada corresponde a la media ±

el error estándar de la relación luciferasa/ β -galactosidasa/ μ g de proteína, de 3 experimentos independientes $n = 7-8$.

6.3 Inmunoprecipitación y Western Blot

Para realizar el ensayo de inmunoprecipitación se utilizaron 100 μ g de extracto nuclear y el protocolo descrito previamente (Perez-Martinez and Jaworski, 2005), con algunas modificaciones. En breve, los extractos de proteína se incubaron con 5 μ g de antisuero anti-*Klf4* durante 12 hrs. a 4°C. Al día siguiente, los inmunocomplejos se recuperaron agregando 50 μ l de proteína A/G (Santa Cruz *Biotechnology*), e incubando por espacio de 1 hrs. a 4°C. Los complejos se lavaron 3X con 1 ml de *buffer* de lisis (*NP-40* 1%, NaCl 150 mM, *fenil-metil-sulfonil-fluoruro* (PMSF) 1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete, Roche*), y centrifugaron a 3000 rpm cada vez. Finalmente los inmunocomplejos se lavaron con Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) y resuspendieron en *buffer* de muestra con SDS.

Para el ensayo de *Western Blot*, las muestras se cargaron en gel de *poliacrilamida* 10% y SDS (condiciones desnaturalizantes), se sometieron a electroforesis con 200 mAmp. de corriente en *buffer* de corrida (Tris-base 0.25 M, glicina 1.92 M, SDS 1%). En el mismo gel un pozo se destinó para cargar el estándar de peso molecular (*Page Ruler*® SM0671, Fermentas). Las proteínas se transfirieron utilizando membrana de PVF (*Immobilon* 0.45 μ m, *Millipore*) y *buffer* de transferencia (glicina 200 mM, Tris-base 25 mM, SDS 1%, metanol 20%). Después de 2 hrs. de transferencia, la membrana se tiñó con solución de rojo de *Ponceau* (*Ponceau S* 0.5%, ácido acético glacial 1%) y posteriormente se bloqueo con solución 5% de leche descremada (NFT, *Carnation*) en *buffer* Tris-base/NaCl (TBS, Tris-

base 20 mM, NaCl 137 mM) con Tween 20 al 0.5% (TBS-T), durante 1 hr. en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se incubó con los anticuerpos correspondientes, anti-*Klf4* (dilución 1:500 en TBS-T, BSA 3%), anti-Sp1 (dilución 1:500 en TBS-T, BSA 3%) y/o anti-actina (dilución 1:5000 en TBS-T, NFT 5%) por 12 hr. a 4°C en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación la membrana se lavó tres veces con TBS-T seguido de una hora de incubación con el anticuerpo (anti-cabra acoplado a peroxidasa (HRP), dilución 1:3000 en TBS-T, NFT 5%, anti-conejo-HRP, dilución 1:3000 en TBS-T, NFT 5%) secundario correspondiente. Enseguida se lavó como arriba antes de revelar por método de quimioluminiscencia con un kit comercial (*Western Lighting® Perkin Elmer*) y film fotográfico.

6.4 Reacción de transcripción reversa y reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR)

6.4.1 Extracción de RNA total

Tejido hipotalámico obtenido de diversos estadios de desarrollo de la rata (de embrionario 14 a adulto 5 meses), se colectó en fresco y almacenó a -70°C hasta su procesamiento. Una vez obtenido el tejido, el RNA total se extrajo de acuerdo con el método de isotiocianato de guanidino (Chomczynski and Sacchi, 1987). Brevemente, ~100 mg de tejido se usaron para cada estadio, a los cuales se les agregó 400 µl de solución D (*Tiocianato de guanidina* 4 M, citrato de sodio 25 mM (pH 7), *sarcosil* 0.5%, y *2-mercaptoetanol* 0.36 ml/50ml solución D). Manteniendo siempre a 4°C, la mezcla se homogenizó con ayuda de rotor y tubo homogenizador. Posteriormente se adicionaron 40 µl de acetato de sodio (2 M, pH 4) y se agitó en *vórtex*, enseguida se agregaron 400 µl de

fenol saturado en agua pH 4 (*Invitrogen*), la mezcla se agitó en vórtex y se le agregaron 100 µl de cloroformo-isoamilalcohol (49:1), los tubos se agitaron en vórtex hasta aspecto lechoso. Enseguida las muestras se incubaron a 4°C durante 15 min. Transcurrido este tiempo las muestra se centrifugaron a 13,000 rpm durante 17 min. La fase acuosa conteniendo el RNA se separo de la fase orgánica que contiene las proteínas y recuperó en tubo *Eppendorf* al cual se le adicionó 450 µl de isopropanol para agitar en vórtex. Los tubos se incubaron en hielo seco (~80°C) por espacio de 30 min. Transcurrido ese tiempo, las muestras se descongelaron a 4°C y fueron centrifugadas por 22 min. a 13,000 rpm y 4°C. El sobrenadante fue retirado y 300 µl de solución D y 300 µl de isopropanol se agregaron a cada muestra para posteriormente agitar en vórtex e incubar a -20°C por 12 hrs. Al día siguiente, las muestras fueron descongeladas manteniéndolas a 4°C. Una vez descongeladas, se agitaron en vórtex y después se centrifugaron durante 22 min. a 13,000 rpm y 4°C. La pastilla se lavó con 400 µl de etanol 70% (*JT Baker*) y centrifugó como antes. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se dejo secar a temperatura ambiente. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en agua ultrapura (*MiliQ, Millipore*) con *dietil-pirocarbonato* (DEPC 0.1%). El RNA total se almacenó a -70°C hasta su uso. Para determinar la concentración, las muestras fueron diluidas en agua ultra-pura (1:100) y la absorbancia medida en espectrofotómetro (*Biophotometer, Eppendorf*) a 260 nm. La pureza se determinó midiendo la relación de la absorbancia a 260/280 y 280/230 nm.

6.4.2 Transcripción reversa (RT)

La reacción de transcripción se llevó a cabo utilizando 1µg de RNA total. El volumen de la muestra se ajustó con agua DEPC a 12 µl finales. Con la finalidad de relajar las estructuras secundarias del RNA total, las muestras se sometieron a calentamiento, previo a la adición de la mezcla de reacción, a 65°C durante 5 min. Posteriormente se les agregó 20µl de mezcla de reacción (*buffer* de reacción (Tris-HCl 50mM pH 8.3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM), DTT 10 mM, deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 200 µM, oligonucleótido *poli-T* (*oligo-dT*) 10 mM, transcriptasa reversa 100 U (M-MLV, *Invitrogen*) y se incubaron a 37°C durante 2 hrs. Posteriormente la reacción se detuvo por choque térmico a 4°C. Las muestras conteniendo ahora el DNA complementario (cDNA), se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

6.4.3 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La PCR semicuantitativa o de punto final se realizó de acuerdo con las siguientes condiciones: 3µl de cDNA obtenido en la reacción de RT se utilizó como templado para amplificar los transcritos de los genes *Klf4* (*Gene* ID 1145405), con los oligonucleótidos siguientes: F GTGTGGGTGGCTGTTCTTTT, R CTGAACAGCAGGGACTGTCA, producto de 218 pb; *Sp1* (*Gene* ID 24790), F TGGGTACTTCAGGGATCCAG, R TGAGGCTCTTCCCTCACTGT, producto de 250 pb, y ciclofilina, F GGGGAGAAAGGATTTGGCTA, R GGCTGGATGGCAAGCATGT, producto 256 pb, como control endógeno. Al tubo conteniendo el cDNA se le agregaron 17 µl de mezcla de reacción de PCR (Tris-HCl 10mM, KCl 50 mM, pH 8.3), MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 200 µM, oligonucleótidos (5' y 3') 25 pmol c/u, y DNA polimerasa de *Thermophilus aquaticus* (Taq.

Pol., Tecnologías Universitarias) 5 U/ μ l. Las condiciones de amplificación para cada una de las reacciones fue un ciclo de 5 min. a 95°C, 30 ciclos de 45 seg., 95°C, 45 seg. 60°C., 1 min. 72°C, y un ciclo de 5 min. a 72°C. En el caso de la amplificación de ciclofilina la temperatura de alineamiento fue de 57°C y 20 ciclos de amplificación en lugar de 30. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (1.5%) en *buffer* TE (0.5). Posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio y la imagen se capturó con ayuda del analizador *Fluor-S®* (BioRad) y la densidad de las bandas se cuantificó con el *software* *Quantity One®* (v 4.2.0, BioRad) y la relación del gen endógeno y el gen de interés se reportó como porcentaje de incremento o decremento.

6.5 Inmunoprecipitación de cromatina

6.5.1 Obtención y fragmentación de cromatina soluble

Para determinar la interacción de los factores de transcripción con el DNA *in vivo*, se utilizó el protocolo de inmunoprecipitación de cromatina de acuerdo a lo reportado (De La Rosa-Velazquez et al., 2007), con algunas modificaciones. En breve, embriones de ratas *Wistar* de 15 días (E15) y ratas adultas fueron usadas para obtener DNA genómico. El tejido se obtuvo por decapitación directa de los animales. Para considerar un experimento independiente, en el caso de E15 se colectaron 10 hipotálamos, mientras que 5 hipotálamos se consideraron para el caso de las ratas adultas. El tejido se colectó en PBS frío para posteriormente lavar 3 veces con la misma solución y remover la mayor cantidad de sangre. Enseguida, el tejido se trituró con tijeras a trozos de <1 mm, e inmediatamente se resuspendió e incubó en solución de entrecruzamiento (formaldehído 11%, NaCl 0.1 M,

EDTA 1 mM, EGTA 0.5 mM, HEPES 50 mM) al 1% durante 15 min. a temperatura ambiente y agitación constante. Para detener la acción del formaldehído, se agregó solución de glicina (glicina 0.125 M final) e incubó durante 5 min. más en las mismas condiciones. Después, el tejido se lavó tres veces con buffer PBS y centrifugó por 5 min. a 4°C y 2000 rpm cada vez. Enseguida el tejido se resuspendió en 1 ml de *buffer* de lisis (SDS 1%, EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.1, PMSF 1 mM, Na₂VO₄ 1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas 1X (*Complete, Roche*) y el tejido se homogenizó en tubo de vidrio y homogenizador hasta obtener suspensión celular. Esta suspensión se utilizó para fragmentar la cromatina con 20 pulsos de 20 seg. e intervalos de 1 min. a 4°C entre cada uno, a 35% de poder máximo en ultrasonicador (*Ultrasonic Homogenizer 4710, Cole Parmer*). La cromatina fragmentada se centrifugó a 4°C por 10 min. a 13,000 rpm. El sobrenadante se recuperó en tubo *Eppendorf* y una alícuota de 50 µl se retiró para usarlo como “*input*”. Posteriormente el resto de la cromatina se diluyó 10 veces en *buffer* de dilución (Tritón X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8.1, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, Na₂VO₄ 1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas 1X (*Complete, Roche*) y se agregaron 20 µl de suero de caballo y 20µl de perlas de agarosa acopladas a proteína A/G (perlas). Esta mezcla se incubó por espacio de 2 a 4 hrs. a 4°C en agitación constante. Concluido ese tiempo, la solución se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. a 4°C. La cromatina soluble contenida en el sobrenadante se recuperó en tubos *Eppendorf* de 1.5 ml (10 en total). Esta cromatina soluble se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.5.2 Inmunoprecipitación

Para enriquecer el DNA genómico asociado a las proteínas de interés, se utilizó la cromatina obtenida previamente. El primer día se agregaron 4 μg de cualquiera de los anticuerpos (anti-*Sp1*, anti-*Klf4* o *IgG* pre-inmune, descritos previamente) en tubos independientes y las muestras se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente los tubos se retiraron en hielo y a cada tubo se le agregó 20 μl de solución de perlas para posteriormente incubar de 2 a 4 hrs. en agitación constante a 4°C. En este punto se consideró un control de perlas, el cual consiste en cromatina soluble a la cual se le agregó únicamente 20 μl de perlas. Después del tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 min. La pastilla conteniendo los complejos perlas/DNA se lavaron entonces con *buffer* de paro I (SDS 0.1%, Tritón X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, Na_2VO_4 1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas 1X (*Complete, Roche*), paro II (SDS 0.1%, Tritón X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, PMSF 1 mM, Na_2VO_4 1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas 1X (*Complete, Roche*) y paro III (EDTA 2 mM, Tris-HCl 200 mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, Na_2VO_4 1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas 1X (*Complete, Roche*), una vez cada uno e incubando 10 min. a 4°C y agitación constante. Entre cada lavado los tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 1 min. Finalmente los complejos perlas/DNA se lavaron y centrifugaron con *buffer* TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Na_2VO_4 1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas 1X (*Complete, Roche*), igual que antes. Posteriormente, los complejos perlas/DNA se resuspendieron en buffer de lavado (NaHCO_3 0.1 M, SDS 1%, proteinasa K (PK) y ribonucleasa A (RNAsa A) 500 $\mu\text{g/ml}$ c/u). En este punto el tubo con la muestra de DNA “*input*” se incluyó agregándole el

mismo volumen de *buffer* de lavado, PK y RNAsa A. Inmediatamente después, los tubos fueron incubados toda la noche a 65°C con la finalidad de revertir el entrecruzamiento y liberar el DNA de los complejos. Al día siguiente, los tubos fueron retirados de la incubación y colocados en hielo para condensar las muestras. Seguido, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm para después purificar el DNA por columna, de acuerdo con un protocolo comercial (*miniElute PCR kit purification, Qiagen*). Al final el DNA se eluyó en un volumen de 50 µl.

6.5.3 PCR

Para amplificar el DNA enriquecido por inmunoprecipitación, se utilizaron 3 µl de DNA eluído a partir de muestras tratadas con cualquiera de los anticuerpos (condiciones) y 1 µl de DNA *input* diluido 1:10 con agua. Los primers utilizados fueron diseñados para amplificar los fragmentos correspondientes a la región promotora del gen de TRH (Figura 24); par 1 (P1) F ACGTCTCTCCCTCCCTTTGT, R AGGAGGGGCTGAGGCTTAT; P2 F TCACAGGTCCCCATTTTTGT, R GAGTAGTCCGCGATGGAAAG; P3 F CGTTTTCCACAGAAGCCAGT, R ACAAAAATGGGGACCTGTG, adicionalmente primers correspondientes a un segmento de la región codificante del gen gliceraldehído 3-deshidrogenasa (G3PDH) se usaron como control de especificidad. La reacción de amplificación se realizó con 3 µl de DNA y 17 µl de mezcla de reacción (*buffer* de reacción Tris-SO₄ 0.6 mM pH 8.9, NH₃SO₄ 2.2 mM, MgSO₄ 3.12 mM, dNTPs 25 µM, primer 0.62 pmol/µl (x2), y DNA polimerasa (*Hi-Fi® Taq. Invitrogen*) 0.025U. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 95°C 5 min.; 30 ciclos de 95°C 45 seg., 60°C 45 seg., 72°C 1 min.; 1 ciclo de 72°C 5 min. Para amplificar G3PDH, la temperatura de alineamiento fue

de 64°C y el número de ciclos igual a 20. Después de la amplificación los productos fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa 1%. Posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio y las imágenes se capturaron con ayuda del analizador *Fluor-S Multilmager* (BioRad). La densidad de las bandas correspondientes se cuantificó con *software Quantity One®* (v 4.2.0, BioRad). Los resultados se expresan como el porcentaje de enriquecimiento de la región de interés en relación con la señal obtenida del control “input” que es igual a 100%, mientras que el control de perlas representa la inespecificidad de la inmunoprecipitación.

6.6 Determinación de genotipo y ensayo de permeabilidad

6.6.1 Extracción de DNA genómico

La purificación de DNA genómico se realizó de acuerdo al siguiente protocolo. Tejido derivado de la cola de ratones de diversas edades se digirió con 500 µl de solución 2 (pronasa 0.9 µg/µl y *buffer A*, Stratagene) toda la noche a 56°C. Al día siguiente, el tejido digerido se incubó a 4°C por 5 min., para después agregar 200µl de solución 3 (*Stratagene*) mezclar por inversión e incubar por 15 min. más a 4°C. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13000 rpm por 30 min. a temperatura ambiente. El sobrenadante de cada tubo se recuperó y se le agregó 2 µl (20µg) de RNAsa (*Stratagene*), para después incubar 30 min. a 37°C. Pasado ese tiempo, a cada tubo se le agregaron 600 µl de etanol absoluto para precipitar el DNA. Enseguida, los tubos se centrifugaron como antes y el sobrenadante se descartó. La pastilla de DNA se lavó con 250 µl de etanol 70% centrifugando a 13000 rpm por 5 min. a temperatura ambiente. Finalmente el DNA se secó al aire y se resuspendió

en agua. El DNA resuspendido se cuantificó por absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.6.2 PCR

Para corroborar el genotipo de los animales, 100 ng de DNA genómico se utilizaron para amplificar fragmentos de los exones 3 y 4 del gen que codifica a *Klf4* (5' GTGCAG CTTGCAGCAGTAAC, 3' GCACTTCTTCCCCTCTTTGG, *Gene ID 16600*), los ratones *nock-out (KO)*, no poseen esta región ya que es escindida durante el evento de recombinación; y un fragmento del gen de neomicina (5' AGACAATCGGCTGCTCTGAT, 3' ATACTTT CTCGGCAGGAGCA, *psiStrike® Neo Vector, Promega*). La reacción de amplificación se realizó ajustando el DNA a 5 µl con agua, al cual se le agregaron 15 µl de mezcla de reacción (*buffer* de reacción, Tris-HCl 10mM, KCl 50 mM, pH 8.3; MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 200 µM, primers (5' y 3) 10 pmol/µl c/u, y DNA polimerasa (Taq. Pol. Tecnologías Universitarias) 5 U/µl. Las reacciones se incubaron en termociclador (*Thermal Cycler gradient®, Eppendorf*) con las siguientes condiciones, 1 ciclo de 5 min. a 95°C, 30 ciclos de 45 seg., 95°C, 45 seg. 60°C., 1 min. 72°C, y un ciclo de 5 min. a 72°C. Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa 1.5% y tiñeron con bromuro de etidio. Posteriormente las bandas se capturaron con sistema *Fluor-S Multilmager® (BioRad)*.

6.6.3 Ensayo de permeabilidad

Para obtener la progenie homocigota nula o *KO*, un ratón hembra y uno macho fueron puestos a cruzar. El día posterior a la cruce se detectó el tapón vaginal y ese se consideró el día post-concepción 1 (dpc1). Para determinar la integridad de la barrera física de la piel de los animales *KO*, se realizó una prueba de permeabilidad al colorante azul de toluidina de acuerdo con lo publicado previamente (Hardman et al., 1998). En breve, ratones embriones de E15 fueron retirados del saco vitelino y puestos en solución de PBS para retirar el exceso de sangre. Después, se sumergieron en un gradiente ascendente de metanol consistente en 25%, 50%, 75% y 100%, incubando 1 min. en c/u. Enseguida, los animales fueron incubados en un gradiente descendente de metanol, consistente en 100%, 75%, 50% y 25%, 1 min. en c/u. Concluido este proceso, los animales fueron puestos en PBS e inmediatamente después sumergidos en solución de azul de toluidina (azul de toluidina (*Sigma*), 1% en agua,) durante < 1 min., los ratones fueron entonces sumergidos en PBS, hasta aparición de patrón característico de coloración azul en aquellos embriones *KO* (Segre et al., 1999).

6.7 PCR cuantitativa (qPCR)

Los niveles de expresión relativa del gen de TRH y actina se determinaron por PCR de tiempo real en un termociclador *Rotor-Gene* RG-3000 (*Corbett Research*) y el kit comercial *SYBR® Green Core Reagents* (*Applied Biosystems*). El tejido hipotalámico y la extracción del RNA total se realizó de acuerdo con lo descrito más arriba. Después de la cuantificación por absorbancia del RNA total, se procedió a realizar la reacción de RT. De manera usual, la concentración del cDNA resultante de la reacción de RT no se cuantifica

por absorbancia, en cambio se infiere que la eficiencia de la reacción de transcripción ocurre al $100 \pm 10 \%$ de eficiencia, por lo que las reacciones en las que se usa $1 \mu\text{g}$ de RNA en un volumen final de $10 \mu\text{l}$ de reacción tendrán aproximadamente $100 \text{ ng cDNA}/\mu\text{l}$; es decir, un microlitro de la reacción de RT tendrá el cDNA de 100 ng de RNA inicial. La reacción de RT se realizó por lo tanto, utilizando $1 \mu\text{g}$ de RNA total por cada $10 \mu\text{l}$ de mezcla de reacción (ver RT-PCR arriba). Posteriormente, $1 \mu\text{l}$ del cDNA (más $2 \mu\text{l}$ de agua) de los animales WT, HT y/o *KO* se mezclaron con $17 \mu\text{l}$ de mezcla de reacción (buffer 1X, MgCl_2 2 mM , dNTPs 0.8 mM , primer 5' y 3' $0.4 \mu\text{M}$ c/u, (set de *primers*, TRH 5' TGATGATGGCTCTGGCTTTGA, 3' TCCCCCTCAT CTGACCATGAATC; actina 5'TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT, 3' CCTAGAAGCATTGCGGTGCAC GATG). Las condiciones de amplificación fueron 5 min a 95°C , 40 ciclos de 45 seg. a 95°C , 30 seg. a 58°C (actina) o 63°C (TRH) y 45 seg. a 72°C , al final un ciclo de 5 min. a 72°C . La amplificación de un solo producto de reacción se confirmó mediante análisis de las curvas de disociación y electroforesis en gel de agarosa 1.5% . La curva de amplificación se ajustó manualmente a un umbral por arriba del ruido de fondo utilizando un *software* comercial (*Rotor-Gene*, v 6.0.19) y el método comparativo $\Delta\Delta\text{Ct}$, en el cual se calculó la relación en la expresión del mRNA de TRH con la del gen endógeno actina en la misma muestra, y posteriormente se comparó contra las relaciones obtenidas en hipotálamo de ratones heterocigotos (HT) o *KO*, respecto del ratón silvestre (WT), como referencia.

6.8 Radioinmunoensayo (RIA)

6.8.1 Extracción del TRH

La determinación de los niveles del péptido maduro de TRH, se realizó mediante el protocolo previamente reportado (Joseph-Bravo et al., 1979). En breve, la preparación de las muestras de tejido hipotálmico se realizó a partir de ratas de E15 o ratas neonatos (P0). El hipotálamo disectado se recuperó en PBS y se lavó 2 veces para quitar el exceso de sangre. Después, se resuspendió en 500 μ l de ácido acético al 20% (v/v en agua), e inmediatamente se homogenizó en ultrasonicador (*Ultrasonic Homogenizer, Cole Palmer*). En este punto se tomaron alícuotas (20 μ l) de cada muestra para determinar la concentración de proteína (mediante ensayo colorimétrico con reactivo de *Bradford, BioRad*) inicial. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 14 mil rpm durante 20 min. y 4°C. Se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos, a los cuales se les agregó 800 μ l de metanol y se dejaron incubando a -20°C durante 12 hrs. Pasado ese tiempo, los tubos se centrifugaron nuevamente como arriba y el sobrenadante obtenido se deshidrató por centrifugación y condiciones de vacío en concentrador (*Savant*). Posteriormente, la pastilla se resuspendió en solución de metanol y ácido acético al 20 % (1:1). Las muestras (denominadas “problema“) se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.8.2 Curva estándar de TRH

Tubos conteniendo diferentes concentraciones del tripéptido TRH (*Sigma*), 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg, cada una por triplicado, se diluyeron en 100 μ l de *buffer* de RIA {Fosfatos 50 mM (NaH_2PO_4 0.2 M + Na_2HPO_4 0.2 M, (5:1) diluido en agua)

pH 7.5, albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) 0.25%, NaCl 150 mM, Azida de sodio 0.02% }.

6.8.3 Estándar interno de hipotálamo

Tubos conteniendo diferentes concentraciones (20, 40, 80 y 160 μ l) de extracto de TRH derivado de 50 hipotálamos de rata, se resuspendieron en 100 μ l de *buffer* de RIA y fueron almacenados para usarse junto con las muestras del estándar de TRH y las muestras problema. Adicionalmente, tubos independientes se marcaron como T (totales), NSB (unión inespecífica), y Bo (no TRH), para usarse como controles. A los tubos NSB y Bo se les agregó 200 y 100 μ l de *buffer* de RIA, respectivamente.

6.8.4 Determinación de la concentración de TRH

El primer paso para la determinación fue la adición de 100 μ l de solución R2 (anticuerpo anti-TRH (suero policlonal de conejo), diluido 1:10,000 en *buffer* RIA) a cada uno de los tubos excepto aquellos marcados como T y NSB. Seguido, se agregó a todos los tubos 100 μ l de TRH marcado con yodo radioactivo (125 I-TRH, 5000 cuentas por minuto (cpm/min.)), se mezcló e incubó a 4°C durante un período de 36 a 48 hrs. Pasado ese tiempo, las muestras se precipitaron agregando 1 ml de etanol 100 %, excepto a los tubos marcados como T. Las muestras se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 3 mil rpm por 30 min. a 4°C. El sobrenadante se retiró y la pastilla conteniendo los complejos antígeno-anticuerpo se utilizó para determinar las cpm en contador de centelleo (*Beckman LS*

6000IC). Los tubos cuantificados incluyeron triplicados de tubos vacíos (ruido de fondo, RF), los tubos T, NSB, Bo, estándar hipotalámico y muestras problema.

Para calcular la inmunoreactividad, se determinó en porcentaje, la relación del promedio de las cpm de Bo (no TRH) y del promedio de cpm de T (totales). Esto es: $\% \text{Bo/T} = \frac{(\text{promedio cpm Bo} - \text{promedio cpm RF}) - (\text{promedio cpm NSB} - \text{promedio cpm RF})}{(\text{promedio cpm T} - \text{promedio cpm RF})} \times 100$. Los datos obtenidos de estos cálculos fueron usados para determinar la concentración final en cada muestra de acuerdo con la curva estándar. La curva estándar se generó utilizando el logaritmo natural de las concentraciones en relación con los porcentajes de desplazamiento en términos de cpm correspondientes a cada una. Los resultados así obtenidos se utilizaron posteriormente para generar una segunda transformación en donde se obtiene la correlación lineal entre el logaritmo natural de la relación B/Bo ($\text{LogiT (B/Bo)} = \text{Ln} ((\text{B/Bo}/1-(\text{B/Bo}))$), y la concentración de TRH en las muestras estándar. Las concentraciones de las muestras problema se determinaron introduciendo los valores de cpm de las muestras al programa de regresión lineal $\text{LogiT B/Bo vs Log concentración}$ y por extrapolación de los datos sobre la curva estándar.

7. Resultados

7.1 Identificación de elementos potenciales para la unión de factores tipo *Krüppel* en la región promotora del gen de TRH

Los datos obtenidos mediante el análisis del microarreglo de neuronas de TRH del hipotálamo de la rata, purificadas por FACS, mostraron el enriquecimiento de varios factores de transcripción en esta población. Entre ellos destaca el factor 4 similar a *Krüppel*, que reconoce secuencias específicas en sus genes blanco del tipo CACCC y GGGCGGG (GC), así como variantes de dichas secuencias (Zhang et al., 1998b; Zhang and Derynck, 2000).

La identificación de elementos de este tipo en la secuencia promotora del gen de TRH, fue una de las primeras metas de este trabajo. Para lograrlo, utilizamos la secuencia genómica del gen de rata reportada en la base de datos *GenBank* (GID, 25569), del ratón (GID, 22044), y del humano (GID, 7200). La búsqueda de elementos de respuesta tipo CACCC y GC, se realizó con ayuda del *software MatInspector* (Cartharius et al., 2005). El análisis de los datos generados por este programa, permitió identificar varios sitios potenciales de unión para factores tipo *Klf* a lo largo de las secuencias promotoras de los tres genes. En la figura 13A, se presenta un esquema elaborado con datos previos de la literatura que indican la presencia de otros elementos ya caracterizados, así como de los datos obtenidos en nuestro análisis. En la secuencia promotora del gen de la rata identificamos dos elementos tipo CACCC (-92/-88pb; y -332/-328pb) y dos elementos tipo GC (-119/-113pb; y -652/-646pb (Balkan et al., 1998).

Interesantemente, se observó que la región promotora que abarca las primeras 700 pares de bases (pb), río arriba del sitio de inicio de la transcripción, está altamente conservada en las tres especies. Sin embargo, destaca el hecho de que el primer elemento CACCC (-92/-88pb), así como la segunda caja tipo GC (-652/-646), presentes en el promotor de la rata, no aparecen como secuencias íntegras en los promotores de ratón y humano. Sin embargo, el alineamiento de las secuencias correspondientes mediante el programa *Clustal W*, indica que en las tres especies, estos dos elementos (CACCC y GC), presentan alto grado de identidad (Figura 13B), sugiriendo que pueden ser relevantes para la regulación transcripcional del gen. Adicionalmente, decidimos realizar un análisis de la expresión del factor *Klf4* durante el desarrollo del hipotálamo de la rata mediante ensayos de RT-PCR y de *Western-blot*. Para esto, recolectamos hipotálamos de distintas etapas del

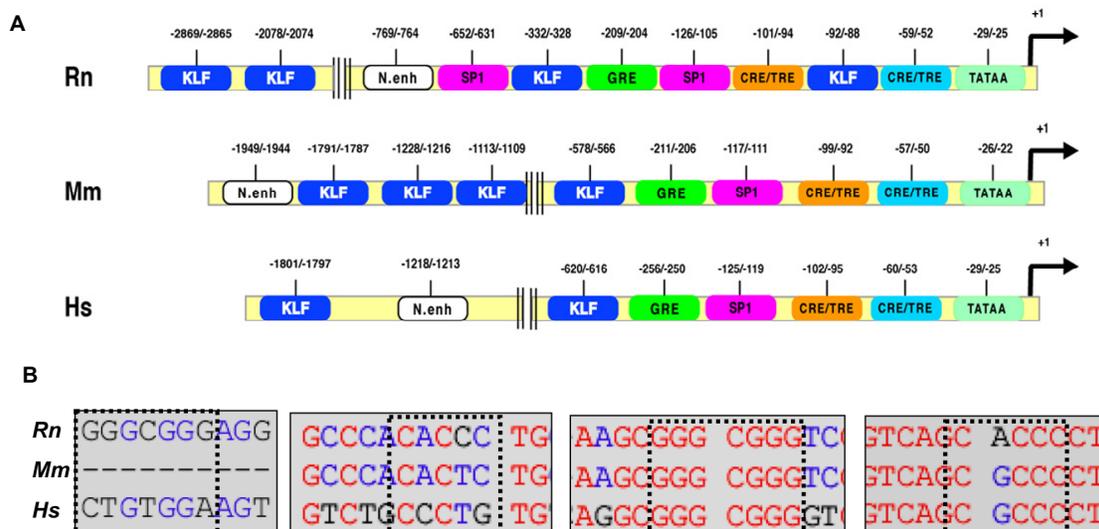


Figura 13. **A)** Diagrama de la región 5'-UTR del gen de TRH de rata (*Rn*), ratón (*Mm*) y humano (*Hs*). Se indican los elementos potenciales de respuesta identificados de tipo CACCC (KLF) y GGGCGGG (SP1), así como las cajas TATA; elementos de respuesta al factor de respuesta a AMP cíclico (CRE); a hormona tiroidea (TRE) y a glucocorticoides (GRE); así como el enhancer neuronal (N. enh.). Se indica la posición relativa (números) respecto del sitio de inicio de la transcripción (+1), de cada uno de los elementos. **B)** Alineamiento de la secuencia regulatoria del gen de TRH de rata, ratón y humano, mediante el programa *Clustal W*. Los recuadros con línea punteada indican los elementos tipo CACCC y GGGCGGG.

desarrollo de la rata, empezando por el día E14 y hasta la etapa adulta de 5 meses. El RNA total de cada muestra se extrajo para ser usado como templado en la generación de DNA complementario (cDNA). Mediante PCR semicuantitativa con sondas específicas para el gen de *Klf4*, se amplificó cada una de las muestras y las bandas representativas de cada etapa se cuantificaron por densitometría.

En la figura 14A se puede observar que la expresión del gen de *Klf4* es detectable desde el día E14 incrementándose un día después de forma significativa, al igual que en la etapa de P0 y P7, para después disminuir en la etapa adulta. Este patrón de expresión no se refleja a nivel de proteína, ya que los niveles de ésta se incrementan conforme avanza el estadio de desarrollo (Figura 14B), indicando que posiblemente el mensajero y/o la proteína son sujetos a regulación pos-transcripcional o traduccional.

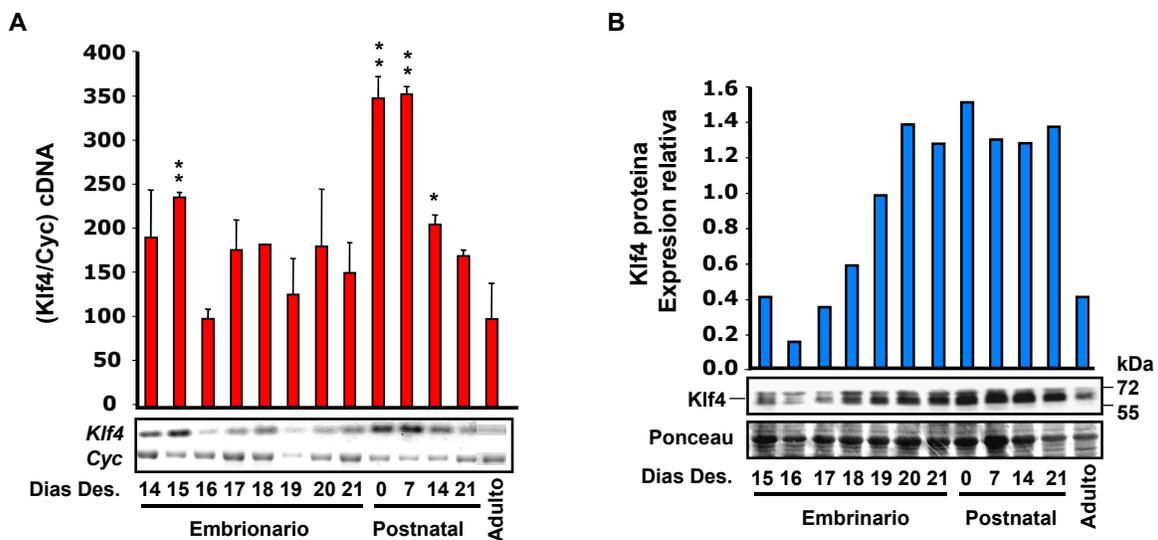


Figura 14. Determinación de la expresión del gen de *Klf4* a lo largo del desarrollo del hipotálamo de la rata. **A)** En la parte superior se presenta el promedio de tres experimentos independientes para determinar el patrón de expresión del RNAm de *Klf4* en hipotálamo de rata, a partir de la etapa embrionaria E14 hasta la etapa adulta (5 meses). La expresión relativa del transcrito se normalizo contra los niveles del gen endógeno de ciclofilina (*Cyc*). En la parte inferior se presenta un gel representativo de la expresión del RNAm en cada etapa analizada. **B)** En esta grafica se presentan los niveles de expresión de la proteína en las mismas etapas de desarrollo previamente mencionadas. En la parte inferior se presenta un gel representativo de la señal obtenida por *Western-blot* utilizando un anticuerpo específico para *Klf4*. Los niveles de la proteína se normalizaron contra aquellos de la carga de proteína determinadas por tinción con colorante Rojo de *Ponceau*. Se indica el peso relativo en la parte derecha.

7.2 *Klf4* reconoce y se une a los elementos de respuesta presentes en la región promotora del gen de TRH durante el desarrollo del hipotálamo.

Datos experimentales publicados por otros grupos han demostrado que *Klf4* promueve la diferenciación celular a través de la unión a elementos de respuesta tipo CACCC y/o cajas tipo GC, presentes en las regiones regulatorias de sus genes blanco (Chen et al., 2003) (Feinberg et al., 2007) (Jaubert et al., 2003). Se sabe que la unión de *Klf4* a sus elementos de respuesta puede inducir o reprimir la actividad transcripcional de acuerdo al contexto celular y la presencia de co-factores que regulen su actividad (Bieker, 2001) (Evans et al., 2007) (Dang et al., 2000). Por lo tanto, pensamos que las secuencias identificadas en el promotor del gen de TRH de la rata, podrían ser potenciales sitios de unión para el factor *Klf4*.

Dado que los dos primeros elementos de respuesta muestran alto grado de identidad entre las tres especies (Figura 13B), decidimos investigar si tenían un papel relevante en el control de la expresión del gen. Para determinarlo, decidimos investigar la funcionalidad de estos elementos mediante ensayos de retardo electroforético (EMSA), los cuales permiten evaluar la interacción DNA-proteína gracias a que el patrón de migración en gel es directamente proporcional al tamaño del complejo. Primero, se diseñaron oligonucleótidos (en adelante sondas) sintéticos conteniendo los elementos identificados (Figura 15); dichas sondas fueron marcadas mediante fosforilación utilizando la enzima T4 polinucleótido cinasa (T4PNK) y un nucleótido radioactivo (^{32}P - γ ATP). Posteriormente, se determinaron los patrones de unión DNA-proteína, utilizando cada uno de las sondas diseñadas en presencia de extractos nucleares derivados de hipotálamo de rata de diversas etapas de desarrollo: desde la embrionaria, hasta la etapa adulta. Las sondas conteniendo las cajas

CACCC se denominaron KEM1 y KEM2; mientras que las cajas tipo GC se denominaron GC-A y GC-B (Figura 15).

El patrón de retardo utilizando la sonda KEM1 y los extractos nucleares mostró la formación de varios complejos conforme avanza el desarrollo hipotalámico. Al día E14 se forma un complejo superior (Figura 16A, asterisco), que disminuye de manera importante al E15 y desaparece por completo en el intervalo E16-E18. Posteriormente, el complejo reaparece nuevamente y continua hasta el día P0; en la etapa perinatal (P7) y la adulta el complejo desaparece completamente. Este patrón de formación sugiere la existencia de un mecanismo de regulación en la formación del complejo, durante la etapa de consolidación del fenotipo de TRH (Perez-Martinez et al., 2001).

Por otro lado, el análisis de la formación de complejos usando las sonda KEM2 mostró la formación de un complejo superior de interés y un complejo inferior (Figura 16B, cabeza de flecha y doble asterisco, respectivamente); ambos aparecen desde el día E14, y continúan hasta el día E16, desapareciendo casi por completo al día E17. Al E18 se observa

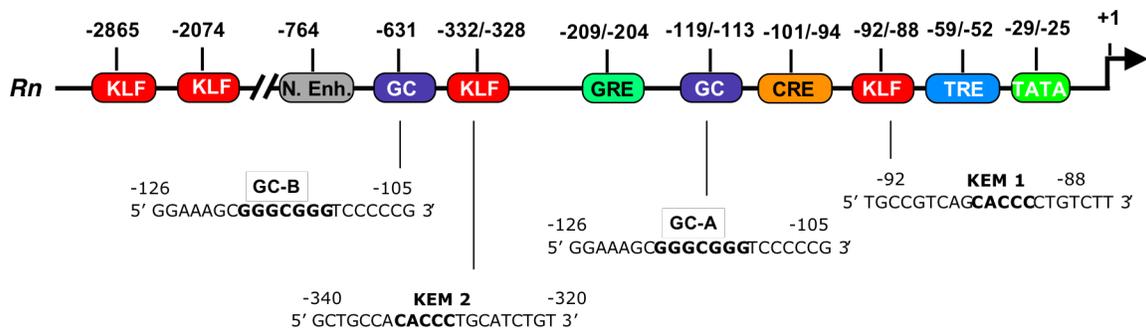


Figura 15. Posición relativa de los elementos de respuesta para factores tipo *Klf* en la región promotora del gen de TRH de la rata. Se indican las secuencias y posiciones relativas de los oligonucleótidos diseñados para los ensayos de EMSA, respecto del sitio de inicio de la transcripción (+1). CRE, elemento de respuesta a CREB; (TRE) elemento de respuesta a receptor de hormona tiroidea; GC, elemento de respuesta a factores tipo *Sp*; GRE, elemento de respuesta a glucocorticoides; KLF, elemento de respuesta a factores tipo *Krüppel*; TATA, caja tata; N.Enh., *enhancer* neuronal. Modificado de: Balkan W., et al., 1998. *Endocrinol* 139: 252.

el inicio de un incremento que disminuye de forma significativa en la etapa postnatal (P0, P7) y en la etapa adulta se reduce a uno sólo con patrón de migración diferente. Es de notar que el complejo superior parece estar sujeto a regulación conforme avanza el desarrollo.

Adicionalmente, sabemos por reportes previos, que los factores tipo *Krüppel* reconocen elementos tipo GC en sus genes blanco (Kanai et al., 2006), por lo que, según el análisis de la región promotora que mostró la existencia de dos cajas tipo GC, evaluamos la posible formación de complejos con las sondas que incluyen las cajas tipo GC. El patrón de formación de complejos utilizando los mismos extractos nucleares de hipotálamo en presencia de la sonda GC-A, permitió observar que existen tres complejos principales que se regulan de manera distinta a lo observado antes con KEM1. Existe un complejo que es más intenso en su formación (Figura 16C, asterisco), el cual disminuye gradualmente conforme avanza el desarrollo de E14 a E16, y desaparece completamente en E17. Una vez que el complejo reaparece en E18, se incrementa gradualmente hasta el día de nacimiento (P0), y al igual que con la sonda KEM1, el complejo desaparece por completo en la etapa adulta (Figura 16C, asterisco). Los complejos menos intensos y cuya migración es más rápida, se comportan de forma similar, indicando que pueden ser sonda que no contiene todas las proteínas que forman al complejo principal, por lo que su migración es más rápida (Figura 16C, doble asterisco).

En cuanto al análisis de la formación de complejos con la sonda GC-B, observamos que no existe un patrón definido, aunque dos complejos principales se pueden apreciar (Figura 16D, cabeza de flecha y doble asterisco). El complejo superior se regula de forma similar a lo observado con KEM2, desapareciendo por completo en la etapa adulta;

mientras que el inferior es menos consistente, sugiriendo que puede ser inespecificidad de unión de la sonda.

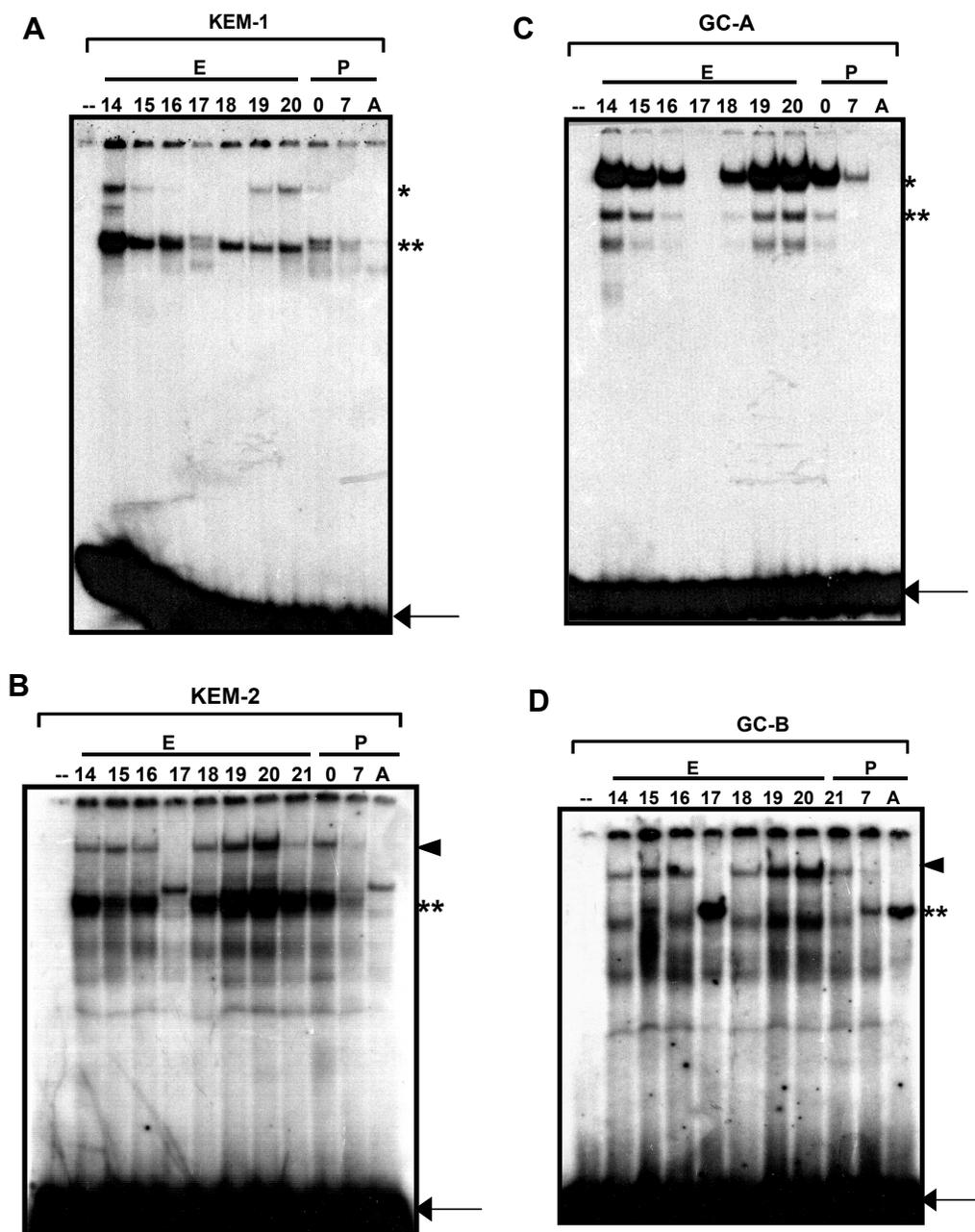


Figura 16. Los elementos CACCC y GC, presentes en el promotor del gen de TRH forman complejos con la fracción nuclear de células de hipotálamo *in vitro*. Ensayos de retardo electroforético (EMSA), fueron realizados con los oligonucleótidos KEM1 (A), KEM2 (B), GC-A (C), y GC-B (D). En cada caso se utilizaron extractos nucleares obtenidos de hipotálamos de ratas de distintas edades de desarrollo, desde el día embrionario (E) 14 hasta la etapa postnatal (P) adulta de 5 meses (A). Se indican los complejos de interés (asteriscos en A y C; cabeza de flecha en B y D); así mismo, se indican los complejos irrelevantes (doble asterisco en A, B, C y D). Las flechas inferiores indican la sonda libre.

Para corroborar la especificidad de los complejos formados, se realizaron ensayos de competencia utilizando sondas no marcadas con el nucleótido radioactivo en la reacción de incubación utilizando extractos de una de las etapas de nacimiento de las neuronas de TRH del hipotálamo, E15. La inclusión de las sondas KEM1, KEM2 y GC-A, GCB, permitió corroborar que: *a*) las proteínas que forman los complejos en conjunto con la sonda KEM1, son desplazados de forma específica y eficiente por la propia sonda KEM1 y de forma menos eficiente pero notable por la sonda KEM2 (Figura 17A, cabeza de flecha y flecha); *b*) la incubación de la sonda KEM2, con la propia sonda KEM2 desplaza de forma eficiente la formación del complejo principal, sin embargo la incubación de la reacción con la sonda no marcada de KEM1, desplaza de forma poco menos eficiente la formación del complejo, inclusive a la concentración más alta (100X) (Figura 17B, cabeza de flecha, comparar carriles 4 y 8); *c*) para el caso del ensayo de competencia con la sonda GC-A, observamos que la inclusión de la sonda con la secuencia GC-A silvestre del promotor de TRH, inhibe la formación de los complejos principales (Figura 17C, cabeza de flecha y flecha, carriles 2-4). Sin embargo, cuando incluimos en la reacción de incubación la sonda con la secuencia CACCC del promotor del gen de beta-globina (BGL), que ha sido reportado como responsiva a *Klf4* (Adam et al., 2000) (Basu et al., 2004), sólo los complejos superiores modifican su migración respecto del control (Figura 17C, carriles 6-8), sugiriendo que ambos promotores reconocen fracciones nucleares similares, de acuerdo al contexto genómico. En conclusión, se puede decir que tanto las cajas KEM1 y KEM2, así como las cajas GC-A y GC-B, pueden ser reconocidas por proteínas nucleares del hipotálamo durante etapas tempranas del desarrollo que coinciden con el período de diferenciación neuronal.

Posteriormente, con el fin de caracterizar la naturaleza de los complejos observados en los ensayos anteriores, es decir, identificar que proteínas pudiesen estar implicadas en la formación de los complejos, decidimos realizar ensayos de “super-retardo”.

Dado que los factores tipo *Krüppel* pertenecen al grupo de factores tipo *Sp* (*Sp1*, *Sp3*, *Sp8*, etc.) (Dang et al., 2000) (Philipsen and Suske, 1999), y que la expresión de *Sp1* se puede observar en etapas tempranas del desarrollo embrionario murino, incluyendo el SNC (Saffer et al., 1991), decidimos utilizar anticuerpos específicos para *Klf4* y *Sp1*, así como extractos nucleares de la etapa más temprana del desarrollo del hipotálamo en donde los complejos se forman con más intensidad (E14). En primer lugar determinamos que los extractos nucleares de E14 incubados con la sonda KEM1 y el anticuerpo anti-*Klf4*, disminuyen la formación del complejo principal (Figura 18A, cabeza de flecha, carriles 2-

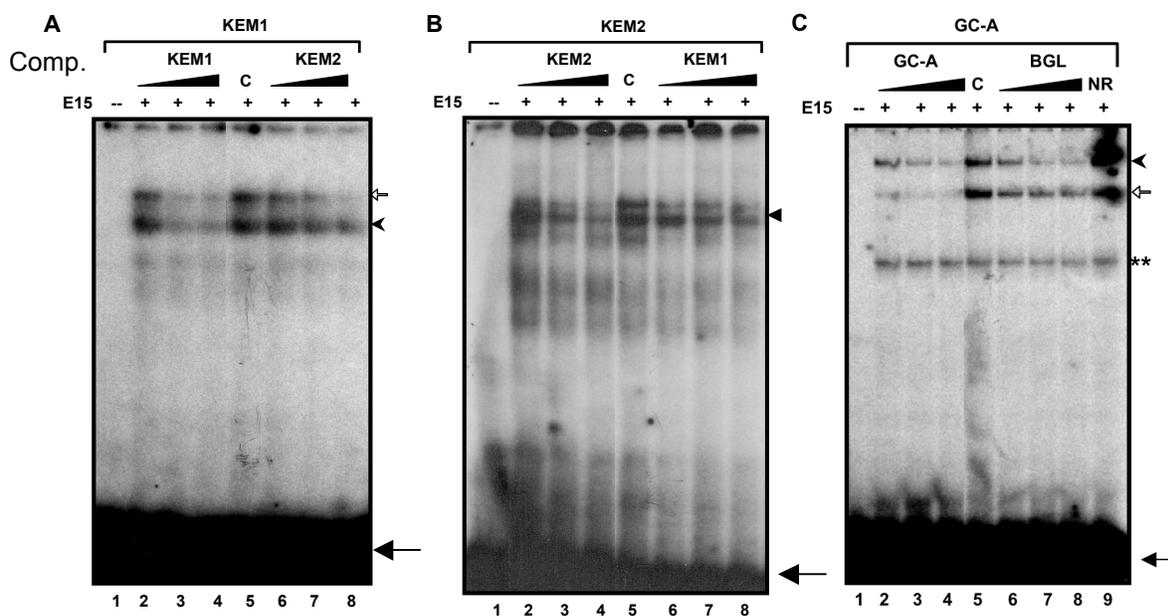


Figura 17. Especificidad del reconocimiento de fracciones nucleares de células de hipotálamo de E15, determinada por ensayos de competencia. Imágenes representativas de EMSAs con los oligonucleótido KEM1 (A), KEM2 (B), y GC-A (C), incubados en presencia de excesos molares (Comp.), de las sondas indicadas (20, 50 y 100X). Las flechas blancas y cabezas de flecha indican los complejos de interés; ** denotan complejos irrelevantes. C, carril control sin competencia. Las flechas negras indican la sonda libre en cada caso. BGL, oligonucleótido del gen de beta-globina conteniendo la secuencia CACCC; NR, oligonucleótido irrelevante incluido como control de especificidad.

3), evidenciando la presencia de *Klf4* en el mismo.

En paralelo, incubamos extractos nucleares de la línea celular de fibroblastos *HEK-293T* transfectados con el vector de expresión para *Klf4*, con la misma sonda y el anticuerpo anti-*Klf4*; observamos que el complejo principal desaparece de manera similar a lo observado con los extractos nucleares de hipotálamo (Figura 18A, flecha, carriles 4, 5). Interesantemente, la incubación del mismo extracto nuclear de *HEK-293T* junto con la sonda KEM1 en presencia del anticuerpo anti-*Sp1*, no produjo ningún cambio en la migración del complejo principal (Figura 18A, flecha, carril 6), lo cual indica que al menos en el contexto del promotor de TRH, el factor *Sp1* no es reclutado hacia el elemento KEM1, para formar parte del complejo. Observamos además, que la incubación de extractos nucleares de células *HEK-293T* transfectados con el vector de expresión para *Sp1*, en presencia del anticuerpo anti-*Sp1* y en el contexto de la sonda KEM1, no retarda la migración del complejo principal (Figura 18A, cabeza de flecha, carril 7), indicando que el factor *Sp1*, no compite por la unión al sitio CACCC más cercano al sitio de inicio transcripcional del gen de TRH.

Por otro lado, los ensayos de super-retardo utilizando la sonda GC-A en presencia de extractos nucleares de hipotálamos de E14 e incubados con el anticuerpo anti-*Klf4*, nos permitieron determinar que en esta etapa de desarrollo hipotalámico, el factor *Klf4* parece no ser reclutado hacia este elemento de respuesta en la región promotora del gen de TRH (Figura 18B, flecha, carriles 2-3), a pesar de que su expresión es detectable desde E14 a nivel de mensajero y proteína (Figura 14A, B). Por el contrario, y como se esperaba, la adición del anticuerpo anti-*Sp1* produjo un retardo importante del complejo principal, impidiendo la entrada completa del mismo al carril (Figura 18B, cabeza de flecha, carril 4),

indicando que *Sp1* es la principal fracción nuclear reclutada a este sitio, aunque aparentemente existen proteínas adicionales que participan en la formación del complejo (Figura 18B, flecha, carril 4). En paralelo, corroboramos que extractos nucleares de la línea *HEK-293T* transfectadas con el vector de expresión para *Sp1*, presentaron el mismo patrón de migración en presencia del anticuerpo anti-*Sp1* (Figura 18B, carriles 5-6), confirmando que *Sp1* se une preferentemente a la secuencia GGGCGGG en el promotor del gen de TRH. Adicionalmente, utilizando extractos nucleares de células *HEK-293T*, transfectadas con el

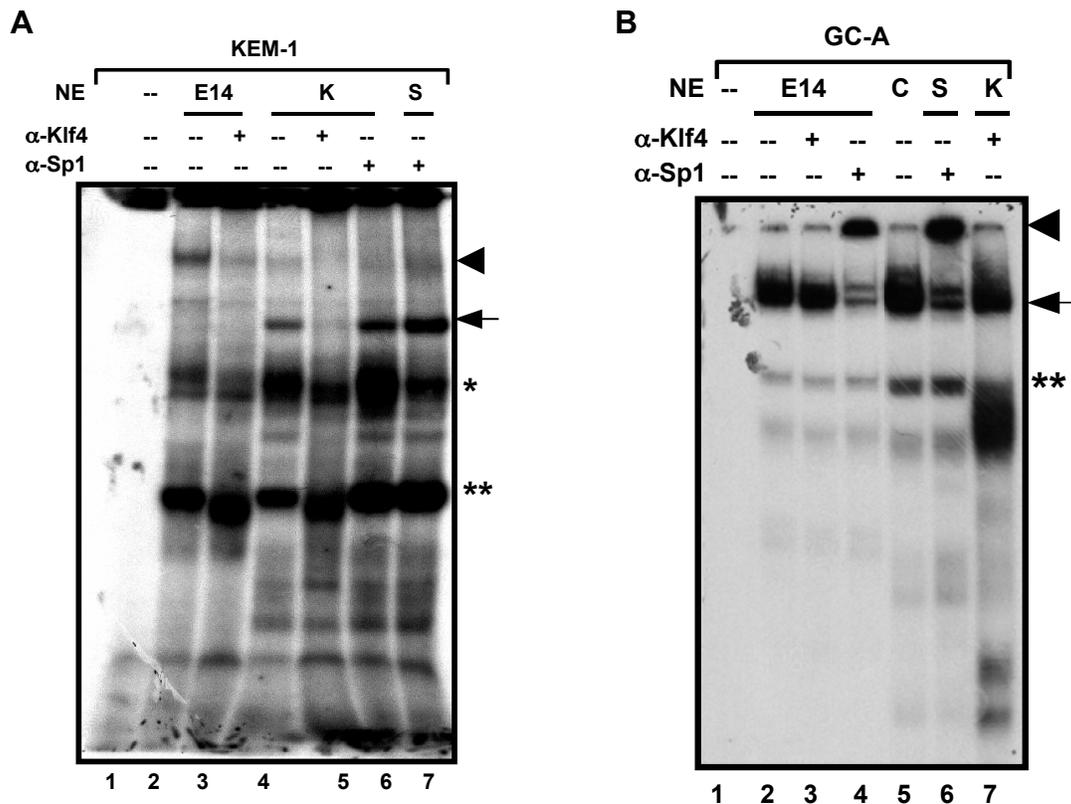


Figura 18. Los factores *Klf4* y *Sp1* están presentes en los complejos formados con las sondas KEM1 y GC-A. Ensayos de super-retardo utilizando las fracciones nucleares de células de hipotálamo de E14, o de células *HEK-293-T* sobre-expresando a *Klf4* (K) o *Sp1* (S). Imágenes representativas de los gels con los oligonucleótidos KEM1 (A) o GC-A (B), incubados en presencia (+) o ausencia (-) de los anticuerpos anti-*Klf4* (α -*Klf4*) o anti-*Sp1* (α -*Sp1*). Las flechas y cabezas de flecha, indican los complejos de interés; mientras que * y **, denotan complejos irrelevantes. C, carril control sin anticuerpo. NE, extracto nuclear.

vector para *Klf4*, en presencia del anticuerpo anti-*Klf4* y la sonda GC-A, observamos que el complejo principal no modificó su migración (Figura 18B, flecha, carril 7), lo que sugiere que *Klf4* no es reclutado hacia esta zona del promotor del gen de TRH.

En conjunto, estos resultados sugieren que *a)* el factor de transcripción *Klf4* está presente en extractos nucleares de hipotálamo en desarrollo y es capaz de unir preferencialmente cajas tipo CACCC, mientras que el factor *Sp1* une preferencialmente cajas tipo GC; *b)* la posibilidad de que otras proteínas o factores adicionales estén involucrados en el complejo formado por la sonda GC-A, debido a la presencia de bandas adicionales cuando el anticuerpo anti-*Sp1* esta presente.

7.3 Los factores de transcripción KLF4 y SP1 regulan de manera cooperativa la actividad del promotor del gen de TRH

Para determinar la relevancia fisiológica de *Klf4* y *Sp1* sobre la expresión del gen de TRH en el contexto hipotalámico, determinamos los niveles de expresión endógenos de ambos genes a nivel de RNAm y proteína. Para el primer caso, el RNA total de hipotálamo de ratas de diversas edades fue usado para determinar la expresión de ambos genes mediante ensayos de RT-PCR; en el segundo caso, utilizando los extractos nucleares de los experimentos previos, determinamos los niveles de expresión a nivel de proteína por *Western-blot*. En la figura 14 y 19 se puede apreciar el patrón de expresión de *Klf4* y *Sp1*, respectivamente. En ambos casos los niveles de expresión se normalizaron contra aquellos del gen constitutivo ciclofilina, además se tomó arbitrariamente la etapa adulta como el 100% de expresión.

Los datos de RT-PCR muestran que tanto *Klf4* como *Sp1* se expresan a lo largo de todas las etapas analizadas (desde E14 hasta adulto). Sin embargo, picos de expresión de *Klf4* se observan al día E15 (Figura 13A, $245 \pm 5\%$ $P < 0.05$), P0, y P7, (Figura 14A, $350 \pm 15\%$ y $355 \pm 8\%$; $P < 0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente), mientras que a nivel de proteína la expresión de *Klf4* se observa también desde la etapa de E14 y permanece constante hasta la etapa adulta (Figura 14B). Por otro lado, la expresión del RNAm de *Sp1* no varía de manera significativa a lo largo del desarrollo, sin embargo al igual que en el caso del RNAm de *Klf4*, se observa un incremento significativo en la etapa de E15 (Figura 19A). Observamos que la expresión endógena del RNAm del factor *Sp1*, es distinta de aquella a nivel de proteína, ya que en las etapas E17, P7 y adulta, la proteína disminuye en forma significativa, sugiriendo que en estas etapas, la estabilidad de este factor puede depender de mecanismos postraduccionales como la fosforilación y/o la glicosilación (Figura 19B) (Black et al., 2001) (Tan and Khachigian, 2009), las cuales pueden afectar tanto el reconocimiento del anticuerpo, así como la susceptibilidad de la proteína para ser procesada por los mecanismos de degradación.

Posteriormente, con el fin de determinar la localización regional a nivel de tejido del RNAm de *Klf4*, realizamos ensayos de hibridación *in situ* (ISH). Para esto, cortes coronales de cerebros de ratas, fueron procesados de acuerdo al protocolo previamente reportado (Sanchez et al., 2001). Dado que la expresión de *Klf4* a nivel de mensajero muestra incrementos significativos en el día postnatal 7 (Figura 14A), se decidió utilizar cerebros de esta edad para el ensayo. La autoradiografía de los cortes coronales mostró que la expresión del RNAm de *Klf4* coincide con la expresión endógena de TRH en zonas hipotalámicas y

extrahipotalámicas (Figura 20A), sugiriendo que efectivamente, *Klf4* puede tener efectos directos sobre fenotipos neuronales peptidérgicos.

Una vez determinado el patrón de expresión de *Klf4 in vivo*, determinamos el impacto de la actividad de *Klf4* y *Sp1* sobre la expresión del gen de TRH. Para esto, realizamos ensayos de expresión transitoria con los vectores de expresión para *Sp1* (*pN3-Sp1FL*) y *Klf4* (*pcDNA-Klf4*), utilizando el modelo de cultivo primario de hipotálamo fetal de 17 días (Perez-Martinez et al., 2001). Determinamos el efecto de la sobre-expresión sobre la actividad del reportero luciferasa fusionado al promotor del gen TRH (*pNASSTRH-Luc*) (Balkan et al., 1998). El análisis de los resultados mostró que la sobre-expresión de *Klf4*, incrementó en forma discreta pero significativa, la actividad del reportero respecto de las células control (Figura 20B, 1.89 ± 0.26 veces vs TRH-Luc, $*p < 0.05$); mientras que la sobre-expresión de *Sp1*, por otro lado, incrementó la actividad del reportero sólo por arriba

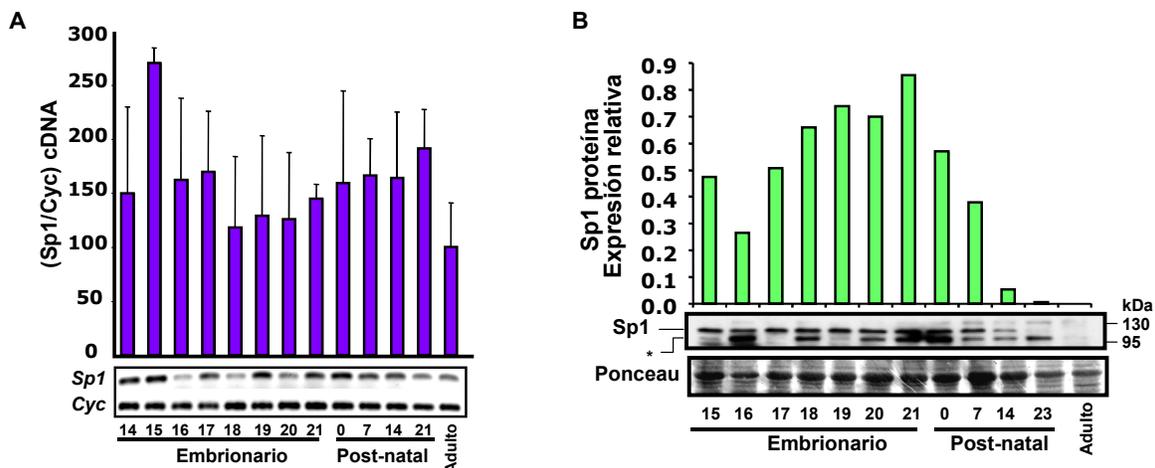


Figura 19. Determinación de la expresión del gen de *Sp1* a lo largo del desarrollo del hipotálamo de la rata. **A)** En la parte superior se presenta el promedio de tres experimentos independientes para determinar el patrón de expresión del RNAm de *Sp1* a lo largo del desarrollo del hipotálamo de la rata, a partir de la etapa embrionaria E14 hasta la etapa adulta (5 meses). La expresión relativa del transcrito se normalizo contra los niveles del gen endógeno de ciclofilina (*Cyc*). En la parte inferior se presenta un gel representativo de la expresión del RNAm en cada etapa analizada. **B)** En esta grafica se presentan los niveles de expresión de la proteína en las mismas etapas de desarrollo previamente mencionadas. En la parte inferior se presenta un gel representativo de la señal obtenida por *Western-Blot* utilizando un anticuerpo específico para *Sp1*. Los niveles de la proteína se normalizaron contra aquellos de la carga de proteína determinadas por tinción con colorante Rojo de *Ponceau*. El peso relativo se indica en la parte derecha de la imagen. * banda inespecífica.

de las células control (Figura 20B, 1.36 ± 0.17 veces vs TRH-Luc).

De manera interesante, observamos que la co-expresión de ambos factores en un mismo plato de cultivo, incrementó la actividad del reportero por arriba de lo observado para cada factor de manera independiente (Figura 20B, 2.47 ± 0.17 veces vs TRH-Luc, ** $p < 0.001$), sugiriendo la existencia de un mecanismo sinérgico en el control de la actividad transcripcional del gen de TRH. Este sinergismo puede indicar que los elementos de respuesta que identificamos en el promotor del gen, pueden ser ocupados al mismo tiempo

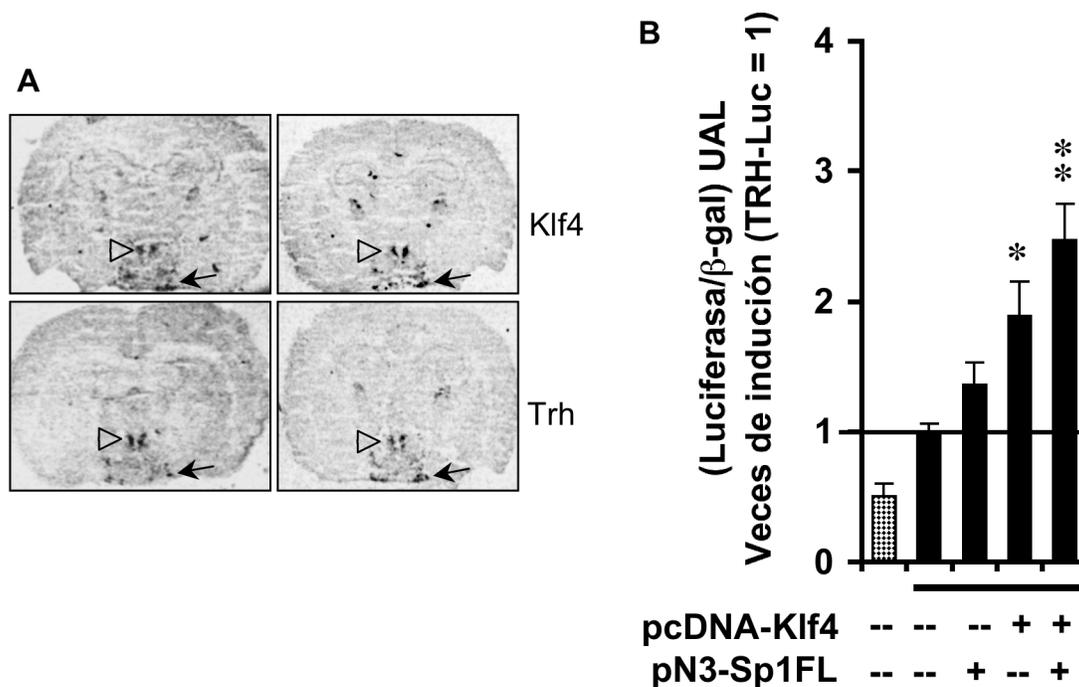


Figura 20. A) Determinación de la expresión del RNAm de *Klf4* y *Trh*, micrografías representativas de cortes coronales de cerebros de ratas de 7 días postnatales. Mediante ensayos de *ISH* se determinó la expresión regional de ambos transcritos, utilizando sondas específicas para cada gen (ver materiales y métodos). Las cabezas de flecha negras y blancas, indican el núcleo reticular y el núcleo paraventricular, respectivamente; la flecha indica el núcleo arcuato en la parte ventral. B) Los factores *Klf4* y *Sp1* controlan la actividad transcripcional del promotor del gen de TRH de la rata. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes en donde se determinó la actividad del reportero luciferasa, normalizada contra aquella del reportero beta-galactosidasa (control de transfección), en neuronas de cultivo primario de hipotálamo de embriones de 17 días de gestación, transfectadas (+) o no transfectadas (-), con los vectores para *Klf4* y/o *Sp1*. * $p < 0.05$ vs TRH-Luc; ** $p < 0.001$ vs TRH-Luc. UAL, unidades arbitrarias de luz.

por los factores tipo *Klf*, o bien que existe una interacción física entre éstos para ejercer sus funciones regulatorias.

Adicionalmente y debido a que el sistema de cultivo de hipotálamo derivado de embriones de E17 contiene una mezcla de fenotipos neuronales distintos del de TRH, lo que complica la interpretación de los datos, decidimos utilizar una línea celular de neuroblastoma humano, las células *SKNMC* (*ATCC HTB-10*), para realizar los mismos ensayos de transfección. Los ensayos de actividad del reportero luciferasa indican que la expresión ectópica de *Klf4*, incrementa de forma significativa la actividad basal del promotor de TRH (Figura 21, 4.12 ± 0.48 veces vs TRH-Luc, *** $p < 0.001$) en esta línea celular, un efecto similar al observado en el cultivo primario de neuronas. La expresión ectópica de *Sp1*, por otro lado, incrementó en forma discreta la actividad del reportero (Figura 21, 1.61 ± 0.17 veces vs TRH-Luc). Interesantemente, la co-expresión de *Klf4* y *Sp1*, incrementó de forma significativa la actividad de luciferasa, recapitulando lo observado en el cultivo primario (Figura 21, 4.68 ± 0.83 veces vs TRH-LUC, *** $p < 0.001$). Estos resultados corroboran la idea del efecto de cooperación sinérgica entre ambos factores para regular la actividad del promotor del gen de TRH. Además, en conjunto indican que las respuestas observadas en el cultivo primario transfectado con los vectores *Klf4* y *Sp1*, derivan principalmente del promotor del gen de TRH, ya que los cambios en la actividad son similares. Lo anterior también coincide con datos previos de otros grupos usando líneas celulares de riñón humano embrionario o células *SL2* de *D. melanogaster*, en donde la co-expresión de ambos factores ejerce un efecto sinérgico sobre la expresión de sus genes blanco (Higaki et al., 2002) (Blanchon et al., 2006) (Shie et al., 2000).

Por otro lado, debido a que existe una amplia gama de factores que pertenecen a la familia de *Krüppel*, entre ellos, *Sp1*, *Sp3*, *Sp4*, etc., decidimos probar la idea de que otro miembro de la familia de *Krüppel* pudiese tener efecto similares sobre la actividad del gen de TRH. Basados en la evidencia experimental de que el factor *Sp3* al igual que *Sp1*, se expresa de manera ubicua, incluyendo al SNC (Black et al., 2001) decidimos transfectar las células *SKNMC* con un vector de expresión para el factor *Sp3* (*pN3-Sp3FL*). Los resultados de la sobre-expresión de *Sp3* mostraron que la actividad del reportero se incrementó de forma similar a lo observado con la sobre-expresión de *Sp1* (Figura 21, 1.41 ± 0.34 veces vs TRH-Luc), sugiriendo que este factor no tiene un efecto represor como se ha observado con otros genes (Li et al., 2004) (Suske, 1999), sino que, por el contrario, ejerce un efecto inductor sobre la tasa transcripcional. Sin embargo, la co-expresión de *Klf4* y *Sp3* en el mismo plato de cultivo, mostró que el efecto sobre la actividad del reportero, no se induce más allá del efecto único observado con *Klf4* (Figura 21, 3.41 ± 1.03 veces vs TRH-Luc ** $p < 0.01$), sugiriendo que estos dos factores no actúan de forma sinérgica sobre la regulación del promotor de TRH.

En conjunto, los datos anteriores sugieren que existe un efecto aditivo entre *Sp1* y *Klf4* para regular la expresión del gen de TRH en etapas tempranas del desarrollo hipotalámico; y posiblemente, que esta regulación se debe a una interacción física entre ambos factores de transcripción. No obstante, no muestran cuál de los elementos de respuesta tiene mayor relevancia en dicha regulación. Por lo tanto, decidimos realizar ensayos de luciferasa utilizando versiones mutantes del vector TRH-Luc, en los que la integridad de los elementos KEM1, KEM2, GC-A y GC-B, se alteró mediante mutagénesis dirigida.

Las mutaciones se realizaron para abatir la unión de *Klf4* en las secuencias CACCC (Δ KEM1-Luc o Δ KEM2-Luc) (Higaki et al., 2002); así como del factor *Sp1* en las cajas GC (Δ GCA o Δ GCB) (Li and Kellems, 2003). Las versiones mutadas del vector TRH-Luc, fueron co-transfectadas en conjunto con los vectores para *Klf4* y/o *Sp1*, y la actividad del reportero luciferasa analizada como antes.

El análisis de la actividad del reportero en los cultivos primarios transfectados con el vector Δ KEM1-Luc, mostró que la actividad basal del promotor es similar a la observada en el control TRH-LUC intacto (Figura 22A, Δ KEM1-Luc 1.15 ± 0.25 veces vs TRH-Luc); sin embargo, la actividad del reportero se incrementó de manera significativa cuando se co-transfectó el vector Δ KEM1-Luc junto con el vector *pcDNA-Klf4* (Figura 22A, Δ KEM1-Luc /*Klf4* 2.92 ± 0.33 veces vs TRH-Luc y Δ KEM1-Luc, $^{***}p < 0.001$), sugiriendo que este elemento esta involucrado en un mecanismo de regulación basal negativa o alternativamente, que la unión de *Klf4* a los elementos GC-A, KEM2 y/o GCB, tienen un efecto positivo sobre la actividad del promotor del gen de TRH. Observamos además, que

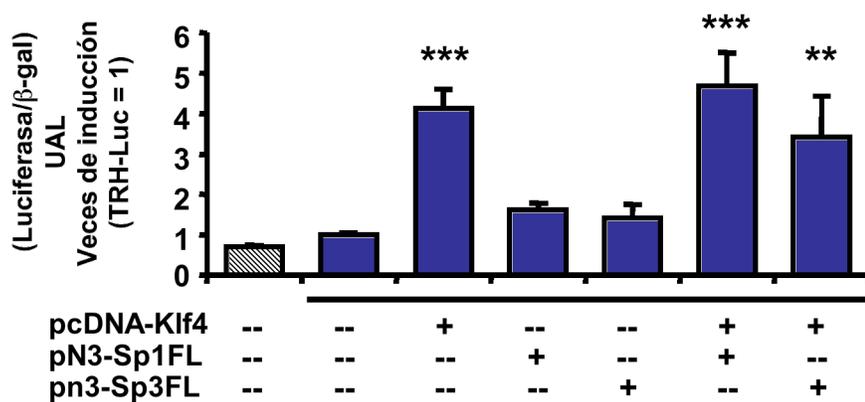


Figura 21. Los factores *Klf4*, *Sp1* y *Sp3*, controlan la actividad transcripcional del promotor del gen de TRH. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes en donde se determinó la actividad del reportero luciferasa, normalizada contra aquella del reportero beta-galactosidasa (control de transfección), en células *SKNMC*, transfectadas (+) o no transfectadas (-) con los vectores para *Klf4*, *Sp1* y/o *Sp3*. $^{**}p < 0.01$ vs TRH-Luc; $^{***}p < 0.001$ vs TRH-Luc. UAL, unidades arbitrarias de luz.

el efecto sinérgico de *Klf4* y *Sp1* sobre el promotor silvestre, se abatió de manera significativa (Figura 22A, Δ KEM1-Luc/*Klf4/Sp1*, 1.26 ± 0.20 veces vs TRH-Luc/*Klf4/Sp1*, 2.47 ± 0.28 , $**p < 0.001$), indicando que la integridad de este elemento es necesaria para regular la respuesta a la unión de *Klf4*, pero no la actividad basal del promotor.

Por otro lado, cuando co-transfectamos las células con el vector Δ GCA-Luc en presencia o ausencia de los vectores para *Klf4* y/o *Sp1*, los niveles de actividad del reportero, disminuyeron de manera significativa en todas las condiciones probadas, comparadas con su control (Figura 22A, Δ GCA-Luc, 1.17 ± 0.15 ; Δ GCA-Luc/*Klf4*, 1.06 ± 0.14 ; Δ GCA-Luc/*Sp1*, 1.30 ± 0.12 ; Δ GCA-Luc/*Klf4/Sp1*, 1.69 ± 0.24 vs TRH-Luc). Un efecto similar fue observado cuando se probó el vector conteniendo mutaciones en los dos primeros elementos, Δ KEM1/ Δ GCA-Luc, en presencia de cualquiera de los vectores para *Klf4* y/o *Sp1*, separados o en conjunto (Figura 22A, Δ KEM1/ Δ GCA-Luc, 1.29 ± 0.34 ; Δ KEM1/ Δ GCA-Luc/*Klf4*, 0.94 ± 0.07 ; Δ KEM1/ Δ GCA-Luc/*Sp1*, 1.24 ± 0.35 ; Δ KEM1/ Δ GCA-Luc/*Klf4/Sp1*, 1.20 ± 0.19 vs TRH-Luc), sugiriendo que en los cultivos de neuronas embrionarias de hipotálamo, el elemento de respuesta GC-A, es necesario para la regulación positiva del promotor de TRH mediada por *Klf4* y/o *Sp1*; así mismo, en conjunto con el elemento KEM1, controlan la actividad basal del promotor, ya que la actividad del reportero, cuando se evalúa en presencia de la mutación Δ GCA (con los sitios KEM1, KEM2 y GC-B intactos) y de la expresión ectópica de *Klf4* y *Sp1*, no se incrementa de manera significativa comparada con la actividad observada en el promotor silvestre.

Por otro lado, la actividad del reportero bajo el control del promotor conteniendo mutaciones en los dos primeros elementos (Δ KEM1- Δ GC-A), la actividad se abate por completo, aún en presencia de la sobreexpresión de *Klf4* o *Sp1*, sugiriendo que la actividad

de KEM1 requiere de la unión de factores específicos como podría ser *Sp1* a la caja GC-A para poder ejercer sus funciones. Esta idea también está relacionada directamente con la hipótesis de la interacción física entre ambos factores.

Por otra parte, la actividad del gen reportero bajo el control de la región promotora que incluyó mutaciones en los tres primeros sitios (Δ KEM1- Δ GC-A- Δ KEM2), mostró que la transcripción del gen de TRH requiere de la integridad de estos elementos, ya que estas mutaciones impiden por completo la expresión del gen reportero en nuestro sistema (Figura 22A). De la misma manera, la mutación en los cuatro elementos, tiene un efecto similar al de la triple mutación (Figura 22A).

Al igual que los experimentos previos, los ensayos de luciferasa con las versiones mutadas también fueron realizados en la línea celular *SKNMC*, transfectadas con las versiones mutadas del vector TRH-Luc. En este caso, observamos que los vectores Δ KEM1-Luc y Δ KEM2-Luc, en conjunto con la sobre-expresión de *Klf4*, incrementa de forma notable la actividad del reportero (Figura 22B, Δ KEM1-Luc/*Klf4*, 3.6 ± 0.32 veces vs

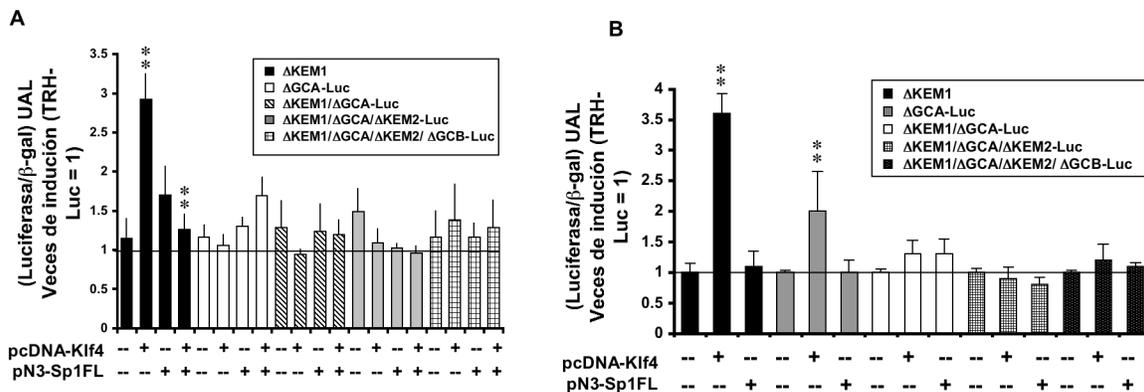


Figura 22. Papel de los elementos de respuesta tipo CACCC y GC en el control transcripcional del promotor del gen de TRH. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes en donde se determinó la actividad del reportero luciferasa, normalizada contra aquella del reportero beta-galactosidasa (control de transfección), en neuronas de cultivo primario de hipotálamo de rata de 17 días de gestación (**A**), y de células *SKNMC* (**B**), transfectadas (+) o no transfectadas (-), con los vectores para *Klf4* y *Sp1*. **p<0.001 vs TRH-Luc. UAL, unidades arbitrarias de luz. Se indican en el recuadro los vectores usados.

Δ KEM1-Luc. $p < 0.001$; Δ KEM2-Luc/*Klf4*, 4.1 ± 0.67 veces vs Δ KEM2-Luc. $p < 0.001$). Sin embargo, el efecto de esta mutación y la expresión ectópica de *Sp1*, no reportó ningún incremento significativo sobre la actividad del reportero (Figura 22B, Δ KEM1/*Sp1*, 1.1 ± 0.25 veces vs Δ KEM1-Luc); un efecto que de alguna manera ya esperábamos debido a la poca efectividad de *Sp1* para poder activar la transcripción del promotor de TRH silvestre, de manera independiente.

Por otra parte, la actividad del reportero en respuesta a las mutación del elemento GC-A, en presencia de la sobre-expresión de *Klf4* o *Sp1*, mostró un incremento discreto o nulo, respectivamente, de la actividad del reportero respecto al control (Figura 22B, Δ GC-A/*Klf4*, 2 ± 0.65 veces vs Δ GC-A-Luc; Δ GC-A/*Sp1*, 1 ± 0.20 veces vs Δ GC-A-Luc).

Interesantemente, como sucedió con el cultivo primario, la mutación de más de dos elementos en el promotor, tiene un efecto supresor de la actividad basal del reportero, ya que no se observó ninguna inducción significativa cuando se probó la mutación doble (Δ KEM1- Δ GC-A-Luc), triple (Δ KEM1- Δ GC-A- Δ KEM2-Luc) o cuádruple (Δ KEM1- Δ GC-A- Δ KEM2- Δ GC-B-Luc), incluso en presencia de la sobre-expresión de cualquiera de los dos factores de transcripción *Klf4* y/o *Sp1* (Figura 22B, actividad promedio de 1.1 ± 0.18 veces vs células control).

En conjunto, estos datos indican que la integridad del elemento KEM1 es necesaria para controlar los efectos de las cajas GC sobre la actividad basal del promotor; mientras que la caja GC más cercana al sitio de inicio de la transcripción, es indispensable para mantener la expresión basal del gen de TRH.

7.4 Los factores *Klf4* y *Sp1* interactúan físicamente *in vivo*

Para corroborar la hipótesis de la posible interacción física entre los factores *Sp1* y *Klf4*; los cuales de acuerdo con su naturaleza intrínseca de factor transcripcional deberían estar enriquecidos en la fracción nuclear de las células, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación directamente con extractos nucleares de hipotálamo de algunas de las etapas del desarrollo que habían sido utilizados para realizar los experimentos de retardo electroforético. La inmunoprecipitación se realizó a partir de extractos nucleares de hipotálamo de E14, P0, P7 y adulto con el anticuerpo anti-*Klf4* y posteriormente, el “Western-blot” se realizó utilizando el anticuerpo específico para *Sp1*. Observamos que en las tres etapas tempranas del desarrollo aparece una banda correspondiente al factor *Sp1*, indicando que hay interacción física; sin embargo, esta interacción no ocurre en la etapa adulta, como se puede observar en la figura 23A. Este resultado demuestra que hay una

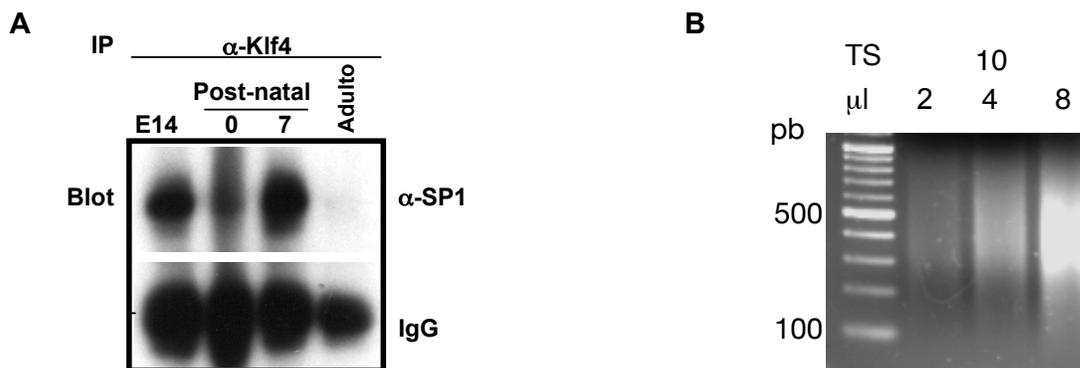


Figura 23. A) Los factores de transcripción *Klf4* y *Sp1* interactúan físicamente *in vivo*. Extractos nucleares de hipotálamos de distintas edades (E14, P0, P7 y Adulto), fueron usados para ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos para ambos factores. Para este ensayo se inmunoprecipitaron 100 μg de proteína con anticuerpo anti-*Klf4* (α -*Klf4*) y la fracción inmunoprecipitada separada en gel de poliacrilamida y analizada por Western-Blot con anticuerpo anti-*Sp1* (α -*Sp1*). Se indica además el control de carga con la fracción correspondiente a la proteína *IgG*. B) Imagen representativa de la cromatina fragmentada mediante sonicación con pulsos de 10 segundo (TS) y resuelta en gel de agarosa 1.5%. Se indica en el recuadro la zona donde se concentra la mayor parte de los fragmentos y que corresponde al rango entre 300 y 600 pares de bases (pb). Los carriles corresponden al volumen de muestra cargado.

interacción física *in vivo* entre los factores de transcripción *Klf4* y *Sp1*, pero además, que dicha interacción ocurre sólo en una ventana de tiempo determinada. De manera interesante, dicha interacción en la etapa de E14 coincide con un pico de expresión del transcrito del RNAm de *Klf4* en el hipotálamo de rata, siendo esto cierto también para la etapa de P7. Más aún, la ausencia de la interacción en la etapa adulta coincide con la disminución tanto del transcrito, como de la proteína del factor *Klf4*, en el mismo período de desarrollo del hipotálamo (Figura 14).

Estos resultados demuestran que efectivamente, *Klf4* y *Sp1* regulan la actividad de gen de TRH a nivel transcripcional, y que esta regulación puede estar ocurriendo a través de la interacción física entre ambos factores.

7.5 Los factores Klf4 y Sp1 se unen al promotor del gen de TRH in vivo

Las evidencias experimentales obtenidas utilizando el modelo de cultivo primario y las células *SKNMC* nos permitieron determinar el papel de *Klf4* y *Sp1* en cuanto su capacidad de regulación sobre el gen de TRH *in vitro*. Sin embargo, hasta este momento no sabíamos si esta regulación era igualmente relevante y observable durante el desarrollo del hipotálamo *in vivo*. Por lo tanto, determinamos si ambos factores estarían presentes en la región promotora del gen de TRH, en distintas etapas del desarrollo hipotalámico. Para ello realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (*ChIP*), utilizando hipotálamos de etapa embrionaria y adulta, así como los anticuerpos específicos previamente descritos. Los ensayos de *ChIP* fueron realizados utilizando diez o cinco hipotálamos para la etapa embrionaria de E15 y de adulto, respectivamente. La cromatina fue entrecruzada con todas las proteínas nucleares por tratamiento con formaldehído y fragmentada por sonicación.

Los tamaños de los fragmentos se corroboraron por electroforesis una vez terminada la sonicación (Figura 23B).

Posteriormente, se incubó en presencia de cualquiera de los dos anticuerpos, anti-*Klf4* o anti-*Sp1*. El DNA enriquecido fue analizado mediante el uso de oligonucleótidos específicos que flanquean las regiones de la zona genómica de interés, en este caso la región que va de -778pb a +81pb del gen de TRH, la cual incluye a los elementos CACCC (KEM1 y KEM2) y GGGCGGG (GC-A y GC-B) (Figura 24A). El diseño de los

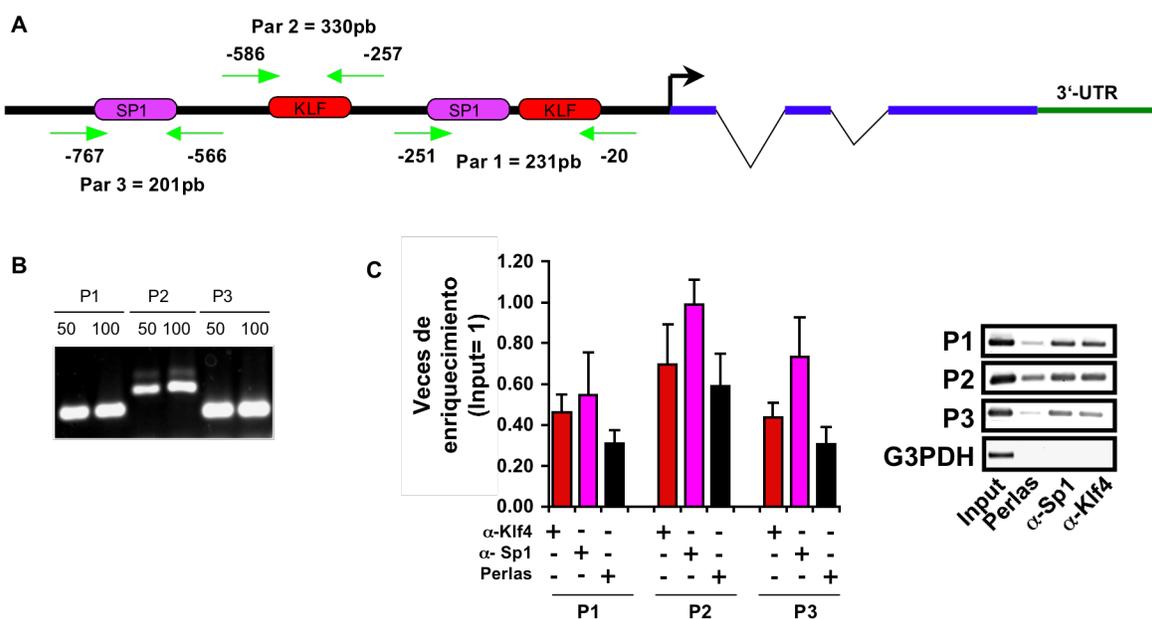


Figura 24. Los factores *Klf4* y *Sp1* interaccionan con el promotor del gen de TRH *in vivo*. **A**) Diagrama que indica las posiciones relativas de los oligonucleótidos para amplificar fragmentos específicos de esta región respecto de los elementos de respuesta tipo CACCC (cajas rojas) y GGGCGGG (cajas moradas) y del sitio de inicio transcripcional (flecha negra), en el gen de la rata. Se indican los nucleótidos del extremo 5' y 3' (flechas verdes), así como el tamaño de los fragmentos para cada par de oligonucleótidos. Las líneas azules indican los exones codificantes y la línea verde la región 3' no traducida (3'-UTR). **B**) Imagen representativa de las bandas obtenidas por electroforesis a partir de DNA genómico derivado de hipotálamo de embriones de 15 días de gestación de la rata, correspondientes a los fragmentos amplificados por PCR con los oligonucleótidos P1, P2 y P3. Los números indican los nanogramos de DNA total utilizado para la amplificación. **C**) En la gráfica se presenta el promedio de tres experimentos independientes de inmunoprecipitación utilizando los anticuerpos anti-*Klf4* (α -*Klf4*) o anti-*Sp1* (α -*Sp1*), así como los controles de perlas de agarosa. Los datos están normalizados contra el valor de la señal densitométría de la banda correspondiente al DNA de inicio (*Input*), la cual se considera 100%. De lado derecho aparece una imagen representativa de las bandas correspondientes a los productos de cada amplificación. La región de 900pb correspondiente a la región codificante del gen endógeno gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (G3PDH), fue usada como control de especificidad.

oligonucleótidos representa una estrategia en la que los dos primeros sitios (KEM1 y GC-A), tuvieron que ser incluidos en un mismo segmento, ya que la distancia que existe entre ellos no es lo suficientemente grande en términos de pares de bases, para poder amplificarlos de forma independiente. Los dos sitios restantes (KEM2 y GC-B) fueron flanqueados por pares de oligonucleótidos independientes. Adicionalmente, se utilizaron oligonucleótidos específicos para el gen endógeno *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa* (G3PDH) como control de especificidad de los anticuerpos (Perez-Martinez et al., 2001). Se corroboró que los oligonucleótidos diseñados amplificaran los fragmentos esperados por PCR (Figura 24B).

Debido a que en las etapas tempranas del desarrollo como E14 y E15, observamos un enriquecimiento de los RNAm tanto de *Klf4* como *Sp1* en la región hipotalámica, así como de los niveles de proteína y de que en los ensayos de super-retardo identificamos a ambos factores en los complejos formados por los oligonucleótidos KEM1 y GC-A, pero más importante, que durante este período las neuronas de hipotálamo inician su diferenciación, decidimos realizar la inmunoprecipitación de la cromatina, a partir de embriones de rata de 15 días de gestación, con el anticuerpo anti-*Klf4* y anti-*Sp1*.

El análisis del DNA enriquecido mediante PCR semicuantitativo mostró que los tres pares de oligonucleótidos, amplifican los fragmentos esperados; indicando que los cuatro elementos pueden reclutar a este factor de transcripción, aunque existen diferencias en cuanto a el nivel de ocupación. Es decir, tomando la señal del “*input*” como el 100% de enriquecimiento; los sitios comprendidos entre -251pb a -20pb (P1) y -767pb a -566pb (P3), mostraron un enriquecimiento relativo de poco menos del 50% ($46 \pm 9\%$ y $44 \pm 7\%$, respectivamente; figura 24C.); mientras que para el fragmento entre -586pb a -257pb (P2),

el enriquecimiento fue de $69 \pm 20\%$, indicando que éste último elemento es capaz de reclutar a *Klf4* de forma más eficiente en esta etapa del desarrollo hipotalámico.

De manera notable e inesperada, observamos que en esta etapa el factor *Sp1* enriquece los tres fragmentos en mayor medida (P1, $55 \pm 21\%$; P2, $99 \pm 12\%$; P3, $73 \pm 19\%$), comparado con lo observado para *Klf4* (Figura 24C, comparar columnas *Klf4* vs *Sp1*), sugiriendo que el factor *Sp1*, a pesar de presentar niveles de expresión de proteína similares a los de *Klf4* (Figura 19B), tiene mayor actividad y afinidad para unir los elementos CACCC como los de tipo GC. No obstante, consideramos que debido al hecho de que los elementos KEM1 y GC-A no pueden ser amplificados por separado, debido a la distancia que los separa en el promotor endógeno, no podemos determinar con certeza cual de los dos elementos está reclutando al factor transcripcional, sin embargo, basados en

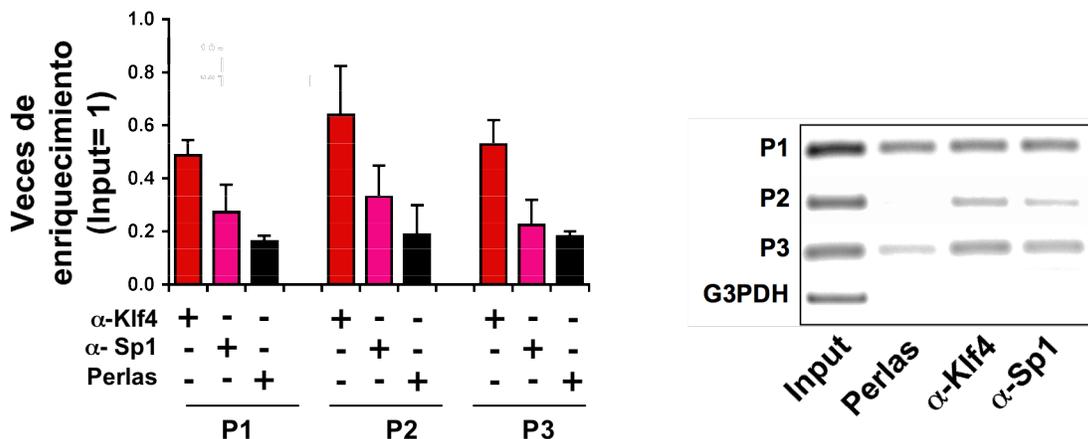


Figura 25. Los factores *Klf4* y *Sp1* interaccionan con el promotor del gen de TRH *in vivo*. En la gráfica se presenta el promedio de tres experimentos independientes de inmunoprecipitación utilizando DNA genómico derivado de hipotálamo de rata adulta de 3 meses y los anticuerpos anti-*Klf4* (α -*Klf4*) o anti-*Sp1* (α -*Sp1*). Los datos están normalizados contra el valor de la señal densitométrica de la banda correspondiente al DNA de inicio (*Input*), la cual se considera 100%. De lado derecho aparece una imagen representativa de las bandas correspondientes a los productos de cada amplificación. La banda de 900 pb correspondiente a la región codificante del gen endógeno *gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa* (G3PDH), la cual fue utilizada como control de especificidad.

nuestros datos de EMSA, proponemos que el elemento KEM1, recluta principalmente al factor *Klf4*, mientras que GC-A hace lo mismo con el factor *Sp1*.

Por otro lado, la amplificación de los tres fragmentos utilizando la cromatina inmunoprecipitada a partir de hipotálamos de rata adulta (3 meses en promedio), mostró lo opuesto a lo observado con E15. En este caso, los tres fragmentos del promotor se enriquecieron en mayor magnitud al usar el anticuerpo anti-*Klf4* (P1, $49 \pm 12\%$; P2, $64 \pm 37\%$; P3, $53 \pm 18\%$), comparado con aquellos observados usando el anti-*Sp1* (P1, $27 \pm 21\%$; P2, $33 \pm 23\%$; P3, $22 \pm 19\%$) (Figura 25); lo que indica que en etapas posteriores a la embrionaria, *Klf4* puede ser importante en el control de la expresión del gen de TRH.

7.6 Klf4 es necesario para la expresión temprana del gen de TRH in vivo

Los resultados anteriores en conjunto, nos indican que los factores *Klf4* y *Sp1* regulan la expresión del gen de TRH en etapas tempranas del desarrollo hipotalámico, tanto in vivo como in vitro; por lo que la caracterización subsiguiente del papel de *Klf4* sobre la expresión del gen de TRH durante el desarrollo del hipotálamo, consistió en determinar los niveles de expresión del gen de TRH en ratones mutantes para la expresión de *Klf4*. Para lograrlo se utilizó una línea de ratones heterocigotos (+/-) para el alelo de *Klf4*^{+/-}, los cuales han sido previamente reportados (Segre et al., 1999). Los ratones homocigotos nulos (-/-) para el alelo *Klf4*^{-/-} al nacer presentan severos problemas de integridad física en la epidermis, por lo que pierden líquidos rápidamente; además, son incapaces de alimentarse con la leche materna debido a malformaciones en la lengua, por lo que mueren a las pocas de haber nacido. Debido a esto, en nuestros ensayos utilizamos embriones de 15 días de gestación, así como neonatos de unas pocas horas.

Para obtener animales $Klf4^{-/-}$, ratones macho $Klf4^{+/-}$ fueron cruzados con ratones hembra $Klf4^{+/-}$. Los embriones se obtuvieron bajo anestesia directamente de la madre gestante. Se corroboró el fenotipo de los embriones $Klf4^{-/-}$ mediante PCR con oligonucleótidos que amplifican la zona correspondiente al exón 3 y 4 del alelo de $Klf4$, la cual es suprimida en el ratón $Klf4^{-/-}$; además utilizamos oligonucleótidos que amplifican un segmento de la región codificante del *cassette* que confiere resistencia a neomicina. Como controles de amplificación negativa y positiva, se utilizó DNA de ratones silvestres y un vector comercial conteniendo un *cassette* de resistencia a neomicina (ver materiales y métodos) (Figura 26A).

Por otro lado, también determinamos el fenotipo mediante ensayos de integridad epidermal con el colorante de azul de toluidina de acuerdo a lo reportado previamente (Segre et al., 1999). Los ratones $Klf4^{-/-}$ tienen dificultad para excluir el colorante cuando son sumergidos en solución, después de 5 minutos, por lo que se tiñen de azul comparados con los ratones $Klf4^{+/-}$ o $Klf4^{+/+}$ (Figura 26B). Adicionalmente, corroboramos la ausencia o

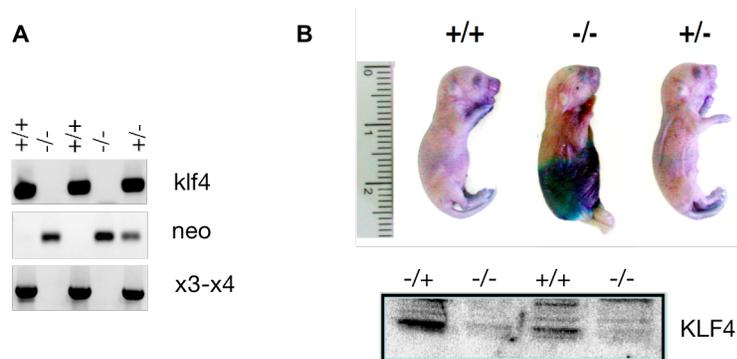


Figura 26. Determinación del fenotipo de los ratones mutantes para la expresión de *Klf4*. **A)** Imagen representativa de los productos amplificados por PCR para un fragmento de la región codificante del gen de *Klf4*, el *cassette* de neomicina (neo) y los exones 3 y 4 (x3-x4), de ratones silvestres (+/+), heterocigotos (+/-) y homocigotos nulos (-/-). **B)** Determinación de la integridad de la barrera epidérmica por ensayo de exclusión de colorante azul de toluidina en ratones +/+, +/- y -/- (panel superior) y de la proteína *klf4* con extractos totales de hipotálamos de ratones post-natales (P0) +/+, -/- y +/-.

presencia de la proteína de *Klf4*, mediante *Western blot* (Figura 26B, panel inferior).

Posteriormente se determinó el efecto de la ausencia de *Klf4* sobre la expresión del gen TRH. Para esto y debido a que los ratones *Klf4*^{-/-} no logran sobrevivir más allá de 24 hrs. después de nacidos, se recolectaron hipotálamos de ratones en etapas de desarrollo embrionario (E15), en la cual demostramos que *Klf4* se une al gen de TRH *in vivo* e *in vitro*, así como de la etapa neonatal (P0). El RNA total se purificó de cada hipotálamo y posteriormente, el cDNA generado de forma independiente, de varios ratones *Klf4*^{+/+} (WT), *Klf4*^{+/-} (HT) o *Klf4*^{-/-} (KO), fue utilizado para realizar ensayos de PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos para el gen de TRH y el gen constitutivo actina. El análisis de los niveles de expresión relativa de TRH en los ratones HT y WT de E15, mostró que hay una ligera disminución en la expresión de TRH (Figura 27A, HT = 0.89 ± 0.065 vs WT = 1 ± 0.085), sugiriendo que la expresión de un solo alelo de *Klf4* es suficiente para mantener la regulación en la expresión del gen de TRH. Sin embargo, una reducción significativa del

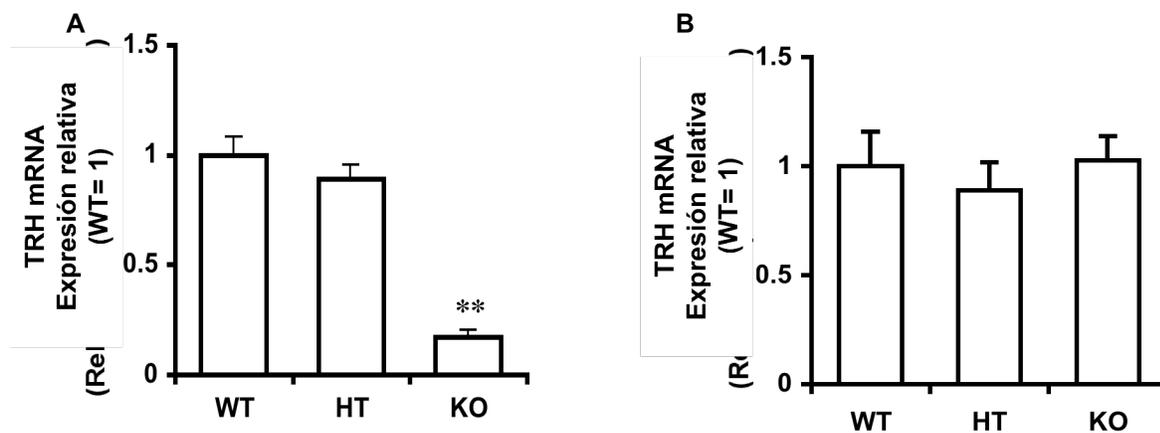


Figura 27. El factor de transcripción *Klf4* es necesario para la expresión temprana del gen de TRH. Determinación de los niveles de expresión relativa del transcrito de TRH por RT-PCR cuantitativa en hipotálamos de ratones de 15 días de gestación (A) y de etapa neonatal (B). En cada caso se muestra el promedio de tres experimentos independientes ± error estándar, tomando a los ratones silvestres como el 100%. **p<0.01

RNAm de TRH se observó en los ratones KO, en relación los ratones WT en esta etapa de desarrollo (Figura 27A, KO = 0.17 ± 0.032 vs WT = 1 ± 0.085 , $p < 0.01$), lo cual indica que la expresión del gen *Klf4* es crucial para la transcripción adecuada de TRH durante etapas tempranas del desarrollo hipotalámico.

Por otra parte, la reducción en los niveles del RNAm de TRH fueron sólo evidentes en la etapa embrionaria, ya que en la etapa neonatal (P0), no se observó diferencia entre los ratones KO y HT en relación con los ratones WT (Figura 27B). Estos datos indican que en la etapa neonatal, la expresión de TRH puede estar sujeta a señales inductivas que no necesariamente activarían vías de señalización que activen a *Klf4*, tales como hormonas (Farkas et al., 2008), neurotrofinas (Ubieta et al., 2007) o incluso otros neuropéptidos (Lechan and Fekete, 2006).

Adicionalmente, datos previos del laboratorio sugieren que *Klf10* se expresa también durante el desarrollo hipotalámico (Miriam Martínez et al. manuscrito en preparación), lo cual podría explicar la existencia de un mecanismo compensatorio ejercido por otros miembros de la familia (*Klf2*, *Klf5* y/o *Klf10*) como se ha demostrado en otros sistemas (Jiang et al., 2008).

El efecto de la ausencia de *Klf4* sobre la expresión de TRH en etapa embrionaria nos llevo a preguntarnos si dicho efecto era resultado de una alteración a nivel histológico, por ejemplo a nivel de la formación o consolidación anatómica de los núcleos neuronales que conforman al hipotálamo. Para responder esta pregunta, realizamos cortes histológicos de cerebros obtenidos de ratones *Klf4^{+/+}* o *Klf4^{-/-}*. Cortes coronales de cerebros de ratones en desarrollo fueron procesados con la técnica de *Nissl* y montados para su análisis en microscopio óptico. En la figura 28 se puede apreciar que los principales núcleos que

conforman el hipotálamo en desarrollo en la etapa E15 son distinguibles tanto en los ratones *Klf4^{+/+}* como *Klf4^{-/-}*, sugiriendo que a nivel histológico no existe un efecto en la formación del hipotálamo.

Se decidió entonces evaluar si la reducción en la tasa transcripcional del gen de TRH en la etapa E15 en los ratones *Klf4^{-/-}* se podía reflejar a nivel de la producción del péptido maduro, se realizó un radioinmunoensayo (RIA), con anticuerpo específico para TRH. Como se esperaba, el contenido del péptido TRH intracelular disminuyó de manera significativa en los ratones *Klf4^{-/-}* comparado con sus similares WT (Figura 29A, KO = 4 ±

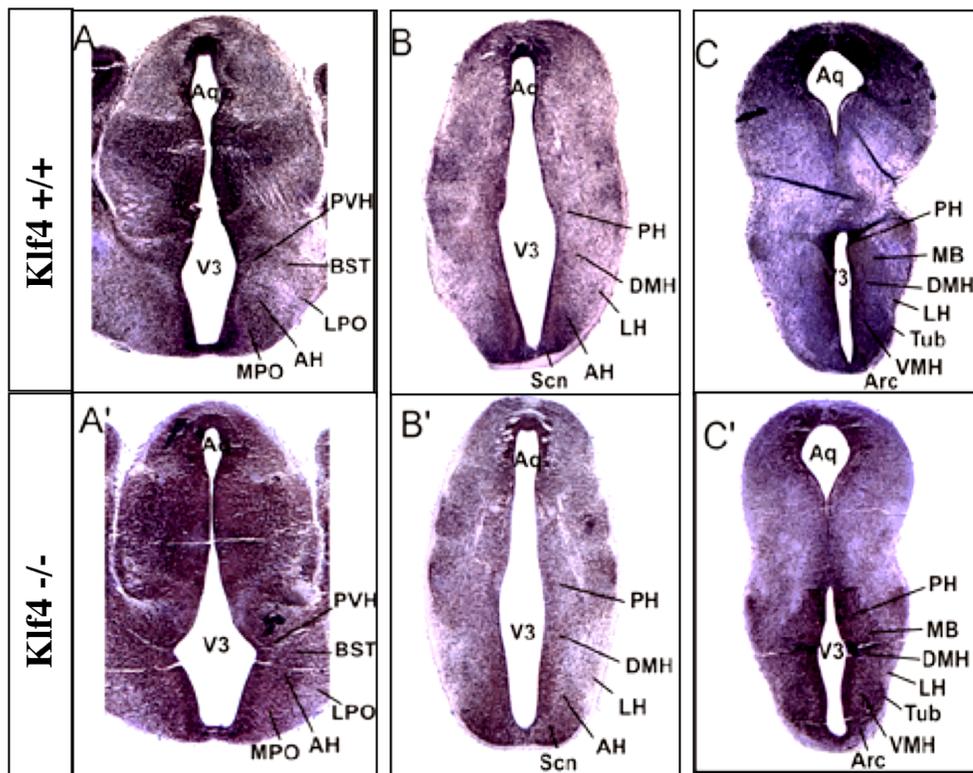


Figura 28. Análisis histológico del hipotálamo en embriones de ratón de 15 días de gestación. Secciones coronales de la parte rostral a la caudal (izquierda a derecha), de ratones *Klf4^{+/+}* (A, B y C) o *Klf4^{-/-}* (A', B' y C'), fueron teñidas con tinción de *Nissl* (cresil violeta), y montadas para su análisis con microscopio óptico (20X). AH, núcleo hipotalámico anterior; Arc, núcleo arcuato; BST, núcleo ventral del estria terminalis; DMH, núcleo dorsomedial; LH, núcleo lateral; LPO, área preóptica lateral; MB, cuerpo mamilar; MPO, núcleo medial preóptico; PH, área hipotalámica posterior; Scn, núcleo supraquiasmático; Tub, núcleo tuberomamilar; VMH, núcleo ventromedial hipotalámico; V3, tercer ventrículo. Nótese que no existen diferencias en tamaño o morfología de las áreas indicadas.

0.57% vs WT = 100 ± 22.5%, p< 0.05). Para el caso de los ratones HT, el porcentaje en el contenido del péptido maduro se disminuyó cerca del 50% (Figura 29A, HT = 44 ± 113.8% vs WT = 100 ± 22.5%).

De manera interesante, el análisis de los niveles del péptido en ratones *KO* en la etapa P0, mostró niveles similares a los de hipotálamos de ratones HT (Figura 29B, *KO* = 48 ± 22% vs HT = 43 ± 8%), sin embargo, estos niveles fueron significativamente menores comparados con sus similares WT (Figura 29B). Estos resultados sugieren que aunque existe un mecanismo de compensación en los ratones *Klf4*^{-/-} en la etapa neonatal (P0) para recuperar la expresión del gen TRH, la producción del péptido biológicamente activo esta afectada. Experimentos posteriores para determinar si algunas de las enzimas que procesan al precursor u otra molécula involucrada en dicho procesamiento, son reguladas de manera directa o indirecta por el factor *Klf4*, permitirán explicar mejor estos resultados.

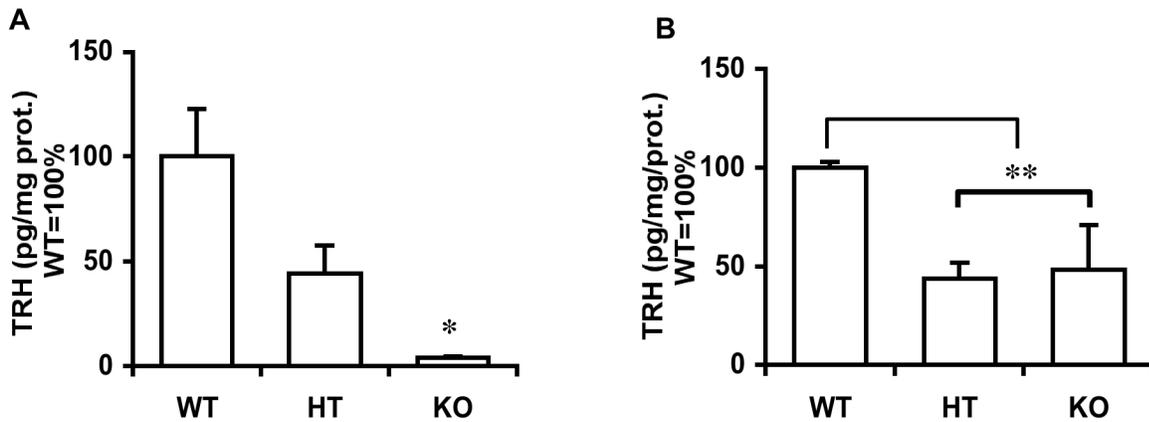


Figura 29. El factor de transcripción *Klf4* es necesario para la producción apropiada del péptido maduro de TRH. Determinación de los niveles del tripéptido TRH mediante radioinmunoensayo en hipotálamo de ratones de 15 días de gestación (A) y de etapa neonatal (B). En cada caso se muestra el promedio de tres experimentos independientes ± error estándar, tomando a los ratones silvestres (WT) como el 100%. **p< 0.01, *p< 0.05

8. *Discusión*

8.1 *Diferenciación del fenotipo neuronal durante el desarrollo embrionario*

Un paso importante en el proceso de maduración de las neuronas durante su tránsito por las diferentes etapas de desarrollo en el SNC, es que deben salir del ciclo celular y activar programas de diferenciación que permitan adquirir el fenotipo específico que ocuparan dentro de las redes neuronales que caracterizan un cerebro adulto (Bally-Cuif and Wassef, 1995) (Ohnuma and Harris, 2003). Se sabe que en etapas tempranas del desarrollo del SNC, una serie de factores difusibles controlan el posicionamiento regional de los neuroblastos (entre los que destacan el RA, los BMPs, FGFs y TGFβ's, así como *Shh*), activando diversas vías de señalización, entre las que destacan, la vía de *Wnt*, la de las *SMADs*, la de *Notch-Delta*, así como *Nodal*, entre otras (Bally-Cuif and Wassef, 1995) (Bertrand et al., 2002). El efecto de la activación de estas vías afecta la expresión de genes proneurales (una lista amplia de estos genes puede verse en (Matsuki et al., 2005), entre los que destacan varios factores transcripcionales del tipo *bHLH*, homeótico y con dominios tipo *POU* (Akin and Nazarali, 2005) (Kageyama et al., 2007) (Andersen and Rosenfeld, 2001).

Uno de los mejores ejemplos de la participación de genes que codifican factores con actividad transcripcional es el del desarrollo del fenotipo dopaminérgico de la parte ventral del cerebro medio (Burbach, 2000) (Burbach and Smidt, 2006). La secuencia de factores necesarios para la adquisición del fenotipo dopaminérgico del cerebro medio inicia con la actividad de FGF8 y *Shh*, los cuales derivan de la frontera entre el cerebro medio y el cerebro posterior, así como de la notocorda, respectivamente, sobre progenitores neuroepiteliales que expresan los factores homeóticos *Otx1* y *Otx2*. Dos de los genes que

deben activarse por efecto de la actividad de ambos factores, son *Nr4a2* (*Nurr1*) y *Lmx1a*, lo que a su vez inicia una cascada de activación de otros genes como *Limx1a*, *Msx1*, *Ngn2*, *Otx2* y *Foxa2*. *Ngn2* inicia la expresión de genes neuronales e inhibe la expresión de genes asociados con proliferación como *Sox2*; por otro lado, *Msx1* suprime la expresión de *Nkx6.1*, inhibiendo un camino alterno hacia otro fenotipo (Burbach and Smidt, 2006). Adicionalmente, se sabe que el morfógeno *Wnt1*, también participa activamente en la generación de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio, regulando la expresión de *Pitx3*, *Otx2* y *Nkx2.2*; uno de estos factores de transcripción, *Pitx3*, es necesario para la sobrevivencia de grupos de neuronas dopaminérgicas recién diferenciadas (Prakash et al., 2006).

8.2 Diferenciación de fenotipos neuronales hipotalámicos y el papel del factor de transcripción *KLF4*.

Datos previos reportados en la literatura han mostrado que el nacimiento de las neuronas hipotalámicas surgen en una ventana específica de tiempo, la cual esta comprendida entre los días 10-12 a 15-16 en la etapa embrionaria de ratón y rata (Angevine, 1970; Karim and Sloper, 1980; Altman and Bayer, 1986; Markakis and Swanson, 1997). De manera similar a lo observado para el fenotipo dopaminérgico, se ha reportado que factores de transcripción del tipo *bHLH*, y homeótico participan de forma activa en la regulación de diversos estadios del desarrollo de progenitores neuronales del sistema magnocelular y parvocelular, entre ellos destacan *Otp*, que controla eventos de proliferación de los neuroblastos que dan origen a las neuronas hipotalámicas; *Sim1* y *Arnt2*, cuya actividad como heterodímero controla la migración lateral mediante el control de la expresión de *Brn2*, un gen relacionado con la maduración a través de la inducción de

genes como CRH (Nakai et al., 1995) (Li et al., 1993). Sin embargo, datos adicionales que muestren el control directo de estos factores transcripcionales sobre los genes que codifican péptidos hipotalámicos, distintos de CRH, en los sistemas magno- y parvocelular, aún no ha sido reportada.

Con la finalidad de obtener mayor información sobre los mecanismo moleculares que regulan el desarrollo de las neuronas TRHérgicas del hipotálamo, recientemente se caracterizó el transcriptoma de estas neuronas durante el desarrollo embrionario del hipotálamo. Este trabajo permitió identificar al factor de transcripción 4 similar a *Krüppel* (*Klf4*), en las neuronas de TRH (Guerra-Crespo M., et al. 2009, sometido).

Los factores de transcripción tipo *Krüppel* poseen un dominio de unión a DNA tipo “*zinc-finger*”, el cual tiene una alta similitud con aquel del producto del gen de segmentación *Krüppel*, descrito en *D. melanogaster*. Algunos ejemplos de proteínas tipo *Krüppel* incluyen a *Sp1*, *zif268* o *Egr-1*, *EklF* o *Klf1* y *FklF*, entre otras (Bieker, 2001) (Dang et al., 2000). La región amino-terminal de la mayor parte de los miembros de la familia, contiene una serie de dominios que le permiten a varios miembros de la familia interactuar físicamente con otras proteínas que modifican su actividad (Bieker, 2001). El factor de transcripción *Klf4* también llamado Gklf, fue descrito por vez primera en el proceso de diferenciación del epitelio intestinal (Shields et al., 1996) (Garrett-Sinha et al., 1996), aunque también se ha observado su expresión en células endoteliales vasculares y de la epidermis (Garrett-Sinha et al., 1996) (Yet et al., 1998). En la mayoría de los fenotipos celulares en donde se expresa, *Klf4* induce arresto celular y el encendido de programas de diferenciación. Estos efectos los lleva a cabo a través de la unión a elementos de respuesta tipo CACCC y cajas GC presentes en las regiones reguladoras de genes como *p21* o ciclina

D1 (*CycD1*) (Kaczynski et al., 2003) (Bieker, 2001) (Philipsen and Suske, 1999); o bien, regulando la expresión de genes de expresión tardía, como keratina 4 (*K4*), en epitelio epidermal (Okano et al., 2000). En conjunto, estas evidencias son un argumento a favor de la idea de que *Klf4* participa en la toma de decisiones de distintos fenotipos celulares para proliferar o iniciar el proceso de diferenciación.

Consideramos que nuestro trabajo es el primer reporte con evidencia experimental sobre el papel que puede desempeñar *Klf4* en el SNC, específicamente sobre el proceso de diferenciación de un fenotipo neuronal hipotalámico. La evidencia experimental que permite afirmar lo anterior se puede discutir desde varios puntos de vista. El primero tiene que ver con la capacidad de *Klf4* para interactuar físicamente con diversas proteínas, en este caso *Sp1*.

Reportes previos utilizando diversos modelos han mostrado que la actividad de genes que controlan procesos de diferenciación son blanco tanto de *Klf4* como de *Sp1* (Brembeck and Rustgi, 2000), y que la regulación de dichos genes es a través de las secuencias tipo CACCC o GC, las cuales en ocasiones se encuentran cerca de otras secuencias del mismo tipo, en lo que podría llamarse islas de regulación factor-dependientes, lo que resulta en tipos de regulación completamente opuestos (Feinberg et al., 2007) (Chen et al., 2003). La presencia de estas secuencias en distintos contextos celulares y de regiones cromosómicas contribuye además a incrementar la complejidad de las respuestas a estos factores de transcripción.

El caso de la regulación del gen de TRH durante etapas tempranas del desarrollo involucra el hecho de que la región promotora contiene cuatro elementos de respuesta para factores tipo *Klf* dentro de la región promotora mínima (ver figura 12). Nuestros datos de

retardo electroforético demuestran que estos elementos no sólo son blancos efectivos de *Klf4* y *Sp1*, sino que la interacción DNA-proteína muestra versatilidad en cuanto a que las secuencias CACCC parecen reclutar preferentemente a *Klf4*; sin embargo también parecen reclutar al factor *Sp1*, dependiendo del contexto del promotor, fenómeno que observamos también para las cajas tipo GC.

Estos resultados en conjunto con aquellos de los ensayos de luciferasa, permitieron determinar que nuestro modelo de estudio se comporta de acuerdo con un modelo en el que ambos factores actúan de manera sinérgica para activar la expresión de TRH, similar a la regulación del gen laminina- γ 1 de la rata (Higaki et al., 2002). Esta idea se refuerza con lo observado cuando se mutan los sitios CACCC, en donde observamos que los niveles basales de la actividad transcripcional aumentaron de manera significativa, pero además, dicha actividad se incrementó aún más cuando sobre-expresamos al factor *Klf4* en ese contexto.

Adicionalmente, observamos que los dos primeros sitios (KEM1 y GCA), son cruciales para la regulación, ya que la actividad del reportero se redujo significativamente al abatir la capacidad de unión, en conjunto, de ambos sitios, lo que indica un proceso de cooperación cis-regulatoria y/o trans-regulatoria, ejercida por ambos elementos de respuesta en el promotor, así como la actividad de los factores *Klf4* y *Sp1*, respectivamente, (Figura 21). Un fenómeno similar fue reportado en el control de la expresión del gen que codifica para la enzima monoamino-oxidasa (*MAO*); la mutación puntual de los elementos tipo CACCC y cajas tipo GC presentes en la región promotora, mostraron que ambos actúan como elementos represores, y la unión de los factores transcripcionales *Fklf* o *Sp1*, incrementa este efecto (Ou et al., 2004).

Además, demostramos que los factores *Klf4* y *Sp1* interactúan físicamente *in vivo*, durante etapas tempranas del desarrollo hipotalámico, y que dicha interacción desaparece en la etapa adulta. En ese sentido, si consideramos el hecho de que la expresión tanto del RNAm como de las proteínas para *Klf4* y *Sp1*, se expresan de manera basal a lo largo del desarrollo hipotalámico (ver figuras 13 y 18), dicha expresión se ve reflejada a nivel de actividad sólo en estadios específicos, sugiriendo por un lado, que existen mecanismos adicionales de control en la expresión del gen de TRH, y por otro, que ambos factores responden a diversos mecanismos de regulación tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Zhang et al., 1998b) (Armstrong et al., 1998).

El segundo argumento se relaciona con los datos obtenidos a partir de los experimentos *in vivo*, en los que la interacción de *Klf4* con el promotor de TRH recapitulan lo observado en los experimentos *in vitro*. Los datos observados con la inmunoprecipitación de cromatina (*ChIP*) indican que, efectivamente, no sólo *Klf4* sino también *Sp1*, reconocen y se unen a los elementos tipo CACCC y GC *in vivo*, tanto en etapas embrionarias como en la etapa adulta. Cabe destacar el hecho de que *Sp1* predomina, en cuanto los niveles de unión al promotor, en el desarrollo embrionario y *Klf4* lo hace en la etapa adulta aunque de forma discreta. Esto es significativo desde el punto de vista molecular, ya que a pesar de que no observamos niveles elevados de expresión del *Klf4* en esta etapa, la expresión endógena es suficiente para unirse al promotor del gen de TRH.

En este sentido, reportes previos se ha demostrado que la activación e inactivación de genes regulados por miembros de la familia de factores tipo *Klf*, puede depender de modificaciones postraduccionales como la acetilación o la sumoilación (Wei et al., 2006) (Evans et al., 2007); por lo tanto, pensamos que los cambios en la ocupación del promotor

de TRH dependientes del etapa de desarrollo analizada, podrían explicarse en el sentido de este tipo de modificaciones sobre *Klf4*, interfiriendo o incluso incrementando su actividad biológica para regular a sus genes blanco (Bieker, 2001).

Los experimentos de *ChIP* demuestra que tanto *Klf4* como *Sp1* se unen al promotor de TRH, sin embargo, no se puede descartar el hecho de que existen mecanismos adicionales en el control de la expresión de TRH, independientes de aquellos en los que se involucra a factores transcripcionales, tales como los receptores a hormona tiroidea, control por glucocorticoides y/o factores tróficos como BDNF (Joseph-Bravo et al., 1998; Guerra-Crespo et al., 2001; Cote-Velez et al., 2008; Carreon-Rodriguez et al., 2009) (Perez-Martinez et al., 1998). Es probable además que la respuesta a hormonas o factores tróficos pueden modificar no sólo la expresión de genes que codifican a los propios péptidos, sino también factores transcripcionales que regulan su expresión, en este caso *Sp1* y *Klf4* (King et al., 2003).

Evidencia sobre cómo *Klf4* contribuye a la diferenciación neuronal dentro del SNC es escasa. De hecho, existen hasta el momento dos reportes en los que se ha demostrado que el tratamiento de neuronas corticales en cultivo con los agonistas NMDA (*N-metil-D-aspartato*) y/o AMPA (*3-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato*), induce la expresión del gen de *Klf4*, resultando en la regulación negativa de genes relacionados con el control del ciclo celular (Zhu et al., 2009) y que la inducción de la diferenciación de las células *PC12* con la neurotrofina NGF (factor de crecimiento nervioso), induce la expresión de varios genes, de forma rápida, entre ellos, el de *Klf4* (Dijkmans et al., 2009); sin embargo las implicaciones fisiológicas de estos resultados, no están completamente claras.

Sabemos también que la vía de señalización inducida por los factores TGF- β 1, así como BMP-2, 4 y 6, inducen la actividad de unión de *Klf4* al promotor del gen de actina del músculo liso (*SM22 α*) durante la diferenciación de la pared vascular, en la transición de embriones a la etapa neonatal (King et al., 2003).

En nuestro laboratorio se ha obtenido evidencia experimental de que TGF- β regula la expresión del gen de TRH en cultivos primarios de hipotálamo (datos no publicados), por lo tanto, es probable que la vía de señalización TGF- β -*Klf4*, pueda regular el proceso de diferenciación de algunos fenotipos hipotalámicos.

En segundo lugar, el punto de vista relacionado con la remodelación de la cromatina. Se ha determinado que la curvatura o nivel de enrollamiento de la molécula de DNA correlaciona directamente con la capacidad de los factores de transcripción para acceder a sus elementos de respuesta en la misma (Nagaich et al., 1999). Nosotros notamos que la actividad transcripcional se alteró de forma significativa cuando mutamos cualquiera de los elementos KEM1 y GC-A; la mutación del segundo sin embargo, tiene un efecto más profundo sobre dicha actividad, posiblemente, debido a que altera la actividad cooperativa entre *Klf4* y *Sp1*, impidiendo el reclutamiento de co-factores o inclusive, alterando la curvatura de la región promotora, lo que resultaría en la interferencia en la formación de un complejo remodelador de la cromatina.

Se ha demostrado que miembros de la familia de factores tipo *Klf* interactúan con proteínas que participan en la formación de complejos remodeladores de cromatina, como *CtBP/P300*, *PCAF* y *SWI/SNF*, entre otros (Zhang and Derynck, 2000) (Turner and Crossley, 1998) (Zhang and Bieker, 1998) (Song et al., 2002) (Armstrong et al., 1998) (Fernandez-Zapico et al., 2003). De hecho la actividad inductora de *Klf4* esta sujeta a

regulación por acetilación, mediada por el factor *p300/CBP*; o desacetilación mediada por desacetilasas de histonas (*HDAC*) (Evans et al., 2007).

En base a nuestros datos, proponemos que el elemento GC-A, podría ser capaz de reclutar a *p300/CBP* a través del factor *Sp1*, como se ha demostrado previamente (Naar et al., 1998), permitiendo la remodelación de la cromatina local y/o la acetilación directa de *Klf4*. Es posible que el elemento GC-A pueda ser esencial en la regulación del gen de TRH durante el desarrollo embrionario. No obstante, para determinar con mayor precisión el papel que pudiese tener *p300/CBP* y las *HDACs*, es necesario realizar nuevos experimentos.

Adicionalmente, la remodelación de cromatina puede ser de importancia en el proceso de regulación de la expresión del gen de TRH, ya que además de poseer varios elementos de respuesta a diversos factores transcripcionales (Pérez-Martínez, 1999), la región promotora posee regiones ricas en secuencias tipo CpG, las cuales han sido asociadas con diferenciación neuronal durante etapas tempranas del desarrollo a través de la remodelación de tipo epigenético (Feng et al., 2007) (Hsieh et al., 2004). Evidencias de otros grupos sugieren que la sobre-expresión de *Klf4* en conjunto con otros factores transcripcionales como *Oct4*, *Nanog* y *c-Myc*, en células somáticas o células troncales, induce cambios que remodelan cromatina para poder re-programar el fenotipo celular (Takahashi and Yamanaka, 2006) (Nakagawa et al., 2008) (Kim et al., 2008).

Más recientemente, se ha obtenido evidencia a favor de esta idea. Mediante el uso de células troncales embrionarias (ESC), células troncales hematopoyéticas (HEC) y neuroesferas derivadas de células troncales neuronales (NEC), tratadas con los agentes remodeladores de cromatina *trichostatina A (TSA)* y *5-Aza-2'-deoxicitidina (AzaC)*, se

observó que dichas drogas modifican los niveles de expresión de genes involucrados con mantenimiento de la pluripotencia, entre los cuales se identificó a *Oct4*, *Nanog* y *Klf4*, entre otros (Ruau et al., 2008).

Por último, y basados en las funciones previamente caracterizadas de *Klf4* y dado que su expresión coincide con la etapa de consolidación de los fenotipos neuronales en el hipotálamo, creemos que en la etapa embrionaria, *Klf4* podría participar en la regulación de la proliferación de los progenitores neuronales, regulando negativamente genes involucrados en este proceso, así como activando genes de diferenciación. Más tarde, durante la etapa post-natal, *Klf4* podría regular la expresión del gen de TRH, ya que la

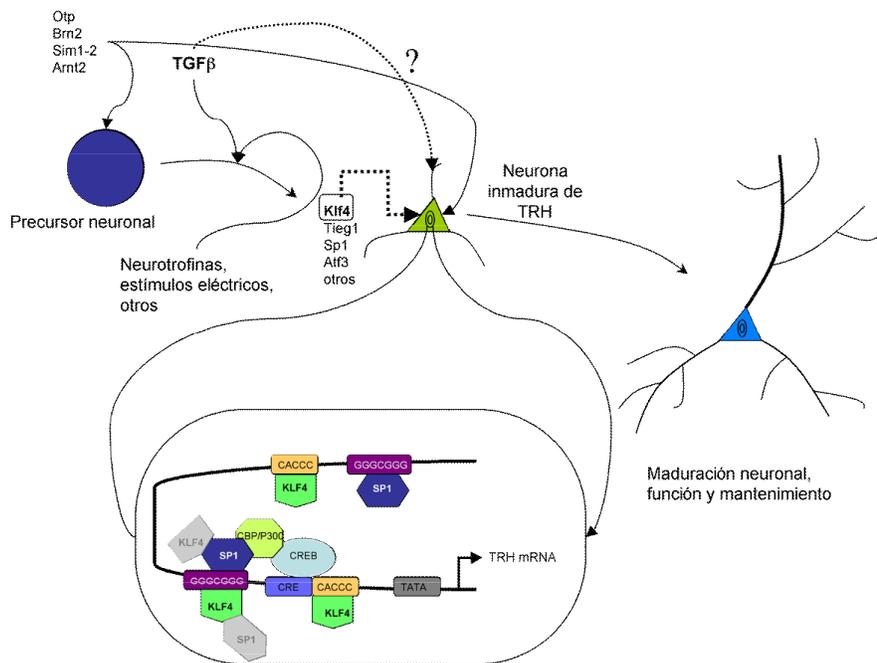


Figura 30. El factor de transcripción *Klf4* participa en el proceso de diferenciación terminal de neuronas TRHérgicas hipotalámicas. El precursor neuronal, arriba a la izquierda, está sujeto a la regulación mediada por factores transcripcionales del tipo *bHLH* y de tipo homeótico (*Otp*, *Brn2*, *Sim1-2*, y *Arnt2*), los cuales lo sensibilizan para responder a otro tipo de señales en etapas posteriores, entre ellas, las de neurotrofinas como BDNF o NGF. Por otro lado, la participación de *Klf4* puede ocurrir en conjunto con la acción de otros factores (*Sp1*, *CPB/P300*, *CREB*) en el momento en que la neurona inmadura inicia la consolidación de su fenotipo, regulando positivamente la expresión del principal marcador fenotípico, el gen que codifica para TRH. Posteriormente, durante el desarrollo, otro tipo de señales como la actividad eléctrica y el efecto de algunas hormonas y neurotransmisores podrían participar en el mantenimiento del fenotipo en la etapa adulta.

ausencia del factor resulta en la disminución significativa del péptido biológicamente activo. Aunque consideramos que hacen falta experimentos adicionales para entender el papel de *Klf4*, proponemos que es crucial para el gen de TRH en ventanas de tiempo específicas, pero además que puede estar debajo de la cascada de factores transcripcionales como *Otp*, *Sim1* y *2*, así como *Brn2*, ya que los ratones mutantes para *Klf4*, no muestran alteraciones morfológicas comparados con sus similares silvestres.

Como resultado de los datos obtenidos en este trabajo, proponemos un modelo de diferenciación del fenotipo TRHérgico hipotalámico (Figura 30), en el que la actividad del *Klf4* se relaciona estrechamente con la de *Sp1* y otros cofactores como *p300/CBP*. En esta hipótesis planteamos la posibilidad de que la estructura de la cromatina puede participar en el control de la expresión acercando o alejando a los distintos factores unidos al promotor del gen y que la ocupación de los sitios CACCC y GC cambia de acuerdo a la etapa de desarrollo en la que se encuentre la célula.

9. Conclusiones

Los factores de transcripción *Klf4* y *Sp1* reconocen y se unen a los elementos de respuesta tipo CACCC y GC del promotor mínimo del gen de TRH.

Los factores *Klf4* y *Sp1* regulan la actividad transcripcional del gen de TRH de forma independiente y en conjunto.

Los elementos KEM1 y KEM2 actúan como represores de la actividad transcripcional del gen de TRH.

Los elementos KEM1 y SP1A son necesarios pero no suficientes para regular la actividad transcripcional del promotor de TRH.

La ausencia de la expresión y la actividad del factor *Klf4* durante etapas tempranas del desarrollo hipotalámico, disminuye los niveles de expresión del gen de TRH así como la producción del péptido biológicamente activo.

10. Perspectivas

En el presente trabajo proponemos que la actividad de los factores transcripcionales *Klf4* y *Sp1* es importante para la diferenciación terminal del fenotipo neuronal que sintetiza al péptido TRH, a través del control de expresión del gen en etapas tempranas del desarrollo del hipotálamo. De manera interesante observamos que la pérdida de la actividad de *Klf4* durante la etapa de E15 repercute directamente sobre los niveles del RNAm de TRH y que la actividad del mismo en la etapa neonatal es dispensable, pues la expresión del péptido se restablece a sus niveles basales. La evidencia previa obtenida por otros grupos sobre el papel que juegan genes involucrados en la proliferación, la migración y adquisición de identidad posicional de neuronas hipotalámicas, sugiere que existe un grupo de factores con actividad transcripcional que son cruciales para dichos procesos. Sin embargo, los genes o vías de señalización involucrados en los mecanismos de diferenciación terminal de dichos fenotipos no ha sido completamente explicado.

Consideramos que, a pesar de que logramos caracterizar parte del mecanismo usado por *Klf4* y *Sp1* en el curso de la maduración del fenotipo de TRH, estos datos pueden verse además como evidencia importante para plantear cuestiones adicionales sobre las posibles interacciones entre diversos actores antes no considerados, como los miRNAs o procesos remodeladores de cromatina en el control de la diferenciación terminal de fenotipos neuronales de hipotálamo.

Una de las ideas que proponemos es determinar mediante el uso de un ratón condicional para la pérdida del alelo que codifica para *Klf4*, los efectos a nivel de la expresión del gen de TRH, y posiblemente de otros péptidos hipotalámicos como CRH, VP o SS, los cuales podrían poseer secuencias tipo CACCC y/o GC en sus regiones

promotoras; aunque se debe aclarar que el contexto de cromatina en el que se ubican así como la proximidad con otros elementos de respuesta es crucial para incrementar la posibilidad de que sean blanco directo de factores tipo Klf. Sería igualmente interesante poder establecer líneas celulares estables en las que mutaciones puntuales de las secuencias mencionadas, puedan ser evaluadas desde el contexto de cromatina más cercano al que ocurre *in vivo*.

Por otro lado, el uso de ratones nulos para *Klf4* nos ha permitido observar que existe la posibilidad de un efecto compensatorio en la regulación de la expresión de TRH, mediado por factores de transcripción de la misma familia, como es el caso de *Sp1*, el cual se sabe que compensa la pérdida de *Klf4* en cuanto a la regulación de la expresión de genes blanco en la progresión de tumores (Kanai et al., 2006). Una alternativa para poder evaluar de manera más específica el efecto de la pérdida de ambos factores sería el uso de cultivos primarios de hipotálamos de ratones nulos para *Klf4* en los que se pueda bloquear la expresión de *Sp1* mediante el uso de RNAs de interferencia, de tal forma que se pudiera evitar un posible efecto de compensación sobre la expresión de TRH. Será interesante también, el poder determinar si la ausencia de *Klf4*, afecta la fisiología de las neuronas de TRH en la etapa adulta.

Además a los experimentos antes descritos, creemos que es necesario considerar la evidencia creciente sobre el papel que juegan los miRNAs durante el desarrollo embrionario. Se ha demostrado que la regulación en la expresión genética ejercida por los miRNAs es determinante en distintas etapas del desarrollo de distintos tejidos, incluido el cerebro (Krichevsky et al., 2003) (Harfe, 2005), por lo tanto, no es difícil imaginar que en alguna de las ventanas del desarrollo neuronal del hipotálamo, entre ellas la diferenciación

terminal, uno o más tipos de miRNAs estén involucrados en su control. Para poder establecer si alguno de los genes que están involucrados en el proceso de diferenciación terminal del hipotálamo, incluyendo a *Sp1* y *Klf4*, es blanco de regulación mediada por miRNAs, será interesante determinar cuales son los que se expresan durante diversas ventanas del desarrollo hipotalámico. Del mismo modo, identificar secuencias responsivas en las regiones 3' no traducidas de los RNAm de los genes que codifican a los péptidos hipotalámicos: CRH, TRH SS, VP, entre otros; así como de los de factores de transcripción que se unan a sus regiones promotoras. Posteriormente, la identificación de blancos será útil en la aplicación de técnicas de pérdida y ganancia de función, que en conjunto con estudios de expresión y de activación de vías de señalización, pueden aportar mayor información sobre el papel de los miRNAs en el desarrollo del hipotálamo.

Otro de los temas que resulta interesante como línea de investigación es la regulación de la estructura de la cromatina en el control de la expresión génica, la cual esta relacionada con la determinación y el mantenimiento de fenotipos celulares de diversos tejidos, incluyendo el SNC (Feng et al., 2007) (Hsieh and Gage, 2005) (Colvis et al., 2005; Wu et al., 2007) (Tsankova et al., 2004) (Hsieh et al., 2004). Un ejemplo de la relevancia del control epigenético sobre el fenotipo neuronal se determinó en un estudio realizado para determinar el papel de la enzima transferasa de metilo-1 (*Dnmt1*), en donde se mostró que la modificación en los niveles de metilación del DNA en precursores neuronales modifica la función y la sobrevivencia de neuronas del cerebelo en etapas postnatales del ratón (Fan et al., 2001), lo cual resalta la importancia del control epigenético en la maduración neuronal.

En nuestro caso, la determinación del estado de metilación del DNA, y de los niveles de acetilación de las histonas durante diversas etapas del desarrollo hipotalámico permitiría descubrir mecanismos novedosos en cuanto al papel del control epigenético sobre los fenotipos peptidérgicos. Además, dado que los patrones de metilación y acetilación, pueden ser sujetos de regulación, resultará interesante poder determinar bajo que tipo de estímulo esta regulación se ve afectada.

11. Apéndice A, Figuras suplementarias 1 y 2

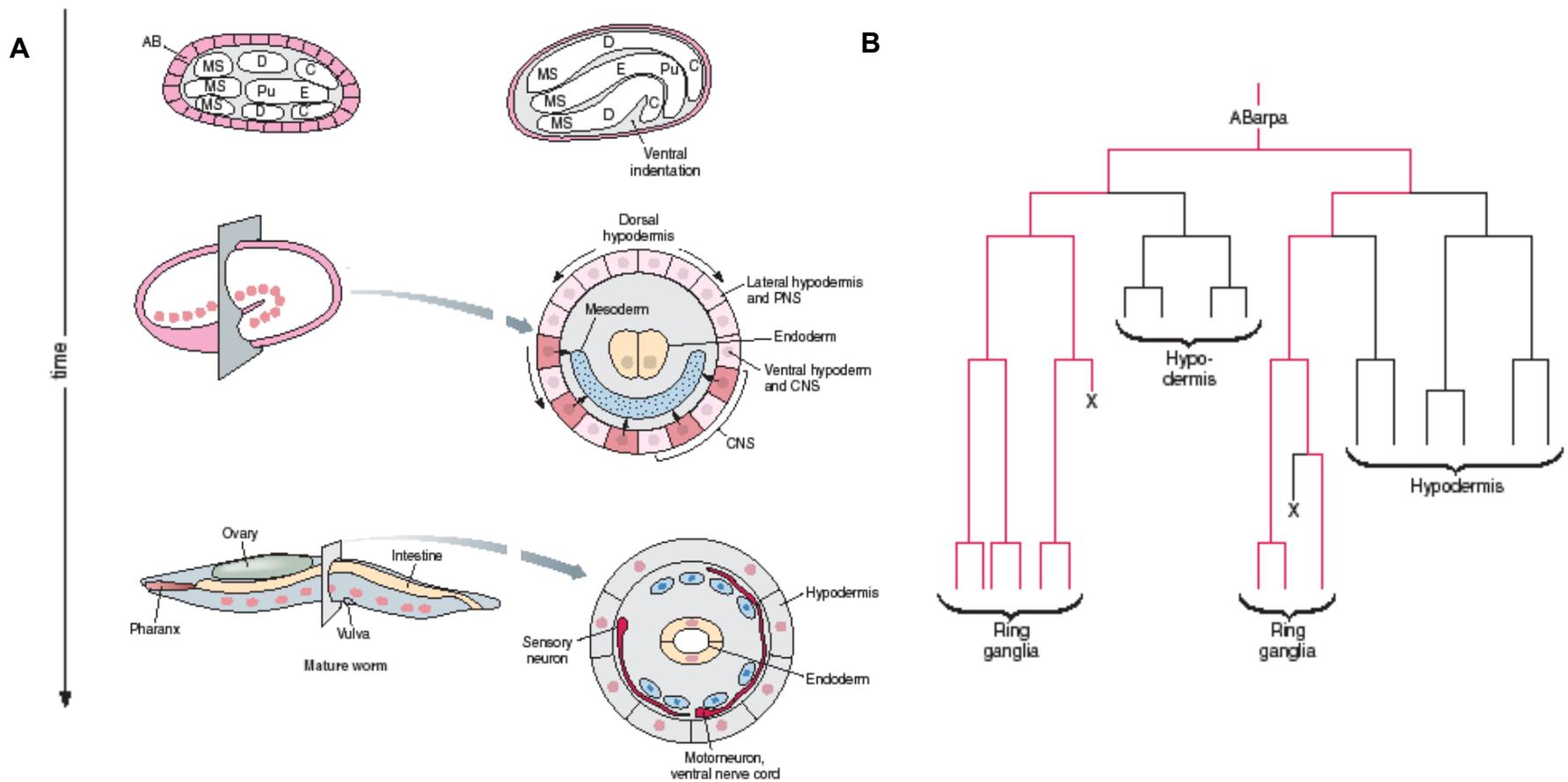


Figura Suplementaria 1. Proceso de gastrulación de *C. elegans*. **A)** En esta figura se destaca la relación existente entre los linajes neuronales e hipodermales. Durante la etapa temprana del proceso los blastómeros MS, E, C y D, migran hacia el interior del embrión, y son rodeados por una capa de células derivadas de la progenie de los blastómeros AB. Los blastómeros MS junto con los E, y D, darán origen al mesodermo y endodermo; mientras que la progenie dorso-lateral de los blastómeros AB, origina el sistema nervioso periférico formado por las neuronas sensoriales y motoneuronas; la progenie ventro-lateral de los blastómeros AB, originan a su vez, el sistema nervioso central, a través de la formación de los anillos nerviosos. **B)** Derivación del linaje de los blastómeros AB, en donde se puede observar que se generan 9 neuronas (líneas rojas) y 10 células hipodermales (líneas negras), tras 5 rondas de división. Tomado de: Sanes DH., Reh TA. & Harris WA., 2006. Development of the nervous system, 2a Ed. Elsevier Academic Press, Londres Inglaterra.

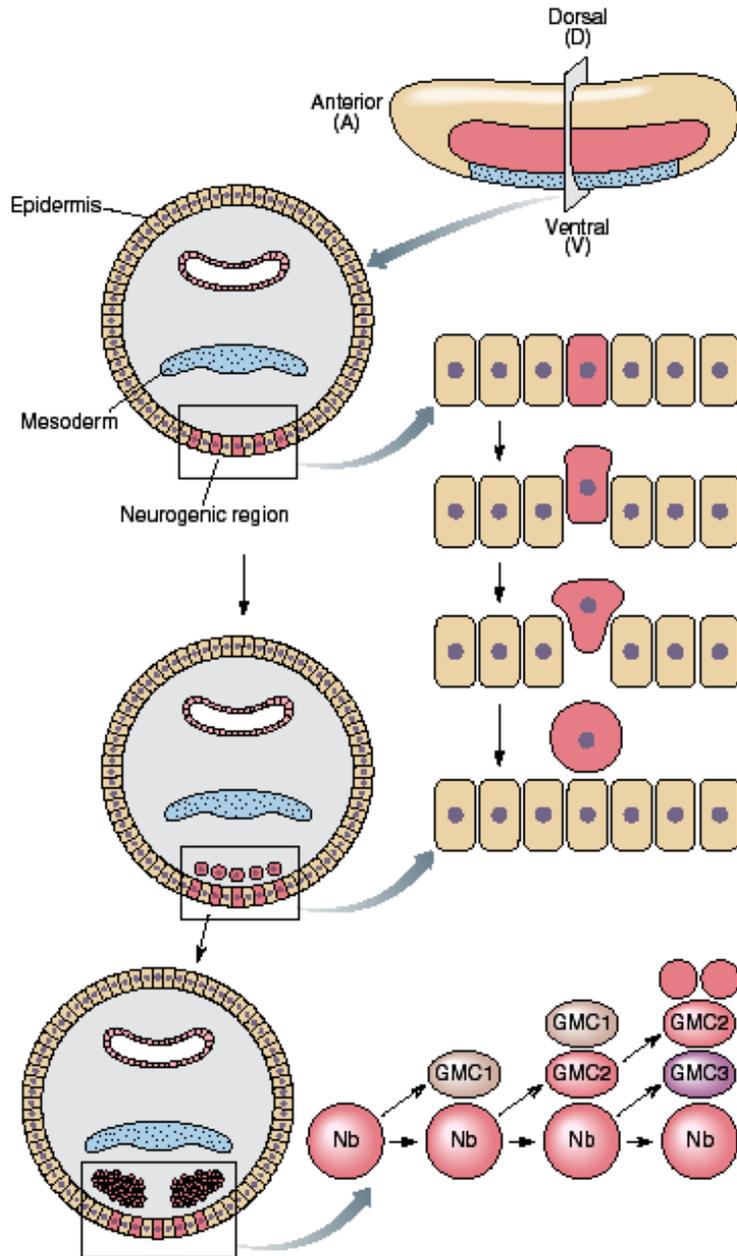


Figura Suplementaria 2. Los neuroblastos en *D. melanogaster* se separan del ectodermo neural por el proceso de delaminación. Los neuroblastos se agrandan en relación a sus células vecinas y se separan del epitelio. Después de que el primer grupo de neuroblastos se delamina del ectodermo, un segundo grupo de células en el ectodermo inicia su agrandamiento para después delaminar. Los neuroblastos delaminados generan varias neuronas según un patrón estereotipado de divisiones celulares. La primera división celular produce un célula hija conocida como célula madre ganglionar (GMC). La primera GMC se divide para formar neuronas, mientras que el neuroblasto continúa dividiéndose para producir otra GMC. Tomado de: Sanes DH., Reh TA. & Harris WA., 2006. *Development of the Nervous System*, 2a Ed. Elsevier Academic Press, Londres Inglaterra.

12. Apéndice B, “The Krüppel-like factor 4 controls biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone during hypothalamus development”



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce



The Krüppel-like factor 4 controls biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone during hypothalamus development

Carlos Pérez-Monter^a, Miriam Martínez-Armenta^a, Amaya Miquelajauregui^b,
Mayra Furlan-Magaril^c, Alfredo Varela-Echavarría^b, Félix Recillas-Targa^c,
Víctor May^d, Jean-Louis Charli^a, Leonor Pérez-Martínez^{a,*}

^a Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico

^b Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, Querétaro 76230, Mexico

^c Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico, D.F. 04510, Mexico

^d Department of Anatomy and Neurobiology, University of Vermont, College of Medicine, Burlington, VT 05405, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 August 2010
Received in revised form
10 December 2010
Accepted 13 December 2010

Keywords:

Cell differentiation
Gene expression
Hypothalamus
Klf4
Sp1
Thyrotropin releasing hormone (TRH)

ABSTRACT

Embryonic neurogenesis is controlled by the activation of specific genetic programs. In the hypothalamus, neuronal thyrotropin-releasing hormone (TRH) populations control important physiological processes, including energy homeostasis and autonomic function; however, the genetic program leading to the TRH expression is poorly understood. Here, we show that the *Klf4* gene, encoding the transcription factor Krüppel-like factor 4 (Klf4), was expressed in the rat hypothalamus during development and regulated *Trh* expression. In rat fetal hypothalamic cells Klf4 regulated *Trh* promoter activity through CACCC and GC motifs present on the *Trh* gene promoter. Accordingly, hypothalamic *Trh* expression was down-regulated at embryonic day 15 in the *Klf4*^{-/-} mice resulting in diminished bioactive peptide levels. Although at the neonatal stage the *Trh* transcript levels of the *Klf4*^{-/-} mice were normal, the reduction in peptide levels persisted. Thus, our data indicate that Klf4 plays a key role in the maturation of TRH expression in hypothalamic neurons.

© 2010 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

Discrete populations of hypothalamic neurons play important roles in homeostasis by regulating hormone secretion from the pituitary gland. These include neurons producing oxytocin, vasopressin, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone (TRH), somatostatin, growth hormone releasing hormone, gonadotropin releasing hormone, and dopamine. Despite extensive studies on the physiological functions of these neurohormones, the molecular pathways regulating their expression during development are less well known.

In the hypothalamus, development of the hypothophysiotropic TRH neurons of the paraventricular nucleus (PVN) depends on a partially characterized cascade of transcription factors. The transcription

factor Otp, along with the Sim1/Arnt2 heterodimer, controls proliferation and differentiation of neuronal hypothalamic phenotypes. Inactivation of these transcription factors by homologous recombination leads to the absence of the PVN with the resulting loss of *Trh* expression (Burbach, 2000). However, the transcriptional cascade that directly regulates *Trh* expression is still unknown.

To gain insight into the mechanism governing *Trh* expression during embryonic development, we have characterized the transcriptome of rat fetal hypothalamic TRH neurons. This analysis showed that the mRNA encoding the transcription factor Krüppel-like factor 4 (Klf4) was enriched in TRH neurons during development (Guerra-Crespo et al., submitted for publication). Klf4 regulates cell cycle progression (Chen et al., 2003), and cell differentiation by controlling target gene expression in various cell types (Shields et al., 1996; Segre, 2003; Suske et al., 2005). Klf4 knock-out mice die shortly after birth, as a consequence of altered barrier skin function and marked feeding difficulties (Segre et al., 1999). Nonetheless, the molecular role of Klf4 during CNS development is unknown.

In this report we show that Klf4 regulates *Trh* gene expression during hypothalamic development. Klf4 up-regulates *Trh* promoter activity in an additive manner with Sp1. This effect resulted from binding of Klf4 and Sp1 to specific CACCC and GC motifs within

Abbreviations: TRH, thyrotropin releasing hormone; Klf4, Krüppel-like factor 4; Sp1, transcription factor specific protein 1; ChIP, chromatin immunoprecipitation; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; G3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

* Corresponding author at: Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM, A.P. 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico. Tel.: +52 777 3 29 0859; fax: +52 777 3 17 2388.

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

0303-7207/\$ – see front matter © 2010 Published by Elsevier Ireland Ltd.
doi:10.1016/j.mce.2010.12.020

Please cite this article in press as: Pérez-Monter, C., et al., The Krüppel-like factor 4 controls biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone during hypothalamus development. Mol. Cell. Endocrinol. (2011), doi:10.1016/j.mce.2010.12.020

the *Trh* gene promoter. Accordingly, *Klf4* deficient mice showed reduced hypothalamic *Trh* expression at the embryonic day 15 that resulted in diminished bioactive peptide levels. Thus, our data indicate that *Klf4* is part of the differentiation program leading to maturation of TRH expression within the hypothalamus.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and transfection

Hypothalamic primary cultures were prepared as described (Perez-Martinez et al., 2001). Cells ($1.4 \times 10^4/\text{mm}^2$) were transfected as reported (Guerra-Crespo et al., 2003) with a vector containing the *Trh* promoter sequence located between -776 and +84bp (TRH-Luc) (Balkan et al., 1998) or a mutated version, alone or together with the pcDNA-KLF4 and/or pN3-Sp1FL expression vectors. An SV40 promoter-driven β -galactosidase expression vector was used for normalization. Luciferase and β -galactosidase activities were determined 72 h later.

2.2. Site-directed mutagenesis

The KEM1 and GC-A motifs in the rat *Trh* promoter were mutated using the TRH-Luc vector as the template and the GeneTailor Site-Directed mutagenesis kit (Invitrogen). The KEM1 motif (CACCC) at -92/-88bp was mutated using forward (5'-TCCCCTGGCTCTCCGTCAGGTCCTGCTTC-3') and reverse (5'-CTGACGGCAGAGCCGGGGACCCGCCGCT-3') primers with the base substitutions underlined. For the GC-A motif (GGCGGG) at 119/113bp the primers with the base substitutions underlined were: forward, 5'-CACCAAGGTTTCGGAAAGCTGCTAGTCCCCTGGC-3'; and reverse, 5'-GCTTCCGGAACCTGGTGGGGCTGAGC-3'. The resulting constructs were sequenced to verify mutagenesis.

2.3. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts were prepared from hypothalamic tissue as described (Schreiber et al., 1989). Labeled oligonucleotides (Supplementary Table 1) were incubated with 5 μg of nuclear extract for 20 min at 4°C. For super shift assays, nuclear extracts were incubated with 4 μg of anti-Klf4 antibody or anti-Sp1 antibody (sc-14027) for 1 h at 4°C, before the addition of the labeled probe. Then the reaction was carried out as described (Pedraza-Alva et al., 2009).

2.4. Luciferase and β -galactosidase assays

Reporter gene activity was measured using the Dual-Light® system according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Data were represented as the ratio of luciferase activity/ β -galactosidase activity.

2.5. Immunoprecipitation and Western blot

Immunoprecipitation was carried out with 100 μg of nuclear extracts and 1 μg of anti-Klf4 antibody, anti-Sp1 antibody or anti-TrkB antibody (sc-012, Santa Cruz, Biotechnology). Immunocomplexes were harvested with protein A/G sepharose (Santa Cruz, Biotechnology), washed as described (Perez-Martinez and Jaworski, 2005) separated by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and detected as described (Perez-Martinez and Jaworski, 2005).

2.6. Chromatin immunoprecipitation

The chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was performed essentially as described (De La Rosa-Velazquez et al., 2007). The chromatin (fragmented to 300–600bp long) was subjected to immunoprecipitation using 4 μg of anti-Klf4 antibody or, anti-Sp1 antibody. Immunoprecipitated DNA was analyzed by PCR using specific primers for the region encompassing the CACCC and GC sequences of the *Trh* gene promoter (Supplementary Table 1). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) gene primers were used as negative control (Perez-Martinez et al., 2001).

2.7. Animal genotyping and skin permeability assay

Procedures that involved mice and rats were performed according to Institutional guidelines. *Klf4*^{-/-} mice (Segre et al., 1999) were maintained on a C57BL/6 background. Genotyping and the skin barrier assay were performed as described (Hardman et al., 1998).

2.8. RT-PCR

RNA extraction and cDNA synthesis were done as described (Girard et al., 2002). Semiquantitative PCR was carried out as reported (Perez-Martinez et al., 1998) using 50 pmol each of either the *Klf4*-, *Sp1*- or *cyclophilin*-specific forward and reverse primers (Supplementary Table 1). PCR amplification products were analyzed by densitometry using the Fluor-S Multimager acquisition system (Bio-Rad)

and the Quantity One software (Bio-Rad, v 4.2.0). Data were normalized to the non-developmentally regulated gene *cyclophilin* (Al-Bader and Al-Sarraf, 2005).

2.9. Real time quantitative PCR

Total RNA was treated with the Turbo DNA-free kit (Ambion), reverse transcribed with SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), and amplified with Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). *Actin* mRNA level was used as internal normalization control. The real time quantitative PCR (qPCR) was performed on a Rotor-Gene RG-3000 detector (Corbett Research). Relative gene expression was determined by the ΔCt method, using the wild-type hypothalamic cDNA as reference.

2.10. Radioimmunoassay

E15 or P0 fresh rat hypothalamic tissue was sonicated in 20% acetic acid. The extracts were dried and TRH peptide levels were determined by radioimmunoassay as previously described using 1:10,000 anti-TRH antibody (Joseph-Bravo et al., 1979).

2.11. Statistical analysis

Results were calculated as percentage of control. Data shown are the mean \pm SEM; they were analyzed by ANOVA, considered significant at $p < 0.05$, followed by Fisher's PLSD test. In general, data correspond to at least two independent experiments.

3. Results

3.1. *Klf4* is expressed in the rat hypothalamus during the establishment of the TRH neurons in vivo

Since the *Klf4* transcript is enriched in fetal hypothalamic TRH neurons (Guerra-Crespo et al., submitted for publication), we determined the developmental expression profile of hypothalamic *Klf4*. Compared to adult stage, *Klf4* expression was higher at the earliest developmental stages examined [embryonic day (E) 15] peaking at neonate (P0) and postnatal (P) day 7; expression then decreased gradually until adult stage (Fig. 1A). *Klf4* protein was detected at the earliest time point examined (E15) and increased gradually with similar levels maintained between E20 and P21. By adult stage, *Klf4* protein levels were comparable to E15 levels (Fig. 1B). In rat the amount of *Trh* mRNA per hypothalamus increases between E17

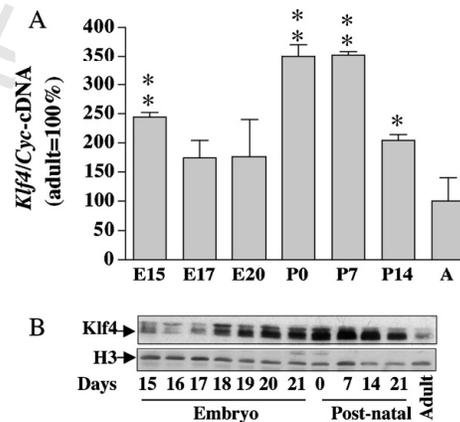


Fig. 1. *Klf4* is expressed during hypothalamic development. (A) Developmental profile of *Klf4* mRNA. At the indicated developmental stages, hypothalami were processed for RT-PCR assays. Data are the ratio of *Klf4* cDNA to *cyclophilin* cDNA (Cyc; internal control) signals in percentage of the adult signal. Results represent the mean \pm SEM of three independent experiments each in triplicate. (B) *Klf4* protein levels during hypothalamus ontogeny. At the indicated developmental stages, nuclear extracts were used for Western-blot assays. Histone H3 (H3) was used as a loading control. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. adult stage by post hoc Fisher analysis.

Please cite this article in press as: Pérez-Monter, C., et al., The Krüppel-like factor 4 controls biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone during hypothalamus development. Mol. Cell. Endocrinol. (2011), doi:10.1016/j.mce.2010.12.020

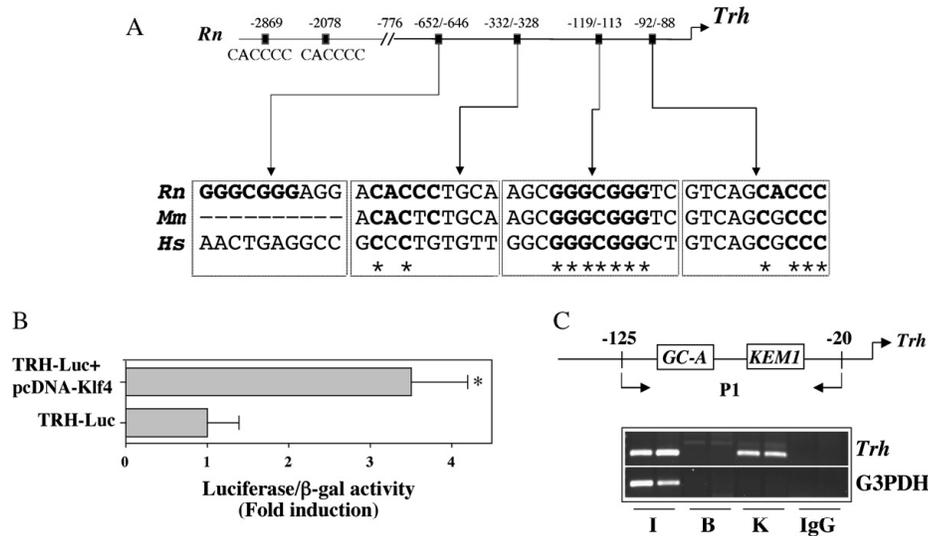


Fig. 2. Klf4 regulates *Trh* gene promoter activity. (A) Schematic representation of the *Trh* gene promoter region of the *Rattus norvegicus* (Rn) indicating relative positions of the identified CACCC and GC motifs. Note that some of the depicted elements are conserved (*) in the *Mus musculus* (Mm) and *Homo sapiens* (Hs) promoter. The position of each motif is indicated relative to the transcription start site. (B) Klf4 enhances *Trh* promoter activity *in vitro*. Primary cultures of fetal (E17) hypothalamic cells were transfected with the minimal *Trh* promoter fused to the luciferase reporter gene (TRH-Luc) alone or together with the pcDNAKlf4 expression vector. TRH-Luc transfected cells included the equivalent concentration of empty pcDNA vector. The luciferase activity was normalized to β-galactosidase activity. Fold induction was calculated relative to TRH-Luc transfected cells. Bars represent the mean ± SEM of three replicates in three independent experiments. **p* < 0.05 vs. TRH-Luc by post hoc Fisher analysis. (C) Klf4 is recruited to the rat *Trh* gene promoter *in vivo*. *Upper panel*: diagram indicating the relative positions (left and right arrows) of the PCR primers (P1) on the rat *Trh* promoter region. *Lower panel*: PCR product derived from ChIP-enriched genomic DNA from E15 hypothalamus. This experiment is a representative of 2–3 replicates in three independent experiments. I: input; B: beads; K: Klf4 antibody; IgG immunoprecipitation.

and P14 (Perez-Martinez et al., 2001); thus, Klf4 expression occurs during a period in which the biosynthesis of TRH is up-regulated.

3.2. Klf4 regulates rat *Trh* gene promoter activity

Klf4 promotes cell differentiation through binding to CACCC or GC motifs present on the regulatory region of target genes (Shields et al., 1996; Philipson and Suske, 1999). Using the MatInspector program (Cartharius et al., 2005) we identified four potential binding sites for Krüppel-like transcription factors within the minimal promoter region of the rat *Trh* gene: two CACCC (−92/−88 and −332/−328 bp) and two GC motifs (−119/−113 and −652/−646 bp) (Fig. 2A). Interestingly, among these elements the −92/−88 and −119/−113 are conserved in the rat, mouse and human *Trh* promoter (Fig. 2A).

To assess whether Klf4 can regulate *Trh* promoter activity, primary fetal hypothalamic cells were co-transfected with the minimal *Trh* promoter region (−776/+84 bp) driving the luciferase reporter gene (TRH-Luc) together with a Klf4 expression vector. This minimal promoter drives *in vitro* reporter expression preferentially in TRH neurons (Balkan et al., 1998). We observed an about 3.5-fold induction of *Trh* promoter activity by Klf4 compared to control cells (Fig. 2B). Consistently with this, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays showed that Klf4 binds to the *Trh* gene promoter *in vivo*. As shown in Fig. 2C, using chromatin derived from E15 rat hypothalamus and specific primers spanning the initial CACCC (KEM1) and GC (GC-A) motifs, we observed the enrichment of the PCR amplification product using the Klf4 immunoprecipitated fraction; in addition, no amplification was detected using an IgG control antibody. This result was specific for the *Trh* promoter since no PCR products were detected using primers from the G3PDH coding region (Fig. 2C). These data suggest that Klf4 can

trans-activate the *Trh* promoter by binding to the two proximal putative Klf sites.

3.3. Klf4 binds to specific sequences on the rat *Trh* gene promoter region

To confirm that the two proximal Klf elements within the minimal *Trh* promoter region are responsible for recruiting Klf4, we performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) using synthetic oligonucleotides containing either the first CACCC sequence (KEM1) or the GC-A motifs (Fig. 3A) together with nuclear extracts from rat hypothalamus. The KEM1 oligonucleotide formed two major DNA–protein complexes (* and **, Fig. 3B). The formation of these complexes was developmentally regulated; however, only the complex (*) could be competed by the addition of a 20–100-fold molar excess of non-labeled KEM1 oligonucleotide (data not shown). The DNA–protein complex (**) was detected at E14, diminished at E15, and was barely detected at E17. It reappeared at E20, decreased gradually at P0 and P7, and disappeared at the adult stage (Fig. 3B).

Experiments using an oligonucleotide spanning the GC motif located at −119/−113 bp (GC-A) showed the formation of a major DNA–protein complex at E14, which then decreased from E15 to E17 (Fig. 3C, *). Complex formation increased at E20, gradually decreased between P0 and P7, and was absent in the adult stage (Fig. 3C, *). Additionally, two minor DNA–protein complexes were also observed (Fig. 3C, **); however, only the major complex (*) could be competed by the addition of a 20- to 100-fold molar excess of non-labeled GC-A oligonucleotide (data not shown).

To determine whether Klf4 binds to the KEM1 and GC-A motifs, super-shift experiments were performed using an anti-Klf4 antibody previously used for EMSA (Zeng et al., 2006) and nuclear

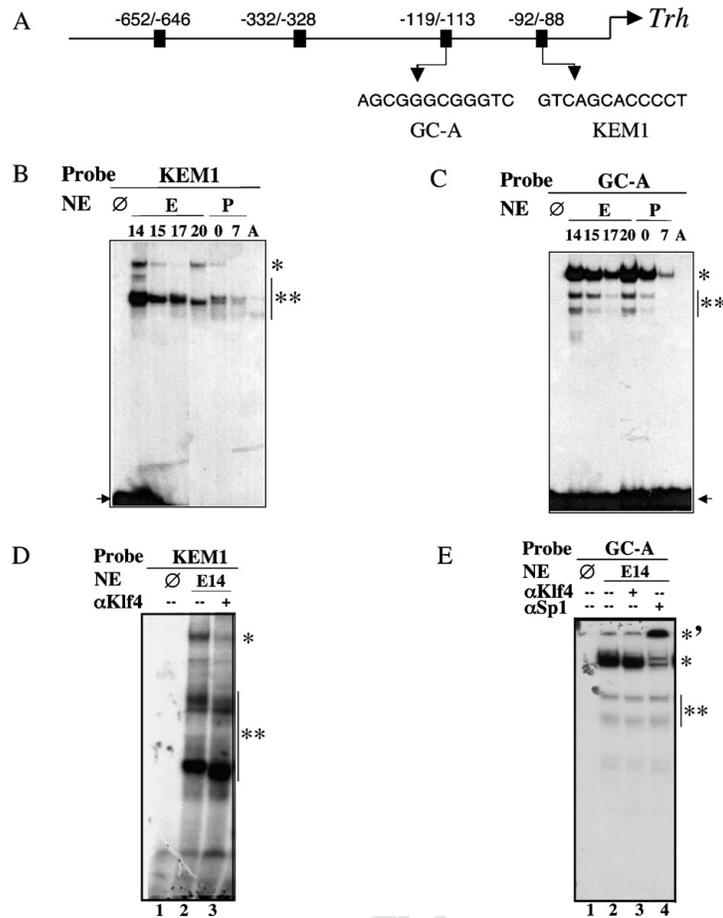


Fig. 3. The Klf4 and Sp1 transcription factors bind to the response elements of the rat *Trh* gene promoter region *in vitro*. (A) Diagram showing the relative position of the KEM1 (CACCC box) and GC-A (GC-rich) motifs. (B and C) EMSA assays were performed with nuclear extracts (NE) from the indicated developmental hypothalamic stage, incubated with the [³²P] ATP-labeled KEM1 (B) or GC-A (C) oligonucleotides and DNA-protein complexes resolved in non-denaturing conditions. (*) Complex of interest and (**) unspecific complexes. (D and E) Super-shift assays using 14-day-old embryonic nuclear extracts (E14) incubated with KEM1 (D) or GC-A (E) oligonucleotides in the absence (D and E, lane 2) or presence (D and E, lane 3; (*)) of the anti-Klf4 antibody or anti-Sp1 antibody (E, lane 4, (**)). (**) Unspecific complexes; (∅): without NE. In the super-shift assays the probe ran out of the gel. Data representative of three independent experiments are shown.

218 extracts from E14 hypothalamus, a stage at which DNA-protein
219 complex formation was more prominent (Fig. 3B and C). The anti-
220 Klf4 antibody abrogated low mobility complex formation with the
221 KEM1 oligonucleotide, indicating Klf4 binding to this sequence
222 (Fig. 3D, compare lanes 2 and 3, *). However, the anti-Klf4 anti-
223 body did not alter the complexes formed by incubation of the E14
224 nuclear extracts with the GC-A oligonucleotide, strongly suggest-
225 ing that Klf4 was not recruited to the GC motif (Fig. 3E, compare
226 lanes 2 and 3, *). Since Klf4 belongs to the transcription factors
227 of the Sp family, and because Sp1 binds preferentially GC boxes
228 and synergizes with Klf4 to control transcription of target genes
229 (Higaki et al., 2002), we investigated whether Sp1 is present in the
230 DNA-protein complexes formed with the GC-A motif. The addi-
231 tion of anti-Sp1 antibody super-shifted the major complex formed
232 with the GC-A oligonucleotide, indicating that Sp1 binds to this
233 sequence (Fig. 3E, compare lanes 2 and 4, **). Consistent with this,
234 RT-PCR and Western-blot analyses demonstrated Sp1 expression
235 during hypothalamus ontogeny from the earliest developmental

236 stage examined (E14) (data not shown). These results indicate that
237 *in vitro* Klf4 is bound to the CACCC motif (KEM1) while Sp1 was able
238 to bind to the GC-A box of the rat *Trh* promoter region.

239 Since Klf4 and Sp1 are expressed during hypothalamic develop-
240 ment and bind to a CACCC motif and a GC box on the rat *Trh* gene
241 promoter, we determined whether both transcription factors regu-
242 late *Trh* transcription. Primary fetal hypothalamic cultures were
243 transfected with TRH-Luc alone or together with Klf4 and/or Sp1
244 expression vectors. As shown in Fig. 2B, over-expression of *Klf4*
245 augmented significantly the reporter activity compared to con-
246 trol cells (Fig. 4A). In contrast, *Sp1* over-expression did not change
247 transcriptional rate compared to control cells; however, *Klf4* and
248 *Sp1* co-expression increased additively luciferase activity (Fig. 4A).
249 These results indicate a trans-acting potential of Klf4 and Sp1 over
250 *Trh* gene expression in fetal hypothalamic cells *in vitro*.

251 To investigate the role of the KEM1 and GC-A motifs on the Klf4
252 and Sp1 mediated *Trh* promoter activity, we mutated the KEM1
253 (gtCCC; ΔKEM1) and/or GC-A (tGcCtaG; ΔGCA) elements to abolish

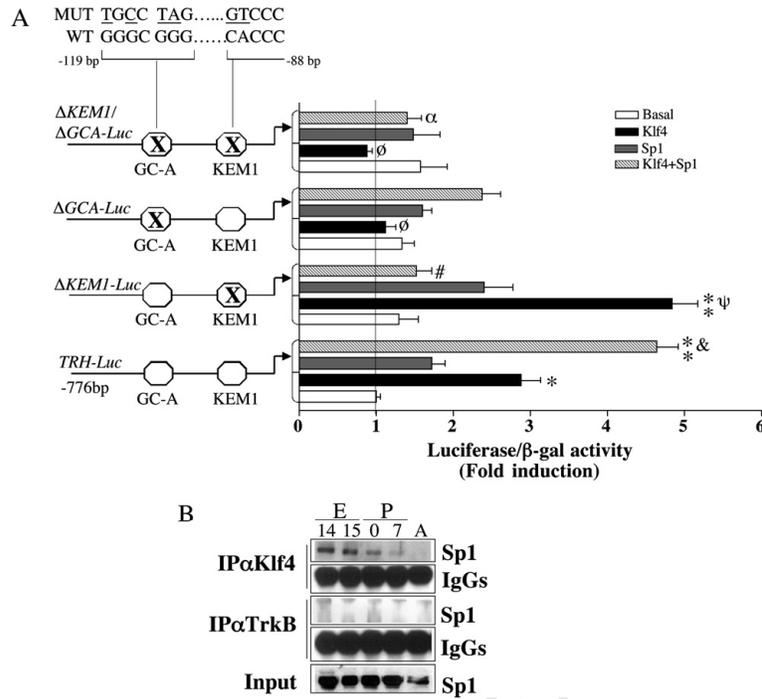


Fig. 4. Klf4 and Sp1 regulate the transcriptional rate of *Trh* gene *in vitro*. (A) Primary cultures of fetal (E17) hypothalamic cells were transfected with either the wild-type *Trh* promoter fused to the luciferase reporter gene (TRH-Luc), or the KEM1 (Δ KEM1-Luc), GC-A (Δ GCA-Luc), or KEM1/GC-A (Δ KEM1/ Δ GCA-Luc) mutated versions of TRH-Luc, alone or together with the pcDNAKlf4 and/or pN3-Sp1FL expression vectors. Wild-type sites are clear white and the presence of the X indicates a mutation. The luciferase activity was normalized to β -galactosidase activity. Fold induction was calculated relative to TRH-Luc transfected cells. Bars represent the mean \pm SEM of three replicates in three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ vs. TRH-Luc. ψ $p < 0.05$ vs. TRH-Luc/Sp1. φ $p < 0.05$ vs. Δ KEM1-Luc. $\#$ $p < 0.05$ vs. TRH-Luc/Klf4/Sp1. \otimes $p < 0.05$ vs. TRH-Luc/Klf4. \circ $p < 0.05$ vs. TRH-Luc/Klf4/Sp1. Basal denotes cells transfected with either the wild-type or mutated version of the TRH promoter alone or together with the equivalent concentration of pcDNA and/or pN3 empty vectors. (B) Klf4-Sp1 interaction *in vivo* at different hypothalamic developmental stages. Nuclear extracts were immunoprecipitated with anti-Klf4 antibody or anti-TrkB antibody used as negative control. Immunocomplexes were subjected to Western-blot analysis using anti-Sp1 antibody. Proteins were revealed with HRP-coupled secondary antibody. E: embryonic day; P: post-natal day; A: adult.

binding of Krüppel-like transcription factors (Higaki et al., 2002), and/or Sp1 (Li and Kellems, 2003), respectively. Primary hypothalamic cultures were co-transfected with the wild-type promoter construct (TRH-Luc), or with Δ KEM1-Luc and/or Δ GCA-Luc constructs, together with Klf4 and/or Sp1 expression vectors. Mutation of the KEM1 site did not alter *Trh* promoter basal activity (Fig. 4A) but, contrary to what we expected, it enhanced Klf4 effect on promoter activity (Fig. 4A). Nevertheless, mutation of the KEM1 site abolished the Klf4-Sp1 mediated *Trh* promoter activity (Fig. 4A). These results indicate that the wild-type KEM1 site exerts a negative effect on the *Trh* promoter activity in response to Klf4; however, Klf4-KEM1 interaction is necessary for Klf4-Sp1 transactivation when Sp1 is bound to the GC-A motif (Fig. 3E, compare lanes 2 and 4, \otimes). Accordingly, mutation of the GC-A site diminished Klf4, and Klf4-Sp1 mediated *Trh* promoter activity (Fig. 4A). These results point out an important regulatory role for the GC-A motif on *Trh* expression. Thus, the fact that the GC-A site is critical for Klf4 and Klf4-Sp1 transcriptional properties, in spite of the absence of binding of Klf4 to the GC-A element (Fig. 3E, compare lanes 2 and 3, \circ), suggests that Klf4 mediates its positive transcriptional activity on the *Trh* promoter independently of DNA binding. Previous studies have shown that Klf4-Sp1 protein-protein interactions regulate transcription (Zhang et al., 1998). To test this possibility we performed co-immunoprecipitation experiments using embryonic and neonatal hypothalamic nuclear extracts. Klf4-Sp1 interaction

was detected at E14 and E15, decreased by P0 and absent in the adult (Fig. 4B). Thus, we propose that the GC-A element cooperates with the KEM1 motif to control Klf4-Sp1 mediated transcriptional activity. Consistently, mutation of both sites had the same effect as the GC-A mutant (Fig. 4A). Therefore, in rat fetal hypothalamic cell cultures the GC-A motif is necessary for positive regulation of *Trh* promoter activity mediated by Klf4 or Klf4-Sp1 but not for basal activity.

3.4. Klf4 is necessary for the early expression of *Trh* in the developing mouse hypothalamus

To further characterize the role of Klf4 *in vivo*, we evaluated *Trh* expression during hypothalamus development in the *Klf4*^{-/-} mouse. The null mutation was confirmed as previously described (Hardman et al., 1998). A survey of the brain of *Klf4*^{-/-} mice did not reveal any apparent gross histological alteration in the hypothalamic area at E15 (data not shown). However, a severe reduction in *Trh* mRNA levels was detected in the *Klf4*^{-/-} (KO) mice hypothalamus at E15 compared to *Klf4*^{+/+} (WT) or *Klf4*^{-/-} compared to *Klf4*^{-/-} (HT). No statistical difference was observed between the *Klf4*^{+/+} and *Klf4*^{+/+} littermates (Fig. 5, upper panel). *Klf4* expression is therefore critical for proper *Trh* gene expression during mouse fetal hypothalamic development and mono-allelic expression of *Klf4* gene is sufficient to maintain *Trh* gene expression.

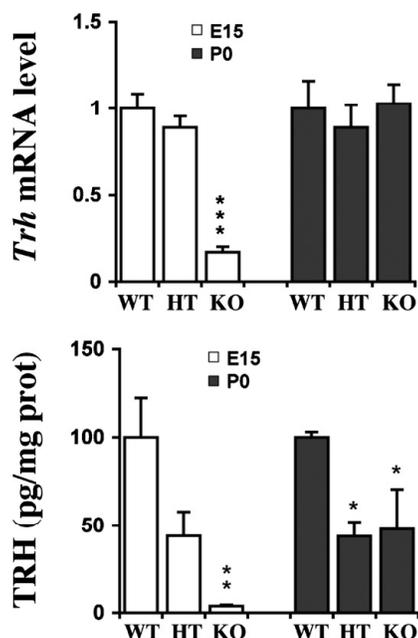


Fig. 5. The Klf4 transcription factor is necessary for proper *Trh* gene expression during fetal development of the mouse hypothalamus. *Trh* mRNA and peptide levels were determined by qRT-PCR (upper panel) and radioimmunoassay (lower panel). Total RNA or peptide extracts were prepared from 15 day-old embryo (E15) or neonate (P0) hypothalamus derived from wild-type (WT), heterozygous (HT) or knockout (KO) mice. For qRT-PCR, relative expression levels were determined using actin as a constitutive expression gene and the WT values for normalization. Data are in percentage of the signal in WT animals taken as one (upper panel) or 100% (lower panel). Results represent the mean \pm SEM of three (qRT-PCR) or two (radioimmunoassay) independent experiments in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. WT by post hoc Fisher analysis.

At the neonate stage (P0) no differences in *Trh* transcripts levels were detected among *Klf4*^{-/-}, *Klf4*^{+/-} and *Klf4*^{+/+} mice (Fig. 5, upper panel). Therefore, at P0 alternative signaling pathways that do not rely on Klf4, e.g. hormones (Farkas et al., 2008), neurotrophins (Guerra-Crespo et al., 2001), or neuropeptides (Lechan and Fekete, 2006) control *Trh* gene transcription, or other members of the Krüppel-like family (Klf2, Klf5 or Klf9) (Jiang et al., 2008; Scobie et al., 2009) compensate the loss of *Klf4*.

Reduction in *Trh* mRNA level at E15 was reflected at the peptide level. Hypothalamic TRH content decreased significantly in the E15 *Klf4*^{-/-} mice compared to *Klf4*^{+/+} mice (Fig. 5, lower panel). A trend for reduction in TRH levels was also observed in the haplo-insufficient *Klf4* mice with respect to *Klf4*^{+/+} mice (Fig. 5, lower panel). In contrast to *Trh* mRNA levels, TRH peptide levels at P0 were significantly reduced in both *Klf4*^{+/-} and *Klf4*^{-/-} compared to *Klf4*^{+/+} littermates (Fig. 5, lower panel). No difference was observed in the *Klf4*^{-/-} compared to *Klf4*^{+/-} mice (Fig. 5, lower panel). These results suggest that although compensatory mechanisms for *Trh* transcript expression lead to TRH synthesis recovery in the P0 *Klf4*^{-/-} mice, there was an apparent delay in the accumulation of bioactive peptide.

4. Discussion

Some of the peptidergic neurons of the hypothalamus mediate homeostasis by regulating hormone secretion from the pituitary

gland. Among these, TRH cells of the PVN play an important role coordinating the hypothalamus-pituitary-thyroid axis function. Other TRH neurons of the hypothalamus have yet poorly understood roles; they may control behavioral arousal, core body temperature and feeding (Gotoh et al., 2007; Lechan and Fekete, 2006; Hara et al., 2009). However, little is known about the mechanisms regulating *Trh* gene expression during hypothalamic development. To gain insight into the molecular mechanisms underlying TRH neuron development, we recently characterized the transcriptome of embryonic hypothalamic TRH neurons. This study demonstrated that the transcription factor Krüppel-like 4 (*Klf4*) is enriched in the TRH neurons (Guerra-Crespo et al., submitted for publication). Evidence showing that *Klf4* contributes to neuronal physiology within the CNS is scarce. Treatment of embryonic cortical neurons cultures with NMDA induces *Klf4* gene expression, which facilitates apoptotic cell death (Zhu et al., 2009). *Klf4* is one of the early genes induced by NGF during PC12 cell differentiation; however, the final *Klf4* target genes are unknown (Dijkmans et al., 2009). These findings suggest that in response to different signaling pathways *Klf4* may play a role in the development of some neuronal cells. Consistently, here we report that *Klf4* is expressed in the developing rat hypothalamus; overexpression of *Klf4* induced *Trh* promoter activity in rat fetal hypothalamic cultures; mutation of a Klf element (GC-A) in the minimal *Trh* promoter significantly inhibited the ability of *Klf4* to transactivate the promoter; and gel shift as well as ChIP studies both verified that *Klf4* can bind to the minimal *Trh* promoter region. Furthermore, we show that *Klf4* and the transcription factor Sp1 co-regulate *Trh* gene transcription in cultures of rat fetal hypothalamus. As for *Klf4*, mutation of the GC-A site significantly diminished *Klf4*-Sp1 mediated *Trh* promoter activity. Based on these observations, we propose that the GC-A motif is necessary for positive regulation of *Trh* promoter activity mediated by *Klf4* or *Klf4*-Sp1. Previous studies in our laboratory have shown that this GC-A motif is bound by nuclear extracts from hypothalamic cells stimulated by cAMP or glucocorticoids (Diaz-Gallardo et al., 2010); it probably serves multiple roles in the transcriptional control of *Trh* expression.

The GC-A element may be involved in the interactions needed for higher-order complex formation to control *Trh* transcription. As previously shown (Zhang et al., 1998), here we demonstrated that *Klf4* interacts with Sp1. Most notably, this physical association occurs early in development but it is absent in the adult hypothalamus. Protein-protein interactions among sequence-specific DNA binding transcription factors suggest specific modes of regulation. Thus, it is conceivable that Sp1 bound to the GC-A motif (our EMSA data) may increase the affinity of *Klf4* to a weak recognition site (Fig. 2A) via protein-protein interactions. Alternatively, introduction of a mutation in the GC-A element hinders *Klf4* or *Klf4*-Sp1 activity by impeding the recruitment of co-activators to the site. This might be achieved through specific chromatin modifications resulting from *Klf4* interaction with either P300 or CBP as previously reported (Evans et al., 2007). Nevertheless, it is safe to suggest that we have identified a sequence motif that could mediate interactions between *Klf4* and Sp1 on the minimal *Trh* promoter. Additional studies are therefore necessary to delineate the exact effect of *Klf4*-Sp1 interaction on regulating *Trh* promoter activity.

In accordance with our data showing regulation of *Trh* transcription by *Klf4* *in vitro*, *Trh* gene expression was down-regulated in *Klf4* null mice embryos. Although it is necessary to corroborate the direct binding of *Klf4* to the mouse *Trh* promoter, the *Klf4*^{-/-} mice phenotype suggests that as for the rat, the mouse *Trh* gene is a target of *Klf4*. This is further supported by the high degree of identity in the GC-A motif in the rat, mouse and human *Trh* promoter. Preliminary data in our laboratory suggest that the effect of *Klf4* is specific for TRH, since the hypothalamic CRH mRNA levels were not changed in the *Klf4*^{-/-} compared to *Klf4*^{+/+} mice (data not shown). Further

Please cite this article in press as: Pérez-Monter, C., et al., The Krüppel-like factor 4 controls biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone during hypothalamus development. Mol. Cell. Endocrinol. (2011), doi:10.1016/j.mce.2010.12.020

experiments are required to elucidate whether the reduction of *Trh* mRNA and peptide levels observed in the *Klf4*^{-/-} mice occurs in non-hypophysiotropic and/or hypophysiotropic TRH neurons.

In summary, we show that *Klf4* is expressed in the developing hypothalamus, and together with Sp1 co-regulates *Trh* gene transcription during embryonic development. In accordance, *Trh* gene expression is down-regulated in *Klf4* null mice embryos in a narrow temporal window during hypothalamic development. Further experiments are required to elucidate whether this reduction occurs in the entire hypothalamic TRH cell population or in a specific subtype. We conclude that *Klf4* is part of the developmental program that up-regulates *Trh* gene expression in hypothalamic neurons during the terminal phase of differentiation.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. G. Pedraza-Alva (Instituto de Biotecnología, UNAM) for insightful scientific discussions, to Dr. K.M. Brass (University of Vermont, USA) for critical review of the manuscript, to K. Schultz (University of Vermont, USA), M. Cisneros, Virginia Barajas and Oswaldo López for technical support, to Dr. J. Segre (NIH, USA) for sharing the *Klf4*^{-/-} mice, to Dr. G. Owens (Virginia University, USA) for the kind gift of the *Klf4* expression vector, to Dr. G. Suske (Philips Universität, Germany) for the Sp1 vector, to Dr. Chi-Chuan Tseng (Boston University, USA) for the gift of the anti-*Klf4* antibody and to the animal house staff for maintaining our rat/mice colonies. Also, we thank A. Martínez and R. Rodríguez for computer assistance. This work was supported by grants from DGAPA-UNAM (IN227506-3, IN224909) and CONACyT (61208, 42605).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.mce.2010.12.020.

References

- Al-Bader, M.D., Al-Sarraf, H.A., 2005. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 156, 38–45.
- Balkan, W., Taviani, M.A., Gkonos, P.J., Roos, B.A., 1998. Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology* 139, 252–259.
- Burbach, J.P., 2000. Genetic pathways in the developmental specification of hypothalamic neuropeptide and midbrain catecholamine systems. *Eur. J. Pharmacol.* 405, 55–62.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Halmmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., Werner, T., 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21, 2933–2942.
- Chen, X., Whitney, E.M., Gao, S.Y., Yang, V.W., 2003. Transcriptional profiling of Kruppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation. *J. Mol. Biol.* 326, 665–677.
- De La Rosa-Velazquez, I.A., Rincon-Arano, H., Benitez-Bribiesca, L., Recillas-Targa, F., 2007. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res.* 67, 2577–2585.
- Diaz-Gallardo, M.Y., Cote-Velez, A., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 2010. A rapid interference between glucocorticoids and cAMP-activated signalling in hypothalamic neurons prevents binding of phosphorylated cAMP response element binding protein and glucocorticoid receptor at the CRE-like and composite GRE sites of thyrotropin-releasing hormone gene promoter. *J. Neuroendocrinol.* 22, 282–293.
- Dijkmans, T.F., van Hooijdonk, L.W., Schouten, T.G., Kamphorst, J.T., Fitzsimons, C.P., Vreugdenhil, E., 2009. Identification of new nerve growth factor-responsive immediate-early genes. *Brain Res.* 1249, 19–33.
- Evans, P.M., Zhang, W., Chen, X., Yang, J., Bhakat, K.K., Liu, C., 2007. Kruppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 282, 33994–34002.

- Farkas, I., Varju, P., Szabo, E., Hrabovszky, E., Okada, N., Okada, H., Liposits, Z., 2008. Estrogen enhances expression of the complement C5a receptor and the C5a-agonist evoked calcium influx in hormone secreting neurons of the hypothalamus. *Neurochem. Int.* 52, 846–856.
- Girard, B.M., May, V., Bora, S.H., Fina, F., Braas, K.M., 2002. Regulation of neurotrophic peptide expression in sympathetic neurons: quantitative analysis using radioimmunoassay and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Regul. Pept.* 109, 89–101.
- Gotoh, K., Fukagawa, K., Fukagawa, T., Noguchi, H., Kakuma, T., Sakata, T., Yoshimatsu, H., 2007. Hypothalamic neuronal histamine mediates the thyrotropin-releasing hormone-induced suppression of food intake. *J. Neurochem.* 103, 1102–1110.
- Guerra-Crespo, M., Ubieta, R., Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., Perez-Martinez, L., 2001. BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB⁺ hypothalamic neurons in primary culture. *Eur. J. Neurosci.* 14, 483–494.
- Guerra-Crespo, M., Charli, J.L., Rosales-García, V.H., Pedraza-Alva, G., Perez-Martinez, L., 2003. Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons. *J. Neurosci. Methods* 127, 179–192.
- Hara, J., Gerashchenko, D., Wisor, J.P., Sakurai, T., Xie, X., Kilduff, T.S., 2009. Thyrotropin-releasing hormone increases behavioral arousal through modulation of hypocretin/orexin neurons. *J. Neurosci.* 29, 3705–3714.
- Hardman, M.J., Sisi, P., Banbury, D.N., Byrne, C., 1998. Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* 125, 1541–1552.
- Higaki, Y., Schullery, D., Kawata, Y., Shnyryeva, M., Abrass, C., Bomsztyk, K., 2002. Synergistic activation of the rat laminin gamma1 chain promoter by the gut-enriched Kruppel-like factor (GKLF/KLF4) and Sp1. *Nucleic Acids Res.* 30, 2270–2279.
- Jiang, J., Chan, Y.S., Loh, Y.H., Cai, J., Tong, G.Q., Lim, C.A., Robson, P., Zhong, S., Ng, H.H., 2008. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 353–360.
- Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., Palacios, J.M., Kordon, C., 1979. Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 104, 801–806.
- Lechan, R.M., Fekete, C., 2006. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog. Brain Res.* 153, 209–235.
- Li, M., Kellems, R.E., 2003. Sp1 and Sp3 are important regulators of AP-2gamma gene transcription. *Biol. Reprod.* 69, 1220–1230.
- Pedraza-Alva, G., Zingg, J.M., Donda, A., Perez-Martinez, L., 2009. Estrogen receptor regulates MyoD gene expression by preventing AP-1-mediated repression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389, 360–365.
- Perez-Martinez, L., Jaworski, D.M., 2005. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal. *J. Neurosci.* 25, 4917–4929.
- Perez-Martinez, L., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 2001. Development of pro-TRH gene expression in primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 130, 73–81.
- Perez-Martinez, L., Carreon-Rodriguez, A., Gonzalez-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.
- Philipsen, S., Suske, G., 1999. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/KLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 27, 2991–3000.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., Schaffner, W., 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17, 6419.
- Scobie, K.N., Hall, B.J., Wilke, S.A., Klemenhagen, K.C., Fujii-Kuriyama, Y., Ghosh, A., Hen, R., Sahay, A., 2009. Kruppel-like factor 9 is necessary for late-phase neuronal maturation in the developing dentate gyrus and during adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* 29, 9875–9887.
- Segre, J., 2003. Complex redundancy to build a simple epidermal permeability barrier. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 776–782.
- Segre, J.A., Bauer, C., Fuchs, E., 1999. *Klf4* is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat. Genet.* 22, 356–360.
- Shields, J.M., Christy, R.J., Yang, V.W., 1996. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J. Biol. Chem.* 271, 20009–20017.
- Suske, G., Bruford, E., Philipsen, S., 2005. Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics.* 85, 551–556.
- Zeng, Y., Zhuang, S., Gloddek, J., Tseng, C.C., Boss, G.R., Pilz, R.B., 2006. Regulation of cGMP-dependent protein kinase expression by Rho and Kruppel-like transcription factor-4. *J. Biol. Chem.* 281, 16951–16961.
- Zhang, W., Shields, J.M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., Yang, V.W., 1998. The gut-enriched Kruppel-like factor suppresses the activity of the CYP1A1 promoter in an Sp1-dependent fashion. *J. Biol. Chem.* 273, 17917–17925.
- Zhu, S., Tai, C., MacVicar, B.A., Jia, W., Cynader, M.S., 2009. Glutamatergic stimulation triggers rapid Kruppel-like factor 4 expression in neurons and the overexpression of *Klf4* sensitizes neurons to NMDA-induced caspase-3 activity. *Brain Res.* 1250, 49–62.

13. Referencias

- Acampora D, Postiglione MP, Avantaggiato V, Di Bonito M, Vaccarino FM, Michaud J, Simeone A (1999) Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the *Orthopedia* gene. *Genes Dev* 13:2787-2800.
- Adam PJ, Regan CP, Hautmann MB, Owens GK (2000) Positive- and negative-acting Kruppel-like transcription factors bind a transforming growth factor beta control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22alpha in vivo. *J Biol Chem* 275:37798-37806.
- Aguilar-Valles A, Sanchez E, de Gortari P, Garcia-Vazquez AI, Ramirez-Amaya V, Bermudez-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. *Neurochem Int* 50:404-417.
- Akin ZN, Nazarali AJ (2005) Hox genes and their candidate downstream targets in the developing central nervous system. *Cell Mol Neurobiol* 25:697-741.
- Altman J, Bayer SA (1978a) Development of the diencephalon in the rat. III. Ontogeny of the specialized ventricular linings of the hypothalamic third ventricle. *J Comp Neurol* 182:995-1015.
- Altman J, Bayer SA (1978b) Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J Comp Neurol* 182:973-993.
- Altman J, Bayer SA (1978c) Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 182:945-971.
- Altman J, Bayer SA (1986) The development of the rat hypothalamus. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 100:1-178.
- Andersen B, Rosenfeld MG (2001) POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocr Rev* 22:2-35.
- Angevine JB, Jr. (1970) Time of neuron origin in the diencephalon of the mouse. An autoradiographic study. *J Comp Neurol* 139:129-187.
- Armstrong JA, Bieker JJ, Emerson BM (1998) A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell* 95:93-104.
- Armstrong WE (1985) *The Rat Nervous System*. Sydney: Academic Press.
- Balkan W, Tavianini MA, Gkonos PJ, Roos BA (1998) Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology* 139:252-259.
- Bally-Cuif L, Wassef M (1995) Determination events in the nervous system of the vertebrate embryo. *Curr Opin Genet Dev* 5:450-458.
- Balordi F, Fishell G (2007) Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J Neurosci* 27:5936-5947.
- Basu P, Sargent TG, Redmond LC, Aisenberg JC, Kransdorf EP, Wang SZ, Ginder GD, Lloyd JA (2004) Evolutionary conservation of KLF transcription factors and

- functional conservation of human gamma-globin gene regulation in chicken. *Genomics* 84:311-319.
- Ben-Arie N, Bellen HJ, Armstrong DL, McCall AE, Gordadze PR, Guo Q, Matzuk MM, Zoghbi HY (1997) *Math1* is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* 390:169-172.
- Berg-von der Emde K, Dees WL, Hiney JK, Hill DF, Dissen GA, Costa ME, Moholt-Siebert M, Ojeda SR (1995) Neurotrophins and the neuroendocrine brain: different neurotrophins sustain anatomically and functionally segregated subsets of hypothalamic dopaminergic neurons. *J Neurosci* 15:4223-4237.
- Berninger B, Guillemot F, Gotz M (2007) Directing neurotransmitter identity of neurones derived from expanded adult neural stem cells. *Eur J Neurosci* 25:2581-2590.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3:517-530.
- Bhat KM (2007) Wingless activity in the precursor cells specifies neuronal migratory behavior in the *Drosophila* nerve cord. *Dev Biol* 311:613-622.
- Bianchi DW, Wilkins-Haug LE, Enders AC, Hay ED (1993) Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans. *Am J Med Genet* 46:542-550.
- Bieker JJ (2001) Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem* 276:34355-34358.
- Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J (2001) Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 188:143-160.
- Blanchon L, Nores R, Gallot D, Marceau G, Borel V, Yang VW, Bocco JL, Lemery D, Panzetta-Dutari G, Sapin V (2006) Activation of the human pregnancy-specific glycoprotein PSG-5 promoter by KLF4 and Sp1. *Biochem Biophys Res Commun* 343:745-753.
- Brembeck FH, Rustgi AK (2000) The tissue-dependent keratin 19 gene transcription is regulated by GKLF/KLF4 and Sp1. *J Biol Chem* 275:28230-28239.
- Brody T, Odenwald WF (2005) Regulation of temporal identities during *Drosophila* neuroblast lineage development. *Curr Opin Cell Biol* 17:672-675.
- Burbach JP (2000) Genetic pathways in the developmental specification of hypothalamic neuropeptide and midbrain catecholamine systems. *Eur J Pharmacol* 405:55-62.
- Burbach JP, Smidt MP (2006) Molecular programming of stem cells into mesodiencephalic dopaminergic neurons. *Trends Neurosci* 29:601-603.
- Burbach JP, Luckman SM, Murphy D, Gainer H (2001) Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system. *Physiol Rev* 81:1197-1267.
- Burgunder JM, Taylor T (1989) Ontogeny of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the rat diencephalon. *Neuroendocrinology* 49:631-640.
- Caqueret A, Boucher F, Michaud JL (2006) Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus. *Dev Biol* 298:95-106.
- Caqueret A, Yang C, Duplan S, Boucher F, Michaud JL (2005) Looking for trouble: a search for developmental defects of the hypothalamus. *Horm Res* 64:222-230.
- Carreon-Rodriguez A, Charli JL, Perez-Martinez L (2009) T3 differentially regulates TRH expression in developing hypothalamic neurons in vitro. *Brain Res* 1305:20-30.

- Carroll SB (1995) Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* 376:479-485.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21:2933-2942.
- Cavallaro M, Mariani J, Lancini C, Latorre E, Caccia R, Gullo F, Valotta M, DeBiasi S, Spinardi L, Ronchi A, Wanke E, Brunelli S, Favaro R, Ottolenghi S, Nicolis SK (2008) Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development* 135:541-557.
- Chen X, Whitney EM, Gao SY, Yang VW (2003) Transcriptional profiling of Kruppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation. *J Mol Biol* 326:665-677.
- Chiamolera MI, Wondisford FE (2009) Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* 150:1091-1096.
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Cicero S, Herrup K (2005) Cyclin-dependent kinase 5 is essential for neuronal cell cycle arrest and differentiation. *J Neurosci* 25:9658-9668.
- Colas JF, Schoenwolf GC (2001) Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* 221:117-145.
- Colvis CM, Pollock JD, Goodman RH, Impey S, Dunn J, Mandel G, Champagne FA, Mayford M, Kozus E, Kumar A, Renthal W, Theobald DE, Nestler EJ (2005) Epigenetic mechanisms and gene networks in the nervous system. *J Neurosci* 25:10379-10389.
- Corbin R, Olsson-Carter K, Slack F (2009) The role of microRNAs in synaptic development and function. *BMB Rep* 42:131-135.
- Cote-Velez A, Perez-Martinez L, Charli JL, Joseph-Bravo P (2008) The PKC and ERK/MAPK pathways regulate glucocorticoid action on TRH transcription. *Neurochem Res* 33:1582-1591.
- Dang DT, Pevsner J, Yang VW (2000) The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 32:1103-1121.
- de Gortari P, Cisneros M, Joseph-Bravo P (2005) Chronic ethanol or glucose consumption alter TRH content and pyroglutamyl aminopeptidase II activity in rat limbic regions. *Regul Pept* 127:141-150.
- De Groef B, Vandenborne K, Van As P, Darras VM, Kuhn ER, Decuyper E, Geris KL (2005) Hypothalamic control of the thyroidal axis in the chicken: over the boundaries of the classical hormonal axes. *Domest Anim Endocrinol* 29:104-110.
- De La Rosa-Velazquez IA, Rincon-Arango H, Benitez-Bribiesca L, Recillas-Targa F (2007) Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res* 67:2577-2585.

- del Toro ED, Borday V, Davenne M, Neun R, Rijli FM, Champagnat J (2001) Generation of a novel functional neuronal circuit in *Hoxa1* mutant mice. *J Neurosci* 21:5637-5642.
- Deschamps J (2007) Ancestral and recently recruited global control of the Hox genes in development. *Curr Opin Genet Dev* 17:422-427.
- Dessaud E, McMahon AP, Briscoe J (2008) Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* 135:2489-2503.
- Diaz AL, Gleeson JG (2009) The molecular and genetic mechanisms of neocortex development. *Clin Perinatol* 36:503-512.
- Diaz ML, Becerra M, Manso MJ, Anadon R (2002) Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) immunoreactivity in the brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 450:45-60.
- Dijkmans TF, van Hooijdonk LW, Schouten TG, Kamphorst JT, Fitzsimons CP, Vreugdenhil E (2009) Identification of new Nerve Growth Factor-responsive immediate-early genes. *Brain Res* 1249:19-33.
- Dityatev A, Schachner M (2006) The extracellular matrix and synapses. *Cell Tissue Res* 326:647-654.
- Dodd J, Jessell TM, Placzek M (1998) The when and where of floor plate induction. *Science* 282:1654-1657.
- Eagleson GW, Theisen S (2008) Stage-specific effects of retinoic acid on gene expression during forebrain development. *Brain Res Bull* 75:281-288.
- Erson AE, Petty EM (2008) MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet* 74:296-306.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-269.
- Evans PM, Zhang W, Chen X, Yang J, Bhakat KK, Liu C (2007) Kruppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation. *J Biol Chem* 282:33994-34002.
- Faivre-Bauman A, Grouselle D, Nemeskeri A, Tixier-Vidal A (1978) Ontogenesis of thyroliberin in the mouse hypothalamus. *Brain Res* 154:382-387.
- Fan G, Beard C, Chen RZ, Csankovszki G, Sun Y, Siniaia M, Biniszkiewicz D, Bates B, Lee PP, Kuhn R, Trumpp A, Poon C, Wilson CB, Jaenisch R (2001) DNA hypomethylation perturbs the function and survival of CNS neurons in postnatal animals. *J Neurosci* 21:788-797.
- Farkas I, Varju P, Szabo E, Hrabovszky E, Okada N, Okada H, Liposits Z (2008) Estrogen enhances expression of the complement C5a receptor and the C5a-agonist evoked calcium influx in hormone secreting neurons of the hypothalamus. *Neurochem Int* 52:846-856.
- Feinberg MW, Wara AK, Cao Z, Lebedeva MA, Rosenbauer F, Iwasaki H, Hirai H, Katz JP, Haspel RL, Gray S, Akashi K, Segre J, Kaestner KH, Tenen DG, Jain MK (2007) The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *Embo J* 26:4138-4148.
- Feng J, Fouse S, Fan G (2007) Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function. *Pediatr Res* 61:58R-63R.

- Fernandez-Zapico ME, Mladek A, Ellenrieder V, Folch-Puy E, Miller L, Urrutia R (2003) An mSin3A interaction domain links the transcriptional activity of KLF11 with its role in growth regulation. *Embo J* 22:4748-4758.
- Galas L, Bidaud I, Bulant M, Jenks BG, Ouwens DT, Jegou S, Ladram A, Roubos EW, Nicolas P, Tonon MC, Vaudry H (2005) In situ hybridization localization of TRH precursor and TRH receptor mRNAs in the brain and pituitary of *Xenopus laevis*. *Ann N Y Acad Sci* 1040:95-105.
- Gale E, Li M (2008) Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Mol Brain* 1:8.
- Gao FB (2008) Posttranscriptional control of neuronal development by microRNA networks. *Trends Neurosci* 31:20-26.
- Garrett-Sinha LA, Eberspaecher H, Seldin MF, de Crombrughe B (1996) A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *J Biol Chem* 271:31384-31390.
- Gilbert SF (2006) *Developmental Biology*, 8th Edition. Sunderland Massachusetts: Sinauer Ass. Inc.
- Glover JC (2001) Correlated patterns of neuron differentiation and Hox gene expression in the hindbrain: a comparative analysis. *Brain Res Bull* 55:683-693.
- Goridis C, Rohrer H (2002) Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* 3:531-541.
- Griffiths EC. & Bennett G (1983) *Thyrotropin-Releasing Hormone: An Introduction To Thyrotropin-Releasing Hormone*. New York: Raven Press.
- Gross RE, Mehler MF, Mabie PC, Zang Z, Santschi L, Kessler JA (1996) Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17:595-606.
- Guerra-Crespo M, Ubieta R, Joseph-Bravo P, Charli JL, Perez-Martinez L (2001) BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture. *Eur J Neurosci* 14:483-494.
- Guerra-Crespo M, Charli JL, Rosales-Garcia VH, Pedraza-Alva G, Perez-Martinez L (2003) Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons. *J Neurosci Methods* 127:179-192.
- Guillemot F (2007) Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* 134:3771-3780.
- Gutierrez-Mariscal M, de Gortari P, Lopez-Rubalcava C, Martinez A, Joseph-Bravo P (2008) Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 33:198-213.
- Han YG, Spassky N, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM, Aguilar A, Schneider-Maunoury S, Alvarez-Buylla A (2008) Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 11:277-284.
- Hardman MJ, Sisi P, Banbury DN, Byrne C (1998) Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* 125:1541-1552.
- Harfe BD (2005) MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 15:410-415.
- Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nillni EA, Bjoorbaek C, Elmquist JK, Flier JS, Hollenberg AN (2001) Transcriptional regulation of the thyrotropin-

- releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest* 107:111-120.
- Hatakeyama J, Kageyama R (2004) Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin Cell Dev Biol* 15:83-89.
- Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, Guillemot F, Kageyama R (2004) Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131:5539-5550.
- Hatten ME (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22:511-539.
- Hemmati-Brivanlou A, Melton DA (1994) Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in *Xenopus*. *Cell* 77:273-281.
- Heuer H, Schafer MK, O'Donnell D, Walker P, Bauer K (2000) Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol* 428:319-336.
- Higaki Y, Schullery D, Kawata Y, Shnyreva M, Abrass C, Bomsztyk K (2002) Synergistic activation of the rat laminin gamma1 chain promoter by the gut-enriched Kruppel-like factor (GKLF/KLF4) and Sp1. *Nucleic Acids Res* 30:2270-2279.
- Holland PW, Takahashi T (2005) The evolution of homeobox genes: Implications for the study of brain development. *Brain Res Bull* 66:484-490.
- Holley SA, Jackson PD, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM, Hoffmann FM, Ferguson EL (1995) A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving *sog* and *chordin*. *Nature* 376:249-253.
- Hooper JE, Scott MP (2005) Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:306-317.
- Hosoya T, Oda Y, Takahashi S, Morita M, Kawauchi S, Ema M, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y (2001) Defective development of secretory neurones in the hypothalamus of *Arnt2*-knockout mice. *Genes Cells* 6:361-374.
- Hsieh J, Gage FH (2005) Chromatin remodeling in neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 17:664-671.
- Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH (2004) Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16659-16664.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Irving C, Mason I (2000) Signalling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of Hox gene expression. *Development* 127:177-186.
- Isshiki T, Pearson B, Holbrook S, Doe CQ (2001) *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* 106:511-521.
- Jaubert J, Cheng J, Segre JA (2003) Ectopic expression of kruppel like factor 4 (*Klf4*) accelerates formation of the epidermal permeability barrier. *Development* 130:2767-2777.

- Jenkins TD, Opitz OG, Okano J, Rustgi AK (1998) Transactivation of the human keratin 4 and Epstein-Barr virus ED-L2 promoters by gut-enriched Kruppel-like factor. *J Biol Chem* 273:10747-10754.
- Jiang Y, Langley B, Lubin FD, Renthall W, Wood MA, Yasui DH, Kumar A, Nestler EJ, Akbarian S, Beckel-Mitchener AC (2008) Epigenetics in the nervous system. *J Neurosci* 28:11753-11759.
- Jo YH, Chua S, Jr. (2009) Transcription factors in the development of medial hypothalamic structures. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E563-567.
- John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2004) Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2:e363.
- Joseph-Bravo P, Charli JL, Palacios JM, Kordon C (1979) Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 104:801-806.
- Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargas MA, Perez-Martinez L, Zoeller T, Charli JL (1998) Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol* 18:231-247.
- Kaczynski J, Cook T, Urrutia R (2003) Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol* 4:206.
- Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T (2007) The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* 134:1243-1251.
- Kageyama R, Ishibashi, M., Takebayashi, K., Tomita, K. (1997) bHLH Transcription Factors and Mammalian Neural Differentiation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 29:1389-1399.
- Kanai M, Wei D, Li Q, Jia Z, Ajani J, Le X, Yao J, Xie K (2006) Loss of Kruppel-like factor 4 expression contributes to Sp1 overexpression and human gastric cancer development and progression. *Clin Cancer Res* 12:6395-6402.
- Karim MA, Sloper JC (1980) Histogenesis of the supraoptic and paraventricular neurosecretory cells of the mouse hypothalamus. *J Anat* 130:341-347.
- Keith B, Adelman DM, Simon MC (2001) Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6692-6697.
- Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Arauzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Scholer HR (2008) Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454:646-650.
- King KE, Iyemere VP, Weissberg PL, Shanahan CM (2003) Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor beta 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *J Biol Chem* 278:11661-11669.
- Korsching S (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 13:2739-2748.
- Kosaka K, Hama K, Nagatsu I, Wu JY, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Kosaka T (1987) Postnatal development of neurons containing both catecholaminergic and GABAergic traits in the rat main olfactory bulb. *Brain Res* 403:355-360.
- Kosaka T, Kosaka K (2009) Two types of tyrosine hydroxylase positive GABAergic juxtglomerular neurons in the mouse main olfactory bulb are different in their time of origin. *Neurosci Res* 64:436-441.
- Kosik KS (2006) The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci* 7:911-920.

- Koutcherov Y, Mai JK, Paxinos G (2003) Hypothalamus of the human fetus. *J Chem Neuroanat* 26:253-270.
- Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS (2003) A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *Rna* 9:1274-1281.
- Kuroiwa Y, Kaneko-Ishino T, Kagitani F, Kohda T, Li LL, Tada M, Suzuki R, Yokoyama M, Shiroishi T, Wakana S, Barton SC, Ishino F, Surani MA (1996) Peg3 imprinted gene on proximal chromosome 7 encodes for a zinc finger protein. *Nat Genet* 12:186-190.
- Kutejova E, Briscoe J, Kicheva A (2009) Temporal dynamics of patterning by morphogen gradients. *Curr Opin Genet Dev* 19:315-322.
- Lechan RM, Fekete C (2006) The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res* 153:209-235.
- Lechan RM, Wu P, Jackson IM, Wolf H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH (1986) Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* 231:159-161.
- Lee KJ, Jessell TM (1999) The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 22:261-294.
- Lee KJ, Dietrich P, Jessell TM (2000) Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* 403:734-740.
- Li H, Zeitler PS, Valerius MT, Small K, Potter SS (1996) Gsh-1, an orphan Hox gene, is required for normal pituitary development. *Embo J* 15:714-724.
- Li L, He S, Sun JM, Davie JR (2004) Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol* 82:460-471.
- Li M, Kellems RE (2003) Sp1 and Sp3 Are important regulators of AP-2gamma gene transcription. *Biol Reprod* 69:1220-1230.
- Li P, He X, Gerrero MR, Mok M, Aggarwal A, Rosenfeld MG (1993) Spacing and orientation of bipartite DNA-binding motifs as potential functional determinants for POU domain factors. *Genes Dev* 7:2483-2496.
- Liem KF, Jr., Tremml G, Jessell TM (1997) A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91:127-138.
- Liem KF, Jr., Jessell TM, Briscoe J (2000) Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development* 127:4855-4866.
- Liem KF, Jr., Tremml G, Roelink H, Jessell TM (1995) Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82:969-979.
- Lipscombe D (2005) Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Curr Opin Neurobiol* 15:358-363.
- Liu A, Niswander LA (2005) Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* 6:945-954.
- Liu C, Goshu E, Wells A, Fan CM (2003) Identification of the downstream targets of SIM1 and ARNT2, a pair of transcription factors essential for neuroendocrine cell differentiation. *J Biol Chem* 278:44857-44867.

- Loudes C, Petit F, Kordon C, Faivre-Bauman A (2000) Brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 enhances differentiation of somatostatin neurons in hypothalamic cultures. *Neuroendocrinology* 72:144-153.
- Lumsden A, Krumlauf R (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274:1109-1115.
- Mabie PC, Mehler MF, Kessler JA (1999) Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *J Neurosci* 19:7077-7088.
- Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T (2007) The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 27:435-448.
- Markakis EA, Swanson LW (1997) Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvicellular neuroendocrine system. *Brain Res Brain Res Rev* 24:255-291.
- Mathieu C, Sii-Felice K, Fouchet P, Etienne O, Haton C, Mabondzo A, Boussin FD, Mouthon MA (2008) Endothelial cell-derived bone morphogenetic proteins control proliferation of neural stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 38:569-577.
- Mathieu J, Barth A, Rosa FM, Wilson SW, Peyrieras N (2002) Distinct and cooperative roles for Nodal and Hedgehog signals during hypothalamic development. *Development* 129:3055-3065.
- Matsuki T, Hori G, Furuichi T (2005) Gene expression profiling during the embryonic development of mouse brain using an oligonucleotide-based microarray system. *Brain Res Mol Brain Res* 136:231-254.
- McDonald JA, Holbrook S, Isshiki T, Weiss J, Doe CQ, Mellerick DM (1998) Dorsoroventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *vnd* homeobox gene specifies ventral column identity. *Genes Dev* 12:3603-3612.
- Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR (1998) An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* 18:136-141.
- Michaud JL (2001) The developmental program of the hypothalamus and its disorders. *Clin Genet* 60:255-263.
- Michaud JL, Rosenquist T, May NR, Fan CM (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev* 12:3264-3275.
- Michaud JL, DeRossi C, May NR, Holdener BC, Fan CM (2000) ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech Dev* 90:253-261.
- Moazed D (2009) Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 457:413-420.
- Muotri AR, Gage FH (2006) Generation of neuronal variability and complexity. *Nature* 441:1087-1093.
- Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116:221-234.
- Naar AM, Ryu S, Tjian R (1998) Cofactor requirements for transcriptional activation by Sp1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:189-199.
- Nagaich AK, Zhurkin VB, Durell SR, Jernigan RL, Appella E, Harrington RE (1999) p53-induced DNA bending and twisting: p53 tetramer binds on the outer side of a DNA loop and increases DNA twisting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1875-1880.

- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26:101-106.
- Nakai S, Kawano H, Yudate T, Nishi M, Kuno J, Nagata A, Jishage K, Hamada H, Fujii H, Kawamura K, et al. (1995) The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev* 9:3109-3121.
- Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, Miyazono K, Kishimoto T, Kageyama R, Taga T (2001) BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5868-5873.
- Nawa H, Pellemounter MA, Carnahan J (1994) Intraventricular administration of BDNF increases neuropeptide expression in newborn rat brain. *J Neurosci* 14:3751-3765.
- Nieto M, Schuurmans C, Britz O, Guillemot F (2001) Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29:401-413.
- Nilni EA, Sevarino KA (1999) The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocr Rev* 20:599-648.
- Nussenzveig DR, Gershengorn, Marvin C. (1995) The structure and function of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 2:437-448.
- O'Leary R, O'Connor B (1995) Thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem* 65:953-963.
- Ohnishi S, Laub F, Matsumoto N, Asaka M, Ramirez F, Yoshida T, Terada M (2000) Developmental expression of the mouse gene coding for the Kruppel-like transcription factor KLF5. *Dev Dyn* 217:421-429.
- Ohnuma S, Harris WA (2003) Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* 40:199-208.
- Okamura Y, Kawano H, Daikoku S (1991) Spatial-temporal appearance of developing immunoreactive TRH neurons in the neuroepithelial wall of the diencephalon. *Brain Res Dev Brain Res* 63:21-31.
- Okano H, Temple S (2009) Cell types to order: temporal specification of CNS stem cells. *Curr Opin Neurobiol* 19:112-119.
- Okano J, Opitz OG, Nakagawa H, Jenkins TD, Friedman SL, Rustgi AK (2000) The Kruppel-like transcriptional factors Zf9 and GKLF coactivate the human keratin 4 promoter and physically interact. *FEBS Lett* 473:95-100.
- Ou XM, Chen K, Shih JC (2004) Dual functions of transcription factors, transforming growth factor-beta-inducible early gene (TIEG)2 and Sp3, are mediated by CACCC element and Sp1 sites of human monoamine oxidase (MAO) B gene. *J Biol Chem* 279:21021-21028.
- Parras CM, Schuurmans C, Scardigli R, Kim J, Anderson DJ, Guillemot F (2002) Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* 16:324-338.
- Pearson JC, Lemons D, McGinnis W (2005) Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet* 6:893-904.
- Perez-Martinez L, Jaworski DM (2005) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal. *J Neurosci* 25:4917-4929.

- Perez-Martinez L, Charli JL, Joseph-Bravo P (2001) Development of pro-TRH gene expression in primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Brain Res Dev Brain Res* 130:73-81.
- Perez-Martinez L, Carreon-Rodriguez A, Gonzalez-Alzati ME, Morales C, Charli JL, Joseph-Bravo P (1998) Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* 68:345-354.
- Perez-Martinez L, Uribe R.M., Sanchez, E., Carreon-Rodriguez, A., Chavez, L., Zacarias, M., Joseph-Bravo, P. and Charli, J.L. (1999) Regulation of TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of rodent hypothalamus. *Curr Topics in Neurochem* 2:79-87.
- Pevny L, Placzek M (2005) SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol* 15:7-13.
- Philipsen S, Suske G (1999) A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* 27:2991-3000.
- Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM (1996) Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86:589-598.
- Prakash N, Brodski C, Naserke T, Puelles E, Gogoi R, Hall A, Panhuysen M, Echevarria D, Sussel L, Weisenhorn DM, Martinez S, Arenas E, Simeone A, Wurst W (2006) A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development* 133:89-98.
- Puelles L, Rubenstein JL (2003) Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26:469-476.
- Purves D. AG, Fitzpatrick D., Hall WC., Lamantia AS., McNamara JO., Williams SM. (2004) Neuroscience. In, Third Edition Edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Rage F, Riteau B, Alonso G, Tapia-Arancibia L (1999) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 enhance somatostatin gene expression through a likely direct effect on hypothalamic somatostatin neurons. *Endocrinology* 140:909-916.
- Rakic P (2009) Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci* 10:724-735.
- Rao MS (2006) Neural Development and Stem Cells, Second Edition Edition. Totowa, NJ. USA: Humana Press.
- Ruau D, Ensenat-Waser R, Dinger TC, Vallabhapurapu DS, Rolletschek A, Hacker C, Hieronymus T, Wobus AM, Muller AM, Zenke M (2008) Pluripotency associated genes are reactivated by chromatin-modifying agents in neurosphere cells. *Stem Cells* 26:920-926.
- Rubenstein JL, Martinez S, Shimamura K, Puelles L (1994) The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* 266:578-580.
- Rubenstein JL, Shimamura K, Martinez S, Puelles L (1998) Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci* 21:445-477.
- Ruiz i Altaba A, Palma V, Dahmane N (2002) Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* 3:24-33.
- Ruiz i Altaba A, Nguyen V, Palma V (2003) The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and GLI code. *Curr Opin Genet Dev* 13:513-521.

- Safaei R (1997) A target of the HoxB5 gene from the mouse nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 100:5-12.
- Saffer JD, Jackson SP, Annarella MB (1991) Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol* 11:2189-2199.
- Sanchez E, Uribe RM, Corkidi G, Zoeller RT, Cisneros M, Zacarias M, Morales-Chapa C, Charli JL, Joseph-Bravo P (2001) Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 74:407-422.
- Sanchez-Camacho C, Rodriguez J, Ruiz JM, Trousse F, Bovolenta P (2005) Morphogens as growth cone signalling molecules. *Brain Res Brain Res Rev* 49:242-252.
- Sanes DH. RTHW (2006) *Development Of The Nervous System*, 2nd Edition. London: Elsevier Academic Press.
- Satoh T, Yamada M, Monden T, Iizuka M, Mori M (1992) Cloning of the mouse hypothalamic preprothyrotropin-releasing hormone (TRH) cDNA and tissue distribution of its mRNA. *Brain Res Mol Brain Res* 14:131-135.
- Satyanarayana A, Kaldis P (2009) Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28:2925-2939.
- Schmidt H, Rickert C, Bossing T, Vef O, Urban J, Technau GM (1997) The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol* 189:186-204.
- Schonemann MD, Ryan AK, McEvelly RJ, O'Connell SM, Arias CA, Kalla KA, Li P, Sawchenko PE, Rosenfeld MG (1995) Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2. *Genes Dev* 9:3122-3135.
- Schuh R, Aicher W, Gaul U, Cote S, Preiss A, Maier D, Seifert E, Nauber U, Schroder C, Kemler R, et al. (1986) A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Kruppel, a *Drosophila* segmentation gene. *Cell* 47:1025-1032.
- Segre JA, Bauer C, Fuchs E (1999) Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet* 22:356-360.
- Shi S, Stanley P (2006) Evolutionary origins of Notch signaling in early development. *Cell Cycle* 5:274-278.
- Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC (2000) Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic Acids Res* 28:2969-2976.
- Shields JM, Christy RJ, Yang VW (1996) Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 271:20009-20017.
- Shimada M, Nakamura T (1973) Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei. *Exp Neurol* 41:163-173.
- Shirasaki R, Pfaff SL (2002) Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu Rev Neurosci* 25:251-281.
- Simpson F, Kerr MC, Wicking C (2009) Trafficking, development and hedgehog. *Mech Dev* 126:279-288.

- Smidt MP, Burbach JP (2007) How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat Rev Neurosci* 8:21-32.
- Song CZ, Keller K, Murata K, Asano H, Stamatoyannopoulos G (2002) Functional interaction between coactivators CBP/p300, PCAF, and transcription factor FKL2. *J Biol Chem* 277:7029-7036.
- Stern CD (2001) Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nat Rev Neurosci* 2:92-98.
- Stevenin BL, S.L. (1995) Hormonal regulation of the thyrotropin releasing hormone (TRH) gene. *The Endocrinologist* 5:286-296.
- Sudarsanam P, Iyer VR, Brown PO, Winston F (2000) Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3364-3369.
- Sugrue ML, Vella KR, Morales C, Lopez ME, Hollenberg AN (2010) The thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone at the level of transcription in vivo. *Endocrinology* 151:793-801.
- Suske G (1999) The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238:291-300.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Tan NY, Khachigian LM (2009) Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* 29:2483-2488.
- Tobet SA (2002) Genes controlling hypothalamic development and sexual differentiation. *Eur J Neurosci* 16:373-376.
- Ton-That H, Kaestner KH, Shields JM, Mahatanankoon CS, Yang VW (1997) Expression of the gut-enriched Kruppel-like factor gene during development and intestinal tumorigenesis. *FEBS Lett* 419:239-243.
- Tsankova NM, Kumar A, Nestler EJ (2004) Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci* 24:5603-5610.
- Turner J, Crossley M (1998) Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Kruppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators. *Embo J* 17:5129-5140.
- Ubieta R, Uribe RM, Gonzalez JA, Garcia-Vazquez A, Perez-Monter C, Perez-Martinez L, Joseph-Bravo P, Charli JL (2007) BDNF up-regulates pre-pro-TRH mRNA expression in the fetal/neonatal paraventricular nucleus of the hypothalamus. Properties of the transduction pathway. *Brain Res* 1174:28-38.
- Urbach R, Technau GM (2004) Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*. *Bioessays* 26:739-751.
- Valenzuela DM, Economides AN, Rojas E, Lamb TM, Nunez L, Jones P, Lp NY, Espinosa R, 3rd, Brannan CI, Gilbert DJ, et al. (1995) Identification of mammalian noggin and its expression in the adult nervous system. *J Neurosci* 15:6077-6084.
- Vella KR, Hollenberg AN (2009) The ups and downs of thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 150:2021-2023.
- Wang W, Lufkin T (2000) The murine *Otp* homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol* 227:432-449.

- Wang W, Xue Y, Zhou S, Kuo A, Cairns BR, Crabtree GR (1996) Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev* 10:2117-2130.
- Wei H, Wang X, Gan B, Urvalek AM, Melkounian ZK, Guan JL, Zhao J (2006) Sumoylation delimits KLF8 transcriptional activity associated with the cell cycle regulation. *J Biol Chem* 281:16664-16671.
- Wesierska-Gadek J, Krystof V (2009) Selective cyclin-dependent kinase inhibitors discriminating between cell cycle and transcriptional kinases: future reality or utopia? *Ann N Y Acad Sci* 1171:228-241.
- Wienholds E, Plasterk RH (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 579:5911-5922.
- Williams G, Harrold JA, Cutler DJ (2000) The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc* 59:385-396.
- Wilson L, Maden M (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 282:1-13.
- Wilson SI, Edlund T (2001) Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci* 4 Suppl:1161-1168.
- Wilson SW, Houart C (2004) Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell* 6:167-181.
- Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11:228-234.
- Wirth MJ, Obst K, Wahle P (1998) NT-4/5 and LIF, but not NT-3 and BDNF, promote NPY mRNA expression in cortical neurons in the absence of spontaneous bioelectrical activity. *Eur J Neurosci* 10:1457-1464.
- Wolgemuth DJ (2008) Function of cyclins in regulating the mitotic and meiotic cell cycles in male germ cells. *Cell Cycle* 7:3509-3513.
- Wu JI, Lessard J, Olave IA, Qiu Z, Ghosh A, Graef IA, Crabtree GR (2007) Regulation of dendritic development by neuron-specific chromatin remodeling complexes. *Neuron* 56:94-108.
- Yamada M, Satoh T, Mori M (2003) Mice lacking the thyrotropin-releasing hormone gene: what do they tell us? *Thyroid* 13:1111-1121.
- Yamada M, Radovick S, Wondisford FE, Nakayama Y, Weintraub BD, Wilber JF (1990) Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human prepro thyrotropin-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 4:551-556.
- Yano N, Luo L (2004) Effect of thyrotropin releasing hormone (TRH) on gene expressions in rat pancreas: approach by microarray hybridization. *Jop* 5:193-204.
- Yet SF, McA'Nulty MM, Folta SC, Yen HW, Yoshizumi M, Hsieh CM, Layne MD, Chin MT, Wang H, Perrella MA, Jain MK, Lee ME (1998) Human EZF, a Kruppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *J Biol Chem* 273:1026-1031.
- Yoo AS, Crabtree GR (2009) ATP-dependent chromatin remodeling in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 19:120-126.
- Yoon K, Gaiano N (2005) Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* 8:709-715.
- Zhang D, Mehler MF, Song Q, Kessler JA (1998a) Development of bone morphogenetic protein receptors in the nervous system and possible roles in regulating *trkC* expression. *J Neurosci* 18:3314-3326.

- Zhang J, Lazar MA (2000) The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol* 62:439-466.
- Zhang W, Bieker JJ (1998) Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9855-9860.
- Zhang W, Shields JM, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y, Yang VW (1998b) The gut-enriched Kruppel-like factor suppresses the activity of the CYP1A1 promoter in an Sp1-dependent fashion. *J Biol Chem* 273:17917-17925.
- Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, Biggs JR, Kraft AS, Yang VW (2000) The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem* 275:18391-18398.
- Zhang Y, Derynck R (2000) Transcriptional regulation of the transforming growth factor-beta -inducible mouse germ line Ig alpha constant region gene by functional cooperation of Smad, CREB, and AML family members. *J Biol Chem* 275:16979-16985.
- Zhao G, Wheeler SR, Skeath JB (2007) Genetic control of dorsoventral patterning and neuroblast specification in the Drosophila Central Nervous System. *Int J Dev Biol* 51:107-115.
- Zhu S, Tai C, MacVicar BA, Jia W, Cynader MS (2009) Glutamatergic stimulation triggers rapid Kruppel-like factor 4 expression in neurons and the overexpression of KLF4 sensitizes neurons to NMDA-induced caspase-3 activity. *Brain Res* 1250:49-62.
- Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86:599-606.