



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS SITIOS CRE Y
LAS SECUENCIAS ADYACENTES EN EL
CONTEXTO DEL PROMOTOR DEL GEN DE TRH
EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN CON T3 Y
ACTIVADORES DE PKA.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Adrián Pérez Maldonado

TUTORA:

Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo

Agosto 2012.



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.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología Molecular en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo y se financió con los donativos DGAPA *IN-215507* y CONACyT *P-83363*. Durante la realización de esta tesis conté con el apoyo económico del CONACyT.

Dedicado a la memoria de Enrique Pérez Maldonado

Agradecimientos

Agradezco a mis padres y a todos mis hermanos el apoyo recibido siempre. Gracias a ustedes he llegado hasta aquí. A Anabel, por ser mi compañera de vida y sobre todo en las situaciones que rodearon a esta tesis.

Agradezco a la Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo por permitirme trabajar en su laboratorio, por dirigir y revisar este trabajo y otorgarme todas las facilidades para realizarlo.

Agradezco a los Drs. Mario Zurita Ortega y Joel Osuna Quintero por participar en la evaluación semestral de los avances de este trabajo.

Agradezco a la Dra. María Juana Antonieta Cote Vélez por su ayuda en el establecimiento de los cultivos primarios y por la realización de los experimentos con los mismos.

También a la Quim. Fidelia Romero Arteaga por su apoyo en la transformación de la cepa bacteriana y la purificación de los plásmidos empleados, a la Dra. Mariana Gutiérrez Mariscal por su apoyo técnico y en la discusión de resultados, al personal del laboratorio de neurobiología por su apoyo técnico y logístico: Sr. José Manuel Villa Herrera, Lic. Miguel Ángel Olvera Rodríguez y a la Sra. Cruz Elena Martell Lugo.

A la Dra. Susana Castro Obregón, al Dr. Gustavo Pedraza Alva, a la Dra. Verónica Narváez Padilla, a la Dra. Carmen Beltrán Núñez y al Dr. Enrique Salas Vidal por formar parte del comité encargado de la revisión de esta tesis y por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Joel Osuna Quintero por el diseño y elaboración de los plásmidos mutantes empleados, a la Dra. Susana Castro Obregón por la donación del plásmido pCH110 y a la Dra. María Eugenia Garrido (CINVESTAV-IPN) por la donación de las líneas celulares GH3 y GH4C1.

CONTENIDO

Abreviaturas.....	1
Resumen	2
Introducción.....	3
1. Los ejes neuroendócrinos y la homeostasis.	3
2. <i>Mecanismo molecular de acción de las hormonas tiroideas.</i>	4
3. <i>Regulación de la biosíntesis de TRH.</i>	5
4. <i>Participación de CREB en la regulación de TRH.</i>	7
Antecedentes.....	8
Hipótesis	12
Objetivo general	12
Objetivos particulares.....	12
Estrategia experimental.....	12
Materiales y métodos.....	13
1. <i>Plásmidos.</i>	13
2. <i>Cultivos celulares.</i>	14
3. <i>Aplicación del estímulo y cosecha de los cultivos transfectados.</i>	16
4. <i>Cuantificación de proteína total.</i>	16
5. <i>Cuantificación de la actividad de luciferasa.</i>	17
6. <i>Determinación de la actividad de β-galactosidasa.</i>	17
7. <i>Normalización de la actividad de luciferasa.</i>	17
8. <i>Selección de la línea celular para la respuesta a la forskolina.</i>	18
9. <i>Análisis estadístico de los resultados.</i>	18
Resultados	18
1. <i>Papel del sitio CRE1 en respuesta a T3.</i>	18
1.1 <i>La inhibición transcripcional del promotor silvestre de TRH por T3 es específica del tipo celular.</i>	18
1.2 <i>Las mutaciones en el sitio CRE1 no afectan la respuesta a T3 del promotor de TRH.</i> ..	20
2. <i>Respuesta del promotor a los cambios en la topología del DNA.</i>	21
2.1 <i>Cambios en la curvatura teórica del DNA no disminuyen la actividad del promotor de TRH.</i>	21
3. <i>Papel del sitio CRE2 en respuesta a forskolina.</i>	24
3.1 <i>La integridad del sitio CRE-extendido es importante en la respuesta del promotor de TRH a la activación de la vía de PKA en la línea C6.</i>	24
3.2 <i>Validación en cultivos primarios.</i>	26
Discusión y conclusiones.	27
Perspectivas	31
Bibliografía.....	31
Anexo	36

Abreviaturas

8Br-AMPC: 8-bromo–adenosin-monofosfato cíclico.

AMPC: 3´5´-adenosin-monofosfato-cíclico.

AP-1: Proteína activadora 1.

gal: β -galactosidasa.

CRE: Elemento de respuesta a AMPC.

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPC.

CREB-P: CREB fosforilado.

Db-AMPC: Dibutiril-adenosin-monofosfato cíclico.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

FBS: Suero fetal bovino.

Forsk: Forskolina.

HS: Suero de caballo.

Luc: Luciferasa.

NPV: Núcleo paraventricular.

ONPG: orto-nitrofenil- β -galactosida.

PBS: Amortiguador de fosfatos salinos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PKA: Proteína cinasa A.

RLU: unidades relativas de luz.

RNA_m: Acido ribonucleico mensajero.

S-DMEM: DMEM Suplementado.

T3: triiodotironina.

TH: Hormonas tiroideas.

TRE: Elemento de respuesta a hormona tiroidea.

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.

TR: Receptor de hormona tiroidea.

TSH: Tirotropina.

TRH: Hormona liberadora tirotropina.

Resumen

El gen de TRH está sujeto a regulación tanto positiva como negativa a través de la interacción de factores de transcripción con distintos sitios en su promotor. Entre estos se encuentran los elementos de respuesta a AMPc (CRE) y a hormonas tiroideas (TRE), siendo reguladores positivo y negativo respectivamente. Estudios previos proponen que la regulación por AMPc mediada por CREB, está dada por un sitio CRE localizado a -59/-52pb del inicio de la transcripción (CRE1; Harris, et al., 2001) el cual se sobrepone al sitio propuesto para la regulación por T3 (-59/-54) mediado por el receptor a hormona tiroidea (TR) (Hollenberg, et al., 1995; Satoh, et al., 1996). Análisis recientes en cultivos de células hipotalámicas, demostraron la unión de los factores de transcripción pertenecientes a las familias CREB/ATF y Sp/Krüppel a otro sitio CRE (CRE2; -101/-94) y sus secuencias adyacentes (caja GC y elemento CACCC) en respuesta al estímulo con un análogo del AMPc mientras que TR se unió al sitio CRE1 en respuesta a T3 (Díaz-Gallardo, et al., 2010a y 2010b). Esto sugiere que en células hipotalámicas, CRE2-Ext es el elemento de respuesta a AMPc y CRE1 de respuesta a T3. Para dilucidar la contradicción de estos resultados con los de Harris et al., (2001) quienes postulan al sitio CRE1 como el mediador de la respuesta al AMPc en el promotor de TRH, se realizaron transfecciones con vectores que codifican para la enzima luciferasa bajo el control del promotor silvestre de TRH así como otros que presentan deleciones en los sitios CRE2, GC, CACCC ó CRE1. Las células fueron estimuladas con T3 o con un activador de la vía de PKA y se midió la actividad del reportero. En los estímulos con T3 se encontró que todas las mutaciones utilizadas, presentaron la misma inhibición mostrada por el promotor silvestre, sin embargo, estos resultados no son concluyentes debido a que recientemente se reportó que el cDNA de luciferasa es regulado negativamente por T3, independientemente del promotor bajo el que se encuentre (Misawa, et al., 2012). También se muestra que sólo las mutaciones en los sitios CRE2, GC y CACCC interfieren con la respuesta al activador de PKA mientras que las mutaciones en CRE1 mimetizan el efecto observado con el promotor silvestre. En conjunto estos resultados demuestran que, en el promotor de TRH, el sitio CRE2 es el elemento de respuesta a AMPc y nos permiten proponer un efecto sinérgico en la respuesta a la activación de la vía de PKA probablemente mediado por la interacción entre factores del tipo CREB/ATF y Sp/Krüppel.

Introducción

1. Los ejes neuroendócrinos y la homeostasis.

El crecimiento, el desarrollo y la reproducción son regulados por interacciones entre el sistema endócrino y el sistema nervioso: casi todas las secreciones endócrinas son controladas directa o indirectamente por el cerebro y recíprocamente casi todas las hormonas ejercen una influencia sobre la actividad neuronal. Tanto las neuronas como las glándulas endócrinas, estimulan diversas células blanco por medio de mediadores químicos que interactúan con receptores celulares específicos (Reichlin, 1998). En la regulación neuroendócrina, los péptidos, también llamados neurohormonas, son liberados de la eminencia media del hipotálamo hacia la circulación para ejercer su acción a distancia (Akil, et al., 2003). Existen varios ejes neuroendócrinos organizados de una manera jerárquica, con el control de su función iniciada en el cerebro, pasando por la pituitaria anterior y terminando con la producción de hormonas en un órgano determinado, entre estos se encuentran los ejes: hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) e hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) (Akil, et al., 2003).

La homeostasis se define como el mantenimiento de las condiciones internas del cuerpo dentro de un estrecho rango fisiológico, por ejemplo: la temperatura, presión sanguínea, el metabolismo basal y el balance energético (Bear, et al., 2001). Una de las principales funciones del sistema neuroendocrino es la regulación de la homeostasis en los mamíferos, siendo las hormonas adrenales y tiroideas los principales factores catabólicos reguladores (Joseph-Bravo y de Gortari, 2007), por lo que los ejes HPA y HPT son fundamentales en el balance energético.

El eje HPT responde a distintos estímulos fisiológicos: las terminales axónicas en la eminencia media, provenientes de las neuronas parvocelulares del Núcleo Paraventricular del hipotálamo (NPV), liberan la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH) al sistema portal que comunica al hipotálamo con el lóbulo anterior de la pituitaria o adenohipófisis. La TRH en la adenohipófisis induce la síntesis y liberación de la Hormona Estimulante de la Tiroides o Tirotropina (TSH) por células especializadas llamadas tirótropos; la TSH se secreta hacia el sistema circulatorio y llega a las células foliculares de la tiroides en las cuales estimula la

producción y liberación de las Hormonas Tiroideas (TH) triiodotironina (T3) y tetraiodotironina (tiroxina, T4) (Nillni, 2010). Un fuerte aumento en la concentración de TH ejerce un efecto retroalimentador negativo, mediado por el receptor de hormonas tiroideas (TR), sobre la pituitaria y el NPV, inhibiendo la síntesis y liberación de TSH y de TRH respectivamente (Koller, et al., 1987; Segerson et al., 1987). Las hormonas tiroideas son responsables del metabolismo basal, la termogénesis y participan en la producción endógena de glucosa, en la lipólisis y proteólisis, que proveen sustratos para el gasto energético (Alkemade, 2010).

2. Mecanismo molecular de acción de las hormonas tiroideas.

La T3 es la forma activa a nivel transcripcional, actuando por medio de sus receptores TR α o TR β , que reconocen elementos de respuesta en la región promotora activando o inhibiendo la transcripción de muchos genes (Cheng et al., 2010). Los TR pertenecen a la familia de receptores nucleares capaces de modular la transcripción de sus genes blanco de forma dependiente e independiente de ligando (Cenni y Picard, 1999). Los genes que codifican a TR α y TR β generan seis isoformas por procesamiento alternativo del RNAm, cuatro de las cuales son capaces de unirse a T3: TR β 1, TR β 2, TR β 3 y TR α 1 y se piensa que la función de las restantes (TR α 2 y TR α 3) es inhibir la acción de las primeras (Lazar, et al., 2003; Cheng, et al., 2010). En genes regulados positivamente por T3, el TR en ausencia de ligando se encuentra unido a un elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) del promotor y se asocia con complejos co-represores que incluyen proteínas como el co-represor nuclear (NCoR), el mediador del silenciamiento de los receptores retinoicos y tiroideos (SMRT), la transducina beta tipo 1 (TBL1) y la desacetilasa 3 de histonas (HDAC3) lo que trae como consecuencia la formación de heterocromatina y la represión transcripcional. En presencia de T3 este complejo co-represor se disocia y en su lugar se recluta un complejo co-activador que incluye al co-activador de receptores a esteroides 1 (SRC1), a la proteína de unión a CREB (CBP) y al factor asociado a p300/CBP (P/CAF) lo que activa la transcripción (Ishizuka y Lazar, 2003; Li, et al., 2002). El mecanismo por el que se lleva a cabo la represión transcripcional inducida por T3 no está bien determinado. Existen varios modelos; uno propone, al igual que en la activación, la unión constitutiva de un homodímero de TR o un heterodímero con el receptor

X a retinoico (RXR), a un TRE y que la unión de T3 a TR sirve de señal de intercambio entre complejos co-reguladores inhibiendo la transcripción (figura 1A). En otro, el complejo TR-RXR/co-regulador se asocia a un factor transcripcional (TF X en la figura 1) que sí está sobre el DNA (figura 1B) y la unión de T3 actúa como en el modelo anterior. Por último, el TR-RXR podría reprimir indirectamente la transcripción al secuestrar co-reguladores evitando que se encuentren disponibles para interactuar con otros factores de transcripción (figura 1C) (Weitzel, 2008).

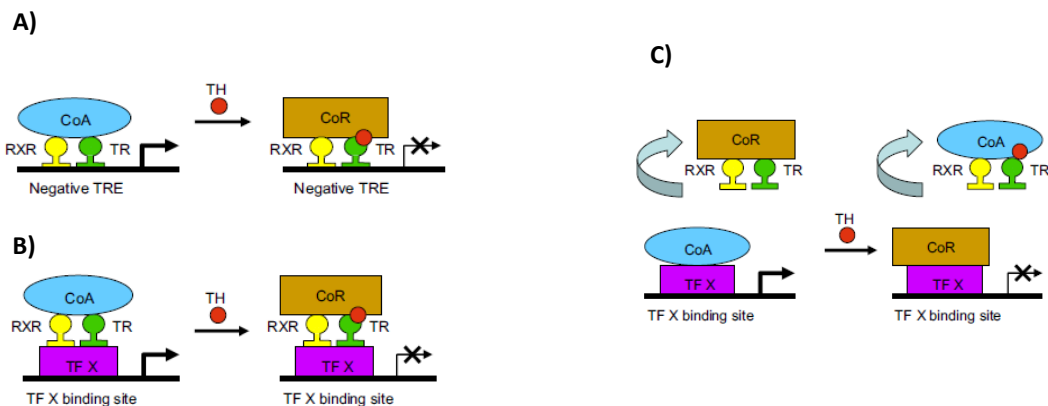


Figura 1. Modelos alternativos para la regulación negativa por hormonas tiroideas. Tomado de Weitzel, 2008. TH=Hormonas tiroideas, TR=Receptor de TH, RXR= Receptor X a retinoico, TRE=Elemento de respuesta a TH, CoA=Co-activador, CoR=Co-represor, TF X=Factor de transcripción X. Ver texto.

3. Regulación de la biosíntesis de TRH.

La TRH es un tripéptido cuya secuencia es piroGlu-His-ProNH₂ (Boler, et al., 1969; Burgus, et al., 1969), que se deriva de un precursor proteico de 26 KDa (Lechan, et al., 1986). Varias áreas del Sistema Nervioso Central sintetizan TRH entre las que se encuentran la amígdala, la pituitaria y el hipocampo pero es en el NPV del hipotálamo en donde se presenta una mayor concentración (Lechan y Fekete, 2006). La TRH también se encuentra en las gónadas, el corazón, la próstata, el páncreas, la placenta e intestino (Iversen, 1995; Wilber y Xu, 1998). La TRH producida en el NPV del hipotálamo es un componente integral para el mantenimiento de la homeostasis de las hormonas tiroideas (Lechan y Fekete, 2006); las neuronas parvocelulares del NPV sintetizan el RNAm que codifica para el precursor proteico de la TRH; éste es procesado por las enzimas pro-hormona convertasa 1 y 2 y es transportado por la vía de secreción regulada hasta las terminales axónicas presentes en la eminencia media en

donde es liberado en respuesta a un estímulo neuronal (Nillni y Sevarino, 1999). Las neuronas TRHérgicas del NPV responden a distintos estímulos como el ayuno, estrés por frío, los ciclos circadiano y estral, etc. modulando los procesos de liberación y la síntesis del TRH.

La biosíntesis de la TRH en el NPV está sujeta a regulación por influencias neuronales inducidas por estímulos como la exposición al frío y por diversas hormonas como los glucocorticoides y las TH. En el gen de TRH de rata, la secuencia comprendida entre las posiciones -547 y +84 (con respecto al sitio de inicio de la transcripción [+1]), confiere casi toda la actividad transcripcional basal en un modelo de células transfectadas (Balkan, et al., 1998). Esta región presenta elementos de respuesta para los factores transcripcionales como los TR, CREB (Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a AMPc), Proteína Activadora 1 (AP-1), Proteína Específica 1 (Sp1) y el receptor de glucocorticoides (GR) entre otros (figura 2; Joseph-Bravo, et al., 2006). La caja TATA se encuentra en la posición -28 del gen de rata (Lee, et al., 1988). Dos elementos similares a la secuencia del Elemento de Respuesta a AMPc (CRE) se localizan en el promotor del gen de TRH: a) el sitio 4 o CRE1 (5' TGACCTCA 3') (Hollenberg, et al., 1995; Harris, et al., 2001) localizado en la posición -59/-52, se sobrepone con un Elemento de Respuesta a Hormona Tiroidea (TRE) (-59/-52; 5'AGGTCA 3') y es reconocido como un sitio importante para la regulación negativa por TH (Satoh, et al., 1996) y b) el sitio CRE2 (5' TGCCGTCA 3') localizado en la posición -101/-94 (Yang, et al., 1992). Cerca del sitio CRE2 se puede identificar una región rica en GC (5' GGGCGGG 3' -119/-113) y un elemento CACCC (-92/-98) que comúnmente se asocian a factores de transcripción de tipo Krüppel/Sp1 (Kaczynski, et al., 2003; figura 2). Un análisis reciente mostró que los sitios de unión para CREB (CRE1/TRE y CRE2), TR (CRE1/TRE), Sp1 (Caja GC y el elemento CACCC) y STAT se encuentran conservados en el promotor de TRH en varios mamíferos, incluyendo el humano y el ratón (Wallis, 2010).

El efecto retroalimentador negativo que ejercen las hormonas tiroideas sobre la síntesis de TRH ocurre preferentemente por TR β 2 (aunque el tipo β 1 también tiene efectos inhibitorios) (Chiamolera y Wondisford, 2009; Chiamolera, et al., 2012) y se encuentra limitado a unos pocos tejidos en el organismo. Se ha postulado que la especificidad regional se debe a las diferencias en la expresión del TR β 2 y de los factores intracelulares que participan en la

inhibición, como podrían ser los co-reguladores que son reclutados por el TR e inclusive la ausencia-presencia de alguna de las isoformas del mismo TR. Ensayos en sistemas heterólogos, utilizando un gen reportero bajo el promotor de TRH y co-transfectando el receptor TR β 2, demostraron el efecto inhibitorio de T3 identificando al TRE (5' AGGTCA 3'), denominado sitio 4, como el mediador de esta respuesta; ensayos de retardo electroforético demostraron que este sitio es reconocido por todos los TR y también, formando heterodímeros con el receptor X a retinoico (RXR) (Sato, et al., 1996; Hollenberg, et al., 1995). Paralelamente a la identificación del sitio 4 como el TRE, se determinó una mínima participación en la respuesta a T3 de una secuencia localizada en la posición +14/+19 (5'GGGTCC 3') y que es parte del intrón 1; a esta secuencia se le llamó sitio 5, sin embargo no se reportó la unión de TR a ella (Hollenberg, et al., 1995). Al hacer la comparación entre especies, se encontró que el sitio 5 sólo se encuentra en el promotor de TRH de humano y no en el de rata o ratón.

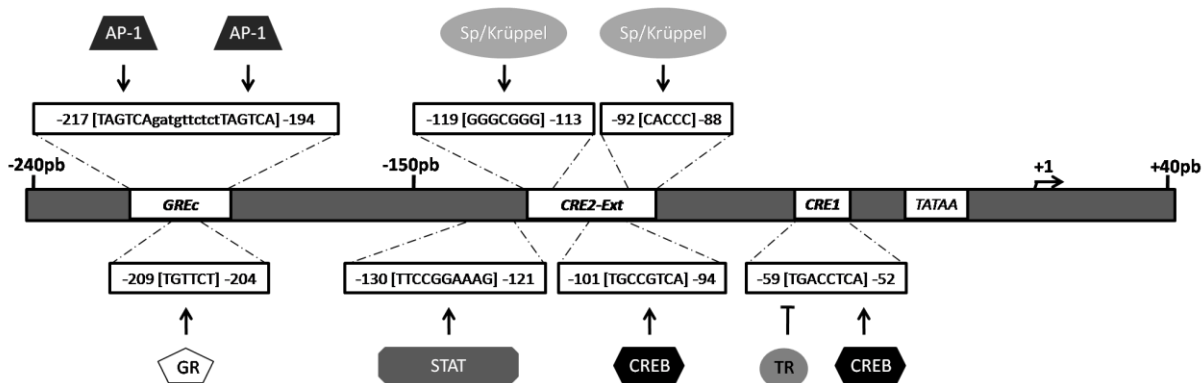


Figura 2. Representación grafica del promotor proximal del gen de TRH (-240/+40) en el que se esquematizan algunos sitios de unión a factores de transcripción importantes en su regulación. AP-1=Proteína activadora 1, GR=Receptor de glucocorticoides, STAT=Transductor de señales y activador de la transcripción, TR=Receptor de hormonas tiroideas, CREB=Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc, Sp/Krüppel=Factores de la familia Sp (proteína específica)/Krüppel, GREc=Elemento compuesto de respuesta a glucocorticoides, CRE1=Elemento de respuesta a AMPc 1 (también Sitio 4 en texto), CRE2=Elemento de respuesta a AMPc 2, CRE2-Ext=CRE2 extendido.

4. Participación de CREB en la regulación de TRH.

El incremento en los niveles de RNAm de TRH en el NPV en respuesta a estímulos neurales inducidos, por ejemplo, por exposición al frío, ocurre en forma rápida y transitoria (30-60min) lo cual puede ser reproducido *in vitro*, mediante la estimulación de células hipotalámicas con análogos del AMPc o activadores de la Proteína Kinasa A (PKA) (Uribe, et al., 1993; Pérez-

Martínez, et al., 1998). La activación de la PKC también tiene efectos estimuladores pero a tiempos más largos (Uribe, et al. 1995). Las respuestas rápidas al incremento en los niveles intracelulares de AMPc se explican por la activación de factores transcripcionales existentes como CREB. El aumento en el AMPc intracelular provoca la disociación de las subunidades reguladoras de la PKA, liberando a las subunidades catalíticas que se translocan al núcleo en donde fosforilan a CREB en el residuo Ser133. Cinasas como MSK-1, AKT, CaMII/IV, etc. también son capaces de fosforilar a CREB. En los modelos *in vitro*, los aumentos intracelulares de AMPc se ocasionan al incubar las células con análogos permeables como el 8Br-AMPc y el dibutilil-AMPc o con compuestos activadores de las adenilato ciclasas (enzimas capaces de sintetizar el AMPc) como la forskolina. La forskolina mimetiza la acción de algunos receptores acoplados a proteínas G, los cuales estimulan la actividad de las adenilato ciclasas en respuesta a la interacción ligando-receptor. Dentro de estos receptores se encuentra los receptores adrenérgicos, los cuales incrementan los niveles de AMPc y activan la vía de señalización de PKA en respuesta a la unión de adrenalina o noradrenalina (Wallukat, 2002).

El factor transcripcional CREB, junto con otros como c-Jun y c-Fos, pertenece a la familia bZip que se caracterizan por poseer un zipper de leucina y un dominio básico que les permiten interactuar con otras proteínas y con el DNA (Shaywitz y Greenberg, 1999). La activación transcripcional por CREB está bien caracterizada: inicia con la actividad de cinasas que lo fosforilen (como la PKA); el CREB fosforilado (CREB-P) se une a su elemento de respuesta (CRE) y recluta moléculas co-activadoras como TORCs y p300/CBP que interactúan con la maquinaria basal de transcripción o promueven la acetilación de residuos específicos de histonas, llevando con esto a la activación transcripcional (Impey y Goodman, 2001; Roesler, 2000; Sands y Palmer, 2008; Sassone-Corsi, 1998; Shaywitz y Greenberg, 1999).

Antecedentes

En el laboratorio se ha estudiado por varios años la regulación de la biosíntesis de TRH en sistemas *in vivo* e *in vitro*. En la introducción se detallaron los elementos de respuesta a TR, GR y los sitios postulados como CRE: CRE2 y sitio 4 ó CRE1 presentes en el promotor de TRH. El papel estimulador de CREB en la transcripción del gen de TRH se demostró primero en un

sistema heterólogo de células HEK293T transfectadas con el gen reportero luciferasa bajo el control del promotor del gen de TRH (Harris, et al., 2001). Estos autores propusieron la secuencia 5' TGACCTCA 3' en el sitio 4, como el sitio de respuesta a AMPc del promotor de TRH. La propuesta de que el sitio 4 es el CRE se basó en las siguientes evidencias obtenidas con las células HEK293T y la co-transfección de CREB y TRH-Luc: a) extractos nucleares de estas células estimuladas con AMPc, mostraron unión a un oligonucleótido conteniendo esta secuencia y, b) la transfección del promotor con el sitio 5' TGACCTCA 3' mutado por 5' TAAAATCA 3', disminuyó la transcripción basal y se perdió la respuesta a la estimulación por AMPc. Demostraron además, que la incubación con la Hormona Estimuladora de α -Melanocitos (la cual incrementa los niveles de CREB-P), aumenta la expresión del gen de TRH; este efecto estimulador se reduce en células co-transfectadas con TR β 2 e incubadas con T3 (Hollenberg, et al., 1995). Estos autores postularon que el TR competía con CREB por el sitio4.

Contrario a esto, en el laboratorio, la estimulación de cultivos primarios de hipotálamos fetales de rata con un análogo de AMPc, no indujo la formación de complejos proteína-DNA al co-incubar los extractos nucleares con un oligonucleótido que contenía la secuencia del sitio 4 pero sí a un oligonucleótido que contenía la secuencia CRE2; ensayos de retardo electroforético revelaron la unión de CREB-P a este sitio (Cote-Vélez, et al., 2005). Además, extractos nucleares de células hipotalámicas estimuladas con 8Br-AMPc protegieron el sitio CRE2 de la digestión por DNAsa mientras que la región CRE1 sólo fue protegida por extractos de células estimuladas con T3 (Díaz-Gallardo, et al., 2010a; Díaz-Gallardo, et al., 2010b). El análisis de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) identificó a CREB-P y c-Jun como algunos de los factores estimulados con 8Br-AMPc que se unen a CRE2 y no a CRE1, mientras que TR β se unió a CRE1 cuando las células eran estimuladas con T3 (Díaz-Gallardo, et al., 2010a; Díaz-Gallardo, et al., 2010b). El papel crucial de CREB en la activación del promotor de TRH al estimular con AMPc quedó demostrado al co-transfectar ya sea con un vector de expresión para CREB o con una dominante negativa incapaz de unirse al DNA (CREB-A); con CREB-A se eliminó la respuesta al análogo de AMPc y disminuyó la actividad basal casi por completo (tabla 1; Pérez-Maldonado, 2010; Cote-Vélez, et al., 2011).

Tabla 1. Participación de CREB en la respuesta a AMPc del promotor de TRH.

Plásmido	Actividad Luc/gal
Control sin estímulo	100±16
Control + AMPc	158±27
CREB 75ng + AMPc	206±5
CREB 150ng + AMPc	224±24
CREB-A 75ng + AMPc	33±3
CREB-A 150ng + AMPc	28±5

Un exceso de CREB aumenta la respuesta al AMPc y una dominante negativa (CREB-A) la disminuye por debajo de los niveles basales. Se midió la actividad Luc/gal en células transfectadas y estimuladas con dibutilil-AMPc. Promedio ± error estándar. Reportado en Pérez-Maldonado, 2010.

En una revisión reciente (Nilni, 2010) se propone que la dicotomía entre nuestros resultados y los de Harris con respecto a CRE1 son el resultado de la especificidad celular ya que en el laboratorio se usaron células hipotalámicas, mientras que Harris utilizó células HEK293T (derivadas de riñón de humano). Sin embargo, el trabajo de Harris mostraba un abatimiento casi total en la transcripción basal al utilizar la mutante del sitio 4. Si el CRE-2 es el elemento responsivo a aumentos en el AMPc, no tendría por qué afectar la respuesta una mutación en el sitio 4 ó CRE1.

Estudios recientes (Yachovchuk, et al., 2010) indican que en promotores que presentan caja TATA, el complejo de pre-inicio de la transcripción ocupa desde -40 hasta +39, a sólo 12pb del sitio CRE1 (-52/-59), por lo que mutaciones en este sitio que alteren la topología del DNA podrían abatir los niveles de transcripción al impedir que se reclute el complejo de pre-inicio. Debido a que este comportamiento se observó en la mutante empleada por Harris, se decidió analizar si el cambio de la secuencia 5' TGACCTCA 3' por 5' TAAAATCA 3' en CRE1 ocasionaba tales cambios en la conformación topológica de esta región del promotor. Un análisis *in silico* realizado por Ana Gutiérrez (tutor: Dr. E. Merino) sobre la curvatura del DNA (Olivares-Zavaleta, et al., 2006) mostró una potencial deformación de la mutante AAAA comparado a la secuencia el promotor silvestre, lo que puede indicar que el abatimiento de la actividad basal reportada con esta mutante pudiera deberse a este cambio topológico y no a una incapacidad de reconocimiento de la secuencia por el factor CREB-P. El vector Mut5 se diseñó para arrojar más información sobre esta posibilidad; como ya se dijo, a diferencia del promotor de TRH de humano, el de rata no presenta la secuencia del sitio 5, sin embargo su posición se tomó de referencia para realizar las mutaciones de Mut5 (Sitio 5r). Para poder

elucidar la participación de los sitios CRE1, CRE2, caja GC y elemento CACCC, se diseñaron mutantes en estos sitios que fueron sintetizados por el Dr. Joel Osuna (IBT), y se compararon las respuestas a estimulación por forskolina (un activador de la vía de PKA) y por T3. Este trabajo se inició en dos tesis de licenciatura del laboratorio, incluyendo la mía (Pérez-Maldonado, 2010; Barrera-Dircio, 2010) y parte de él ya se encuentra publicado (artículo anexo: Cote-Vélez, et al., 2011). En ambas tesis se empezó a determinar el papel de los sitios CRE1 y CRE2 en respuesta a la activación de PKA utilizando algunas de las mutantes que también se emplearon en este trabajo. Se reportó que mutaciones puntuales en la secuencia de CRE1, no modifican la actividad basal ni la respuesta a la forskolina cuando se comparan con la secuencia silvestre, en contraste, cambios en la secuencia del sitio CRE2 o su sustitución por una secuencia idéntica a la de CRE1 disminuyen la actividad basal y la estimulada (tabla 2).

Tabla 2. Mutaciones en CRE2 y no en CRE1 afectan la respuesta del promotor de TRH a la activación de PKA.

Plásmido	Control	Forsk 10 μ M 4hrs	Forsk 10 μ M 6hrs
TRH-Luc (Secuencia silvestre)	100 \pm 4.5	157 \pm 7.1	239 \pm 10.8
p766 (Mutante en CRE1)	114 \pm 6.9	195 \pm 6.2	262 \pm 12.6
p767 (Mutante en CRE1)	112 \pm 12.8	139 \pm 13	218 \pm 28.8
p1808 (Dos sitios CRE1; sin CRE2)	55 \pm 7.0	78 \pm 10	116 \pm 10.5
p1805 (Mutante en CRE2)	74 \pm 9.6	90 \pm 13	112 \pm 9.7

Se midió la actividad Luc/gal en células C6 transfectadas. Promedio \pm error estándar. Datos reportados en Pérez-Maldonado, 2010 ó Barrera-Dircio, 2010.

En conjunto, estos resultados indican que la activación transcripcional del gen de TRH inducida por la elevación de los niveles intracelulares de AMPc está mediada por la unión de CREB-P a la región CRE2 mientras que el sitio CRE1 se une a TR y no a CREB-P. El presente trabajo da continuidad a esta propuesta al incluir delecciones completas de los sitios CRE1 y CRE2 y ayuda a determinar la participación de los sitios adyacentes a CRE2 en la respuesta a la activación de la vía de PKA; además se explora el comportamiento de las mutaciones en el sitio CRE1 en respuesta a la estimulación con T3.

Hipótesis

El aumento de la transcripción del gen de TRH por la activación de la vía de PKA se encuentra mediado por el sitio CRE2 mientras que la inhibición de la transcripción por T3 se encuentra mediada por el sitio CRE1. Mutaciones en CRE1 que eliminan la unión de TR, deberían eliminar el efecto inhibitorio en la transcripción de TRH en respuesta a la estimulación con T3 sin alterar la respuesta a activadores de la vía de PKA. La posible interacción entre eventos estimuladores (activación de vía de PKA) e inhibidores (T3) se debe no a una competencia por el sitio de unión, sino al balance estequiométrico de los factores de transcripción o co-reguladores requeridos.

Objetivo general

Determinar la participación de los sitios CRE2, caja GC y elemento CACCC en la regulación de la transcripción de TRH en la respuesta a la activación de la vía de PKA y la participación del sitio CRE1 en respuesta a la estimulación con T3.

Objetivos particulares

- a) Diseñar mutantes puntuales en los sitios CRE1, CRE2, caja GC y elemento CACCC del promotor de TRH, que, de acuerdo a un análisis *in silico*, no fueran reconocidas por los factores transcripcionales CREB, TR y Sp1.
- b) Cuantificar y analizar la expresión del gen reportero acoplado al promotor de TRH silvestre o mutado en los sitios CRE1, CRE2, GC y CACCC en respuesta a la activación de la vía de PKA.
- c) Cuantificar y analizar la expresión del gen reportero acoplado al promotor de TRH silvestre o mutado en el sitio CRE1 en respuesta a la estimulación con T3.

Estrategia experimental

Se verificó *in silico*, utilizando los programas MathInspector (Genomatix Software, GmbH) y Transcription Element Search Software (Universidad de Pennsylvania) que los sitios CRE1, CRE2, caja GC y elemento CACCC del promotor de TRH fueran reconocidos como sitios de unión para los factores de transcripción TR, CREB y Sp/Krüppel respectivamente; se diseñaron

mutantes puntuales en cada uno de los sitios de manera que el análisis *in silico* indicara la pérdida de unión a sus respectivos factores transcripcionales. Las mutantes elegidas las sintetizó el Dr. J. Osuna mediante mutagénesis por sobreposicionamientos de PCR (figura 3; Merino, et al., 1992). Se analizó la respuesta a la activación de la vía de PKA por forskolina o la respuesta a la hormona tiroidea T3 en diferentes líneas celulares transfectadas con el plásmido TRH-Luc para seleccionar la de mejor respuesta. Cultivos celulares se co-transfectaron con vectores codificantes para la enzima luciferasa bajo el control del promotor del gen de TRH silvestre o con mutaciones, y con un vector de expresión para la enzima β -galactosidasa como control de la eficiencia de transfección. Se comparó el efecto de las mutaciones sobre la expresión basal y estimulada con la obtenida con el promotor silvestre.

Materiales y métodos

1. Plásmidos.

a) Bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5- α se transformaron con alguno de los siguientes plásmidos: pCH110 que contiene la enzima β -galactosidasa bajo el control del promotor del virus SV40 (donado por la Dra. Susana Castro; Instituto de Biotecnología, UNAM), pUC18 (Fermentas) y pNASS-TRH-Luc que codifica para la enzima luciferasa bajo el control del promotor del gen de TRH de rata (TRH-Luc; donado por el Dr. Wayne Balkan; Escuela de Medicina, Universidad de Miami).

b) Se realizó el análisis bioinformático para seleccionar las mutaciones. Para los elementos que flanquean a CRE2: la delección de ambos elementos (Δ -Ext) que eliminan el reconocimiento de estos sitios por factores Sp/Krüppel. Para el sitio CRE1: p767 que no es reconocido por TR; p766 que tiene cambiado el dinucleótido central CC por GG; Δ -CRE1 que al no presentar el TRE, no debería responder a T3, aunque la delección ocasiona la formación de un posible sitio de reconocimiento de factores Sp/Krüppel; Mut4 que incorpora cuatro adeninas en cadena en el sitio CRE1. Para el sitio CRE2: Δ -CRE2 que al tener eliminada la secuencia de respuesta a AMPc se predice la pérdida de unión a CREB; p1808 al que se le cambió la secuencia CRE2 por CRE1 y por lo tanto presenta dos TREs y posiblemente ninguna unión de CREB. Además se realizaron delecciones combinadas: Δ -CRE1-CRE2, Δ -CRE2-Ext. Las

mutaciones (figura 4) las realizó el Dr. Joel Osuna (IBT, UNAM) (figura 3; Merino, et al., 1992) en el plásmido pNASS TRH-Luc. La purificación de los plásmidos se realizó empleando columnas de purificación comerciales (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

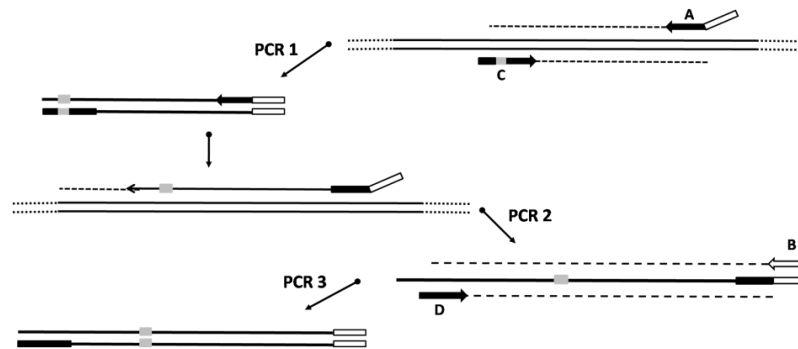


Figura 3. Diagrama del procedimiento empleado para realizar las mutantes. Brevemente, se realiza una primera PCR (PCR 1) utilizando el promotor silvestre de TRH como templado; el oligonucleótido A, que presenta una secuencia no complementaria al promotor (rectángulo blanco) y un sitio de restricción *StuI*; y el oligonucleótido C, que tiene la secuencia de la mutación (rectángulo gris). El producto se purifica y se emplea en una segunda reacción (PCR 2) utilizando el mismo templado. El producto de la extensión se amplifica en una tercera reacción con el oligonucleótido B (complementario al fragmento del oligonucleótido A, lo que asegura que sólo se amplificará la molécula que contiene la mutación producto de PCR 2) y el oligonucleótido D que presenta un sitio de restricción *AatII*. El producto es un fragmento de DNA con la mutación en ambas cadenas flanqueada por un par de sitios de restricción por medio de los cuales puede integrarse al plásmido. Tomado de Merino, et al., 1992.

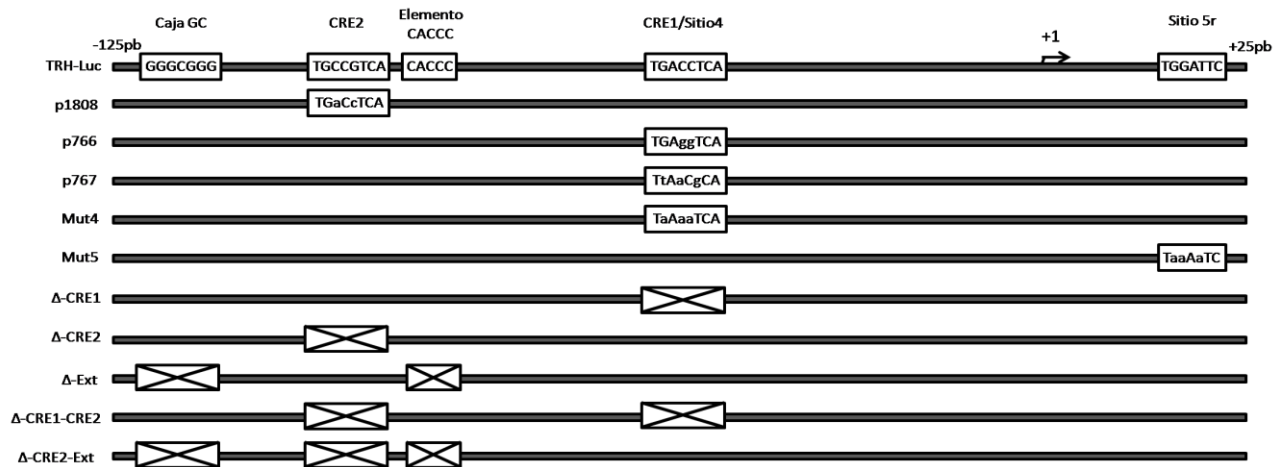


Figura 4. Diagrama de las mutaciones en el promotor de TRH generadas a partir del plásmido pNASS-TRH-Luc (TRH-Luc). Sólo se encuentran marcadas las regiones mutadas en cada plásmido. Una letra minúscula representa un cambio de nucleótido con respecto a la secuencia silvestre, un rectángulo con x representa la eliminación del sitio completo.

2. Cultivos celulares.

Cultivos de las líneas celulares C6 (glioblastoma de rata), NIH-3T3 (fibroblasto de ratón), Neuro2a (neuroblastoma de ratón), GH3 y GH4C1 (hipófisis de rata) se mantuvieron hasta alcanzar el 80% de confluencia, en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ y a 37°C (Revco-

Ultima) en platos de cultivo estériles de 100mm de diámetro con medio de cultivo suplementado con suero, glucosa 0.25% (Sigma), glutamina 2mM (Sigma), insulina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Sigma), vitaminas 0.5% (Gibco-BRL) y antibióticos-antimicóticos (50 unidades/mL de penicilina G sódica, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de estreptomicina y 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B; Gibco-BRL) esterilizado por filtración a 22 μm (Millipore). El medio de cultivo y suero utilizado varía de acuerdo a cada línea celular: para la línea C6, medio F-12 con 10% de suero fetal bovino (FBS, Biowest); para las líneas GH3 y GH4C1, medio F12 con 2.5% de FBS y 15% de suero de caballo (HS, ByProducts); para las líneas NIH-3T3 y Neuro2a, MEM con 10% FBS. La monocapa celular se lavó con 2mL de solución de Hank y posteriormente se desprendió utilizando 700 μL de una solución de Tripsina-EDTA (Gibco). Las células se recuperaron y se concentraron por centrifugación (300xg) durante 5min a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y el sedimento celular se resuspendió mecánicamente en 3mL de medio fresco; se determinó la viabilidad celular con azul de tripano (Cote-Vélez, et al., 2005).

Los cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata se establecieron como está descrito (Díaz-Gallardo, et al., 2010a). Brevemente, hipotálamos fetales de rata de 17 días de gestación se disgregaron mecánica y enzimáticamente, las células se concentraron por centrifugación (210xg, 5min a temperatura ambiente) y resuspendidas en medio DMEM suplementado con glucosa, vitaminas, insulina, glutamina (ver arriba) y 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco). La viabilidad se determinó con azul de tripano.

Las células se sembraron en placas de 24 pozos (Corning) preincubadas con poli-D-lisina (Sigma) por tres horas a 37°C y lavadas tres veces con amortiguador de fosfatos salinos 1x (PBS 1x), a una densidad de 200,000 (C6, NIH-3T3 y Neuro2a), 250,000 (GH3 y GH4C1) o 600,000 (cultivos primarios) células/pozo. El volumen final fue de 500 μL /pozo. Las células se mantuvieron en las mismas condiciones de humedad, CO₂ y temperatura mencionadas.

La transfección se realizó empleando el reactivo LipofectaminaTM 2000 (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, el medio de incubación se reemplazó por medio sin suplementos (M-S); por pozo, se diluyeron 2.5 μL de LipofectaminaTM 2000 en 48 μL de M-S (volumen final 50 μL) (tubo 1) y se dejó incubar por cinco minutos a temperatura ambiente; aparte, se diluyeron 800ng totales de DNA plasmídico en M-S para un volumen

final de 50 μ L (tubo 2); se mezcló el contenido de ambos tubos y se dejó incubar por veinte minutos a temperatura ambiente (mezcla de transfección: MT). 100 μ L de la MT se agregaron a cada pozo y las placas se mantuvieron en las condiciones de cultivo por 5 horas, posteriormente se cambió el medio por medio suplementado con la mitad de suero; las células se mantuvieron en las condiciones de cultivo hasta la aplicación del estímulo. Para el caso de células que se estimularon con T3, el suero se trató previamente con la resina de intercambio aniónico (AG1-X8; BioRad) para eliminar las TH. Las líneas celulares se transfectaron dos días después de sembrarlas mientras que los cultivos primarios se transfectaron 12 días después de la siembra. La eficiencia de transfección varía según el tipo celular y fue desde 40% hasta 85%.

Las células se transfectaron con tres plásmidos: 250ng de TRH-Luc o alguna de sus variantes (p766, p767, p1808, Mut4, Mut5, Δ -CRE1, Δ -CRE2, Δ -CRE1-CRE2, Δ -Ext o Δ -CRE2-Ext) para medir la actividad transcripcional del promotor de TRH en condiciones basales y estimuladas, 300ng de pCH110 para medir la actividad de la β -galactosidasa y emplearla como control de transfección y 350ng de pUC18 para completar la cantidad total de DNA en la transfección.

3. Aplicación del estímulo y cosecha de los cultivos transfectados.

Las células se cosecharon 52hrs después de retirar la mezcla de transfección; el tiempo de estímulo se encuentra dentro de este periodo, por ejemplo, los estímulos de 48hrs empezaron 4hrs después de la transfección. Durante los periodos en los que no hay manipulación de los cultivos éstos permanecen en las condiciones de humedad y temperatura descritas anteriormente. Las células se lavaron con 500 μ L/pozo de PBS 1x y se cosecharon con 50 μ L/pozo de amortiguador de lisis celular (cell culture lysis reagent, Promega); el lisado se mantuvo a 4°C. Los restos celulares se concentraron por centrifugación por 2min (12,000xg a 4°C). El sobrenadante se recuperó (extracto celular) y se mantuvo a -70°C hasta su empleo (Cote-Vélez, et al., 2005).

4. Cuantificación de proteína total.

Para conocer la cantidad de proteína presente en el extracto celular se siguió el método descrito (Bradford, 1976). Brevemente, se realizó una curva estándar (0.5 - 14 μ g/mL) para

cada ensayo con concentraciones conocidas de proteína mezclando cantidades crecientes de una solución stock de albúmina sérica bovina (Sigma) 0.2µg/µL con 200µL de reactivo de ensayo de proteína (Reactivo de Bradford; BioRad Labs.) y completando con agua bidestilada para un volumen final de 1ml. Las mezclas conteniendo las muestras experimentales se prepararon con 4µL de extracto celular, 200µL de reactivo de Bradford y 796µL de agua bidestilada. Las mezclas se prepararon por duplicado, se agitaron en vortex y se incubaron a temperatura ambiente por 5min previo a la lectura de su absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm (Beckman DU-650).

5. Cuantificación de la actividad de luciferasa.

La actividad de la luciferasa se cuantificó en un luminómetro (Monolight). Por muestra, se colocaron 100µL de Luciferase Assay Reagent que contiene luciferina (Luciferase Assay System, Promega) en tubos para luminómetro; por separado, 5µg de proteína de extracto celular se llevaron a 20µL de volumen total con agua bidestilada, adicionándolos a la solución de luciferina y se midió la emisión de luz (RLU) durante un periodo de 10 segundos a temperatura ambiente (Cote-Vélez, et al., 2005).

6. Determinación de la actividad de β-galactosidasa.

La cuantificación de la actividad de β-galactosidasa se realizó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 405nm. Se tomaron 50µg de proteína de extracto celular y se llevó a un volumen de 30µL con agua bidestilada, se mezcló con una solución amortiguadora consistente de 3µL de solución 100xMg [concentraciones finales MgCl₂ 0.1M (Sigma), β-mercaptoetanol 4.5M (Sigma)], 201µL de fosfato de sodio 0.1M pH7.5 [41mL de Na₂HPO₄ 0.2M (Sigma), 9mL de NaH₂PO₄ 0.2M (Sigma), 50mL de agua bidestilada] y 66µL de ONPG 4mg/mL [ONPG (Sigma) disuelto en fosfato de sodio 0.1M pH7.5] y se incubó a 37°C hasta que alcanzó la coloración amarilla característica. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de ONPG hidrolizado y por tanto a la cantidad de enzima (Sambrook, et al., 1989).

7. Normalización de la actividad de luciferasa.

Los valores RLU de la actividad de luciferasa para las distintas muestras pueden reflejar la modulación de la transcripción debida al estímulo, sin embargo, las diferencias que se observan entre los valores RLU para los distintos tratamientos puede deberse también a las

variaciones en el número final de células presentes en cada pozo o a la eficiencia de transfección lograda en cada ocasión, es por ello que los valores obtenidos en los ensayos de luciferasa fueron divididos por los valores obtenidos de la actividad de β -galactosidasa.

8. Selección de la línea celular para la respuesta a la forskolina.

El establecimiento de las condiciones de cultivo y la respuesta de diferentes líneas al estímulo con forskolina se describieron previamente en tesis de licenciatura (Barrera-Dircio, 2010; Pérez-Maldonado, 2010) y se encuentra reportado en el artículo anexo (Cote-Vélez, et al., 2011). La línea C6 presentó una mejor relación entre actividad basal y estimulada con forskolina por lo que se seleccionó ésta.

9. Análisis estadístico de los resultados.

Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media (E.S.M.) de los valores obtenidos para cada una de las condiciones. A los resultados se les aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey con el software SPSS 13.0. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

Resultados

1. Papel del sitio CRE1 en respuesta a T3.

1.1 La inhibición transcripcional del promotor silvestre de TRH por T3 es específica del tipo celular.

La inhibición en la expresión génica ocasionada por las TH se encuentra limitada a unos cuantos genes y preferentemente se da de forma tejido-específica. La inhibición de la expresión de TRH por TH se observa únicamente en el NPV aunque el TRH se expresa en otros núcleos hipotalámicos (Sugrue, et al., 2010). Debido a este fenómeno y particularmente porque la distribución de los receptores TR α o TR β así como los co-reguladores necesarios pueden variar de una tipo celular a otro, la elección de la línea celular para los ensayos de estimulación con T3 era de particular importancia, por ello, se realizó un ensayo de respuesta a T3 en cuatro diferentes líneas celulares transfectadas con el plásmido TRH-Luc: HEK293T (derivadas de riñón embrionario humano), NIH-3T3 (fibroblastos de ratón), Neuro2a (neuroblastoma de ratón), C6 (glioblastoma de rata), GH3 y GH4 (derivadas de hipófisis de rata). Los resultados se muestran en la figura 5. No todas las líneas respondieron

negativamente, e inclusive una (Neuro2a) presentó un efecto estimulador en respuesta a T3. Este efecto estimulador es interesante e inesperado, aunque puede explicarse con la tejido-especificidad de la respuesta negativa del TRH a las TH que se mencionó anteriormente; ensayos de co-transfección con un vector de expresión para TR β podría arrojar mayor información al respecto; además, existen reportes en los que se describe un efecto activador de co-represores bien identificados en genes regulados negativamente por TH (Tagami, et al., 1997; Santos, et al., 2011).

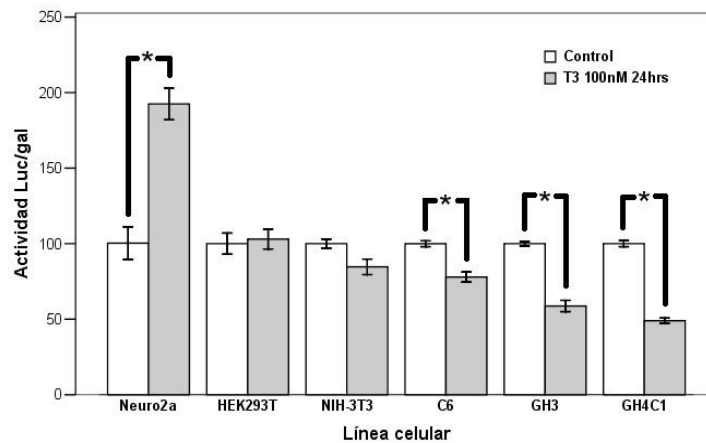


Figura 5. La respuesta transcripcional del promotor silvestre de TRH a T3 es diferente en cada línea celular. Cultivos de las líneas celulares indicadas en el eje X se transfectaron con el vector TRH-Luc y se estimularon con T3 100nM durante 24hrs. Control de cada línea celular=100%. ANOVA una vía $F=32.98$; post-hoc: $*=p<0.0005$ vs su propio control. $n\geq 3$. Las barras representan el promedio \pm el error estándar.

En las líneas C6, GH3 y GH4C1 se observó la inhibición de la actividad del gen reportero cuando se estimularon con T3 100nM por 24hrs. Las líneas derivadas de células hipofisarias (GH4C1 y GH3) fueron en las que se obtuvo una mejor inhibición, comparable a la reportada en otros trabajos (Carr, et al., 1992; Ishii, et al., 2004); tales líneas han sido ampliamente utilizadas para demostrar el efecto transcripcional de T3 en genes como el de la hormona de crecimiento (Dobner, et al., 1981), de TSH (Carr, et al., 1992; Carr y Wong, 1994), del receptor de estrógenos (Fujimoto, et al., 2004), entre otros (Hahn, et al., 1999; Ishii, et al., 2004). Además, estas líneas expresan TR endógenos (Han, et al., 1999), lo que nos permitió determinar la respuesta del promotor de TRH sin necesidad de transfectarlos como en los reportes previos (Hollenberg, et al., 1995, Satoh, et al., 1996).

Se determinó en platos paralelos, dentro de los mismos cultivos, la respuesta del promotor

silvestre a la estimulación con forskolina. Los resultados muestran diferencias en la respuesta a la estimulación pero en diferente magnitud (tabla 3); todas las líneas mostraron una tendencia a aumentar la expresión del gen reportero cuando se estimularon con forskolina. Células de la línea C6 respondieron como lo reportado (Pérez Maldonado, 2010; Barrera-Dircio, 2010), mientras que la respuesta de las dos líneas GH fue mayor, probablemente debido a su origen hipofisiario; si bien, la de GH3 presentó una respuesta mucho mayor, lo que sugiere que existen diferencias en las concentraciones de co-activadores o fosfodiesterasas con la línea GH4C1 o simplemente puede ser el reflejo de la diferencia en la eficiencia de transfección obtenida en ambas líneas.

Tabla 3. Respuesta del promotor silvestre de TRH a la activación de la vía de PKA en distintas líneas celulares.

Línea celular	Control	Forskolina 10 μ M 6hrs
Neuro2a	100 \pm 10.8	315 \pm 72.5
HEK293T	100 \pm 7.0	143 \pm 15.0
NIH-3T3	100 \pm 3.0	187 \pm 48.7
C6	100 \pm 1.9	216 \pm 32.7
GH3	100 \pm 1.5	2,782 \pm 456
GH4C1	100 \pm 2.0	875 \pm 71.5

Se midió la actividad Luc/gal en células transfectadas. n \geq 3. Promedio \pm error estándar.

1.2 Las mutaciones en el sitio CRE1 no afectan la respuesta a T3 del promotor de TRH.

Si bien la línea celular GH4C1 fue la que presentó una mayor inhibición en respuesta a T3, la eficiencia en la transfección fue menor que con la línea GH3 (40 y 65% respectivamente) por lo que se seleccionó esta última. Para determinar el papel que juega el sitio CRE1 del promotor de TRH en la respuesta a la estimulación con T3, cultivos celulares de la línea GH3 se transfectaron con el plásmido TRH-Luc o alguna de sus variantes que presentan el promotor de TRH mutado en el sitio CRE1 (p766, p767, Mut4 y Δ -CRE1) o el Sitio 5r (Mut5) y se estimularon por 24 y 48hrs con T3 10nM, los cuales han sido los tiempos y concentración más utilizados en los estudios sobre la transcripción de TRH (Sato, et al., 1996; Hollenberg, et al., 1995). Tal como está reportado, se observó la inhibición en la expresión de luciferasa utilizando el TRH-Luc pero, contrario a lo esperado, los vectores con el promotor mutado en CRE1 presentaron una inhibición de similar magnitud a la mostrada por el silvestre, con solo una ligera diferencia a las 48hrs con la mutante Mut4 pero sin llegar a ser significativa (figura

6). Esta respuesta también ocurrió con la mutante Mut5 que tiene alterada la secuencia +14/+19 del promotor de TRH (figura 4). Estos resultados fueron inesperados, sin embargo una búsqueda en la literatura arrojó información importante la cual se presentan en el apartado de discusión.

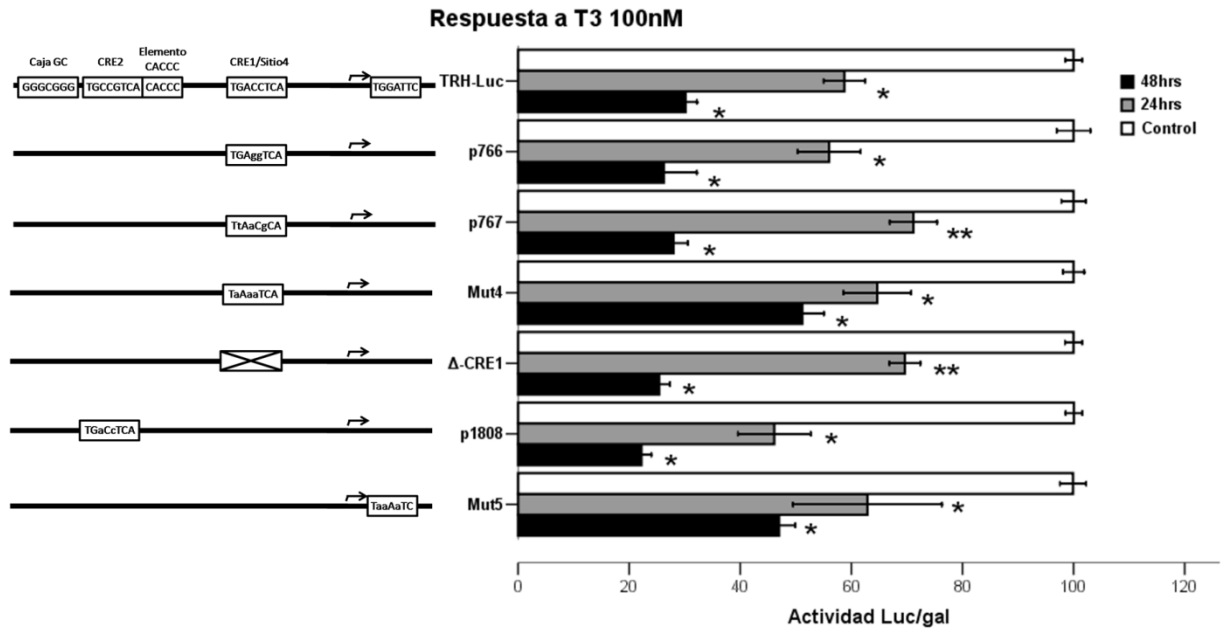


Figura 6. La respuesta del promotor de TRH al estímulo con T3 no se ve afectada por las mutaciones en el sitio CRE1. Células GH3 se transfectaron con el vector indicado y se estimularon por 24 ó 48hrs con T3 100nM. Control de cada plásmido=100%. ANOVA dos vías: F=43.06, plásmido F=3.44, estímulo F=335.89, interacción F=2.12; post-hoc: *= $p < 0.000001$ y **= $p < 0.001$ vs su propio control. $n \geq 6$. Las barras representan el promedio \pm el error estándar.

2. Respuesta del promotor a los cambios en la topología del DNA.

2.1 Cambios en la curvatura teórica del DNA no disminuyen la actividad del promotor de TRH.

Como ya se mencionó, el análisis *in silico* realizado al promotor silvestre y a la mutación Mut4 (utilizada por Harris y Hollenberg) con el programa MUTACURVE, predijo un cambio en la curvatura teórica del DNA que suponemos podría ser la causa del abatimiento de la actividad transcripcional. Para tratar de obtener más información al respecto, se diseñó la mutante Mut5, que al igual que Mut4 presenta las siguientes características: a) la mutación está cerca del sitio de inicio de la transcripción, b) la secuencia mutante incluye cuatro adeninas en cadena y c) la mutación altera la curvatura teórica del DNA predicha por el programa MUTACURVE; pero a diferencia de Mut4, la mutación en Mut5 se encuentra río

abajo del sitio de inicio de la transcripción (figuras 2 y 4). Se repitió el análisis de curvatura teórica de las secuencias silvestre y mutante (Mut4) realizado por Ana Gutiérrez y además se incluyó la mutante Mut5 (figura 7). Se observa que, comparadas con la secuencia silvestre, Mut5 sufre un cambio drástico en la curvatura teórica del DNA al igual que Mut4.

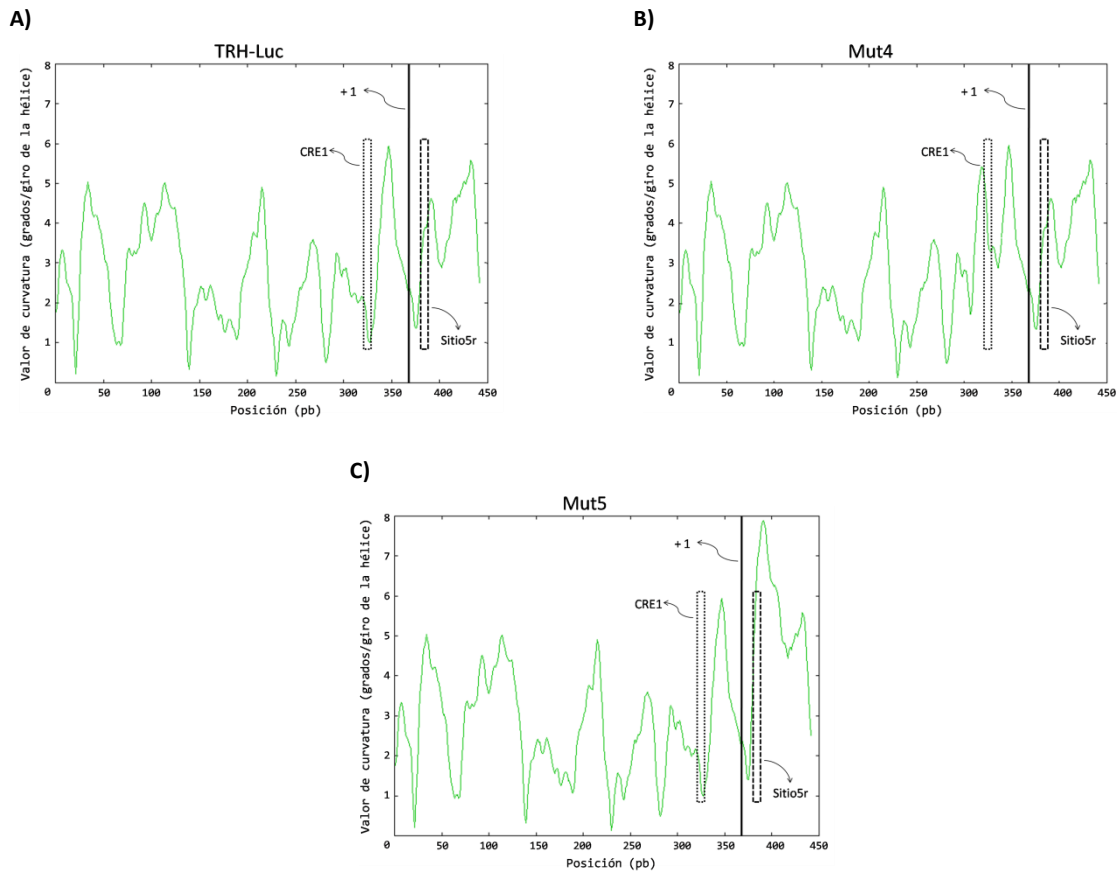
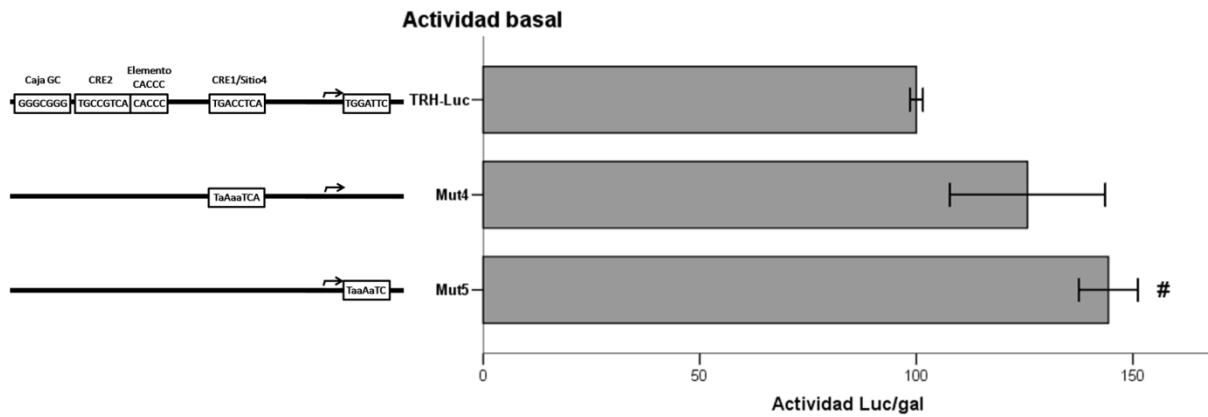


Figura 7. Las mutaciones Mut4 y Mut5 causan cambios en la curvatura teórica del DNA con respecto al promotor silvestre. Un fragmento del promotor de TRH (-360/+84) silvestre (TRH-Luc) y mutado (Mut4 y Mut5) se analizó con el programa MUTACURVE (Olivares-Zavaleta, et al., 2006) para detectar cambios en la curvatura teórica del DNA. A) curvatura de la secuencia silvestre; B) curvatura de la secuencia mutante Mut4; C) curvatura de la secuencia mutante Mut5. Cuando la secuencia del sitio CRE1 (TGACCTCA) es sustituida por la secuencia TAAAATCA (Mut4), y la secuencia del Sitio 5r (TGGATTC) se sustituye por TAAAATC (Mut5) cambia la curvatura teórica del DNA. Los recuadros indican las regiones de las secuencias CRE1 y Sitio 5r; la línea horizontal indica el sitio de inicio de la transcripción (+1).

Para tratar de probar nuestra hipótesis de que el abatimiento en la actividad basal de la mutante Mut4 reportado por Harris y colaboradores (2001) se debía a un cambio en la conformación del DNA y no a la incapacidad de reconocimiento del sitio por CREB-P (ver la sección de “antecedentes”) se probó la actividad basal y la respuesta a forskolina de ambas mutaciones en el promotor de TRH (figura 8).

A)



B)

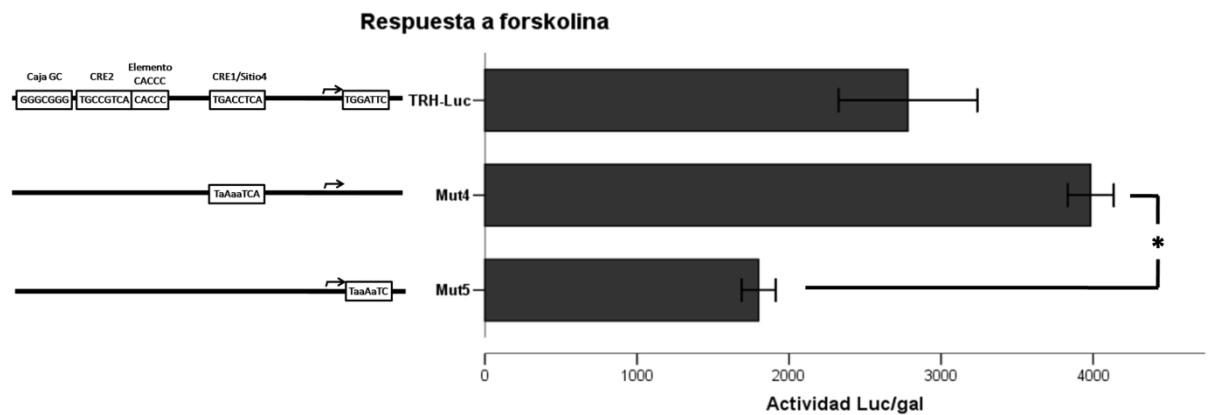


Figura 8. La mutación Mut5 y no la Mut4 cambia los niveles de actividad basal del promotor de TRH mientras que la respuesta a forskolina no se ve afectada. Células GH3 se transfectaron con el vector indicado y se estimularon (B) o no (A) por 6hrs con forskolina 10 μ M. TRH-Luc Control=100%. ANOVA una vía F=40.35; post-hoc: #= p <0.0006 vs TRH-Luc basal; *= p <0.003 vs Mut4 Forsk. n \geq 6. Las barras representan el promedio \pm el error estándar.

A diferencia de lo reportado por Harris, la actividad basal de Mut4 no fue distinta a la del vector silvestre e inclusive su respuesta a forskolina fue mayor aunque no significativa, mientras que la actividad basal de Mut5 fue significativamente mayor que la del promotor silvestre pero la respuesta a forskolina fue menor que la de Mut4 y TRH-Luc. Estos resultados indican que el cambio en la curvatura teórica del DNA predicho por el análisis *in silico* para las mutantes Mut4 y Mut5 no afecta la actividad basal y tiene ligeros efectos en la respuesta a la activación de PKA, en contraste a lo reportado por Harris. La diferencia entre ambos reportes podría entonces deberse al cambio en las concentraciones de factores de transcripción debido al empleo de distintas líneas celulares y no a un posible cambio en la curvatura del DNA ocasionado por la mutación.

3. Papel del sitio CRE2 en respuesta a forskolina.

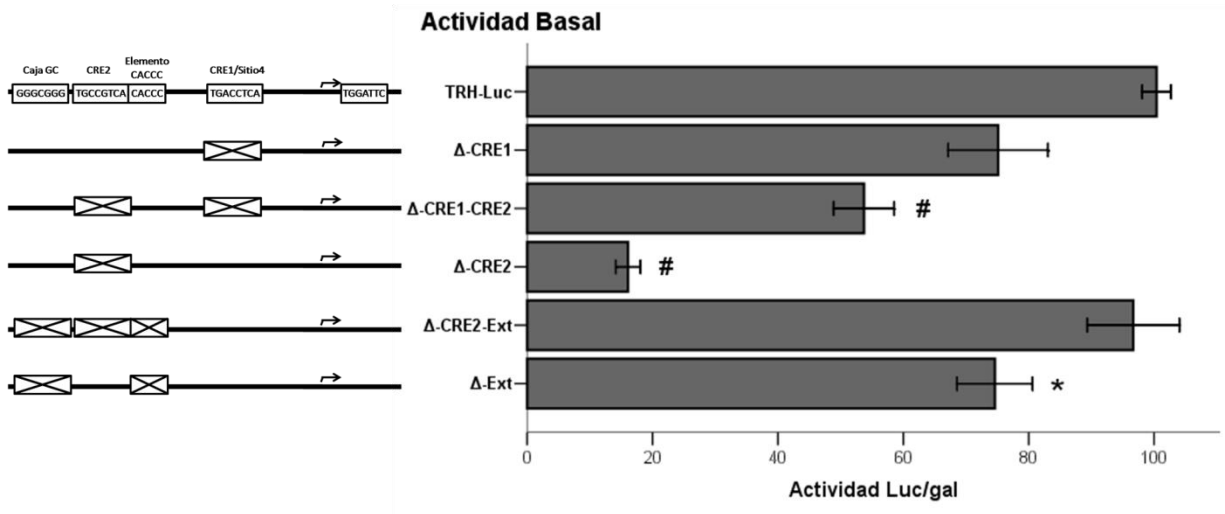
3.1 La integridad del sitio CRE-extendido es importante en la respuesta del promotor de TRH a la activación de la vía de PKA en la línea C6.

Una vez demostrado que el sitio CRE1 tiene poca participación en la respuesta del promotor de TRH a la activación de PKA (Tabla 2; Pérez-Maldonado, 2010) quedó por probar la hipótesis de la preponderancia del sitio CRE2. Para ello, se midieron las respuestas de las deleciones en el promotor de TRH en este sitio y en CRE1 en la misma línea celular empleada para las mutaciones puntuales en los trabajos antes citados (Pérez-Maldonado, 2010; Barrera-Dircio, 2010). Como ya se mencionó, en nuestro laboratorio se demostró, por ensayos de protección a DNAsa, que los elementos adyacentes a CRE2 (elemento CACCC y caja GC; potenciales sitios de unión para factores del tipo Sp/Krüppel) se protegían con extractos nucleares de células incubadas con activadores de PKA y, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se demostró la unión de Sp1 a esta región luego del mismo estímulo (Díaz-Gallardo, et al., 2010a; Díaz-Gallardo, et al., 2010b), por lo que resultó de interés probar también la respuesta a la forskolina en mutantes en estos elementos. Para evaluar los efectos de las mutantes tanto en la actividad basal como en la respuesta a forskolina se calcularon los datos de los diferentes cultivos, normalizando a los datos de los platos control (transfectados con TRH-Luc) incluidos en cada experimento (=100%); asimismo, los valores de la actividad Luc/gal en respuesta a forskolina de las células control, se normalizó a 100% y se calcularon las diferencias en las respuestas de las mutantes (figura 9).

La actividad basal disminuyó significativamente en las mutantes que tienen escindido el sitio CRE2 (Δ -CRE2, Δ -CRE1-CRE2), a niveles variables dependiendo de la mutación, alcanzando hasta un 84% en Δ -CRE2, mientras que la mutante Δ -CRE1 no presentó cambios significativos. Como se describió anteriormente, cuando el sitio CRE2 es sustituido por otro sitio CRE1 (tabla 2, mutante p1808) disminuye la actividad basal, curiosamente a un mismo nivel que el observado en la deleción de los dos sitios CRE (Δ -CRE1-CRE2). En el caso de la mutante a la que se le eliminaron los sitios GC y CACCC (Δ -Ext) la actividad también disminuyó, pero a un nivel intermedio, cuando se compara con mutantes en uno solo de los sitios (mutantes m-GC y m-CACCC reportadas en Cote-Vélez, et al., 2011). Debido a la

disminución en la actividad basal observada en Δ -CRE2 y Δ -Ext, fue sorprendente que el vector Δ -CRE2-Ext recuperara la actividad basal (figura 9A).

A)



B)

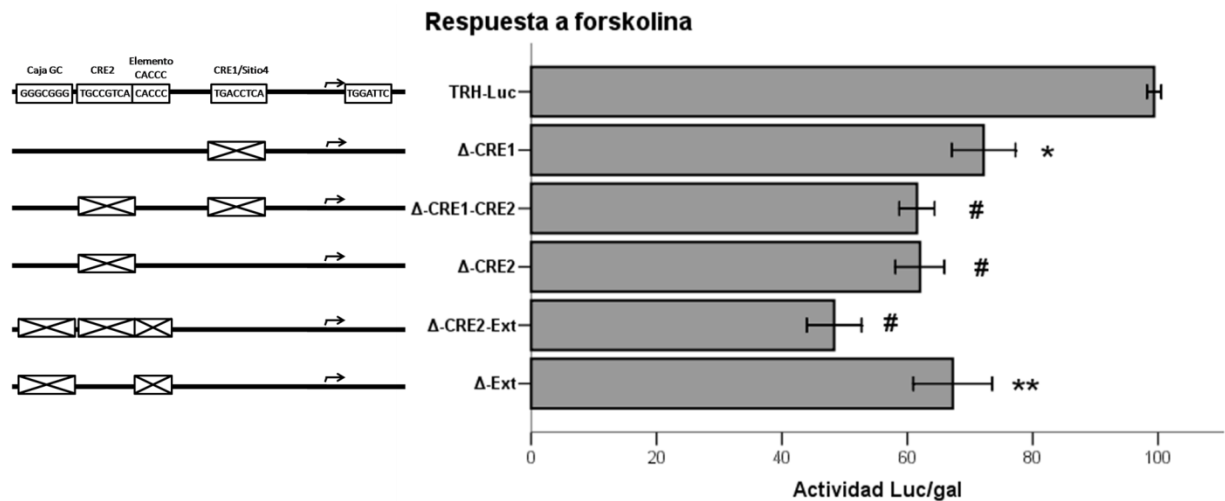


Figura 9. La delección del sitio CRE2 ocasiona cambios en la actividad basal y en la respuesta a la activación de la vía de PKA del promotor de TRH. Células C6 se transfectaron con el plásmido indicado y se estimularon (B) o no (A) con forskolina 10 μ M por 6hrs. TRH-Luc=100%. ANOVA una vía F=52.84(A) y F=53.28(B), post-hoc: *=p<0.02, **=p<0.002 y #=p<0.000001 vs TRH-Luc. n \geq 6. Las barras representan el promedio \pm el error estándar.

Estas diferencias en la actividad basal de las mutantes de CRE2, tan pronunciadas en algunas de ellas, no se observaron en la respuesta a forskolina ya que todas presentaron una estimulación de entre 38 y 50% menor a la del promotor silvestre (figura 9B). Puede observarse una mínima participación, aunque significativa, del sitio CRE1 en la respuesta a la

forskolina, sin embargo las mutaciones puntuales en este sitio no presentan el mismo efecto que su delección (tabla 2 y figura 9B). Estos resultados sugieren que la integridad del sitio CRE2 es esencial en la respuesta a la activación de la vía de PKA y que los sitios aledaños contribuyen a esta respuesta.

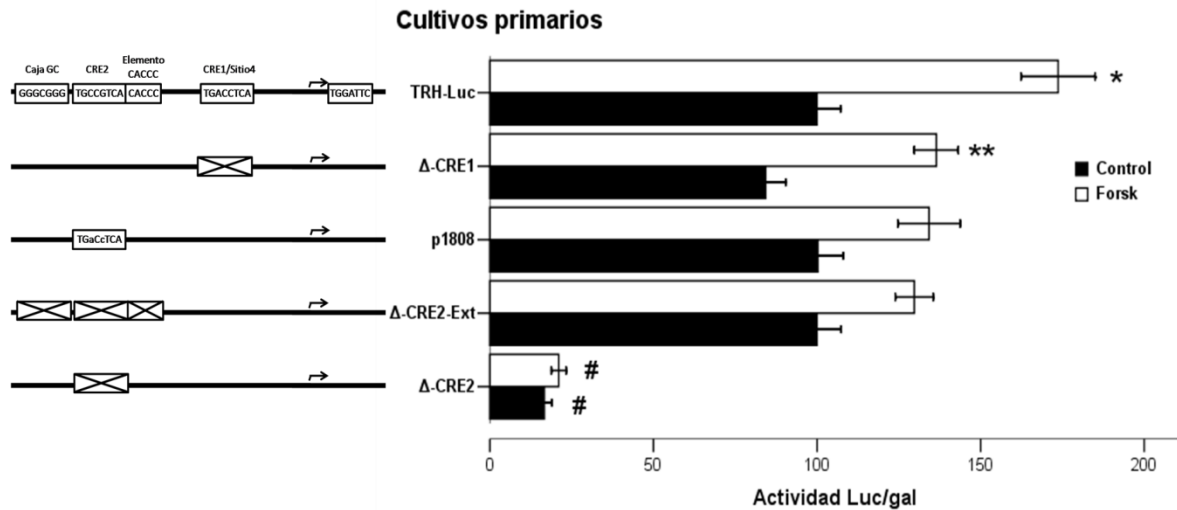


Figura 10. Las mutaciones en el promotor de TRH tienen básicamente el mismo comportamiento en cultivos primarios de hipotálamos fetales de rata que el reportado en la línea celular. Cultivos primarios se transfectaron con el vector indicado y se estimularon por 6hrs con forskolina 10 μ M. TRH-Luc control=100%. ANOVA una vía F=40.52, post-hoc: *=p<0.005 y **=p<0.02 vs su propio control; #=p<0.00003 vs TRH-Luc control. n \geq 6. Las barras representan el promedio \pm el error estándar.

3.2 Validación en cultivos primarios.

Al igual que para el sitio CRE1, los resultados obtenidos con las mutantes de CRE2, GC y CACCC en la línea celular C6 se validaron en cultivos primarios hipotalámicos (figura 10). Se observa que la respuesta a la activación de PKA, obtenida con el promotor silvestre, se pierde si se cambia CRE2 por otro CRE1 (p1808), si se elimina el sitio CRE2 (Δ -CRE2) o si se eliminan CRE2, GC y CACCC (Δ -CRE2-Ext). De forma similar, se reproduce el comportamiento en las actividades basales de Δ -CRE2 (disminuye 83%) y Δ -CRE2-Ext (igual al silvestre) obtenido en células C6. La mutante Δ -CRE1 muestra una ligera reducción en la actividad basal (no significativa) pero mantiene la activación por forskolina aunque de menor magnitud que la mostrada por TRH-Luc.

Discusión y conclusiones.

El objetivo de este trabajo consistió en determinar el papel que juegan los sitios CRE1, CRE2, así como las secuencias adyacentes a éste (caja GC y elemento CACCC) en respuesta a la activación de PKA y cómo CRE1 participa de la respuesta a la hormona tiroidea T3. Para lograrlo, se utilizó un sistema de células transfectadas con un gen reportero bajo el control del promotor de TRH en su versión silvestre o diversas mutantes en los sitios mencionados. Se emplearon mutaciones puntuales y deleciones de los sitios de interés. De acuerdo a las características intrínsecas de las líneas y la respuesta a los activadores, se utilizaron dos líneas celulares: un glioblastoma de rata (C6) para determinar el papel de los sitios en respuesta a la forskolina; y para explorar el papel del sitio CRE1 en respuesta a T3, las células GH3 de origen hipofisiario, ampliamente utilizadas para observar la regulación por TH y caracterizadas por expresar niveles adecuados de TR (Dobner, et al., 1981; Carr y Wong, 1994; Hahn, et al., 1999; Fujimoto, et al., 2004). Reportes anteriores asignaron el sitio CRE1 como el mediador de ambas respuestas, postulando los efectos estimuladores (AMPC) o inhibidores (T3) debidos a una competencia entre CREB y TR por la unión al sitio (Hollenberg, et al., 1995; Harris, et al., 2001). Experimentos realizados en el laboratorio indicaron la unión de CREB-P, no a CRE1 sino a CRE2, luego de a la activación de PKA, encontrándose, también, la unión de factores Sp/Krüppel a las secuencias adyacentes en respuesta al mismo estímulo; TR se unió a CRE1 en respuesta a T3 (Díaz-Gallardo, et al., 2010a; Díaz-Gallardo, et al., 2010b).

En este trabajo obtuvimos una respuesta tan similar en la inhibición por T3 en las mutantes de CRE1 que parecía artefactual, ya que al menos 2 de ellas carecían del sitio TRE. Esto podría indicarnos: a) debido a la participación fundamental de las TH en la regulación de varias enzimas metabólicas como la G3PDH (Díaz-Gallardo, et al., 2010a) y en procesos como la biogénesis mitocondrial (Weitzel y Iwen, 2011), la T3 podría estar modificando el metabolismo propio de la célula; b) probables efectos indirectos al actuar sobre receptores membranales que activan vías de señalización como la de ERK1/2 o el tráfico intracelular de factores de transcripción (Cheng, et al., 2010), que a su vez pudieran causar la inhibición; c) los resultados apoyaban un modelo en el que la inhibición por el complejo T3-TR no estaba mediado por su interacción con el DNA (figura 1C) sino que el complejo participa del

secuestro de co-reguladores que entonces no están disponibles para otros factores de transcripción; y d) la inhibición podría ser un efecto artefactual del sistema. En los trabajos citados (Hollenberg, et al., 1995, Satoh, et al., 1996, Guissouma, et al., 2002) utilizan el TRH-Luc co-transfectado con vectores de expresión para TR β que incrementan la expresión del reportero en ausencia de T3 y disminuyen en un 60% al adicionar T3 por 24 ó 48hrs. Nosotros en cambio, utilizamos los TR presentes en las líneas celulares. Es posible que ante tal aumento en la cantidad de reportero ocasionado por el exceso de TR β , no se observe algún efecto indirecto de T3 sobre el metabolismo celular u otros eventos. Una búsqueda en la literatura permitió encontrar un reporte en el que muestran que el cDNA de luciferasa de luciérnaga (empleado aquí como gen reportero) posee elementos regulatorios que inhiben su expresión en respuesta a T3 independientemente del promotor que lo regule y que este fenómeno no se observa cuando el reportero es por ejemplo la CAT (cloranfenicol acetiltransferasa) (Misawa, et al., 2012). Este trabajo incluyó las líneas celulares CV1 y JEG31, mismas que fueron utilizadas por Hollenberg cuando propuso al sitio CRE1 como el principal elemento de respuesta a T3 en el gen de TRH. Este reporte explica nuestros resultados ya que, como se mencionó, el nivel de inhibición fue muy similar en todas las mutantes. Por lo tanto, será necesario cambiar el gen reportero (e.g. CAT) si se quiere continuar con el análisis del efecto de T3.

Desde su identificación en el gen de somatostatina (Montminy y Bilezikjian, 1987), múltiples variantes de CRE se han reportado en otros genes, incluyendo el de TRH (Lee, et al., 1998). Se ha reconocido que varios factores influyen en el reconocimiento de CRE por CREB, en particular, el dinucleótido central CpG juega un papel importante (Schumacher, et al., 2000), así como la conformación del dímero formado por CREB, ya que existen varios tipos de CREB y ATFs, muchos de los cuales son célula-específicos (Cha-Molstad, et al., 2004). Sin embargo algunos de los mecanismos moleculares finos por los que CREB actúa siguen estando en discusión, por ejemplo, algunos autores mencionan que CREB se encuentra constitutivamente unido a las secuencias CRE (Sands y Palmer, 2008), otros, que la interacción CREB-DNA no se produce sino hasta la fosforilación del factor transcripcional (Cha-Molstad, et al., 2004) y hay quien propone que las diferencias tejido-específicas de la

función de CREB se deben a una combinación de ambos mecanismos (Carlezon Jr, et al., 2005). Entre más se aleja el sitio CRE de la secuencia consenso, la necesidad de fosforilaciones, interacciones con otros factores del tipo Sp/Krüppel, etc. se vuelven esenciales.

Los resultados aquí reportados demuestran la participación de varias secuencias del promotor del gen de TRH de rata en su regulación transcripcional. Existe poca participación de CRE1 en la actividad basal ya que no se vio modificada en ninguna de las mutantes empleadas (p766, p767 en tabla 2 y Δ -CRE1 en la figura 4). La eliminación de CRE1 o su mutación más allá del posible reconocimiento por CREB tampoco causó cambios en la respuesta a la activación de PKA, sólo la mutante p767 vio eliminada tal respuesta a las 4hrs y disminuida a las 6hrs de estímulo; esto podría deberse a ligeras variaciones en la afinidad de la maquinaria basal de transcripción ocasionada por el cambio en la secuencia ya que, como se mencionó anteriormente, el sitio CRE1 se encuentra a sólo 12pb de distancia del sitio ocupado por el complejo de pre-inicio de la transcripción. La baja afinidad de CREB por el sitio CRE1 queda de manifiesto en la mutante a la cual se le cambió la secuencia CRE2 por CRE1 (p1808), la cual presentó una disminución del 50% en las actividades basal y estimulada (tabla 2).

La pérdida de la unión de CREB-P al DNA no es suficiente para explicar la actividad basal disminuida en las mutantes de CRE2 ya que la mutación en el elemento CACCC tiene el mismo efecto (figura 9 y Cote-Vélez, et al., 2011). La actividad basal de TRH depende de varios elementos en su promotor, entre ellos, sitios para la unión de factores STAT, Sp/Krüppel, GR, etc. los cuales pueden ser activados por componentes del suero con el que se suplementa el medio de cultivo. La secuencia CACCC ha sido propuesta como un elemento de unión a factores de la familia Sp/Krüppel que incluye tanto elementos activadores como represores (Kaczynski, et al., 2003) y que pueden interactuar con factores de la familias de CREB o AP-1 para activar la transcripción (Lui, et al., 2006). Nuestros resultados indican que para una adecuada expresión basal de TRH es necesaria la unión de factores a los sitios CRE2 y CACCC, sin embargo, las construcciones Δ -Ext y Δ -CRE2-Ext no mostraron una actividad basal disminuida lo que podría indicar que el acercamiento de los elementos GC y CACCC al

eliminar CRE2 (Δ -CRE2), pudiera cambiar las asociaciones entre factores de la familia Sp/Krüppel, favoreciéndose la unión de elementos represores, contribuyendo con esto a disminuir la actividad basal.

El papel fundamental del sitio CRE2 en la respuesta a la activación de PKA quedó demostrado al observar que todas las mutantes de este sitio presentan una disminución en su respuesta a forskolina que varía un poco de acuerdo a la mutación. Contrario a lo ocurrido con la actividad basal, la mutante Δ -CRE2-Ext fue la que presentó una menor respuesta a la activación de la vía de PKA (47% de la mostrada por el vector silvestre). La participación del sitio CRE2 en respuesta a la forskolina es independiente de la presencia de CRE1, ya que cuando se comparan las respuestas de las mutantes Δ -CRE2 y Δ -CRE1-CRE2, se puede observar que son de igual magnitud. Este resultado y el mantenimiento de la respuesta a la forskolina de la mutante Δ -CRE1 (discutido arriba) nos indican que es CRE2 y no CRE1 el sitio que media la respuesta a la activación de PKA. Los resultados obtenidos con las mutantes de los sitios GC y CACCC, nos permiten establecer su importancia en la respuesta a forskolina además de proponer la participación conjunta de factores de las familias CREB/ATF y Sp/Krüppel en la regulación positiva del gen de TRH en respuesta a la activación de PKA (figura 11). Esta propuesta está en línea con el hecho de que Sp1 se encuentra unido al promotor de TRH en cultivos primarios hipotalámicos fetales de rata estimulados con AMPc (Díaz-Gallardo, et al., 2010b). Esta sinergia entre los factores CREB y Sp1 ya ha sido demostrada en otros genes (Schumacher, et al, 2000; Raychowdhury, et al., 2002; Mahapatra, et al., 2006; Cramer, et al., 2008); adicionalmente, secuencias que pueden reconocer un complejo de factores de transcripción formado por integrantes de las familias CREB/ATF y Sp/Krüppel ya se han descrito con anterioridad (Lui, et al., 2006; Wang, et al., 2007).

La relevancia de los sitios CRE2, GC y CACCC en la regulación transcripcional por AMPc fue validada mediante cultivos primarios hipotalámicos (figura 10). Se observan los mismos resultados a los obtenidos con la línea celular C6 para tres de las cuatro mutantes probadas; con el vector p1808 no se pudo reproducir el descenso en la actividad basal reportado en mi tesis de licenciatura, lo que indicaría que otros sitios como el GRE compuesto con sitios aledaños de reconocimiento a AP-1, o el STAT-3 y quizá la secuencia del CRE1 pueden suplir la

ausencia de CRE2, al menos en la actividad basal, ya que la respuesta a forskolina se pierde al igual que con las mutantes que no tienen ni el sitio CRE2 (Δ -CRE2) ni los elementos GC y CACCC (Δ -CRE2-Ext).

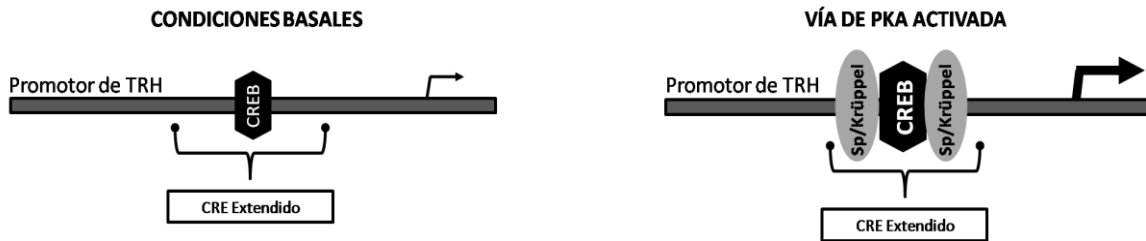


Figura 11. Los factores CREB y Sp/Krüppel actúan de manera sinérgica en la activación del promotor de TRH en respuesta a la activación de la vía de PKA. De acuerdo a lo presentado en esta tesis y resultados previamente reportados (Díaz-Gallardo, et al., 2010a; Díaz-Gallardo, et al., 2010b; Pérez-Maldonado, 2010; Barrera-Dircio, 2010) se propone que la actividad basal del promotor de TRH es debida principalmente a la unión de CREB al sitio CRE2. Cuando aumenta la transcripción a causa de la activación de la vía de PKA, esta unión se ve favorecida probablemente por la asociación de factores Sp/Krüppel (Sp1 en Díaz-Gallardo, et al., 2010b) con las secuencias adyacentes formando así un sitio CRE Extendido.

Perspectivas

- Realizar ensayos de transfección como los reportados en el apartado 1.2 de resultados empleando un gen reportero que no sea sujeto a regulación por T3 (e.g. la cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT)) para obtener información acerca de la participación del sitio CRE1 en la respuesta transcripcional del gen de TRH a la estimulación con T3.
- Seguir explorando las respuestas diferenciales de los tipos celulares empleados en el apartado 1.1 de resultados para arrojar más información acerca del posible mecanismo de regulación transcripcional negativa por T3 al comparar los factores co-reguladores que se encuentran en cada tipo celular.

Bibliografía

- Akil, H., Campeau, S., Cullinan, W. E., Lechan, R. M., Toni, R., Watson, S. J., Moore, R. Y. (2003). Neuroendocrine systems I: Overview - Thyroid and adrenal axes. In L. R. Squire, F. E. Bloom, S. K. McConnell, J. L. Roberts, N. C. Spitzer, M. J. Zigmond (Eds.), *Fundamental Neuroscience*. Academic Press.
- Alkemade, A. (2010). Central and peripheral effects of thyroid hormone signaling in the control of energy metabolism. *Journal of Neuroendocrinology*. 22(1):56-63.
- Balkan, W., Tavianini, 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 exon1. *Endocrinology*. 139(1):252-259.

- Barrera-Dircio, B. (2010). Papel de la proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB) y del elemento de respuesta al cAMP 2 (CRE-2) en la regulación transcripcional del gen de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. (2001). *Neuroscience: Exploring the brain*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Boler, J., Enzmann, F., Folkers, K., Bowers, C. Y., Schally, A. V. (1969). The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochemical and biophysical research communications*. 37(4):705-10.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72:248-54.
- Burgus, R., Dunn, T. F., Desiderio, D., Guillemin, R. (1969). Structure moleculaire du facteur hypothalamique hypophysiotrope TRF d'origine ovine: mise en évidence par spectrometrie de masse de la sequence PCA-His-Pro-NH₂. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles*. 269(19):1870-3.
- Carlezon Jr, W. A., Duman, R. S., Nestler, E. J. (2005). The many faces of CREB. *Trends in Neuroscience*. 28(8):436-445.
- Carr, F. E., Kaseem, L. L., Wong, N. C. W. (1994). Thyroid hormone inhibits thyrotropin gene expression via a position-independent negative L-triiodothyronine-responsive element. *The Journal of Biological Chemistry*. 267(26):18689-18694.
- Carr, F. E., Wong, N. C. W. (1994). Characteristics of a negative thyroid hormone response element. *The Journal of Biological Chemistry*. 269(6):4175-4179.
- Cha-Molstad, H., Keller, D. M., Yochum, G. S., Impey, S., Goodman, R. H. (2004). Cell-type-specific binding of the transcription factor CREB to the cAMP-response element. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 101(37):13572-13577.
- Cheng, S.-Y., Leonard, J. L., Davis, P. J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormones actions. *Endocrine Reviews*. 31(2):139-170.
- Chiamolera, M. I., Sidhaye, A. R., Matsumoto, S., He, Q., Hashimoto, K., Ortiga-Carvalho, T. M., Wondisford, F. E. (2012). Fundamentally distinct roles of thyroid hormone receptor isoforms in a thyrotroph cell line are due to differential DNA binding. *Molecular Endocrinology*. 26(6):926-939.
- Chiamolera, M. I., Wondisford, F. E. (2009). Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*. 150(3):1091-1096.
- Cenni, B., Picard, D. (1999). Ligand-independent activation of steroid receptors: New roles for old players. *Trends in endocrinology and metabolism*. 10(2):41-46.
- Cote-Vélez, A., Pérez-Maldonado, A., Osuna, J., Barrera, B., Charli, J.-L., Joseph-Bravo, P. (2011). CREB and Sp/Krüppel response elements cooperate to control rat TRH gene transcription in response to cAMP. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1809(3):191-199.
- Cote-Vélez, A., Pérez-Martínez, L., Díaz-Gallardo, M. Y., Pérez-Monter, C., Carreón-Rodríguez, A., Charli, J.-L., Joseph-Bravo, P. (2005). Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter. *Journal of molecular endocrinology*. 34(1):177-197.
- Cramer, T., Juttner, S., Plath, T., Mergler, S., Seufferlein, T., Wang, T.C., Merchant, J., Hocker, M. (2008). Gastrin transactivates the chromogranin A gene through MEK-1/ERK- and PKC-dependent phosphorylation of Sp1 and CREB. *Cellular Signalling*. 20(1):60-72.
- Díaz-Gallardo, M. Y., Cote-Vélez, A., Carreón-Rodríguez, A., Charli, J. L., Joseph-Bravo, P. (2010a). Phosphorylated cyclic-AMP-response element-binding protein and thyroid hormone receptor have independent response elements in the rat thyrotropin-releasing hormone promoter: an analysis in hypothalamic cells. *Neuroendocrinology*. 91(1):64-76.
- Díaz-Gallardo, M. Y., Cote-Vélez, A., Charli, J. L., Joseph-Bravo, P. (2010b). A rapid interference between glucocorticoids and cAMP-activated signalling in hypothalamic neurones 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. *Journal of neuroendocrinology*. 22(4):282-293.
- Dobner, P. R., Kawasaki, E. S., Yu, L.-Y., Bancroft, F. C. (1981). Thyroid or glucocorticoid hormone induces pre-growth-hormone mRNA and its probable nuclear precursor in rat pituitary cells. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the USA*. 78(4):2230-2234.
- Fujimoto, N., Jinno, N., Kitamura, S. (2004). Activation of estrogen response element dependent transcription by thyroid hormone with increase in estrogen receptor levels in a rat pituitary cell line, GH3. *The Journal of Endocrinology*. 181(1):77-83.
- Guissouma, H., Dupré, S. M., Becker, N., Jeannin, E., Seugnet, I., Desvergne, B., Demeneix, B. A. (2002). Feedback on hypothalamic TRH transcription is dependent on thyroid hormone receptor N terminus. *Molecular Endocrinology*. 16(7):1652-1666.
- Hahn, C.-G., Pawlyk, A. C., Whybrow, P. C., Tejani-Butt, S. M. (1999). Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms by thyroid hormone and lithium in rat GH3 and B103 cells. *Biological Psychiatry*. 45(8):1004-1012.
- Harris, M., Aschkenasi, C., Elias, C. F., Chandrankunnel, A., Nillni, E A, Bjørbaek, C., Elmquist, J. K., Flier, J. S., Hollenberg, A. N. (2001). Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *The Journal of clinical investigation*. 107(1):111-120.
- Hollenberg, A. N., Monden, T., Flynn, T. R., Boers, M. E., Cohen, O., Wondisford, F. E. (1995). The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Molecular endocrinology*. 9(5):540-550.
- Impey, S., Goodman, R H. (2001). CREB signaling--timing is everything. *Science's STKE*. 82:pe1.
- Ishii, S., Yamada, M., Satoh, T., Monden, M., Hashimoto, K., Shibusawa, N., Onigata, K., Morikawa, A., Mori, M. (2004). Aberrant dynamics of histone deacetylation at the thyrotropin-releasing hormone gene in resistance to thyroid hormone. *Molecular Endocrinology*. 18(7):1708-1720.
- Ishizuka, T., Lazar, M.A. (2003). The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor. *Molecular and cellular biology*. 23(15):5122-5131.
- Iversen, E. (1995). Thyrotropin releasing hormone. Occurrence and role outside the central nervous system. *Danish medical bulletin*. 42(3):257-268.
- Joseph-Bravo, P., Cote-Vélez, A., Pérez-Martínez, L. (2006). Integration of neuroendocrine signals that regulate the activity of hypophysiotropic peptides. In P. Joseph-Bravo (Ed.), *Molecular Endocrinology* (Vol. 661, pp. 1-24). Research Signpost.
- Joseph-Bravo, P., de Gortari, P. (2007). El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. In F. Rebolledo, A. López-Munguía (Eds.), *Una ventana al quehacer científico*.
- Kaczynski, J., Cook, T., Urrutia, R. (2003). Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biology*. 4(2):206.
- Koller, K. J., Wolff, R. S., Warden, M. K., Zoeller, R. T. (1987). Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 84(20):7329-7333.
- Lazar, M. A. (2003). Thyroid hormone action: a binding contract. *Journal of Clinical Investigation*. 112(4):497-9.
- Lechan, R. M., Fekete, C. (2006). The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Progress in brain research*. 153:209-235.
- Lechan, R., Wu, Ping, Jackson, I., Wolf, H., Cooperman, S., Mandel, G., Goodman, R. H. (1986). Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science*. 231(4734):159-161.
- Lee, S. L., Stewart, K., Goodman, R H. (1988). Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *The Journal of biological chemistry*. 263(32):16604-16609.
- Li, J., Lin, Q., Yoon, H.-G, Huang, Z.-Q., Strahl, B. D., Allis, C. D., Wong, J. (2002). Involvement of histone methylation and phosphorylation in regulation of transcription by thyroid hormone receptor. *Molecular and cellular biology*. 22(16):5688-5697.
- Lui, W. Y., Sze, K. L., Lee, W. M. (2006). Nectin-2 expression in testicular cells is controlled via the functional cooperation between transcription factors of the Sp1, CREB, and AP-1 families. *Journal of Cellular Physiology*. 207(1):144-157.
- Mahapatra, N. R., Mahata, M., Ghosh, S., Gayen, J. R., O'Connor, D. T., Mahata, S. K. (2006). Molecular basis of neuroendocrine cell type-specific expression of the chromo- granin B gene: crucial role of the transcription factors CREB, AP-2, Egr-1 and Sp1. *Journal of Neurochemistry*. 99(1):119-133.
- Merino, E., Osuna, J., Bolívar, F., Soberón, X. (1992). A general, PCR-based method for single or combinatorial oligonucleotide-directed mutagenesis on pUC/M13 vectors. *BioTechniques*. 12(4):508-510.
- Misawa, H., Sasaki, S., Matsushita, A., Ohba, K., Iwaki, H., Matsunaga, H., Suzuki, S., Ishisuka, K., Oki, Y., Nakamura, H. (2012). Liganded thyroid hormone receptor inhibits phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate-

- induced enhancer activity via firefly luciferase cDNA. *PLoS ONE*. 7(1):e28916.
- Montminy, M., Bilezikjian, L. M. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*. 328:175-178.
- Nillni, E.A. (2010). Regulation of the hypothalamic Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 31(2):134-156.
- Nillni, E.A., Sevarino, K. A. (1999). The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocrine reviews*. 20(5):599-648.
- Olivares-Zavaleta, N., Jáuregui R., Merino, E. (2006). Genome analysis of *Escherichia coli* promoter sequences evidences that DNA static curvature plays a more important role in gene transcription than has previously been anticipated. *Genomics*. 87(3):329-337.
- Pérez-Maldonado, A. (2010). *Determinación del papel transcripcional del sitio CRE-1 del promotor del gen de TRH*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pérez-Martínez, L., Carreón-Rodríguez, A., González-Alzati, M. E., Morales, C., Charli, J. L., Joseph-Bravo, P. (1998). Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology*. 68(5):345-354.
- Raychowdhury, R., Schafer, G., Fleming, J., Rosewicz, S., Wiedenmann, B., Wang, T. C., Hocker, M. (2002). Interaction of early growth response protein 1 (Egr-1), specificity protein 1 (Sp1), and cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate response element binding protein (CREB) at a proximal response element is critical for gastrin-dependent activation of the chromogranin A promoter. *Molecular Endocrinology*. 16(12):2802-2818.
- Reichlin, S. (1998). Neuroendocrinology. In J. D. Wilson, D. W. Foster, H. M. Kronenberg, P. R. Larsen (Eds.), *Williams text of endocrinology*. W.B. Saunders Company.
- Roesler, W.J. (2000). What is a cAMP response unit? *Molecular and cellular endocrinology*. 162(1-2):1-7.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. USA: Cold Spring Harbor.
- Sands, W. A, Palmer, T. M. (2008). Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cellular signalling*. 20(3):460-6.
- Santos, G. M., Fairall, L., Schwabe, J. W. R. (2011). Negative regulation by nuclear receptors: a plethora of mechanisms. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 22(3):87-93.
- Sassone-Corsi, P. (1998). Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 30(1):27-38.
- Satoh, T., Yamada, M., Iwasaki, T., Mori, M. (1996). Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors. *The Journal of biological chemistry*. 271(44):27919-27926.
- Schumacher, M.A., Goodman, R.H., Brennan, R. G. (2000). The structure of a CREB bZIP-somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(45):35242-35247.
- Segerson, T. P., Kauer, J., Wolfe, H. C., Mobtaker, H., Wu, P, Jackson, I. M., Lechan, R M. (1987). Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*. 238(4823):78-80.
- Shaywitz, A. J., Greenberg, M. E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual review of biochemistry*. 68:821-861.
- Sugrue, M. L., Vella, K. R., Morales, C., Lopez, M. E., Hollenberg, A. (2010). The thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone at the level of transcription in vivo. *Endocrinology*. 151(2):793-801.
- Tagami, T., Madison, L.D., Nagaya, T., Jameson, J.L. (1997). Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Molecular and Cellular Biology*. 17(5):2642-2648.
- Uribe, R. M., Redondo, J. L., Charli, J. L., Joseph-Bravo, P. (1993). Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*. 58(1):140-145.
- Uribe, R.M., Pérez-Martínez, L., de Lourdes, C.M., Gómez, O., Covarrubias, L., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P. (1995). Phorbol ester or cAMP enhance thyrotropin-releasing hormone mRNA in primary cultures of hypothalamic cells. *Neuroscience Letters*. 201(1):41-44.
- Wang, G., Kawakami, K., Gick, G. (2007). Divergent signaling pathways mediate induction of Na, K-ATPase alpha 1 and beta 1 subunit gene transcription by low potassium. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 294(1-2):73-85.
- Wallis, M. (2010). Molecular evolution of the thyrotrophin-releasing hormone precursor in vertebrates: insights

- from comparative genomics. *Journal of neuroendocrinology*. 22(6):608-619.
- Wallukat, G. (2002). The beta-adrenergic receptors. *Herz*. 27(7):683-690.
- Weitzel, J. (2008). To bind or not to bind – how to down-regulate target genes by liganded thyroid hormone receptor? *Thyroid Research*. 1(1):4.
- Weitzel, J., Iwen, K. (2011). Coordination of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 342(1-2):1-7.
- Wilber, J.F., Xu, A.H. (1998). The thyrotropin-releasing hormone gene 1998: cloning, characterization, and transcriptional regulation in the central nervous system, heart, and testis. *Thyroid*. 8(10):897-901.
- Yang, I.M., Lin, A., Lee, S. L. (1992). CREB binding to variant cAMP responsive elements (CREs) in the rat TRH gene (abstract). San Antonio, 75th Annual Meeting of the Endocrine Society.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

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

Creb and Sp/Krüppel response elements cooperate to control rat TRH gene transcription in response to cAMP

Antonietta Cote-Vélez^a, Adrián Pérez-Maldonado^a, Joel Osuna^b, Benito Barrera^a, Jean-Louis Charli^a, Patricia Joseph-Bravo^{a,*}

^a Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, México

^b Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2010

Received in revised form 18 January 2011

Accepted 20 January 2011

Available online 23 January 2011

Keywords:

TRH

CRE

cAMP

Sp/KFL

Hypothalamus

Transcription

ABSTRACT

Expression of hypophysiotropic TRH, that controls thyroid axis activity, is increased by cold exposure; this effect is mimicked in rat hypothalamic cells incubated with norepinephrine or cAMP analogs. TRH proximal promoter contains three putative CRE: Site-4 or CRE-1 that overlaps an element recognized by thyroid hormone receptors, CRE-2 with adjacent sequences GC box or CACCC recognized by Sp/Krüppel factors (extended CRE-2), and AP-1 sites flanking a GRE_{1,2}. To evaluate the role of each element in the cAMP response, these sites were mutated or deleted in rat TRH promoter linked to luciferase gene (TRH-luc) and co-transfected with β-gal expression vector in various cell lines; C6 cells gave the highest response to forskolin. Basal activity was most affected by mutations or deletion of CRE-2 site, or CACCC (50–75% of wild type–WT). Forskolin-induced 3× stimulation in WT which decreased 25% with CRE-1 or AP-1 deletions, but 50% when CRE-2 or its 5′ adjacent GC box was altered. SH-SY5Y cells co-transfected with CREB-expression vector increased dB-cAMP response in the wild type but not in the CRE-2 mutated plasmid; cotransfecting CREB-A (a dominant negative expression vector) strongly diminished basal or cAMP response. Primary cultures of hypothalamic cells transfected with plasmids containing deletions of CRE-1, CRE-2, or extended CRE-2 failed to respond to forskolin when CRE-2 was modified. These results corroborate the CRE-2 site as the main cAMP-response element of rat TRH promoter, not exclusive of transcription factors of hypothalamic cells, and stress the relevance of adjacent Sp-1 sites, important mediators of some metabolic hormones.

Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Thyrotropin releasing hormone (TRH) was originally identified (and named) as the hypophysiotropic hormone controlling the adenohypophysial release of thyrotropin [1]. TRH and its receptors were later detected in several brain regions where it functions as a neuromodulator [2]. Biosynthesis of TRH in the parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nuclei (PVN) is tightly modulated by hormonal influences including thyroid hormones, glucocorticoids, and leptin, and in a fast and transient manner by neuronal inputs that respond to metabolic changes or to environmental stimuli such as cold [1,3–5]. TRH mRNA levels increase in a fast and transient manner in rats exposed to cold (1 h) or in dams after 30 min of suckling, conditions that stimulate the release of TRH and in turn, that of

thyrotropin or prolactin (respectively) [6–8]. In vitro, TRH biosynthesis has been studied in primary cultures of hypothalamic or pancreatic islet cells, as well as in various cell lines co-transfected with the TRH promoter linked to a reporter gene and expression vectors of thyroid hormone receptors or CREB [5,9–19]. These systems have provided information of transcriptional down-regulation by thyroid hormones [5,14,16,17] as well as the stimulatory effect of neuromodulators, or cAMP analogs that activate protein kinase A (PKA) [3,10–13,17,18]. Stimulation of hypothalamic cells by cAMP analogs or by norepinephrine mimics the fast increase in TRH mRNA levels seen *in vivo*, after cold exposure [6–8,10,11,13,17,18]. Primary cultures of hypothalamic cells increase TRH mRNA levels and TRH release within 1 h of noradrenaline or 8Br-cAMP treatment [13], while it takes over 2 h by protein kinase C (PKC) stimulation [10,11,19].

The multifactorial modulation of TRH gene expression involves several transcription factors interacting with their cognate recognition elements, or with other transducing molecules that affect their binding to DNA. TRH gene promoter contains response elements to various transcription factors whose binding has been demonstrated (CREB [12,13,17,18], thyroid hormone receptor (TR) [5,9,17], GR [13,18], STAT [12], c-Jun [13,18], c-Fos [18], Sp-1 [15,18]). The CREB response element (CRE) of the TRH promoter was first suggested [12]

Abbreviations: TRH, thyrotropin releasing hormone; GRE, glucocorticoid response element; cAMP, cyclic AMP; Luc, luciferase; Fsk, forskolin; PVN, paraventricular nucleus of the hypothalamus; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; β-gal, β-galactosidase; WT, wild type; LPS, lipopolysaccharide

* Corresponding author at: Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, A.P. 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México. Tel.: +52 555 6227632; fax: +52 555 6227622.

E-mail address: joseph@ibt.unam.mx (P. Joseph-Bravo).

1874-9399/\$ – see front matter. Published by Elsevier B.V.
doi:10.1016/j.bbagrm.2011.01.005

to be the one overlapping the thyroid hormone response element, named Site-4 [5,9] (TGACCTCA; at -59/-52 of rat TRH promoter [20]). Site-4 is a functional thyroid response element (THRE) that binds TR and mediates T3-induced repression of TRH transcription [4,5,9,16,21]. Its role as a CRE was characterized in 283T cells transfected with -900/+55 human TRH promoter linked to a reporter gene and CREB expression vectors [12]. However, binding of nuclear extracts of primary cultures of embryonic rat hypothalamic cells stimulated with cAMP analogs to labeled oligonucleotides containing Site-4 (or CRE-1) is lower than to oligonucleotides containing the CRE-2 sequence (TGCCGTCA; at -101/-94 bp of rat TRH gene) [13]; only the latter region is protected in DNase footprinting assays [17]. The sequences of both response elements are conserved in various eutherian species including human, mouse and some primates [22]. DNA-footprinting analyses, using rat TRH promoter and nuclear extracts of hypothalamic cultures incubated with 8Br-cAMP, revealed a protected region extending at both sides of CRE-2 (extended CRE-2) that contains the sequences of a GC box (GGCCGGG at -119/-113 bp) and a CACCC motif (at -92/-88 bp) [17,18,20]; both are response elements of Sp/Krüppel-like factors (Sp/KLF) [23]. Another element located upstream is also protected, the 3'-AP-1 site (TTAGTCA) of a composite GRE (cGRE: -218/-197 bp) that contains a GRE half site flanked by two AP-1 recognition sites; binding to both AP-1 sites is increased with PKC activation [13,18,19]. The preferential binding of phospho CREB (pCREB) to the region containing the extended CRE-2 was demonstrated by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays [17,18]. ChIP analyses of cAMP-stimulated hypothalamic cells revealed pCREB, c-Fos, c-Jun and Sp1 binding to the extended CRE-2 region and to that containing cGRE, c-Fos, c-Jun and in a lower proportion, pCREB; a negligible signal was detected in the pCREB-immunoprecipitate of short chromatin fragments selectively amplified for the CRE-1 region [18].

The differences observed in the involvement of CRE-1 between transfected heterologous and hypothalamic cells could involve either cell specificity of CREB proteins, the intrinsic difference of the nucleosome-free DNA template vs. organized chromatin, species, cell type, or the use of endogenous transcription factors vs. transfected expression vectors. A parallel comparison of the importance of the CRE-1 and CRE-2 sites on TRH transcription has not been performed. We therefore studied the contribution of each of these two proposed CRE sequences, as well as the AP-1 of cGRE, in the response to PKA stimulation on TRH transcription. Since protection of the extended CRE-2 region included the GC box where Sp1 binding has been demonstrated by EMSA [15], or by ChIP assays using nuclear extracts from stimulated hypothalamic cultured cells [18], the role of

this and of the CACCC site was also studied. Different cell types were initially tested to identify a cell line with a robust transcriptional response to cAMP, measured with a plasmid containing the rat TRH promoter linked to luciferase (pNASS-TRH-Luc plasmid, -776/+85 pb of rat promoter) [24]. The transcriptional activity (basal and forskolin-stimulated) of site-directed mutants and deletion constructs was compared to that of the wild type plasmid. Finally, plasmids containing deletions in the CRE-1 or CRE-2 sites were transfected into primary cultures of hypothalamic cells to verify the results obtained in the cell lines.

2. Material and methods

2.1. Plasmids

Plasmids were amplified in *E. coli*-DH5- α . Source of plasmids: pCH110 containing β -galactosidase under SV40 promoter (GE Healthcare, Piscataway, NJ); pUC18 (Fermentas, Life Sci., MD.); pNASS-TRH-Luc (-776/+85 pb of rat TRH gene promoter linked to luciferase reporter, kindly donated by Dr. Wayne Balkan, U. Miami [24]). CREB [25] or CREB-A [26] expression vectors were kindly donated by Dr. R. Goodman (Institut Vollum, Oregon University). Mutants of the GC box (m-GC: cGGGCTAG) or CACCC site (m-CACCC: tcaGTCCCctg) were constructed using pNASS-TRH plasmid and the "Gene Taylor site-directed mutagenesis system" (Invitrogen, Carlsbad, CA).

2.2. Construction of mutated plasmids

For cloning purposes, using standard molecular biology strategies, we first eliminated an undesired *AatII* restriction site present in the pNASS-TRH-Luc vector. This extra *AatII* site is located around 60 base pairs upstream of the -35 box of the beta-lactamase gene promoter. pNASS-TRH-Luc was mutated using the strategy reported [27] to obtain the mutations and deletions described in Fig. 1. Briefly, synthetic oligonucleotides containing the desired alterations (Table 1) were mixed with an external oligonucleotide (ExtTailStuI) flanking the *StuI* restriction site; a PCR reaction was carried out using pNASS-TRH-Luc as DNA template. The resultant PCR product was agarose gel-purified and used in a second PCR reaction containing again pNASS-TRH-Luc as DNA template and a new external oligonucleotide flanking the *AatII* restriction site (ExtAatII). To avoid TRH promoter wild type sequence contamination, this second PCR reaction used an oligonucleotide complementary only to the Tail portion of the TailStuI primer added during the first PCR reaction.

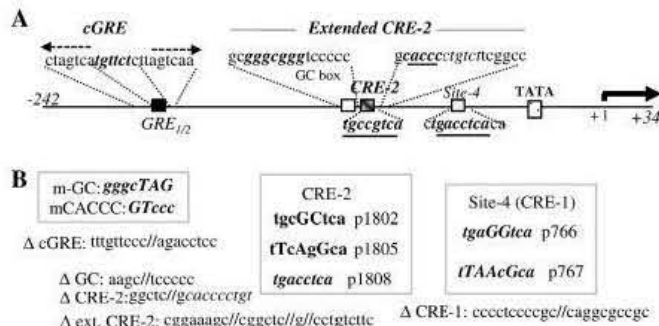


Fig. 1. Diagram of response elements in the proximal promoter of TRH gene and sequences of mutated plasmids used in this work. **A**) The following sites are signaled in bold-italics: the GRE_{1/2} of composite GRE (cGRE), with the sequence of and the adjacent AP-1 sites under the arrows; the extended CRE-2, with the GC box at the 5' side in bold-italics, below the CRE-2 sequence, above the CACCC of the 3' side; Site-4 = CRE-1 with the CRE-like sequence in bold-italics. **B**) The sequences of the different mutations next to the plasmid number are represented, as well as the sequences remaining after deletions (Δ); // = locus of deletion (s).

Table 1
Sequences of oligonucleotides used to construct plasmids containing mutations (underlined), or deletions, of the CRE-1 (Site-4), CRE-2 and adjacent sequences: GC box and CACC, and composite GRE present in rat TRH promoter (Fig. 1). Abbreviations: Del, deleted; Forw, forward; Back, backward.

Clone	Oligonucleotides
CRE-1MutA (p766)	5' GCCCCCTCCCCTGAGGTACAGGGCC GCGTCCAGCTCA 3'
CRE-1MutB (p767)	5' GCCCCCTCCCCTTAACGCACAGGGCCGG TCTCCAGCTCA 3'
CRE-2 to CRE-1 (p1808)	5' CCGGAAAGCGGGGCTCCCGGCTCTGACCTCA GCACCTGT CTTCGGC 3'
CRE-2MutA (p1802)	5' CCGGAAAGCGGGGCTCCCGGCTCTGCGCTCA GCACCTGTCT TCGGC 3'
CRE-2MutB (p1805)	5' CCGGAAAGCGGGGCTCCCGGCTCTCAGGCA GCACCTGTCT TCGGC 3'
m-GC	5' CCGGAAAGCGGGCTAGTCCCGGCTCTGCGGTAG CACCTGTCT TCGGC 3'
m-CACC	5' CCGGAAAGCGGGGCTCCCGGCTCTCAGGCA GCTCCCTGTCTTCGGC 3'
ExtTailStul	5' CCGGAGCCGGTGTGCTGGAACTTCCGTA CAGGCTAGAAG TAA 3'
ExtAatlI	5' TCCAT CGGGACTACTCCCG 3'
Tail	5' CCGGAGCCGGTGTGCTGG 3'
DelCre-1Back	5' GGGGGGAGGGGGCGC 3'
DelCre-2Forw	5' CCGGGGCTCGCACCTGTCTT 3'
DelCre-2Back	5' GCGAGCCGGGGACCCGC 3'
DelCre-2 + ExtForw	5' CAGCCCCACAGGGTTCCGGAAA GCGGCTCGCTCTTCGGCC 3'
DelCre-2 + ExtBack	5' CCGGAAACCTGGTGGG 3'
DelGREForw	5' CCTCCCTTTGTTCCAGACTCCGGAGC 3'
DelGREBack	5' GGGAAACAAGGGAGGG 3'
DelExtForw	5' TTCCGAAAGCCGCTCTGCGCTCAGCTGTCTTCGGCC 3'
DelExtBack	5' GACGGCAGAGCCGGCTTT 3'
DelCre-1 + Cre-2Forw	5' CCGGGGCTCGCACCTGTCTTCGGCTCGCCCC TCCCGCCAGCGCGCGGT 3'
DelCre-2Back	5' GCGAGCCGGGGACCCGC 3'
ExtAatlI-2	5' CTGTCTCGGATGCTCGC 3'

The deleted variants were constructed by overlap-extension PCR [28] using the oligonucleotide pairs described in Table 1. Forward (Forw) oligonucleotides were mixed with the external oligonucleotide ExtTailStul described earlier. Backward (Back) oligonucleotides were mixed with the external oligonucleotide ExtAatlI-2. Forw and Back PCR products were gel-purified and mixed together to produce the complete TRH promoter region in an overlapping PCR reaction using the external oligonucleotides (ExtTailStul and ExtAatlI-2). To construct the triple CRE-1 + CRE-2 + cGRE deleted variant an extra PCR was done using the DelCREForw and DelCRE-2Back oligonucleotides. The gel-purified PCR product was mixed with the cGREBack/ExtAatlI-2 PCR product and a new PCR product was produced by overlapping PCR using the oligonucleotides CRE-2Back and ExtAatlI-2. This gel-purified PCR product was then mixed with the DelCRE-1 + CRE-2Forw/ExtTailStul PCR product by a new overlapping PCR with the external oligonucleotides ExtTailStul and ExtAatlI-2 the final TRH promoter triple deleted variant was obtained.

All complete PCR products were gel-purified and digested with AatlI and Stul restriction enzymes and ligated to pNASS-TRH-Luc vector previously prepared with the same restriction enzymes. All constructs were verified by nucleotide sequencing. Plasmids are ampicillin resistant and were purified with Qiagen columns.

Mutated sequences were analyzed for recognition of the family of CREB/ATF transcription factors with MatInspector Genomatix Software [29], within the -776/+85 pNASS-TRH-Luc or, in fragments containing the mutated regions: -69/-42 (includes adjacent 10 pb of Site-4/CRE-1); -112/-41 (includes CRE-2, the 10 adjacent 5'-bases, up to CRE-1), and the -226/+44 sequence that includes the cGRE with its flanking AP-1 sites and the two CREs. The program approved CREB recognition of the wild type and the p766 mutant but not the p767 mutant. Mutant p1808 containing the CRE-1 sequence at

its original site and replacing that of CRE-2 was recognized by the program as CRE but only the one at the original CRE-1 site and not when inserted in the CRE-2 locus (-101/-94). Mutants with deleted regions did not recognize the proper transcription factor; however, deletion of the region containing the CRE-1 site (-52/-59) created a new Sp/KLF site: CCCC GCC [23].

2.3. Cell culture

The cell lines tested were from ATCC (Manassas, VA): NIH-3T3 (derived from mouse embryonic fibroblast; CRL-1658), Neuro-2a (mouse brain neuroblastoma; CCL-131), C6 (rat brain glioma; CCL-107), and COS-7 (monkey kidney fibroblast, CRL-1651). SH-SY5Y cells, derived from human neuroblastoma, were kindly donated by Dr. R Padros (U. Puebla; [13]). SH-SY5Y, COS-7 and NIH-3T3 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with: 0.25% glucose, 10% bovine fetal serum (BioWest, Nuallé, Fr), 2 mM glutamine (Sigma, St. Louis, MO), 1.65 µg/ml insulin (Sigma) and 0.5% vitamins (Invitrogen); C6 cells were grown in F-12K (Invitrogen) with supplements and Neuro-2a cells in supplemented MEM (Modified Eagle's Medium, Invitrogen). SH-SY5Y were differentiated as described [13]; briefly, cells were treated with 16 nM of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, Sigma) on the 2nd day in culture and medium was changed every third day. When cultures achieved confluence (3–6 days), cells were detached with 0.125% trypsin-EJTA (Invitrogen), and plated at a density of 2×10^5 cells in 24 wells pre-coated with 15 ng of poly-D-lysine (Sigma).

Primary cultures of rat fetal hypothalamic cells were prepared and maintained as described [11,13] using embryos from anesthetized dams at 17th day of gestation. Hypothalami were dissected from each embryo, cells dispersed, seeded on 1.5 µg/ml poly-D-lysine pre-coated plates, and cultured for 12 days in vitro (DIV) in 15 mm plates (6×10^5 cells; yield: 2.7×10^6 /hypothalami) in supplemented DMEM. Cultures were maintained at 37 °C with 7% CO₂, 93% air atmosphere, and 90% humidity.

2.4. Transient transfection and reporter gene assay

Cells were transfected, at confluence, on the 2nd day after seeding except for hypothalamic primary cultures that were transfected on the 12th DIV. The mixture containing the plasmids (200 ng of pNASS-TRH-Luc or of the mutated vector [Fig. 1], 250 ng pCHI10 [β-gal expression vector], 350 ng pUC18) was preincubated for 20 min at room temperature with Lipofectamine 2000 in fresh medium containing glucose as indicated (Invitrogen). When the CREB (or CREB-A) expression plasmid was co-transfected, the quantity of pUC18 was adjusted for a final DNA amount of 800 ng. In each well, 100 µl of incubation medium were replaced with 100 µl of the transfection mixture and incubated for 4–6 h at 37 °C; medium was then discarded, 700 µl of fresh supplemented medium was added, and the cells were left undisturbed for 48 h. 500 µl of incubation media were replaced with fresh supplemented medium containing (or not) PKA stimulating drugs (8-Br-cAMP, db-cAMP or forskolin, Sigma) at doses and times indicated in results. Forskolin was dissolved in DMSO (Sigma); controls contained the same volume of DMSO. At the end of the experiment, media were withdrawn and cells washed with PBS once, 50 µl of lysis buffer (Promega Biotech, Madison, WI) were added and after 5 min, cells of two identical plates were scraped and transferred to a microcentrifuge tube. Tubes were centrifuged at 12,000 × g, 4 °C, 2 min. The supernatant was recovered, 10 µl separated for protein quantification [30] and the rest, kept at -70 °C.

Since luciferase activity (Luc) in lysate of SH-SY5Y cells transfected with TRH-Luc was linear from 1.5–20 µg of protein, 5 µg were used for each lysate and quantified with the Luciferase assay system (Promega) in a luminometer (Monolight 3010, Pharmigen, NJ). Results were normalized against β-galactosidase activity, measured

as described [13] using 50 µg of protein (linearity observed in the 30–60 µg protein range). Optical density (o.d.) was read in an ELISA lector at 405 nm.

2.5. Statistical analyses

Since two identical plates were pooled to obtain adequate protein quantity for enzyme activity determination, this pool was considered as n = 1. Each plasmid was tested in at least 2 independent cultures always including in each, a group with the wild type plasmid and alternating, in different experiments, the various plasmids under study; in each culture, n = 3–4/group. Results of Luc/β-gal were calculated against the values of the basal activity of cells transfected with the wild type TRH-Luc in each trial, taken as 100%, for an adequate comparison between different experiments. Results are expressed as the mean ± S.E.M. except when a results from a representative experiment has n = 3/group, then the S.D. of the mean is included in the graph (i.e. Fig. 4B). Statistical significance was calculated by one or two way (2w) ANOVA considering controls of each culture (p < 0.05), followed by post hoc Bonferroni or Tukey multiple comparison (software Statview or SPSS 13.0).

3. Results

Cells from different origins were transfected with pNASS-TRH-Luc and assayed for their response to PKA activation by incubating each with 1, 10 or 100 µM forskolin for 3 h. β-galactosidase activity was similar in the different cell lines but luciferase activity varied considerably, suggesting differences in modulating TRH promoter. The lowest basal luc/β-gal activity was observed in NIH-3T3 cells (967 ± 215 relative light units/µg protein) increasing over 4000 fold in COS-7 cells and even more, in SH-SY5Y cells. The response to forskolin differed, being highest in the glioma cell line C6; in most, the highest forskolin response was attained with 10 µM (not shown). Fig. 2 shows data of a representative experiment where all cell lines were tested for their response to 10 µM forskolin (F_{9,34} = 29, p < 0.0001, n = 4/group); the experiment was repeated providing similar results. The C6 cell line was thus chosen for studying the effect of mutations in the TRH promoter on the transcriptional activity.

Basal activity was not significantly affected by mutations in the CRE-1 sequence compared to the wild type (WT), neither forskolin induced activity except for plasmid (p) 767, that was unresponsive at 4 h (Fig. 3A; mean of 2 independent cultures with n = 8–9/group, 2w ANOVA: differences between plasmids: F_{2,84} = 3.6 p = 0.031; treatment: F_{2,84} = 63.8 p < 0.0001; interaction: no significant). In contrast, mutations at the CRE-2 site (TGCCGTC A) diminished forskolin response; changing the central CpG for GpC (p1802) decreased the

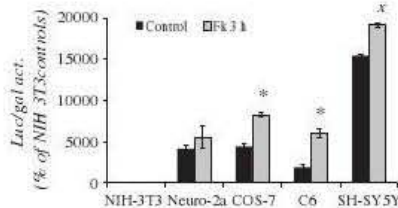


Fig. 2. TRH transcription in response to cAMP differs according to cell type. Cell lines stated in abscissa were transfected with the pNASS-TRH-Luc plasmid containing the -776/+85 pb sequence of rat TRH gene promoter linked to luciferase reporter [24], and with the β-gal expression vector. After 48 h, cells were incubated in fresh medium or, in medium containing 10 µM forskolin, for 3 h. Luciferase over galactosidase activity was calculated and expressed as % of values obtained in the NIH-3T3 control cells (= 100%). Post hoc analyses: significance vs. control; *p < 0.0001, *p = 0.003.

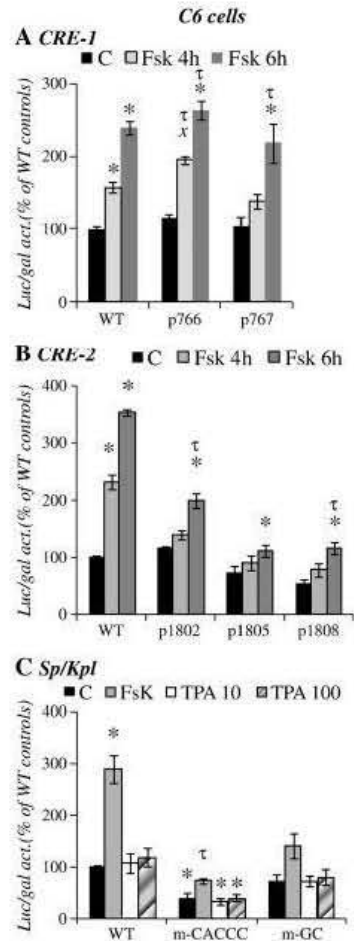


Fig. 3. Effect of point mutations in the CRE-1, CRE-2, GC box, or CACCC site of TRH promoter on transcriptional activity in Glioma C6 cell line. Cells were transfected with β-gal expression vector and with pNASS-TRH-Luc (WT), or the plasmid stated in abscissa (see Fig. 1). After 48 h cells were incubated in fresh medium or in medium containing 10 µM forskolin, for 4 or 6 h (A,B). C) Cells were incubated 6 h with either 10 µM forskolin, or TPA at 10 or 100 nM. Luciferase/galactosidase activity was calculated as % of control cells transfected with WT promoter (= 100%). Post hoc analyses: *p < 0.0001; *p < 0.05 vs WT control; τ p < 0.05 vs. its own control.

response to forskolin but not basal activity (Fig. 3B). The mutant with several base changes, including the central CpG (p1805), was unresponsive to forskolin stimulation although basal activity was preserved. When the CRE-2 site was substituted for the CRE-1 sequence (p1808), basal and forskolin-induced activities were reduced by 50% (Fig. 3B; results are the mean of each plasmid assayed in 3 of 4 independent cultures, n = 12/group except for p1808 n = 14 and WT = 16, 2w ANOVA: differences between plasmids: F_{3,179} = 33 p < 0.0001; treatment: F_{2,179} = 19 p < 0.0001; interaction: F_{6,179} = 6 p < 0.0001).

To confirm the prevalent role of CREB in the cAMP response, C6 cells were co-transfected with 150 ng of CREB-A plasmid and pNASS-TRH-Luc and incubated (or not) 6 h with 10 µM forskolin (Fsk); CREB-A reduced basal transcription and impeded the response to cAMP

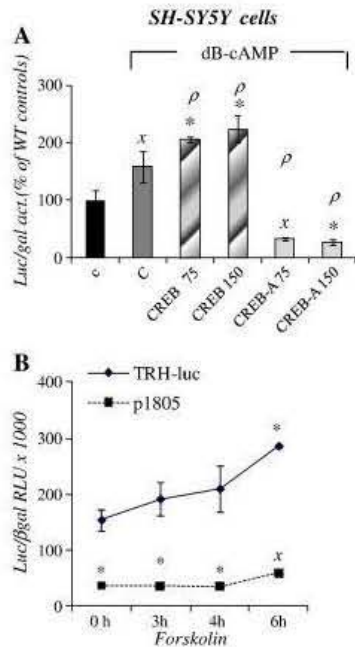


Fig. 4. Effect of CREB or CREB-A on TRH transcription in SH-SY5Y cells. **A)** Cells were transfected with pNASS-TRH-Luc and β -gal expression vector and incubated for 3 h in fresh medium (c) or with 1 mM db-cAMP (C); or, co-transfected with 75 or 150 ng of CREB or the dominant negative CREB-A expression vectors and stimulated 3 h with 1 mM db-cAMP. Post hoc: significance against WT control (c): * $p < 0.0001$, $^{\rho} p < 0.005$; against WT stimulated with forskolin: $^{\rho} p \leq 0.02$. **B)** Cells were co-transfected with CREB expression vector and either the pNASS-TRH-Luc or the p1805 plasmid and incubated with 10 μ M of forskolin for the times stated in abscissa. Results are Luc/ β -gal activity in % of control cells transfected with pNASS-TRH-Luc (= 100%), mean \pm S.D. * $p < 0.0001$; $^{\rho} p = 0.003$ against control WT.

stimulation (Luc/ β -gal activities of a representative experiment: WT controls: $100 \pm 4\%$, WT-Fsk: $348 \pm 17\%$; WT + CREB-A controls: $47 \pm 2\%$, WT + CREB-A Fsk: $56 \pm 3\%^*$; $F_{3,12} = 20.5$, $p > 0.0001$, post hoc: * $p < 0.0001$, $^{\rho} p = .0075$ vs. WT controls; $^{\rho} p < 0.0001$ between forskolin stimulated groups; $n = 4$). We then used the SH-SY5Y cells since they had a small response to forskolin (see Fig. 2). Different doses of cAMP analogs or forskolin were first assayed: 8Br-cAMP (1–3 mM), db-cAMP (0.2–1 mM), or (1, 10, 100 μ M) forskolin. A small increase in luciferase activity was significant only after 4 h incubation with cAMP analogs, increasing more by 6 h (not shown) and similarly with forskolin or noradrenaline (representative experiment $n = 4$ /group: $100 \pm 6\%$ in controls; $158 \pm 13\%$, 1 mM db-cAMP; $154 \pm 6\%$, 10 μ M forskolin; $216 \pm 21\%$, 10 nM NA; $F_{3,16} = 20.5$, $p > 0.0001$; post hoc * $p < 0.002$ vs. control). Plasmids expressing CREB or the dominant negative CREB-A [26] were co-transfected with pNASS-TRH-Luc in SH-SY5Y cells, and incubated with 1 mM db-cAMP only for 3 h to evaluate the fastest response possible; luciferase activity slightly increased after cAMP stimulation in TRH-Luc/ β -gal transfected cells, and over 2 fold when cells were co-transfected with CREB expressing vector; db-cAMP-induced activity decreased considerably when the dominant negative CREB-A was co-transfected with pNASS-TRH-Luc (Fig. 4A, $n = 4$ /group; $F_{5,23} = 56.6$, $p > 0.0001$). When the p1805 mutant was co-transfected with the CREB expression vector into SH-SY5Y cells, basal transcription was lower than in cells transfected with the pNASS-TRH-Luc, and no response was observed after forskolin stimulation, in contrast to wild type vector that showed

the previously observed 2 fold increase (Fig 4B shows results of a representative experiment $n = 3$ /group; $F_{7,24} = 26$, $p < 0.0001$). These results confirmed CREB's involvement in TRH transcription, independently of the cell line used.

The following experiments were performed in C6 cells to have a complete assessment of various response elements in a homogeneous cell population. The contribution of the Sp/Krüppel recognition elements adjacent to each side of the CRE-2 was studied mutating them as shown in Fig. 1. Transfected cells were incubated with forskolin or with TPA, since this drug stimulates PKC but does not increase pCREB or SP1 binding to the extended CRE in hypothalamic cells [18] and may stimulate some factors of the Sp/KFL family [31]. Basal activity was lower in the m-CACCC than in the m-GC box or the WT (Fig. 3C); in contrast, the response of these mutant to forskolin stimulation was lower than WT, but lowest for the m-GC (Fig. 3C; mean of 2 independent cultures, $n = 8$ /group; 2w ANOVA: differences between plasmids: $F_{2,96} = 36.3$ $p < 0.0001$; treatment: $F_{3,96} = 18$

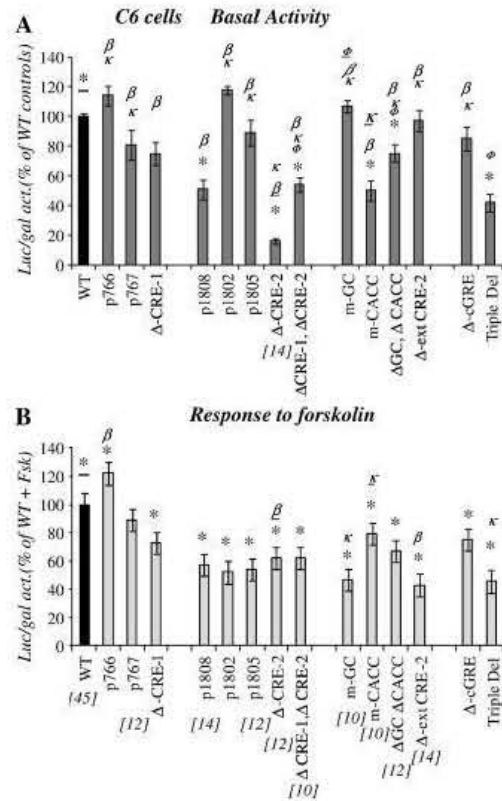


Fig. 5. Effect of mutations, or deletions, in different cAMP response elements of the rat TRH promoter, on the transcriptional activity in C6 cells. C6 cells were transfected with β -gal expression vector and wild type pNASS-TRH-Luc (WT) or the mutated plasmids stated in abscissa. After 48 h, cells were incubated 6 h with fresh medium or with 10 μ M of forskolin. **A)** Effect on basal activity. For each culture, values of Luc/ β -gal activities were calculated against values of controls transfected with WT (= 100%). **B)** Values of Luc/ β -gal activities of cells stimulated with forskolin were calculated against values of cells transfected with WT and stimulated with forskolin (= 100%). Each plasmid was tested in, at least, 2 independent cultures; $n = 8$ except those stated in brackets below legend in x axis. Post hoc significance: * vs. WT $p < 0.0001$; $^{\rho}$ vs. Δ CRE-2; $^{\circ}$ vs. m-CACCC; $^{\circ}$ vs. m-GC, $p \leq 0.001$ [symbols underlined indicate the group against which the differences are evaluated]. Triple Del: plasmids with deleted CRE-1, CRE-2 and cCRE.

$p < 0.0001$; interaction: $F_{6,98} = 5$, $p = 0.0002$). TPA had no effect in the WT, nor in the mutants, despite the stimulatory response observed in hypothalamic cultured cells [10,13,19].

Each of the possible CRE sites, including the AP-1 of the cGRE, as well as the GC box and CACCC adjacent to CRE-2, were deleted to evaluate their particular contribution in TRH promoter activity. Cultures included some of the previously assayed plasmids. In each culture, results of each plasmid were calculated against the wild type values, either basal or forskolin-stimulated, to be able to compare the behavior of each mutant in the basal expression (Fig. 5A; one way ANOVA: $F_{14,211} = 32$, $p < 0.0001$) or, in the response to forskolin (Fig. 5B; $F_{14,207} = 38$, $p < 0.0001$; n, stated in the figure). Deletion of CRE-1 produced the same tendency as the p767 mutant on this site; basal activity was slightly reduced without achieving statistical significance. In contrast, when CRE-2 site was deleted, basal activity was maximally reduced (by 80%), even more than when CRE-2 and CRE-1 were both deleted, which produced an activity similar to that of the p1808 mutant (54%; Fig. 5A). Deletion of both Sp/KLF sites also affected basal activity (25%), although maximal reduction (50%) was observed when the CACCC site was mutated, while no significant effect was obtained with mutations in GC box located at the 5' side of CRE-2 or, the complete extended CRE-2 (lacking CRE-2 and the adjacent Sp/KLF sites: both GC box and CACCC site). If CRE-2 together with CRE-1 were deleted (Δ CRE-1, Δ CRE-2), the basal activity diminished by 60%. Deleting only cGRE had no effect on basal activity while deletion of the 3 possible CRE binding sites: CRE-1, CRE-2 and cGRE produced an activity similar to Δ CRE-1, Δ CRE-2 (Fig. 5A).

Forskolin response of cells transfected with WT (3–4 fold of control values) was considered as 100%. Mutating or deleting the CRE-1 site slightly but significantly decreased the forskolin response (11–27% respectively), except for p766 whose response was higher than WT. Any alteration of the CRE-2 site diminished by 40–50% the forskolin-induced activity of the TRH promoter, whether mutating the GC-box, deleting 3' and 5' Sp/KLF sites, or the whole CRE-2 extended region. In contrast to the strong reduction of basal activity in the CACCC-deleted mutant, its response to forskolin was stronger than other alterations of this cluster-site (Fig. 5b). Only 25% decrease was obtained with cGRE-deletion. The triple deletion still presented forskolin response, albeit as low as the deleted extended CRE-2.

Hypothalamic cells

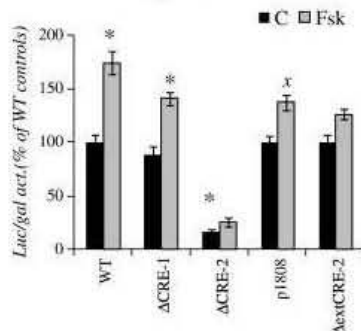


Fig. 6. Effect of CRE deletions or CRE-2 mutation on transfected hypothalamic cells. Rat hypothalamic cells were cultured for 12 days in vitro, transiently transfected with 0.8 μ g of reporter plasmid (WT: pNASSTRH-Luc, mutated in CRE-1; p1808, or deleted in either: Δ CRE-1, Δ CRE-2, or Δ CRE-2 and adjacent GC and CACCC sequences [ext CRE-2]) and β -gal as described in experimental procedures. Forty eight hours after transfection, cells were stimulated 6 h with fresh medium and \pm 10 μ M of forskolin. Luciferase values were normalized to those obtained for β -galactosidase activity; data was calculated as percent of unstimulated plates transfected with WT plasmid. posthoc * $p < 0.0001$ or * $p = 0.0008$ vs. control WT; within same plasmid, significance between unstimulated or forskolin treated cells: * $p \leq 0.0009$.

To verify the prominent role of CRE-2 on TRH transcription in an homologous system, cultured hypothalamic cells were transfected with the wild type plasmid or with those containing deletions in CRE-1, CRE-2, or the extended CRE-2, and with plasmid containing CRE-2 replaced by CRE-1 sequence (p1808). Compared to the basal activity of WT, only that of Δ CRE-2 was decreased (to $17 \pm 2\%$ of WT controls). Forskolin stimulated transcription of the WT, and of Δ CRE-1 transfected hypothalamic cells, albeit to a lower extent than in C6 cells but similar to SH-SY5Y; forskolin response decreased but was still significant in p1808, while Δ CRE-2, or Δ CRE-2 extended was unresponsive (Fig. 6, mean results of 2 independent cultures, $n = 6$ /group; ANOVA: $F_{9,58} = 47$, $p < 0.0001$).

4. Discussion

Our results demonstrate that the various sequences of the rat TRH proximal promoter that bind transcription factors in response to cAMP activation are functional and contribute to regulate TRH promoter activity in C6 cells. They support the crucial role of CRE-2 and the contribution of the adjacent sites, Sp/KLF-response elements, to the basal activity (site CACCC) and to the response to forskolin (mainly the GC box). Although CRE-1 or cGRE affected only slightly basal activity, both diminished significantly (by 25%) the response to PKA activation. The critical role of CRE-2 in cAMP-induced TRH transcription was confirmed in hypothalamic cells [17,18].

A differential response to 3 h incubation with forskolin was observed among different cell types transfected with the pNASS-TRH-Luc reporter and the control β -gal reporter; from no response (NIH-3T3) to a 2–4 fold induction (COS-7 or C6 glial cells). These differences could stem from the amount of adenylate cyclase, cell-type specificity of pCREB binding on cAMP-response elements [32], varying phosphodiesterase activities, relative importance of CREB-independent regulation, varying concentrations of other interacting transcription factors (see subsequent discussion), coregulators, or specific tissue transcription factors pertaining to the basal transcription machinery [33,34]. Some of these cell types increased their transcriptional capability if co-transfected with CREB expression plasmid, as the NIH-3T3 [13], C6 or the SH-SY5Y cells (these results). We decided to use the glioma cell line C6 as it showed the highest response to forskolin stimulation, and we corroborated by western blots that it expressed CREB and Sp-1 in higher amounts than SH-SY5Y (not shown). The significant contribution of CREB on TRH basal and c-AMP-induced transcriptional activity was evidenced by the loss of both activities when either C6 or SH-SY5Y cells were co-transfected with the dominant negative CREB-A [26].

When the central CpC sequence of CRE-1 was changed to CpG, a slight increase in activity was observed; whether this mutation improves binding of c-Jun, or allows it in a better orientation [34], remains to be studied as c-Jun is always observed in ChIP from hypothalamic cells [18], and it is able to bind factors of the basal transcriptional machinery [35]. The low affinity of CREB for the CRE-1 site [13] is further supported by the mutant containing the CRE-1 sequence in the CRE-2 site that diminished over 50% basal activity. Deleting the CRE-1 site, or mutating it beyond recognition by AP-1 factors (Geromatix analyses), caused only a slight decrement in the response to forskolin. CRE-1 is only 10 bp afar from the 40 bp that constitute the essential core promoter on TATA-containing promoters, recognized by TATA binding protein (TBP) [36]; recent studies find TBP and RNA polymerase II bound to the core promoter region up to -50 pb or further upstream [37,38]. TBP and other 14 associated factors (TAF) constitute the general transcription factor TFIID, the main component within the transcriptional machinery capable of recognizing and targeting specific promoter DNA, activator-dependent coactivator targeting (ie. TAF7 and 4 interact with Sp-1), and other enzyme activities as histone acetylation [36,39]. The pre-initiation complex binds to the core promoter in a defined sequence; even in nucleosome-

free DNA templates, RNA polymerase II binding to TATA requires some general cofactors, TBP and the mediator complex [36]. The decrease of the PKA-induced transcription, evident only at 4 h in the p767 mutant that has the CRE-2 intact, could be due to changes in DNA conformation altering binding of the required basal transcription factors [36]. The CRE-1 deleted mutant, in which a GC rich site is formed, may allow the binding of Sp/KLF related proteins with repressor or antagonizing activities [23,35,36,40]. ChIP assays using these mutants are required to identify the possible factors bound (or lack of) to this region.

Basal activity was strongly diminished by altering CRE-2 or the 3' CACCC sequence. The loss of pCREB binding is not sufficient to explain the low basal activity of the CRE-2 deleted plasmid since mutating the CACCC sequence without altering CRE-2 was also deleterious. Basal activity is dependent on the various response elements present, including those localized upstream (STAT, GRE half-sites, etc) [20] and, the existing transcription factors activated by components of the incubating medium such as serum, insulin, and possibly released growth factors [41] as epidermal growth factor that requires the extended CRE-2 region for regulating TRH transcription [15]. Insulin for example, stimulates Sp1 transcriptional activity [42]; serum induced kinases that may influence c-Jun activity [34] which in turn may interact with Sp/KLF [40,43], or growth factors through their effects on the Ras and MAPK pathways that influence the phosphorylation of CREB-related factors [44] as well as binding of Sp-like elements [40], in a cell specific fashion. The CACCC sequence has been proposed to bind class-II factors of the Sp-KLF family [23] and as mentioned, some of their members have clear stimulatory transcriptional activity while others inhibitory, as they compete for the same sequence; the effect might thus vary upon the interaction with pCREB or other factors [40,43,45]. Our results support the requirement of factors bound to CRE-2 and CACCC for an adequate expression of TRH basal transcriptional activity. However, neither the Δ GC, Δ CACC construct, nor the one without the complete extended CRE, showed the low activity observed when only CRE-2 was deleted suggesting interaction of different members of the Sp/KLF family able to interact after binding to the now closer GC and CACCC sites. An important consideration is that the CACCC sequence found in the rat promoter is not present in the human or mouse promoters; instead, there is a CGCCc which might still bind Sp/KLF factors, but its relevance remains to be confirmed [22].

The forskolin response of the different mutants suggests that all possible CRE sites of the proximal promoter may contribute to the regulation of TRH transcriptional activity, albeit in different proportions since, compared to that of the wild type, there is only 20–30% less stimulation by deleting CRE-1, cGRE, or CACCC. In contrast to the apparent lack of effect in modulating basal activity of the m-GC or the Δ -extCRE-2, these mutants had the strongest effect on forskolin response reducing it over 50%, similar to the triple-deleted mutant lacking CRE-1, CRE-2 and cGRE. Altering the essential core of CRE (CGTCA) decreased cAMP induced-activity by 50% coincident with the critical importance of central CpG in the binding of CREB [46], and with the reduced affinity of CREB observed for sequences differing even by one nucleotide from the consensus (TGACGTCA) [25]. This was further supported by the lack of cAMP response of SH-SY5Y cells co-transfected with CREB expression vector and p1805 mutant. Another potential CRE site is the AP-1 response element present in the 3' cGRE, protected from DNase digestion by nuclear extracts of cAMP or TPA stimulated hypothalamic cells, and where ChIP reveals c-Fos and c-Jun binding in cAMP-stimulated hypothalamic cells [18]; its role in basal or forskolin-induced activity was similar to that of the CRE-1 (15–20% of wild type activities) in contrast to the requirement of adequate GR binding [18,19] but and when deleted, together with CRE-1 or CRE-2, responded similarly to the mutant lacking only CRE-1 and CRE-2 suggesting it does not play a major role on cAMP response.

Of interest was the lack of transcriptional response of C6 cells to TPA stimulation that may activate Sp-like proteins [31] and is able to

increase TRH mRNA or transcription in hypothalamic cells [13]. However, the degree of stimulation is considerably lower than that of cAMP; furthermore, no c-Fos, pCREB or Sp1 containing the sequence of TRH promoter is immunoprecipitated from chromatin of TPA stimulated cells despite being able to protect the 3' AP-1 sequence of cGRE [18]. These results give further support to the cell-specificity of regulatory factors since, as mentioned, the extent of the cooperative effect of the CRE-2 with its adjacent Sp/KLF recognition sites may vary between different cell types likely due to differences in the proportion of the various members of the families of CREB/ATF, Jun/Fos or Sp/KLF transcription factors. The relevant role of the CRE-2 site was however confirmed in hypothalamic cells since only plasmids lacking CRE-2 or extended CRE-2 sequences were unable to respond to forskolin. As with C6 cells, hypothalamic cells transfected with Δ CRE-2 had a very low basal expression while the other mutants were similar to the WT suggesting either the presence of other transcription factors recognizing CRE-1 (p1808) in hypothalamic cells, or absence of those responsible for decreasing expression in C6 (GC sequence formed in Δ CRE-1). However, as the primary culture of fetal hypothalamus contains different nuclei able to express TRH (PVN, dorsomedial, lateral [1,3]), it is not possible to assume that results reflect behavior of hypophysiotropic neurons. However, since we previously demonstrated that in response to PKA activation, Sp-1 was recruited to the endogenous TRH gene promoter to a similar extent as pCREB and RNA polymerase II in primary cultures of rat fetal hypothalamus [18], the ensemble of these results confirms the CRE-2 site as the main CRE of the rat TRH gene proximal promoter, and reveals the importance of the adjacent sequences to CRE-2. CREB is phosphorylated within minutes of neuronal activation through receptors that stimulate PKA activity as well as by other kinases as Ras-MAPK [44]; these enzymes also phosphorylate Sp-1 inducing its nuclear transport and transactivator capabilities [40]. Sp-1 is a member of a family of related proteins that, as the Krüppel-like proteins (15 members) recognize GC boxes present in many genes [23]. The versatility of these factors includes for example, mutual antagonism or cooperation, or combined effects, depending on the cell type or the promoter, between Sp-1 and Sp-3 or Sp-4 [42,45,47]. They are important components regulating the mechanisms of nuclear signaling elicited by several hormones, as they interact with many regulatory transcription factors as well as with those of the basal transcriptional machinery facilitating the sequential recruitment of TFIID and RNA polymerase II [35,40,42]. A functional interplay between Sp-1 and CREB, that depends on their phosphorylation, was first reported for the gastrin-activator of chromogranin A or B promoters [31,45,48]; the presence of adjacent sequences that might recognize a cluster of transcription factors that include Sp/KLF and CRE/ATF recognition elements is found in many other promoters [43,49]. Sp-1 related factors may stabilize CREB binding to non consensus sequences [25], as has been proposed for binding of the viral protein Tax that recognizes the same elements as Sp and interacts with CREB [50]. The co-activation of CREB and members of Sp-1 family, produced by PKA activation increasing their binding to extended CRE-2, could provide the mechanism whereby TRH mRNA levels or TRH-Luc expression increase in either hypothalamic primary cultures or cell lines of neuronal or glial origin.

5. Conclusion

The present work demonstrated the important role of the extended CRE that provides a platform for a cluster of transcription factors able to bind and affect basal and PKA-stimulated transcription of the rat TRH gene. The Sp/KLF recognition elements flanking the CRE site proved essential for maintaining basal and forskolin stimulated transcription. The Sp-1 cooperativity with pCREB may influence the response of TRH transcription to diverse environmental and hormonal signals able to activate or inhibit, in different spatio-temporal expression patterns, Sp-related factors. For example, the human

TRH gene transcriptional response to leptin involves cooperation between Sp-1 and STAT3 [12]. Given the important role of hypophysiotropic TRH in energy homeostasis, Sp-like factors could play a pivotal role in translating multiple signals; Sp-1 is invariably recruited to the promoters of insulin-regulated genes, high glucose increases nuclear translocation of Sp-1, TNF α or interleukin-6 decrease Sp-1, and lipopolysaccharides (LPS) rapidly de-phosphorylate Sp-1 in lung cells promoting its degradation [42]. Whether the decrease of PVN TRH mRNA observed after LPS injection [51] is due to the de-phosphorylation of Sp-1 remains to be verified.

Adequate experiments in homologous systems, complemented by *in vivo* strategies [52], are thus required to define if the response of hypophysiotropic TRH neurons of the PVN to neuronal stimuli, through PKA activation, might be modified by the prevailing hormonal status as glucocorticoids, insulin or leptin [3,5,11–13,17,18,53]. Furthermore, TRH expression in regions of the limbic system is also stimulated by neuronal activation in a regional-specific manner dependent on the stimulus [54,55,56], the specificity may arise on the particular effectors involved and the ratio of activated transcription factors present.

Acknowledgements

We acknowledge Q. Fidelia Romero for technical support, P. Gaytan and E. López of the Macromolecule synthesis and sequencing Unit (IBT-UNAM) for synthesizing the oligonucleotides used in this work, and Sergio González for providing pregnant rats. This work was partially supported by grants from CONACYT (83363) and DGAPA-UNAM (PJB: IN221710, JO: IN206509).

References

- [1] R.M. Lechan, C. Fekete, The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism, *Prog. Brain Res.* 153 (2006) 209–235.
- [2] K.A. Gary, K.A. Sevancino, G.G. Yarbrough, A.J. Prange, A. Winokur, The thyrotropin-releasing hormone (TRH). Hypothesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305 (2003) 410–416.
- [3] E.A. Nilni, Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs, *Front. Neuroendocrinol.* 31 (2010) 134–156.
- [4] M.I. Chiamolera, F.E. Wondisford, Minireview: thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism, *Endocrinology* 150 (2009) 1091–1096.
- [5] A.N. Hollenberg, The role of the thyrotropin-releasing hormone as a metabolic sensor, *Thyroid* 18 (2008) 131–139.
- [6] R.M. Uribe, J.L. Redondo, J.L. Charli, P. Joseph-Bravo, Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus, *Neuroendocrinology* 58 (1993) 140–145.
- [7] R.T. Zoeller, N. Kabeer, H.E. Albers, Cold-exposure elevates cellular-levels of messenger-ribonucleic-acid encoding thyrotropin-releasing-hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid-hormones, *Endocrinology* 127 (1990) 2955–2962.
- [8] E. Sánchez, R.M. Uribe, G. Corkidi, R.T. Zoeller, M. Cisneros, M. Zacharias, C. Morales-Chapa, J.L. Charli, P. Joseph-Bravo, Differential responses of TRH neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the PVN of rat hypothalamus, *Neuroendocrinology* 74 (2001) 407–422.
- [9] T. Satoh, M. Yamada, T. Iwasaki, M. Mori, Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 27919–27926.
- [10] R.M. Uribe, L. Pérez-Martínez, C.M. de Lourdes, O. Gómez, L. Covarrubias, J.L. Charli, P. Joseph-Bravo, Phorbol ester or cAMP enhance thyrotropin-releasing hormone mRNA in primary cultures of hypothalamic cells, *Neurosci. Lett.* 201 (1995) 41–44.
- [11] L. Pérez-Martínez, A. Carreón-Rodríguez, M.E. González-Alzati, C. Morales, J.L. Charli, P. Joseph-Bravo, Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway, *Neuroendocrinology* 68 (1998) 345–354.
- [12] M. Harris, C. Aschkenasi, C.F. Elias, A. Chandrankunnel, E.A. Nilni, C. Björbaek, J.K. Elmquist, J.S. Flier, A.N. Hollenberg, Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 111–120.
- [13] A. Cote-Vélaz, L. Pérez-Martínez, M.Y. Díaz-Gallardo, C. Pérez-Manter, A. Carreón-Rodríguez, J.L. Charli, P. Joseph-Bravo, Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter, *J. Mol. Endocrinol.* 34 (2005) 177–197.
- [14] P. Fragner, S.L. Lee, S.A. de Leon, Differential regulation of the TRH gene promoter by triiodothyronine and dexamethasone in pancreatic islets, *J. Endocrinol.* 170 (2001) 91–98.
- [15] Y. Ren, T. Satoh, M. Yamada, K. Hashimoto, S. Konaka, T. Iwasaki, M. Mori, Stimulation of the preprothyrotropin-releasing hormone gene by epidermal growth factor, *Endocrinology* 139 (1998) 195–203.
- [16] S.M. Dupre, H. Guissouma, F. Flamant, I. Seugnet, T.S. Scalan, J.D. Baxter, J. Samarut, B.A. Demeneix, N. Becker, Both thyroid hormone receptor (TR) beta1 and TR beta 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone, *Endocrinology* 145 (2001) 2337–2345.
- [17] M.Y. Díaz-Gallardo, A. Cote-Vélaz, A. Carreón-Rodríguez, J.L. Charli, P. Joseph-Bravo, Phosphorylated cyclic-AMP-response element-binding protein and thyroid hormone receptor have independent response elements in the rat thyrotropin-releasing hormone promoter: an analysis in hypothalamic cells, *Neuroendocrinology* 91 (2010) 64–76.
- [18] M.Y. Díaz-Gallardo, A. Cote-Vélaz, J.L. Charli, P. Joseph-Bravo, 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 CRE sites of thyrotropin-releasing hormone gene promoter, *J. Neuroendocrinol.* 22 (2010) 282–293.
- [19] A. Cote-Vélaz, L. Pérez-Martínez, J.L. Charli, P. Joseph-Bravo, The PKC and ERK/ MAPK pathways regulate glucocorticoid action on TRH transcription, *Neurochem. Res.* 33 (2008) 1582–1591.
- [20] S.L. Lee, K. Stewart, R.H. Goodman, Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 16604–16609.
- [21] S. Ishii, M. Yamada, T. Satoh, T. Monden, K. Hashimoto, N. Shibusawa, K. Onigata, A. Morikawa, M. Mori, Aberrant dynamics of histone deacetylation at the thyrotropin-releasing hormone gene in resistance to thyroid hormone, *Mol. Endocrinol.* 18 (2004) 1708–1720.
- [22] M. Wallis, Molecular evolution of the thyrotropin-releasing hormone precursor in vertebrates: insights from comparative genomics, *J. Neuroendocrinol.* 22 (2010) 608–619.
- [23] J. Kaczynski, T. Cook, R. Urrutia, Sp1- and Kruppel-like transcription factors, *Genome Biol.* 4 (2003) 206.
- [24] W. Balkas, M.A. Tavaniini, P.J. Gkonos, B.A. Roos, Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in Exon 1, *Endocrinology* 139 (1998) 252–259.
- [25] J.C. Craig, M.A. Schumacher, S.E. Mansoor, D.L. Farrens, R.G. Brennan, R.H. Goodman, Consensus and variant cAMP-regulated enhancers have distinct CREB-binding properties, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11719–11728.
- [26] S. Ahn, M. Olive, S. Aggarwal, D. Krylov, D.D. Ginty, C. Vinson, A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos, *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 967–977.
- [27] E. Merino, J. Osuna, F. Bolívar, X. Soberón, A general, PCR-based method for single or combinatorial oligonucleotide-directed mutagenesis on Puc/M13 vectors, *Biotechniques* 12 (1992) 8–9.
- [28] S.N. Ho, F.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen, L.R. Pease, Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene* 77 (1989) 51–59.
- [29] K. Cartharius, K. Frech, K. Grote, B. Klocke, M. Haltmeier, A. Klingenhoff, M. Frisch, M. Bayerlein, T. Werner, MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites, *Bioinformatics* 21 (2005) 2933–2942.
- [30] M.M. Bradford, Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [31] T. Cramer, S. Jüttner, T. Plath, S. Mergler, T. Seufferlein, T.C. Wang, J. Merchant, M. Hocker, Gastrin transactivates the chromogranin A gene through MEK-1/ERK- and PKC-dependent phosphorylation of Sp1 and CREB, *Cell. Signal.* 20 (2008) 60–72.
- [32] H. Cha-Molstad, D.M. Keller, G.S. Yochum, S. Impey, R.H. Goodman, Cell-type-specific binding of the transcription factor CREB to the cAMP-response element, *PNAS* 101 (2004) 13572–13577.
- [33] J.A. D'Alessio, K.J. Wright, R. Tjian, Shifting players and paradigms in cell-specific transcription, *Mol. Cell* 36 (2009) 924–931.
- [34] F. Mecha-Grigoriou, D. Gerald, M. Yaniv, The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity, *Oncogene* 20 (2001) 2378–2389.
- [35] W.L. Liu, E.A. Coleman, E. Ma, P. Grob, J.L. Yang, Y.X. Zhang, G. Dailey, E. Nogales, R. Tjian, Structures of three distinct activator-TFIIID complexes, *Genes Dev.* 23 (2009) 1510–1521.
- [36] M.C. Thomas, C.M. Chiang, The general transcription machinery and general cofactors, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41 (2006) 105–178.
- [37] B.J. Venter, B.F. Pugh, A canonical promoter organization of the transcription machinery and its regulators in the Saccharomyces genome, *Genome Res.* 19 (2009) 360–371.
- [38] P. Yakovchuk, B. Gilman, J.A. Goodrich, J.F. Kugel, RNA polymerase II and TAFs undergo a slow isomerization after the polymerase is recruited to promoter-bound TFIIID, *J. Mol. Biol.* 397 (2010) 57–68.
- [39] X. Liu, D.A. Bushnell, D. Wang, G. Calero, R.D. Kornberg, Structure of an RNA Polymerase II-TFIIH Complex and the transcription initiation mechanism, *Science* 327 (2010) 206–209.
- [40] I. Wierstra, Sp1: emerging roles – beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372 (2008) 1–13.
- [41] J.L. Charli, C. Cruz, J.L. Redondo, C. Guerra, P. Joseph-Bravo, Homologous conditioned medium enhances expression of TRH in hypothalamic neurons in primary cultures, *Dev. Brain Res.* 89 (1995) 155–160.
- [42] S.S. Solomon, G. Majumdar, A. Martínez-Hernández, R. Raghov, A critical role of Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other hormones, *Life Sci.* 83 (2008) 305–312.

- [43] W.Y. Lui, K.L. Sze, W.M. Lee, Nectin-2 expression in testicular cells is controlled via the functional cooperation between transcription factors of the Sp1, CREB, and AP-1 families, *J. Cell. Physiol.* 207 (2006) 144–157.
- [44] A.J. Shaywitz, M.E. Greenberg, CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals, *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999) 821–861.
- [45] R. Raychowdhury, G. Schafer, J. Fleming, S. Rosewicz, B. Wiedenmann, T.C. Wang, M. Hocker, Interaction of early growth response protein 1 (Egr-1), specificity protein 1 (Sp1), and cyclic adenosine 3′/5′-monophosphate response element binding protein (CREB) at a proximal response element is critical for gastrin-dependent activation of the chromogranin A promoter, *Mol. Endocrinol.* 16 (2002) 2802–2818.
- [46] M.A. Schumacher, R.H. Goodman, R.G. Brennan, The structure of a CREB bZIP center dot somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35242–35247.
- [47] N.S. Chandran, P. Vunnavai, Y. Wu, G. Kapatos, Specificity proteins Sp1 and Sp3 interact with the rat GTP cyclohydrolase 1 proximal promoter to regulate transcription, *J. Neurochem.* 104 (2008) 1233–1248.
- [48] N.R. Mahapatra, M. Mahata, S. Ghosh, J.R. Gayen, D.T. O'Connor, S.K. Mahata, Molecular basis of neuroendocrine cell type-specific expression of the chromogranin B gene: crucial role of the transcription factors CREB, AP-2, Egr-1 and Sp1, *J. Neurochem.* 99 (2006) 119–133.
- [49] C. Wang, K. Kawakami, C. Cick, Divergent signaling pathways mediate induction of Na⁺/K-ATPase alpha 1 and beta 1 subunit gene transcription by low potassium, *Mol. Cell. Biochem.* 294 (2007) 73–85.
- [50] J.R. Lundblad, R.P.S. Kwok, M.E. Lurance, M.S. Huang, J.P. Richards, R.G. Brennan, R.H. Goodman, The human T-cell leukemia virus-1 transcriptional activator Tax enhances cAMP-responsive element-binding protein (CREB) binding activity through interactions with the DNA minor groove, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 19251–19259.
- [51] K. Kondo, M.S. Harbuz, A. Levy, S.I. Lightman, Inhibition of the hypothalamic-pituitary thyroid axis in response to lipopolysaccharide is independent of changes in circulating corticosteroids, *Neuroimmunomodulation* 4 (1997) 188–194.
- [52] M.L. Sagrue, K.R. Vella, C. Morales, M.E. Lopez, A.N. Hollenberg, The thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone at the level of transcription in vivo, *Endocrinology* 151 (2010) 793–801.
- [53] L. Jaimes-Hoy, P. Joseph-Bravo, P. de Gortari, Differential response of TRHergic neurons of the PVN in animals submitted to food restriction or dehydration induced anorexia and cold exposure, *Horm. Behav.* 53 (2008) 366–377.
- [54] P. de Gortari, R.M. Uribe, I. García-Vázquez, A. Martínez, A. Aguilar-Valles, J.L. Charli, A. Fernández-Guardiola, P. Joseph-Bravo, Amygdala kindling differential regulates the expression of the elements involved in TRH transmission, *Neurochem. Int.* 38 (2006) 41–42.
- [55] A. Aguilar-Valles, E. Sánchez, P. de Gortari, I. García-Vázquez, V. Ramírez-Amaya, F. Bermúdez-Ratóni, P. Joseph-Bravo, 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 (2007) 404–417.
- [56] M. Gutiérrez-Mariscal, P. de Gortari, C. López-Ruvalcaba, A. Martínez, P. Joseph-Bravo, Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety, *Psychoneuroendocrinology* 33 (2008) 198–213.