



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

TGF β -2 a través de TIEG1 regula la expresión del gen de TRH durante la etapa de diferenciación terminal en neuronas hipotalámicas

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

MIRIAM MARTÍNEZ ARMENTA

TUTOR PRINCIPAL:

LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ

Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Susana López Charreton (IBt-UNAM)

Dr. Félix Recillas Targa (IBt-UNAM)

Dra. Mario Enrique Zurita Ortega (IBt-UNAM)

Cuernavaca Morelos. Junio, 2017



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Alfredo Martínez Jiménez
Secretario	Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
Vocal	Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Vocal	Dr. José Luis Reyes Taboada
Vocal	Dr. Tomás David López Díaz

AGRADECIMIENTOS

A Oswaldo López Gutierrez y
Miguel Angel Cisneros Ramírez
por su invaluable apoyo técnico

Agradecimientos	3
Índice	4
1. Resumen	5
2. Abstract	6
3. Introducción	7
3.1 <i>Origen del hipotálamo</i>	7
3.2 <i>Inducción y modelamiento hipotalámico</i>	8
3.3 <i>Especificación celular del hipotálamo</i>	8
3.4 <i>Diferenciación neural hipotalámica</i>	9
4. Antecedentes	12
4.1 <i>El gen inducido tempranamente por TGFβ: TIEG-1 o KLF10</i>	14
4.2 <i>El factor de crecimiento transformante beta - TGFβ</i>	18
5. Justificación	23
6. Hipótesis	24
7. Objetivo	24
8. Materiales y métodos	25
8.1 <i>Muestreo de Hipotálamos</i>	25
8.2 <i>Cultivo Primario Hipotalámico</i>	25
8.3 <i>Cultivo de Línea Celular CA77</i>	26
8.4 <i>Extracción de RNA</i>	26
8.5 <i>Retrotranscripción y PCR semicuantitativa</i>	27
8.6 <i>RT-PCR semicuantitativa</i>	28
8.7 <i>Transfección y ensayo de luciferasa</i>	28
8.8 <i>Silenciamiento de KLF10 mediante siRNA</i>	29
8.9 <i>Western blot</i>	29
8.10 <i>Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)</i>	30
8.11 <i>Análisis estadístico</i>	31
9. Resultados	32
9.1 <i>TGFβ2 regula los niveles del mRNA de TRH in vitro</i>	32
9.2 <i>La expresión de TIEG1 en el hipotálamo de rata coincide con el establecimiento de las neuronas de TRH in vivo</i>	39
9.3 <i>La expresión del gen de TRH embrionario depende de la expresión de TIEG1.</i>	41
9.4 <i>TIEG1 es necesario para la expresión de TRH en el hipotálamo del ratón</i>	43
10. Discusión	45
11. Conclusiones	48
12. Perspectivas	48
13. Referencias	49

En el cerebro, el hipotálamo es la estructura encargada de regular la homeostasis de los organismos al controlar la secreción de múltiples hormonas. Durante los últimos años, nuestro grupo ha estado interesado en la caracterización de los mecanismos moleculares que regulan la diferenciación de las neuronas que secretan la Hormona Liberadora de Tirotropina (Trh). En este sentido, a través del análisis del transcriptoma de neuronas hipotalámicas de 17 días de gestación mediante microarreglos de DNA, hemos identificado diferentes factores de transcripción enriquecidos en las neuronas TRHérgicas. Entre estos factores, previamente caracterizamos a Klf4 como un mediador importante en el establecimiento de este fenotipo. Otro transcrito que se encontró enriquecido en esta población es el Klf10 o TGFβ inducible early gene-1 (Tieg1), cuyo papel en el desarrollo del sistema nervioso central aún no ha sido descrito.

En este estudio encontramos que las isoformas 1-3 del TGFβ y dos de sus receptores (TβRI and II) se expresan en etapas tempranas del desarrollo embrionario, las cuales coinciden con el establecimiento del fenotipo TRHérgico. También observamos que TGFβ2 induce la expresión tanto de Tieg1 como de TRH en cultivos primarios hipotalámicos. Asimismo, en la línea celular CA77 Tieg1, induce la expresión de Trh mediada por TGFβ.

De acuerdo con esto, Tieg1 es reclutado en el promotor de Trh en sitios específicos para regular su expresión. Finalmente, el ratón deficiente en Tieg1 presenta una reducción en la expresión de Trh al día embrionario 17.

En conjunto, estos resultados indican que la vía de señalización de TGFβ, a través de la inducción de Tieg1, juega un papel importante en el establecimiento del fenotipo TRHérgico a través de regular la expresión del gen de Trh en etapas embrionarias.

In the brain, the hypothalamus is the structure that regulates the homeostasis of the organism by regulating hormone secretion. Our group has been interested in the characterization of the molecular mechanisms that regulate the differentiation of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuronal phenotype. Previous studies in our group have identified different transcription factors that are enriched in TRH neurons by analyzing the transcriptome of TRH neurons at rat embryonic day 17 using DNA microarrays. Among these transcription factors, we previously characterized Klf4 as an important mediator in the establishment of this phenotype. Another transcript that was enriched in this population is Klf10 or TGF β inducible early gene-1 (Tieg1), whose role in the development of the central nervous system has not been characterized. Here we found that the TGF β isoforms (1-3) and both receptors (T β RI and II) are expressed in early embryonic stages which correlate with the establishment of TRH neurons. We also show that TGF β 2 induces the expression of both Tieg1 and Trh in primary hypothalamic cultures and in the TRH expressing CA77 cell line, where the upregulation of Trh expression by TGF β 2 is mediated by Tieg1. Accordingly, Tieg1 is recruited to the Trh promoter at specific sites to regulate its expression. Finally, mice deficient in Tieg1 present reduced expression of Trh at embryonic day 17. Altogether, these results indicate that TGF β signaling, through the upregulation of Tieg1, plays an important role in the establishment of the TRH phenotype by the regulation of Trh expression in embryonic stages.

El hipotálamo es el regulador maestro tanto de las funciones del Sistema Nervioso Autónomo como del Sistema Neuroendócrino. A pesar de ser una estructura altamente conservada a lo largo de la evolución en el cerebro de los vertebrados y de que muchas poblaciones neuronales en el adulto se encuentran bien caracterizadas, poco se sabe del mecanismo que regula la neurogénesis en ésta región del cerebro durante el desarrollo (Lee JE et al 2006)

3.1 ORIGEN DEL HIPOTÁLAMO

El prosencéfalo -cerebro anterior- es posiblemente el sistema biológico más complejo, ya que comprende estructuras altamente heterogéneas que se derivan de la zona anterior del tubo neural. Tan pronto como éste se ha cerrado, el prosencéfalo primario se divide en dos componentes: el diencefalo caudal y el prosencéfalo secundario. El prosencéfalo secundario forma el diencefalo rostral –futuro hipotálamo-, mientras que el resto originará, por evaginación, las vesículas telencefálicas y ópticas (Kandel E et al. 2000).

Al igual que en otras regiones del tubo neural, el prosencéfalo embrionario parece estar organizado en secciones transversales y longitudinales. Evidencia experimental ha demostrado que las subdivisiones transversales del prosencéfalo generan dominios llamados prosómeros, los cuales son más evidentes en la zona caudal del diencefalo, constituido por los prosómeros 1-3 (p1-p3), mientras que el diencefalo rostral está formado por los prosómeros 4-6 (p4-p6) (Kiecker C and A Lumsden 2005).

El prosencéfalo puede también ser subdividido en dominios longitudinales, denominados en dirección ventro-dorsal como: placa del piso, placa basal, placa alar y placa del techo. Al igual que en las regiones más caudales del tubo neural, las placas del piso y del techo constituyen respectivamente, la línea media ventral y dorsal. Por otro lado, la placa basal forma el tegmentum prerubral en el diencefalo caudal (p1-p3), mientras que rostralmente, ésta origina el hipotálamo en sentido estricto (p4-p6) (Marín O and JLR Rubenstein 2002).

3.2 INDUCCIÓN Y MODELAMIENTO HIPOTALÁMICO

Se ha demostrado que, en las etapas tardías del desarrollo de la placa neural, existen dominios de expresión para ciertos genes (Marín O and JLR Rubenstein 2002), por ejemplo, el diencefalo se distingue del telencefalo por la falta de expresión del gen BFI (Foxg1). En contraste, el diencefalo rostral a la zona limitante intratálamica (ZLI) se caracteriza por la expresión de BF2 (Marín O and JLR Rubenstein 2002).

El diencefalo ventral está constituido por la placa alar y la placa basal, siendo esta última la que originará el hipotálamo. La evidencia sugiere que los constituyentes celulares de la placa basal son inducidos y modelados mediante señales originadas en el mesodermo axial (Marín O and JLR Rubenstein 2002). Una de las moléculas candidatas es Sonic Hedgehog (Shh), ya que el ratón nulo para su expresión carece de hipotálamo y la sobre-expresión del mismo lleva a la expresión ectópica de marcadores hipotalámicos en el pez cebra (revisado en Mathieu J et al 2002). En el ratón, las señales transducidas por Shh tienen como blanco genes homeobox como *Nkx*, de los cuales al menos seis son expresados en el diencefalo ventral: *Nkx 2.1*, *Nkx 2.2*, *Nkx 2.4*, *Nkx 5.1*, *Nkx 5.2* y *Nkx 6.1*, aunque únicamente el ratón *nkx2.1^{-/-}* (Marín O and JLR Rubenstein 2002) revela defectos morfológicos y en el modelamiento temprano hipotalámico.

Por otro lado, el factor de crecimiento fibroblástico-8 (Fgf-8), posee un dominio de expresión que incluye la región más anterior del diencefalo ventral, donde participa en colaboración con Shh en la modelación del hipotálamo tuberal (Marín O and JLR Rubenstein 2002).

3.3 ESPECIFICACIÓN CELULAR DEL HIPOTÁLAMO

Los procesos que controlan la especificación y crecimiento diferencial del cerebro, actúan sobre células progenitoras neuroepiteliales que residen en el epitelio pseudoestratificado –epitelio germinal- que rodea el espacio ventricular. Conforme avanza el desarrollo, este epitelio forma la zona ventricular (VZ) y la zona del manto (MZ). Las células progenitoras salen del ciclo celular dentro de la VZ y migran hacia la zona de diferenciación (MZ) ubicada debajo de la superficie pial. Sin embargo, algunas células que han salido de la VZ permanecen mitóticamente activas y entran a una segunda zona proliferativa (la zona

subventricular –SVZ-) ubicada entre la VZ y la MZ. En el caso particular del hipotálamo, éste tiene su origen a partir del epitelio germinal del tercer ventrículo (Figdor MC y CD Stern, 1993).

La generación de neuronas y células gliales a partir de los precursores del neuroepitelio involucra una serie de pasos para generar tipos celulares más restringidos. Estos pasos incluyen 1) especificación del tipo celular, 2) salida del ciclo celular, 3) diferenciación de sus propiedades celulares, 4) migración hacia su destino final y 5) producción de los contactos célula-célula adecuados (vg sinapsis) a través de la elaboración de procesos dendríticos y axonales (Marín O and JLR Rubenstein 2002).

Los primeros pasos hacia la especificación de ciertos fenotipos podrían estar controlados por procesos más generales como la especificación regional. Por ejemplo, se sabe que el establecimiento del eje dorso-ventral produce columnas longitudinales de progenitores neuronales con propiedades moleculares distintas a diferentes niveles sobre este eje. De manera similar, ciertas subpoblaciones de neuronas telencefálicas con distintos fenotipos, se derivan de progenitores localizados en diferentes regiones. Así, mientras las células glutamatérgicas son generalmente producidas en el área del pallium, la mayoría de las células que expresan GABA se generan en el subpallium. Sin embargo, es posible que algunos aspectos de la especificación del prosencéfalo y en particular del hipotálamo puedan ser reguladas de manera independiente a la especificación regional y después del estadio de progenitor neural. Por ejemplo, que la identidad celular pueda ser modulada después de que una célula postmitótica haya migrado desde su sitio de origen hasta su ubicación final, la cual contiene señales de diferenciación específica, tal y como sucede con las células ganglionares de la retina (Marín O and JLR Rubenstein 2002).

3.4 DIFERENCIACIÓN NEURAL HIPOTALÁMICA

El hipotálamo neuroendócrino consiste fundamentalmente de dos poblaciones distintas de neuronas, la primera constituida por las magnocelulares agrupadas en los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON) que proyectan sus axones a la hipófisis posterior para liberar oxitocina (OT) y arginina vasopresina (AVP). La segunda población está integrada por las neuronas parvocelulares distribuidas en los núcleos preóptico (PON), periventricular (PV), arcuato (ARN), ventromedial (VMN) y PVN de donde proyectan sus

terminales a la eminencia media de donde liberan la hormona estimulante de tirotrópina (TRH), hormona estimulante de corticotropina (CRH), somatostatina (SS), hormona estimulante de la hormona de crecimiento (GHRH), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y dopamina (DA) (Zigmong MJ et al., 1999).

Gracias al uso de timidina [^3H] y bromodeoxiuridina (BrdU), se ha podido establecer *in vivo* el "nacimiento" de poblaciones neuronales específicas. Los cinco fenotipos neuroendócrinos parvocelulares, con excepción de GnRH, son generados a partir del tercer ventrículo con periodos de formación parcialmente sobrelapados entre los días E11-E17, aunque sus picos de nacimiento difieren, tal como se puede observar en la Tabla 1 (Markakis E y LW Swanson, 1997).

	Neuronas neuroendócrinas		Neuronas no neuroendócrinas	
Péptido	Ventana de nacimiento	Pico máximo de nacimiento	Ventana de nacimiento	Pico máximo de nacimiento
TRH	E12-E14	E13	E11-E15	E12
CRH	E12-E14	E13	E12-E14	E13
GHRH	E11-E15	E13	E12-E16	E14
SS	E12-E15	E13	E11-E17	E15
DA	E11-E15	E12	E11-E16	--

Tabla 1. Generación de neuronas parvocelulares en hipotálamo de rata (Tomado de Markakis y Swanson, 1997)

Asimismo, los análisis efectuados por hibridación *in situ* (HIS) e inmunohistoquímica, han permitido detectar al mRNA y/o al péptido característico para cada uno de los fenotipos. Para el caso de TRH, el mRNA se detecta por HIS desde el día E14 en el área lateral hipotalámica (LHA), y hasta el día E16 en el PVN, expresión que va en aumento hasta el día siete de la vida post-natal, en donde comienza a ser regulado negativamente por hormonas tiroideas (Segerson TP et al. 1987). De manera similar, estudios con anticuerpos contra CRH han detectado la señal inmunorreactiva en células de E15 en el LHA y al E16 en el PVN. Asimismo, el mRNA en el PVN se detecta al día E16 por HIS (Revisado en Markakis E, 2002).

Una vez que una célula se ha comprometido a abandonar el ciclo celular y ha sido especificada para una clase de neurona en particular, un proceso progresivo de diferenciación guiará a dicha célula hacia su fenotipo maduro. La neurogénesis del hipotálamo neuroendócrino requiere la acción combinada de varios factores de transcripción, cuya función se ha podido identificar gracias a estudios realizados tanto a nivel genético como molecular. En el caso del ratón “knock-out” para el gen de la familia homeobox *otp* el PVN, SON, PV anterior y ARN muestran una baja densidad celular, además de que la expresión de TRH, CRH, AVP, OT y SS se encuentra totalmente abatida (Acampora D et al., 1999; Wang W y T Lufkin, 2000).

Otro factor de transcripción involucrado en el desarrollo de las neuronas del PVN y SON es *brn2*, el cual pertenece a la familia de factores con dominio POU; el ratón nulo para la expresión de *brn2* exhibe defectos en la expresión de CRH, OT y AVP de dichos núcleos, sin embargo, los niveles de TRH y SS se mantienen normales (Schonemann MD et al., 1995).

Finalmente, el análisis de los ratones mutantes *sim1^{-/-}* y *arnt2^{-/-}* ha demostrado hipocelularidad tanto en el PVN como en el SON, dando como resultado la ausencia en la expresión de OT, AVP, TRH, CRH y SS (Michaud JL et al., 1998, Michaud, JL et al., 2000).

En conjunto, estos estudios demuestran la importancia de dichos factores de transcripción al regular la diferenciación de ciertos fenotipos neurales en regiones específicas dentro del cerebro. Sin embargo, a pesar de esto y del amplio conocimiento que existe sobre la función de los fenotipos, existe un gran abismo en nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares existentes entre la especificación del hipotálamo y la adquisición de un fenotipo neuronal en particular.

Durante los últimos años, uno de los principales objetivos de nuestro grupo ha sido caracterizar los mecanismos moleculares que regulan el establecimiento y/o mantenimiento del fenotipo TRHérgico hipotalámico. En este sentido, analizamos el transcriptoma de neuronas TRHérgicas de hipotálamos fetales de 17 días de gestación, a través de microarreglos de DNA (GenChip U34A, Affymetrix) (Guerra-Crespo M et al. 2011).

De especial interés resultaron los incrementos observados en la expresión de tres factores de transcripción: el factor de inducción de la transcripción 3 (ATF3), el factor 4 similar a krüppel (GKLF o KLF4) y el gen inducido tempranamente por TGFβ (TIEG1 o KLF10) los cuales comparten la peculiaridad de ser regulados por TGFβ (King et al., 2003; Hefferan et al., 2000b; Kang et al., 2003), y de que su papel durante el desarrollo del sistema nervioso y en particular del hipotálamo es aún desconocido.

La familia de los factores de transcripción similares a krüppel (KLFs) está filogenéticamente relacionada con la familia de los factores de transcripción SP1 (Figura 1), se caracterizan por la presencia de tres dedos de zinc tipo C2H2 en el extremo carboxilo terminal, a través de los cuales interactúan con el DNA; además poseen gran homología con el gen de segmentación *Kriippel* de *Drosophila melanogaster* (Dang et al., 2000).

Los 16 KLFs identificados hasta el momento en el humano (Tabla 1) regulan una amplia gama de procesos biológicos incluyendo proliferación celular, apoptosis, diferenciación, tumorigénesis y más recientemente reprogramación celular (Wernig et al., 2007; Takahashi y Yamanaka, 2006), esto a través de activar o inhibir la expresión de un gran número de genes al unirse a la secuencia consenso CACCC o bien cajas ricas en GC (Dang 2000; Lomberk y Urrutia, 2005; Kaczynski et al., 2003; Philipsen y Suske, 1999), lo cual sucede en respuesta a estímulos específicos como es el daño a DNA (revisado en Ghaleb et al 2005) o por ciertas citocinas (IFNγ, TGFβ) (Subramaniam M et al., 1995a, Chen et al 2000).

A nivel molecular, los miembros de la familia de los KLFs pueden tanto activar como reprimir la expresión de sus genes blanco. Múltiples evidencias del mecanismo transactivador se han determinado a partir del estudio de KLF1/EKLF, el cual regula la expresión del gen de β -globina, a través de su interacción con p300 y CBP, co-activadores transcripcionales que acetilan tanto histonas como al propio KLF1, modificación que incrementa la unión de este factor de transcripción con componentes del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF (Zhang et al. 2001a). Otro ejemplo interesante lo constituye el KLF4/GKLF el cual induce la salida del ciclo celular, al regular tanto de manera positiva como negativa la expresión de genes como p21 y la ciclina B1 a través de su interacción directa con p300/CBP y la HDAC3 respectivamente (Evans et al. 2007). Finalmente, en un estudio bioquímico se determinó que el dominio RI de KLF11/TIEG2 interactúa con el dominio PAH2 (*paired amphipathic helix*) del complejo de desacetilasas de histonas mSin3A para reprimir la transcripción (Zhang JS et al. 2001)

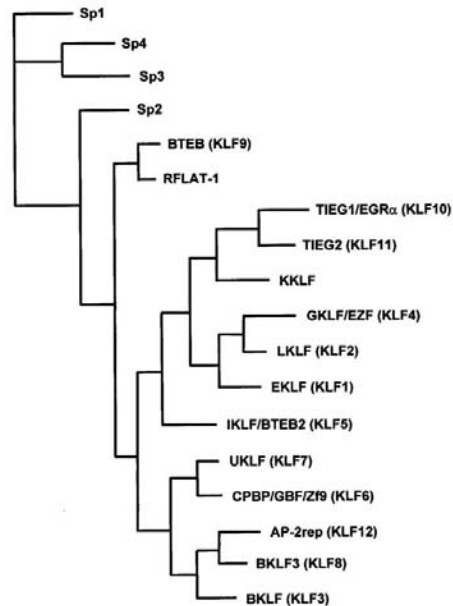


Figura 1. CLASIFICACIÓN DE LOS FACTORES SIMILARES A KRÜPPEL EN EL HUMANO. KLF10 (TIEG1) y las proteínas relacionadas fueron identificadas mediante un análisis tipo el BLAST y las secuencias de aminoácidos alineadas mediante el programa PileUp. (Tomado de Dang et al. 2000)

4.1 EL GEN INDUCIDO TEMPRANAMENTE POR TGF β : TIEG-1 O KLF10

El gen de KLF10 consta de 8 kb organizadas en cinco exones y cuatro intrones. El análisis informático de la región 5' del gen de KLF10 no muestra la presencia de una caja TATA o secuencia de inicio de la transcripción, aunque sí existen secuencias consenso para la unión de factores de transcripción como Sp1 o JunB (Subramaniam M et al., 1995).

Descrito originalmente en el humano como un gen de inducción temprana en respuesta a TGF β , el transcrito de KLF10 (Figura 2) codifica para una proteína de 480 aminoácidos (72 kDa), la cual posee además del dominio de unión a DNA, tres dominios de represión (R1-R3), un dominio SH3 que podría ser sitio de interacción con proteínas que poseen dominios ricos en prolina, así como un dominio de unión para la ligasa de ubiquitina SIAH –“*Seven In Absentia Homologue-1*”- (Figura 2. Subramaniam M et al., 1995, Subramaniam M et al. 2007).

En cuanto a su regulación, se sabe que la expresión de la proteína de KLF10 es rápidamente inducida -30 minutos- en osteoblastos de humano tratados con TGF β , alcanzando un máximo de aproximadamente diez veces respecto al control 120 minutos después del tratamiento (Subramaniam M et al., 1995). Además del efecto inductor de las tres isoformas de TGF β se ha observado que otros miembros de la superfamilia como BMP-2 y BMP-4 (Hefferan, TE et al 2000b) así como el factor de crecimiento epidermal -EGF- (Subramaniam M et al., 1995a), los estrógenos (Tau KR et al 1998) y más recientemente el NGF (Dijkmans TF et al., 2008), pero no otras citocinas (PDGF, IGFs, FGF, TNF- α , IL-6, y IL-1 β) (Subramaniam M et al., 1995) regulan tanto los niveles de expresión del mRNA de KLF10 como los de proteína. Asimismo, se ha observado mediante microscopia confocal que en osteoblastos de humano la proteína de KLF10 se localiza principalmente en el núcleo de células no tratadas, cuyos niveles se incrementan tras el tratamiento con TGF β . Sin embargo, el análisis en queratinocitos de humano no tratados, revela que KLF10 se localiza fundamentalmente en el citoplasma y que el tratamiento con H₂O₂ induce su traslocación hacia el núcleo (Subramaniam M, 1998).

Klf10 es capaz de regular la tasa de transcripción positiva (Noti J.D. et al., 2004) o negativamente (Johnsen SA, 2002a) al unirse a secuencias tipo 5'-CACCC-3' o cajas GC 5'-GGGCGGG-3' o 5'-GGTGTG-3' presentes en la región promotora de sus genes blanco (Ou XM, 2004 y Chrisman, 2003). La capacidad represora de Klf10 se atribuye a su interacción con el co-represor mSin3A, el cual media la represión de sus genes blanco (Zhang JS et al. 2001b); sin embargo, el mecanismo como regulador positivo de la transcripción aún no se ha descrito (Figura 2).

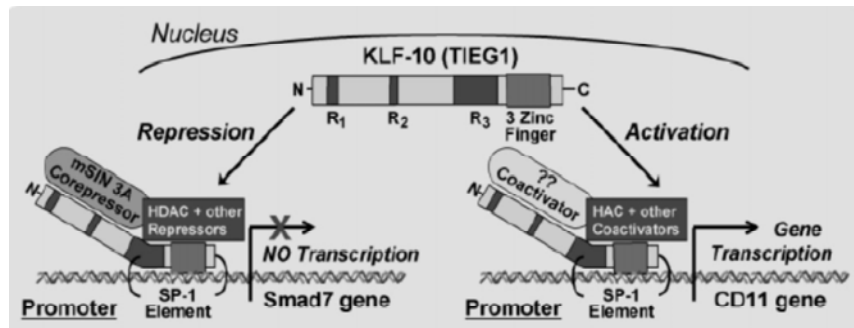


Figura 2. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA KLF10. Diagrama donde se representan los principales dominios presentes en la proteína de KLF10. La caja gris claro representa el dominio de unión al DNA, mientras que las tres cajas en gris oscuro representan los tres dominios únicos de represión. También se esquematizan el dominio Siah (azul) y la región rica en prolinas (naranja) (Tomado de Subramaniam M et al 2007)

Respecto al papel que Klf10 juega en la vía de señalización de TGF β (Figura 3), estudios realizados con células MG-63 -osteosarcoma humano- y PANC1 -carcinoma pancreático- demuestran que la sobre-expresión de KLF10 mimetiza los efectos de TGF β (Tachibana I, et al. 1997, Hefferan et al. 2000a Cook, T and R. Urrutia. 2000) los cuales son Smad dependientes, ya que en ausencia de Smad4 o en presencia de Smad7 la sobre-expresión de Klf10 no tiene ningún efecto (Johnsen et al. 2002a).

Como se esquematiza en la Figura 3, se ha demostrado que los efectos de KLF10 sobre la vía de TGF β se pueden dar a tres niveles: 1) incrementando la inducción de genes regulados por TGF β como p21; 2) incrementando la tasa de transcripción y la fosforilación de Smad2 o bien; 3) reprimiendo la expresión del gen inhibitorio Smad7 (Johnsen et al. 2002a y 2002b)

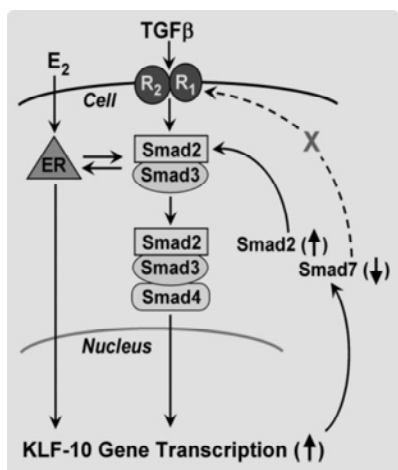


Figura 3. PAPEL DE KLF10 EN LA REGULACIÓN DE LA VIA DE SEÑALIZACIÓN TGFβ-Smad. Los principales efectos mediados por la sobre-expresión de Klf10 en diferentes sistemas se representan en este esquema: 1) aumento en la actividad transcripcional y fosforilación de Smad2; 2) inhibición de la proteína inhibitoria Smad7; 3) inducción de genes blanco de la vía TGFβ (Subramaniam M et al 2007).

Estudios diversos indican que Klf10 participa en la regulación de diferentes procesos celulares sumamente importantes durante el desarrollo como la progresión del ciclo celular y la apoptosis (Hefferan TE et al., 2000b y Tachibana et al., 1997); además se ha observado una correlación inversa entre los niveles de expresión de Klf10 y la severidad de ciertos tipos de cáncer (revisado en Subramaniam M et al. 2007).

Para dilucidar el papel que este factor de transcripción pudiese jugar durante el desarrollo principalmente del sistema óseo, el grupo de Spelsberg generó el ratón mutante *klf10^{-/-}*. Éste muestra un aumento en el número de osteoblastos sin contribuir a la formación nueva de hueso, así como una disminución en el número de osteocitos y osteoclastos, lo cual se atribuye a problemas en la diferenciación de estos tipos celulares, y que de manera interesante se observa exclusivamente en hembras (Subramaniam et al. 2005). Por otro lado, los machos muestran problemas de hipertrofia cardíaca la cual incluye un incremento en el tamaño de los ventrículos, en el peso y grosor de las paredes cardíacas e hipertrofia septal (Rajamannan NM et al. 2007). Sin embargo, en este trabajo no se reporta ningún fenotipo sobre el sistema nervioso central o periférico.

Recientemente el grupo de Pons reportó que Klf10 es capaz de regular la salida del ciclo celular -previa a la diferenciación- de precursores neuronales de células granulares en la corteza cerebelar provenientes de ratones del día post-natal (P)6 (Alvarez-Rodríguez et al. 2007). De manera interesante, Dijkmans y colaboradores identificaron a Klf10, KLF4 y ATF3 como genes de inducción temprana en respuesta al tratamiento con NGF en la línea celular PC12, un feocromocitoma de rata ampliamente utilizado para estudiar el mecanismo de acción de esta neurotrofina, la cual induce la adquisición de un fenotipo neuronal (Dijkmans TF et al., 2008). Finalmente, Spittau y colaboradores han descrito que la inducción en la transcripción de Klf10 mediada por NGF es TrkA dependiente, además de que el tratamiento con esta neurotrofina en células PC12 es capaz de promover la salida del ciclo celular pero no la diferenciación terminal (Spittau B et al., 2010).

Por otro lado, el uso del programa MATINSPECTOR de GENOMATIX (Cartharius K et al., 2005), para analizar la región promotora del gen de TRH de la rata ha permitido identificar cuatro posibles sitios de unión para los factores del tipo KLF: dos cajas tipo CACCC: -95/-87 y -328/-334 y dos cajas GC: -113/-120 y -686/-692 (Figura 4). El hecho de que algunos de estos sitios se encuentren conservados en ratón y humano, sugiere que los KLFs pudiesen jugar un papel importante en la expresión del gen de TRH.

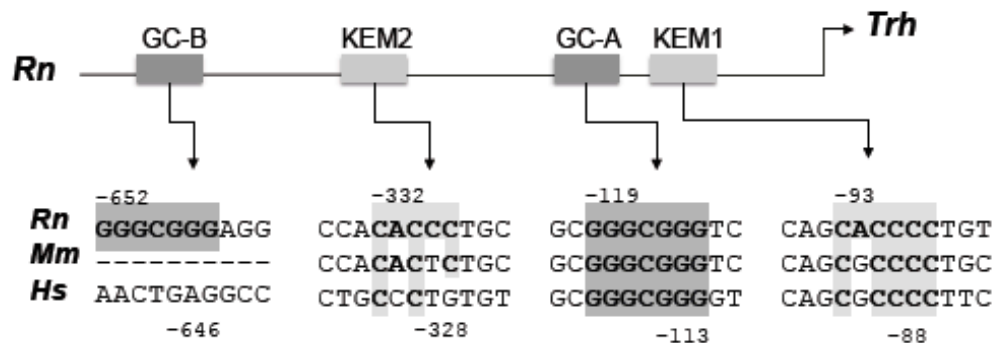


Figura 4. ELEMENTOS DE UNIÓN PARA FACTORES TIPO KLF EN LA REGIÓN PROMOTORA DE TRH. Esquema que representa los elementos de respuesta a distintos factores de transcripción presentes en la región regulatoria del gen de TRH de rata, ratón y humano. Los sitios posibles de reconocimiento para elementos tipo KLF están representados en gris claro, mientras que los elementos con cajas tipo GC están representados en gris oscuro.

4.2 EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA - TGF β

Como se mencionó anteriormente, una de las peculiaridades de ATF3, Klf4 y Klf10 –transcritos enriquecidos en células TRHérgicas- es que en fenotipos no neuronales la expresión de estos factores se regula, de manera positiva, en respuesta al tratamiento con TGF β (King et al., 2003; Hefferan et al., 2000a; Kang et al., 2003).

La familia de TGF β está representada por tres isoformas, provenientes de genes diferentes y expresadas tanto en células gliales como en neuronas. TGF β 1 se expresa principalmente en el plexo coroideo y meninges (Unsicker et al., 1991). Por otro lado, TGF β 2 y β 3 poseen un patrón de distribución más general: prosencéfalo, glia radial y cuerpos neuronales de corteza y cerebelo (Flanders et al., 1991) y mesencéfalo (Poulsen et al., 1994) durante la etapa embrionaria, así como neuronas piramidales del hipocampo, giro dentado, capas II, III y V de la corteza cerebral, células de Purkinje (Unsicker et al., 1991) e hipotálamo en etapa adulta (Bouret et al., 2004).

Los miembros de esta familia se unen a tres tipos de receptores denominados T β RI, T β RII y T β RIII, los cuales son específicos para el TGF β y no para otros miembros de la superfamilia. El receptor T β RIII, betaglicano o endoglina, no participa directamente en el proceso de señalización, aunque sí es capaz de modular el acceso del ligando al receptor. Los receptores T β RI y T β RII, responsables de la transducción de señales, son proteínas transmembranales tipo serina/treonina cinasas. La unión de TGF β al T β RII induce el reclutamiento del T β RI formando un complejo tetramérico. El siguiente paso es la fosforilación en los residuos de serina ubicados en las cajas GS del T β RI por el T β RII, el cual, una vez activo, fosforila residuos de serina en las proteínas R-Smad (Smad 2 y 3). La fosforilación de R-Smad induce su unión a la proteína Co-Smad4. El complejo trimérico R-Smad I y II/Co-Smad4 se transloca al núcleo donde regula a sus genes blanco a través de la unión a los elementos de respuesta (SBE: *Smad binding element*) presentes en la región promotora de dichos genes. El proceso culmina con la conjugación de Smad2 con la ubiquitina y el envío del complejo al proteosoma para su degradación. Asimismo, existe una regulación negativa, a través de los Smads inhibitorios (I-Smads), como Smad 6 y 7. El

Smad7 es capaz de unirse al T β RI evitando que fosforile a los Smads2 y Smad3, además de reclutar en el mismo receptor proteínas que ligan ubiquitina como Smurf1 y Smurf2 (Revisado en Böttner et al., 2000) (Figura 5).

La habilidad de las Smads para activar o reprimir la actividad transcripcional de sus genes blanco, depende de la interacción del dominio de activación (MH2) con cofactores que afectan la estructura de la cromatina, o bien, por la interacción con el aparato de transcripción basal. Por ejemplo, la acetil-transferasa de histonas CBP/p300 relaja la estructura del nucleosoma al interactuar con las proteínas R-Smads o Co-Smad, facilitando así el inicio de la transcripción. De manera contraria, Smad2 interactúa con el cofactor TGIF (*TG sequence interacting factor*), el cual recluta a la desacetilasa de histonas 1 (HDAC1) reprimiendo así la transcripción en células COS 1 (Wotton et al., 1999).

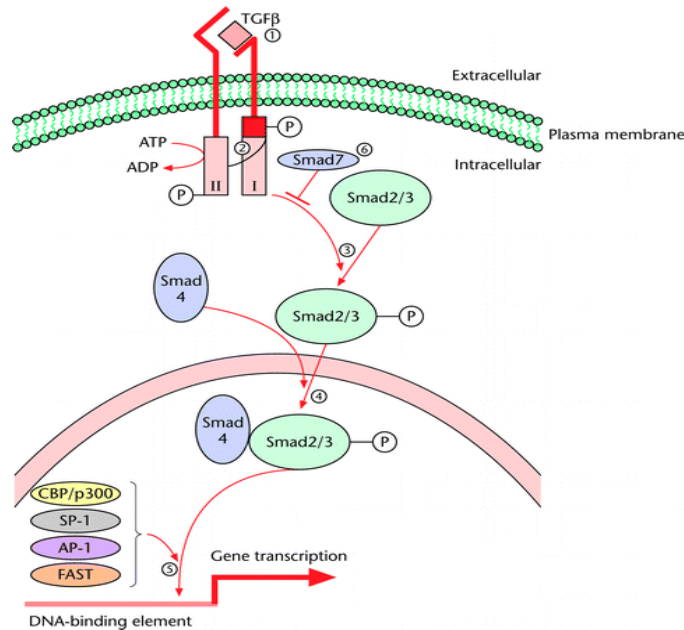


Figura 5. VÍA DE SEÑALIZACIÓN CLÁSICA DE TGFβ. La cascada de señalización inicia con la unión del TGFβ a sus receptores (I y II), los cuales activan a las proteínas Smad 2/3. Éstas a su vez forman complejo con la Smad4 para trasladarse al núcleo en donde finalmente regulan la expresión de sus genes blanco tras la asociación con moléculas co-activadoras o co-represoras (Tomado de Serra, 2002).

Respecto a sus funciones dentro del sistema nervioso, recientemente se encontró que en cultivos primarios de prosencéfalo de ratón, el mRNA de Smad 2 se expresa desde etapas embrionarias tempranas (E14), post-natales (P1 y P8) y disminuye en el adulto. Inversamente el mRNA de Smad 3 es indetectable al día E14 y aumenta de manera considerable al día E17 manteniéndose estable hasta la etapa adulta; mientras que Smad 4 se expresa constantemente en las diferentes etapas del desarrollo del SNC analizadas (Lopez-Coviella et al., 2006).

En el adulto, la expresión del mRNA de TGF β 1, los receptores T β RI y T β RII y los R-Smad 2 y 3 ocurre en zonas del área preóptica (POA) y del hipotálamo mediobasal (PV anteroventral, área preóptica medial, ARN y eminencia media) (Bouret et al., 2004). Sin embargo, el patrón de expresión de estas moléculas durante el desarrollo del hipotálamo aún no se ha determinado.

Es importante recalcar que los T β Rs pueden ejercer su efecto no sólo a través de proteínas Smad, sino utilizar vías alternas. Por ejemplo, se ha demostrado que tras la activación de TGF β , el T β RI recluta y fosforila de manera directa a la proteína adaptadora ShcA en residuos de serina y de tirosina. Esta fosforilación induce a su vez la asociación de ShcA con Grb2 y Sos, activando así la vía de Erk-MAPK (Lee et al., 2007). Asimismo, al tratar de dilucidar el mecanismo molecular que controla la disolución de las uniones estrechas, un evento temprano involucrado en la transición epitelio-mesénquima, el grupo de Wrana observó que el T β RII fosforila directamente a Par6, el cual interactúa directamente con la ligasa de ubiquitina Smurf1. Esta interacción permite a Smurf1 la degradación de RhoA, cuyo efecto último es la pérdida de uniones estrechas (Ozdamar et al., 2005).

Respecto a las funciones de la familia de los TGF β s durante el desarrollo neuronal, durante los últimos años se ha estudiado ampliamente el papel del TGF β sobre el fenotipo dopaminérgico. El grupo de Poulsen ha observado que TGF β 2 y TGF β 3 promueven de manera importante la sobrevivencia de neuronas dopaminérgicas de rata en cultivos de mesencéfalo (E14) (Poulsen et al., 1994). Otros estudios sugieren que el TGF β por sí sólo no es un factor neurotrófico, sino que actúa en concierto con otras moléculas como FGF2, FGF8 y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), induciendo la sobrevivencia

neuronal (Krieglstein et al., 1998; Roussa et al., 2004). Recientemente, el grupo de Krieglstein reportó que el TGF β induce la especificación neuronal y sobrevivencia de neuronas TH+ en el cerebro medio, actuando de manera sinérgica con Shh (Farkas et al., 2003).

Otros estudios reportan que las tres isoformas inducen de igual manera la expresión de marcadores serotoninérgicos en cultivos de romboencéfalo de rata (E12-E14) (Galter et al., 1999). Por otro lado, los patrones de expresión de TGF β 2 y β 3 sugieren un papel importante en la regulación de la migración neuronal y diferenciación tanto en la corteza telencefálica como en el cerebelo (Flanders et al., 1991).

Aunque el papel de TGF β durante la neurogénesis no se ha estudiado directamente, un estudio reciente en el que se analizó el transcriptoma de células troncales diferenciadas a fenotipos neuronales, muestra que la expresión de las isoformas TGF β 2 y β 3, los receptores T β RI, II y III, así como del factor Smad 3, se encuentran significativamente incrementados desde el estadio 3 (progenitores neurales) hasta el estadio 5 (neuronas diferenciadas) (Ahn et al., 2004). Dado que la salida del ciclo celular es una condición indispensable para el proceso de diferenciación, estos datos apuntan a que TGF β pudiese participar en la regulación del ciclo celular de progenitores neurales.

En este sentido, el grupo de Almeida identificó -al utilizar medio condicionado de cerebelo de adulto-, que la interacción de TGF β y BDNF regula la salida del ciclo celular de progenitores neurales hipocampales de cerebro adulto (Lu et al., 2005).

Si bien estudios previos indican que TGF β 1 regula negativamente la expresión de los genes pro-opiomelanocortina (POMC) (Bouret et al., 2001) y GnRH (Bouret et al., 2004) en el cerebro adulto, su papel durante el desarrollo de los fenotipos neuroendócrinos hipotalámicos aún no se ha determinado, por lo que resulta sumamente prometedor el estudio de TGF β durante el desarrollo, particularmente sobre uno de sus genes blanco obvio: el KLF10.

En este sentido, en nuestro grupo hemos determinado que el patrón de expresión -en el hipotálamo- de las isoformas TGF β 1, 2 y 3, así como los receptores T β RI, II y II coincide con la etapa de establecimiento-diferenciación terminal del fenotipo TRHérgico, además de que en el mismo período se expresan las proteínas Smad2/3, principales ejecutoras en la vía de señalización clásica de TGF β .

Con base en: i) los niveles de expresión de KLF10 se encontraron incrementados al analizar el transcriptoma de células TRHérgicas hipotalámicas en etapas embrionarias; a la presencia de elementos de unión para proteínas del tipo KLF en el promotor de TRH, y a que componentes de la vía de señalización de TGF β se expresan desde etapas tempranas durante el desarrollo hipotalámico nosotros proponemos a Klf10 como un posible regulador de la transcripción del gen de TRH durante la etapa de diferenciación terminal.

El hipotálamo integra múltiples señales, tanto de la periferia como del propio cerebro, controlando la síntesis y liberación de hormonas, las cuales regulan funciones tan diversas como crecimiento, reproducción, metabolismo y conducta. Además de su importancia en el mantenimiento de la homeostasis en los organismos, recientemente, múltiples trabajos han asociado ciertos fenotipos hipotalámicos -como dopamina y oxitocina (Delgado 2008; Lee et al. 2006; Hattori et al 2008)- con importantes neuropatologías como la Depresión, la Esquizofrenia y el Autismo; sin embargo, la etiología de estas enfermedades no es del todo clara.

Si bien la generación reciente de ratones *knock-out* ha permitido identificar algunos factores de transcripción (*Otp*, *Sim1/2*, *Brn*, *Arnt2*) importantes para la diferenciación terminal de fenotipos hipotalámicos, las señales que regulan la expresión de estos genes y los blancos directos a través de los cuales regula dicha expresión aún se desconoce.

Por todo esto, consideramos que el presente trabajo no sólo incrementará nuestro conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que regulan el proceso de diferenciación de fenotipos neuroendocrinos hipotalámicos –particularmente el TRHérgico-, sino que eventualmente dicha información podría utilizarse para diferenciar células reprogramadas hacia fenotipos dañados en patologías como Esquizofrenia y Autismo.

6. HIPÓTESIS

TGF β a través de TIEG1, promueve la diferenciación de neuronas TRHérgicas hipotalámicas durante el desarrollo.

7. OBJETIVO

Demostrar que TGF β induce la expresión del gen de Trh durante la etapa de diferenciación terminal de este fenotipo hipotalámico.

8.1 MUESTREO DE HIPOTÁLAMOS

Para todos los experimentos se emplearon ratas de la cepa Wistar mantenidas en el bioterio del Instituto de Biotecnología-UNAM. Para el estudio ontogénico durante el desarrollo del hipotálamo de rata, utilizamos tejidos desde el día embrionario 14 (E14) hasta E21, los días post-natales (P) 0, 7, 14 y 21, así como en adulto (5 meses de edad). Las ratas gestantes y animales post-natales, se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12 h/12 h), temperatura (17 °C) y alimentadas *ad libitum* hasta el momento de su decapitación, alrededor de las 12:00 h. Las hembras gestantes se anestesiaron con pentobarbital (40 µl/250 g peso, Sedalphorte) y los embriones extraídos uno a uno. Bajo el microscopio estereoscópico, se realizó un corte a través de la línea imaginaria que une el borde superior del ojo y el oído, disecando el hipotálamo, región comprendida por detrás del quiasma óptico, entre los surcos laterales y por delante de los cuerpos mamilares a una profundidad aproximada de 3 mm. Los hipotálamos fueron congelados en hielo seco y almacenados a -70 °C hasta su uso (Joseph-Bravo et al. 2002).

8.2 CULTIVO PRIMARIO HIPOTALÁMICO

Los cultivos se realizaron empleando hipotálamos de embriones de rata de 17 días de gestación los cuales fueron disectados como se describió previamente. Los hipotálamos fueron colectados en solución Hank's, lavados, cortados e incubados durante 15 minutos con una mezcla de DNAsa tipo I (0.28 mg/ml) y Tripsina tipo III (0.26 mg/ml). La reacción de ambas enzimas se detuvo con suero fetal bovino (FBS) y DNAsa tipo I (0.28 mg/ml) dispersando posteriormente de manera mecánica con pipetas Pasteur de diferentes diámetros. La suspensión celular fue centrifugada a 1500 rpm por 4 min a temperatura ambiente y resuspendida en 5 ml de medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% FBS. La densidad celular se determinó en un hematocitómetro, obteniendo un rendimiento promedio de 1.0×10^6 células/hipotálamo. La viabilidad fue determinada mediante tinción por exclusión con azul tripano. Cajas de cultivo con pozos de 15 mm previamente cubiertas con poli-D-lisina (1.5 µg/ml) fueron sembradas con $1.5-2.0 \times 10^5$ células en un volumen final de 0.5 ml de NB suplementado con B27, en presencia o ausencia de las diferentes

isoformas de TGF- β (R&D Systems), cvcdfa una concentración de 2.5 ng/ml. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C con 7% CO₂, 90% de humedad y cosechados en los tiempos requeridos.

8.3 CULTIVO DE LÍNEA CELULAR CA77

La línea CA77 (carcinoma de tiroides) fue crecida en un medio compuesto DMEM/F10 (Gibco-BRL) en una relación 1:1 (vol/vol) suplementado con 10% FBS y 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco BRL). Las células ($0.5 \times 10^4/\text{cm}^2$) fueron sub-cultivadas cada semana y el medio cambiado después de 4 días *in vitro* DIV. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora REVCO a 37°C con 5% CO₂ y 95% de humedad. La transfección se realizó utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

8.4 EXTRACCIÓN DE RNA

El RNA total fue extraído a partir de células en cultivo o tejido congelado por el método de isotiocianato de guanidina (Chomczynski P et al. 1987), el cual consistió en homogenizar las muestras en 400 μl de solución D (4 M tiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sodio pH 7.0, 0.5% sarcosil, 0.1 M β -mercaptoetanol), 40 μl acetato de sodio 2 M (NaOAc) y mezclar en vortex vigorosamente. Posteriormente se añadieron 400 μl de fenol saturado con agua agitando de la misma forma. A la mezcla anterior se le agregaron 100 μl de cloroformo:isoamil-alcohol (49:1), centrifugando los tubos a 4°C y 13,000 rpm durante 17 minutos. El sobrenadante se mezcló con 450 μl de isopropanol, se mezcló e incubó durante 30 minutos en hielo seco, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm/4°C durante 22 minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 300 μl de solución D y 300 μl de isopropanol, incubando toda la noche a -20°C.

Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm/4°C durante 22 minutos. Posteriormente la pastilla se lavó con 400 μl de etanol al 70% centrifugando bajo las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante se desechó dejando secar el botón a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos. El RNA se resuspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y fue cuantificado por densidad óptica con luz ultravioleta a 260

nm en un espectrofotómetro (Nanodrop). Sólo se utilizaron aquellas muestras cuya relación 260/280 fuera mayor a 1.5.

La calidad del RNA se verificó por electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio (EtBr). Las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S debían guardar una proporción 2:1 y no mostrar barridos que indicasen degradación.

8.5 RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR SEMICUANTITATIVA

Las condiciones de transcripción reversa fueron las que previamente se estandarizaron en el laboratorio (Pérez-Martínez L et al. 1998). Brevemente, consistió en adicionar 1 µg de RNA total a un volumen final de reacción de 32 µl que contenían por cada tubo 8.9 µl de agua bidestilada estéril tratada con DEPC, 6 µl de amortiguador RT 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.4, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 3 µl de dithiothreitol (DTT) 0.1 M, 0.6 µl de deoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM, 1 µl de oligodeoxinucleótido de timidina (oligo dT) 0.5 µg/µl y 0.5 µl de transcriptasa reversa M-MLV (200 U/µl; Invitrogen). El RNA fue preincubado durante 5 minutos a 65°C antes de la síntesis del cDNA y transferido inmediatamente a hielo. La reacción de transcripción reversa se realizó durante 2 h a 37°C. Las muestras fueron mantenidas a 4°C para realizar la PCR inmediatamente o almacenadas a -20°C hasta su uso.

Los cambios relativos en los niveles del mRNA de TRH, TIEG1 y CRH se determinaron por PCR semicuantitativa, utilizando el mRNA de ciclofilina o G3PDH como controles internos. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50 µl conteniendo: 6 µl del producto de RT (4 µl para el caso de los controles endógenos), 5 µl de amortiguador para Taq DNA polimerasa 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, gelatina 10 µg/ml), 2.5 µl de MgCl₂ 30 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de los oligonucleótidos -sentido y antisentido- correspondientes para los genes de interés (25 pmol/µl) y ciclofilina/G3PDH (50 pmol/µl), 0.5 µl de Taq DNA polimerasa (Amplificasa 5 U/µl; Biogénica) y agua para llevar al volumen final de 50 µl.

8.6 RT-PCR SEMICUANTITATIVA

El RNA total fue aislado de hipotálamos de rata de días E17, 18, 21, P0, 7, 21 y adulto como se describió previamente. La transcripción reversa se realizó a través de M-MLV (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expresión del mRNA de KLF10 y TRH se analizaron por PCR en tiempo real utilizando un detector ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y reactivos Taqman de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cebadores y secuencias de la sonda utilizada para KLF10 fueron 5'-AGGCAGCCAACCATGCT-3', 5'-ATGGACATGAGCGTTCCA-3' y TRH 5'-TTCCCCTCCGAAGGCTT-3', 5'-GATGGAGTCTGATGTCACCAAGAG-3', 5'-GCCCTTTTGCCAGGATGCT-3' y 5'-CAGGCCGGAGGTTTCAT-3'. La expresión relativa se calculó mediante la normalización con β -actina mediante el método $\Delta\Delta CT$.

8.7 TRANSFECCIÓN Y ENSAYO DE LUCIFERASA

Cultivos primarios hipotalámicos mantenidos durante 24 h en cajas de cultivo con pozos de 15 mm y sembradas a una densidad celular de 2.0×10^5 fueron transfectados de manera transitoria utilizando polietilenimina (Guerra-Crespo et al. 2003). Para las transfecciones se utilizaron 800 ng del vector de expresión pNASS-rTRH-Luc (TRH-Luc) el cual contiene la región promotora del gen de TRH de rata (-776/+85) unido al gen reportero de luciferasa (Balkan et al. 1998) y 80 ng de pCH110 (β -galactosidasa) (donado por la Dra. Susana Castro-IBT-UNAM) utilizado como control interno de eficiencia de transfección. Las co-transfecciones se realizaron con 800 ng del vector de expresión pcDNA4/TO-Flag-TIEG para el factor de transcripción TIEG1 (Donado por el Dr. Malayan Subramaniam, Clínica Mayo), junto con el 800 ng del plásmido reportero TRH-Luc, 80 ng de β -gal u 800 ng de pUC18 (Fermentas) para un total de 1.68 μ g de DNA plasmídico por pozo. Después de cuatro horas la mezcla de transfección fue sustituida por 0.5 ml de NB suplementado con B27 (GIBCO). Setenta y dos horas después se añadió un tratamiento durante 24 horas con 2.5 ng/ml de TGF β .

Transcurrido el tiempo, las células fueron cosechadas con 30 μ l de amortiguador de lisis (Applied Biosystems), siguiendo las especificaciones del fabricante para determinar la actividad enzimática de luciferasa. Los valores de luciferasa fueron normalizados respecto a

los valores obtenidos para β -galactosidasa y contenido de proteína. Los datos se expresaron como actividad relativa de luciferasa.

8.8 SILENCIAMIENTO DE KLF10 MEDIANTE siRNA

El siRNA-KLF10 diseñado para abatir la expresión de KLF10 tiene la secuencia 5'-GAT CCC CCA TGC TTA ACT TCG GCG C TTCAAGAGA GCG CCG AAG TTA AGC ATG G TTT TT G GAA G -3' (sentido) y 5'- TCG ACT TCC AAAAA CCA TGC TTA ACT TCG GCG C AAGTTCTCT GCG CCG AAG TTA AGC ATG G GGG-3 (antisentido) correspondiente a los nucleótidos 118 a 136 del gen de KLF10 de rata (ENSEMBL: ENSRNOT00000008350). Dicha secuencia fue clonada en el vector pSuper (Invitrogen) siguiendo las condiciones del fabricante. Brevemente, se alinearon los oligonucleótidos sentido y antisentido. Se linearizó el vector pSuper con las enzimas Bgl y SalII. Se clonaron los oligonucleótidos dentro del vector, para posteriormente transformar bacterias DH5 α . La transfección para determinar la eficacia de dicho interferente se realizó en células HEK293T utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

8.9 WESTERN BLOT

Se prepararon extractos totales de proteína a partir de hipotálamos de diferentes edades, tal y como se describió previamente (Pérez-Martínez, L and DM Jaworski, 2005), utilizando amortiguador de lisis (0.5 mM PMSF, 20 mM Hepes (pH 7.4), 0.4 M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science) e incubando 15 min a 4°C. Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 10000 x g por 30 min a 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes y se cuantificó el contenido de proteína a 594 nm utilizando el ensayo de Bradford. Los extractos se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Cantidades iguales de proteína (30 μ g) se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare) durante 1.5 h a TA utilizando amortiguador de transferencia pH 8.3 (39mM glicina, 48mM TRIS base, 0,037% SDS, 20% metanol). Las

membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en Tris amortiguador salino con 0.05% de Tween-20 (TBST). Los anticuerpos anti-Smad2/3 (1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti-TIEG1 (3 µg/ml), anti-Flag (1:1500, Stratagene) y anti-actina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) y anti-GFP (1:10000 USB) se incubaron en 5% de leche en TBST toda la noche en agitación a 4°C. Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces en TBST durante 10 minutos y se incubaron durante 2 h a TA con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa (1:3000, Millipore) utilizando leche al 5% en TBST. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBST, se revelaron con el reactivo quimioluminiscente Western Lighthouse Plus-ECL (Perkin Elmer) y se expusieron a películas radiográficas Kodak.

8.10 ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP)

El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito (De La Rosa-Velázquez IA et al. 2007) con algunas modificaciones. Preparamos células -2×10^7 - a partir de hipotálamos fetales (E17) tal y como se describió para el cultivo primario. Tras fijar durante 10 min a TA con 1% de formaldehído, se añadió 1.25 M de glicina para detener la reacción de entrecruzamiento agitando suavemente y centrifugando 5 min a 1200 rpm/4°C y lavando dos veces con PBS 1X frío. Las células se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de lisis (1% SDS, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,1) conteniendo inhibidores de proteasas y se incubaron 10 min en hielo. Las muestras se sonicaron en un ultrasonicador (Cole Palmer) durante 20 segundos con salida 35% para obtener fragmentos entre 300 y 600 pb. Los lisados se centrifugaron a 4°C por 10 min a 13000 rpm. Se recuperó el sobrenadante asegurando de tomar una alícuota a la que se refiere como INPUT. Con el fin de “clarear” la cromatina, ésta se diluyó 1:10 en amortiguador de dilución (1% Tritón X-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-Hcl pH 8,1, 150 mM NaCl) y se incubó 3 h a 4°C con 20 µl de esferas de agarosa acopladas a proteína A/G más agarosa. Transcurrido ese tiempo las muestras se centrifugaron a 4°C por 5 min a 3000 rpm y se recuperó el sobrenadante en alícuotas de 1 ml. A cada alícuota se le añadieron 4 µg de los anticuerpos anti-TIEG o IgG como anticuerpo irrelevante y se incubaron toda la noche a 4°C con agitación constante.

Al día siguiente se añadieron 20 μ l de proteína A/G-agarosa incubando 4 horas en agitación a 4°C. Se recuperó la fracción inmunoprecipitada mediante centrifugación y se realizaron lavados secuenciales con los amortiguadores paro I (0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,1, 150 mM NaCl) paro II (0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,1, 500 mM NaCl), paro III (0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% Deoxicolato, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,1) y dos veces con amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0).

Las muestras se incubaron con 500 μ l de RNAsa A y proteinasa K durante 30 min a 37°C y posteriormente a 65°C durante toda la noche. Al día siguiente, el DNA se purificó con el DNA Extraction Kit de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante, para posteriormente analizarlo mediante PCR semicuantitativa. Para esto, se diseñaron a partir del promotor de TRH, tres juegos de oligonucleótidos denominados P1, P2 y P3 cuyas secuencias se muestran en la Tabla 3, donde además se indican las regiones que flanquean, los elementos presentes en dichas regiones y los productos de PCR esperados.

Oligonucleótido		Secuencia	Región flanqueada	Elementos de unión presentes	Producto PCR
P1	S As	5'-ACG TCT CTC CCT CCC TTT GT-3' 5'-AGG GGG GGG TGA GGC TTA T-3'	-125/-20	GC y CACCC	232 pb
P2	S As	5'-TCA CAG GTC CCC ATT TTT GT-3' 5'-GAG TAG TCC GCG ATG GAA AG-3'	-586/-257	CACCC	330 pb
P3	S As	5'-CGT TTT CCA CAG AAG CCA GT-3' 5'-ACA AAA ATG GGG ACC TGT GA-3'	-767/-566	GC	201 pb

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para en análisis de inmunoprecipitación de cromatina mediante PCR semicuantitativa.

8.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos representan la media \pm EE (error estándar) de por lo menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico para comparaciones múltiples se realizó mediante ANOVA utilizando la prueba post-hoc de Bonferroni o bien utilizando la prueba de *t* de Student. Se tomaron como significativos valores de $p < 0.05$.

9.1 TGF β 2 REGULA LOS NIVELES DEL MRNA DE TRH IN VITRO

Estudios previos han demostrado que la vía de señalización de TGF- β regula genes importantes para el desarrollo neuronal, por lo que, como una primera aproximación, decidimos analizar el patrón de expresión de TGF- β 1, β 2 y β 3, así como de los receptores T β RI y T β RII durante el desarrollo hipotalámico. El análisis mediante RT-PCR semicuantitativa muestra que las tres isoformas de TGF- β se expresan a lo largo del desarrollo del hipotálamo y que, además, poseen patrones bien definidos (Figura 6).

TGF- β 1 se expresa con niveles relativamente constantes desde etapas muy tempranas del desarrollo (E14) y hasta la edad adulta (3M). Por otro lado, TGF- β 2 muestra un patrón de expresión mucho más dinámico, con niveles de expresión detectables al día E14, los cuales disminuyen drásticamente entre los días E15-E16. Posteriormente observamos un incremento al día E17, el cual disminuye drásticamente al día E18, a partir de donde se incrementa nuevamente hasta el momento del nacimiento (P0). Tras el alumbramiento, observamos un descenso en la expresión al día P7 para incrementarse nuevamente a los días P14 y P21, reduciéndose a niveles casi imperceptibles en el adulto. Respecto al TGF- β 3, observamos que este es detectable también en etapas embrionarias (E14-15), estadios en los cuales la expresión es máxima y que disminuye posteriormente para mantenerse con niveles relativamente constante hasta la edad adulta (Figura 6A).

Nuestros datos resultan novedosos, al ser el primer grupo en analizar y detectar la expresión de las diferentes isoformas de TGF- β durante el desarrollo del hipotálamo, logrando identificar, por ejemplo, un claro patrón de expresión para las tres isoformas TGF- β y sus receptores T β RI y II.

Para determinar el papel que TGF- β juega durante la diferenciación del fenotipo TRHérgico decidimos utilizar como modelo cultivos primarios de hipotálamo de rata E17, en los cuales se analizó la expresión del TGF- β 1 y β 2, así como de los receptores T β RI y RII a los 2 y 4 días in vitro (DIV) (Figura 6B). Nuestro análisis indica que, a nivel de mRNA, las

dos isoformas y los receptores de TGF- β se expresan en nuestros cultivos en los días analizados, sin embargo, los niveles de expresión del mRNA de TGF- β 2 son significativamente mayores en comparación con TGF- β 1 (Fig. 6B).

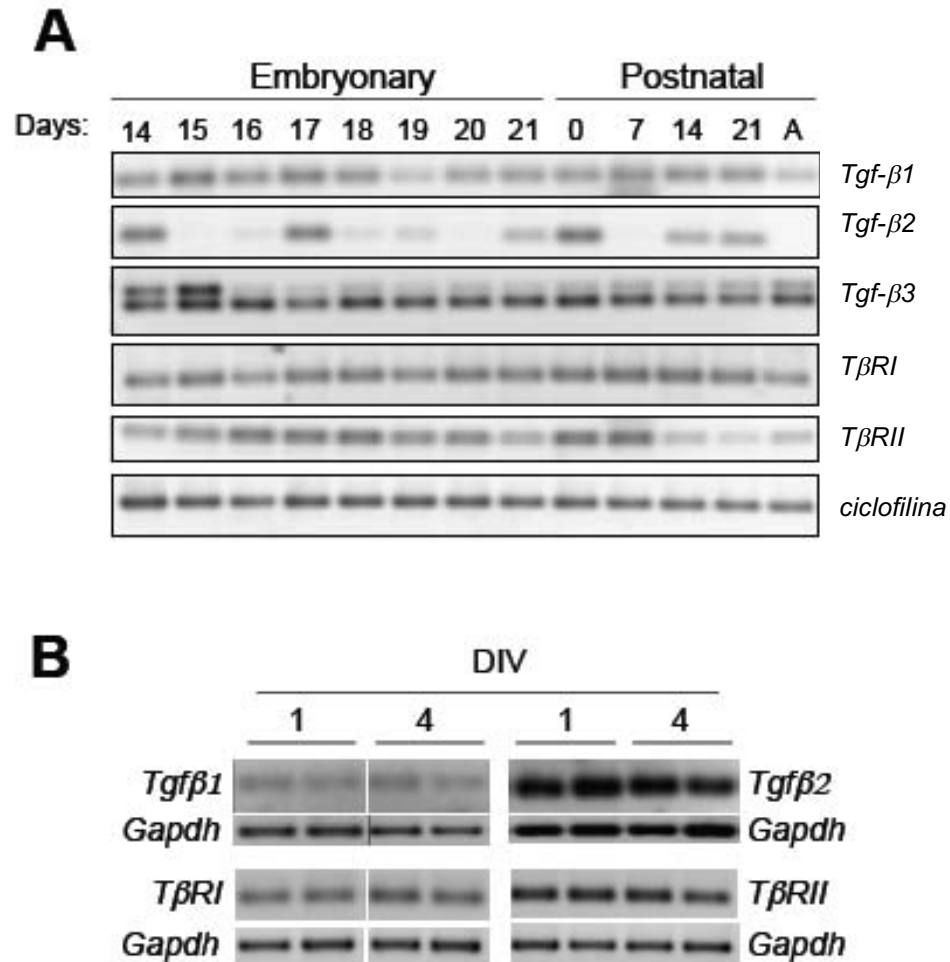


Figura 6. Expresión de TGF- β *in vivo* e *in vitro*. Los niveles del mRNA de las diferentes isoformas TGF- β 1, β 2, β 3 y los receptores T β R1 y T β R2 fueron determinadas mediante RT-PCR durante el desarrollo del hipotálamo o en células en cultivo a los días *in vitro* (DIV) indicados y utilizando como controles internos los genes de *Gapdh/ciclofilina*. Los productos amplificados se resolvieron en gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio. A) Imagen representativa de tres experimentos independientes, en donde cada punto representa un estadio en etapas embrionarias (E) desde el día 14 y hasta el 21, postnatales (P) a los días 0, 7, 14 y 21, así como el adulto de 3 meses (3m). B) Cultivos primarios de hipotálamo fetal E17 se mantuvieron durante 1-4 DIV, para posteriormente ser analizados.

Con base en estos resultados, decidimos investigar si en nuestro sistema, el TGF- β es capaz de regular los niveles del mRNA de *Trh* en un medio libre de suero. Como podemos observar en la Figura 7A (panel izquierdo), la expresión de *Trh* se incrementa en respuesta a TGF- β 2 de manera dosis y tiempo-dependiente (2.5 ng/ml, curva dosis-respuesta no mostrada), alcanzando niveles máximos de expresión (3 veces) a los 3 DIV y regresando a los niveles basales después de 4 DIV (datos no mostrados). Para determinar si el efecto observado sobre *Trh* es específico o abarca a otros neuropéptidos hipotalámicos, decidimos utilizar a la hormona liberadora de corticotropina (CRH), cuyas neuronas nacen y poseen un patrón de expresión similar a TRH (Markakis EA 2002). En la Figura 7A (panel derecho), podemos observar que el tratamiento con TGF- β 2, no modifica los niveles de mRNA de CRH, lo cual sugiere que el efecto observado con TGF- β 2 es específico para *Trh* y no abarca otros neuropéptidos dentro del hipotálamo.

Para definir si los incrementos observados con TGF- β a nivel del mRNA de *Trh* se deben a que esta citocina regula la actividad transcripcional del promotor de *Trh in vitro*, utilizamos nuevamente cultivos primarios de hipotálamo fetal, en donde transfectamos el vector TRH-Luc (Balkan W et al., 1998), que expresa el gen reportero de luciferasa bajo la región promotora mínima del gen de *Trh* (-776/84 pb), y posteriormente determinamos la actividad de luciferasa en respuesta al tratamiento con TGF- β . Como se puede observar, el TGF- β 2 induce un incremento (2.3 veces) en la actividad del promotor de *Trh* respecto a las células no tratadas (Figura 7C). Por otra parte, observamos que el efecto observado es específico del TGF- β 2, ya que en cultivos tratados con la isoforma TGF- β 3, la actividad del promotor no varía respecto al mismo control (Figura 7C).

El hecho de que las diferentes isoformas de TGF- β regulen la expresión de Tieg1 en fenotipos no neurales (Subramaniam M et al., 1995a, Tachibana I et al. 1997), aunado a que la expresión de Tieg1 se encuentra enriquecida en neuronas *Trh*⁺ de hipotálamo fetal (Guerra-Crespo M et al. 2011), nos llevó a determinar si en el contexto neuronal el TGF- β regula la expresión de Tieg1 en medio libre de suero. El análisis mediante RT-PCR muestra que TGF- β 2 induce un incremento (5 veces) en los niveles de mRNA Tieg1 24 horas

después del tratamiento (Figura 7B). Un aumento adicional (10 veces) se observó a los 3 DIV, después de lo cual los niveles de *Tieg1* disminuyen hasta regresar a los niveles basales (datos no mostrados). Estos datos confirman que, al igual que en otros tipos celulares, *Tieg1* es blanco de la actividad de TGF- β en células hipotalámicas.

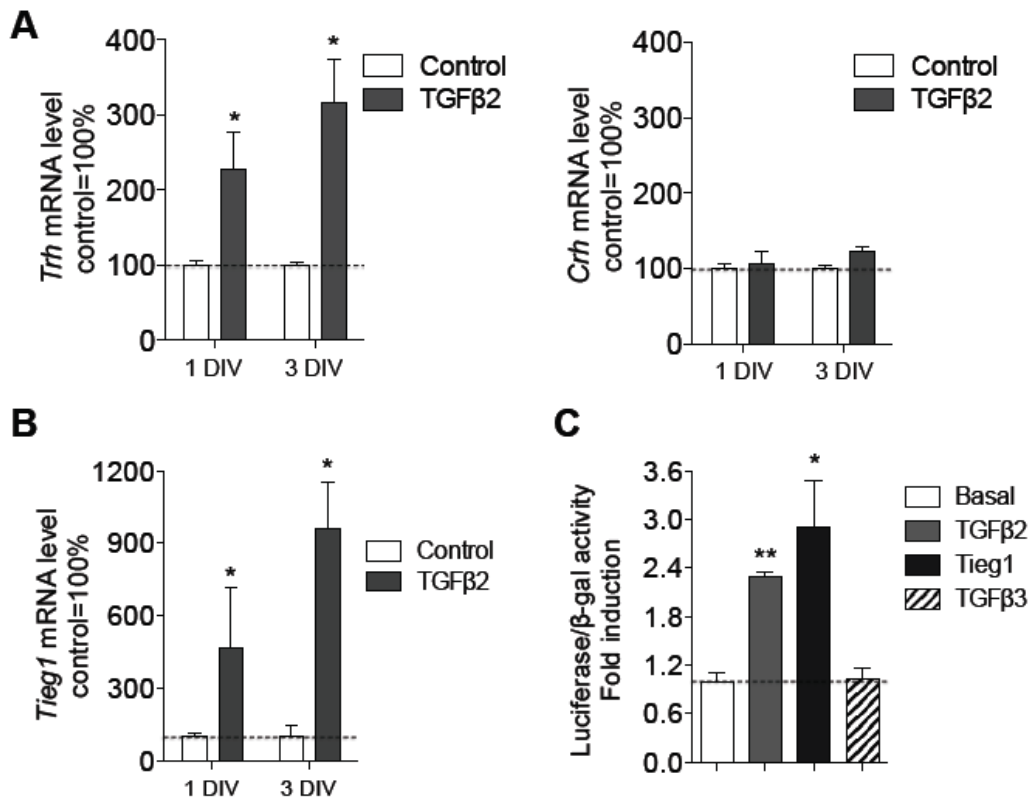


Figura 7. TGF- β 2 REGULA LA EXPRESIÓN DE TRH Y TIEG1 *IN VITRO*. Expresión del mRNA de *Trh* y *Tieg1* en respuesta a TGF- β 2. Cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata (E17) fueron mantenidos durante 1-4 días *in vitro* (DIV) en presencia o ausencia de TGF- β 2 (2.5 ng/ml). Se preparó RNA total a los diferentes tiempos para analizar, mediante RT-PCR, la expresión de los neuropéptidos: A) *Trh* y *Crh*, así como del factor de transcripción; B) *Tieg1*, utilizando como controles internos los genes de *Gapdh/ciclofilina*. Los productos amplificados se resolvieron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. La intensidad de las bandas se determinó mediante densitometría asistida por computadora y se normalizó respecto a la expresión de *Gapdh/ciclofilina*. En las gráficas cada barra está expresada como porcentaje respecto al control (100%) de células sin tratar, y corresponde al promedio \pm EE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. C) Regulación de la actividad del promotor de TRH por TGF- β 2. Cultivos primarios (E17) fueron transfectados con el gen reportero de luciferasa dirigido por la región promotora del gen de *Trh* (TRH-Luc) y *Tieg1*. 72 h post transfección las células fueron tratadas con las isoformas TGF- β 2 y β 3 (2.5 ng/ml). La actividad de luciferasa se determinó a las

24 h a partir de extractos totales. Los datos fueron corregidos contra la actividad de β -Galactosidasa por μ g de proteína y graficados como porcentaje respecto al control TRH-Luc. Los datos corresponden a tres experimentos independientes realizados al menos por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante una ANOVA seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni * $p < 0.01$ ** $p < 0.05$ como significativo respecto a TRH-Luc.

Debido a que la sobreexpresión de *Tieg1* es capaz de mimetizar los efectos de TGF- β en diversas líneas celulares y a que TGF- β regula la expresión de este factor de transcripción en nuestro sistema, pensamos que *Tieg1* podría regular la expresión de *Trh* en respuesta al tratamiento con TGF- β . Para probar esta hipótesis, y utilizando nuevamente los cultivos primarios, realizamos ensayos de co-transfección con el vector TRH-Luc sólo o en combinación con el vector de expresión pCDNA-TIEG1. Tal y como sucede con TGF- β 2, la sobre-expresión de *Tieg1* induce un incremento (3 veces) en la actividad del promotor de *Trh* respecto a las células transfectadas con el vector vacío (Figura 7C). En conjunto, nuestros resultados muestran que TGF- β 2 regula los niveles del mRNA de *Trh* en el contexto neuronal hipotalámico. Asimismo, sugieren que el efecto de TGF- β 2 sobre la expresión de *Trh* puede estar mediada por la acción de *Tieg1*.

Para demostrar que la regulación en la expresión de *Trh* mediada por TGF- β es un efecto directo sobre las células TRHérgicas y no efecto sobre células adyacentes, utilizamos la línea celular CA-77 (Sevarino KA et al. 1988) proveniente de un carcinoma de médula de tiroides de rata, la cual fue descrita como un sistema efectivo para el estudio de la biosíntesis de *Trh*, ya que muestra una regulación similar a la observada en neuronas TRHérgicas en el cerebro (Ubieta R et al. 2007). Esta línea celular expresa tanto la isoforma TGF- β 2, como los receptores T β RI y II (Datos no mostrados). Observamos que al igual que en los cultivos primarios, el tratamiento con TGF- β 2 regula de manera dependiente de dosis (5 ng/ml) y tiempo, los niveles del mRNA de *Trh* dependiente alcanzando una expresión máxima (2.3 veces) a los 2 DIV (Figura 8A). Estos datos indican que el efecto de TGF- β 2 sobre la expresión de *Trh* es un efecto directo sobre las células TRHérgicas.

Como mencionamos anteriormente, la cascada de señalización de TGF- β inicia con la unión al T β RII y la posterior activación del T β RI, propagando así la señal -a través de las proteínas Smad- desde la membrana hasta el núcleo. Para determinar si la cascada de

señalización iniciada por TGF- β participa en la regulación de la expresión de *Trh*, decidimos utilizar el inhibidor SB-431542, el cual inhibe de manera específica la actividad cinasa del T β RI (Matsuyama S et al. 2003). La pre-incubación de las células en cultivo con el SB-431542 (0.3 μ M) previo al tratamiento con TGF- β 2 inhibe el incremento observado en los niveles del mRNA de *Trh* en respuesta a esta citosina (Figura 8A). La especificidad del inhibidor fue corroborada a través de la fosforilación de la proteína Smad2. Como podemos observar (Figura 8A, panel inferior) la fosforilación de Smad2 inducida por TGF- β es también inhibida tras la incubación con el SB-431542, sin afectar los niveles de proteína total (Smad2/3). De igual forma, pudimos observar que tal y como sucede en los cultivos primarios, el tratamiento con TGF- β 2 (5ng/ml) induce un incremento en los niveles del mRNA de *Tieg1* en las células CA-77, y que dicha inducción es abatida al emplear el inhibidor SB-431542 (Figura 8A, panel superior derecho). Este efecto puede apreciarse también a nivel de proteína (Figura 8A, panel inferior). En conjunto, estos datos indican que el TGF- β y la activación de la vía de señalización mediada por el T β RI, regula tanto los niveles de expresión de *Trh* como los de *Tieg1*, y que este factor de transcripción pudiese ser el intermediario en esta cascada de señalización.

En concordancia con esta idea y de acuerdo con los datos obtenidos en el cultivo primario, la sobreexpresión de *Tieg1* en la línea CA-77 es suficiente para incrementar los niveles del mRNA de *Trh* 4 días post-transfección (Figura 8B, panel superior). Este efecto es resultado de un aumento en la tasa de transcripción, ya que la sobreexpresión de *Tieg1* induce también un incremento (6 veces) en la actividad del promotor de *Trh* (Figura 8B, panel inferior), además de ser específico de *Tieg1*, ya que el uso de Sp3, otro miembro de la familia de los Sp/Klf, no muestra ningún efecto en la actividad del reportero. Adicionalmente utilizamos la mutante R440W-*Tieg1*, en la cual se substituyó la arginina 433 por un triptófano, lo cual abate la unión de *Tieg1* a la región promotora de sus genes blanco (Little MH et al. 1992). Como podemos observar en la Figura8, panel inferior, la co-transfección del gen reportero con la mutante R440W es incapaz de transactivar al gen de *Trh in vitro*. Estos datos apuntan a que el efecto transactivador mediado por *Tieg1* se debe a la interacción directa de este factor de transcripción con la región promotora del gen de *Trh*.

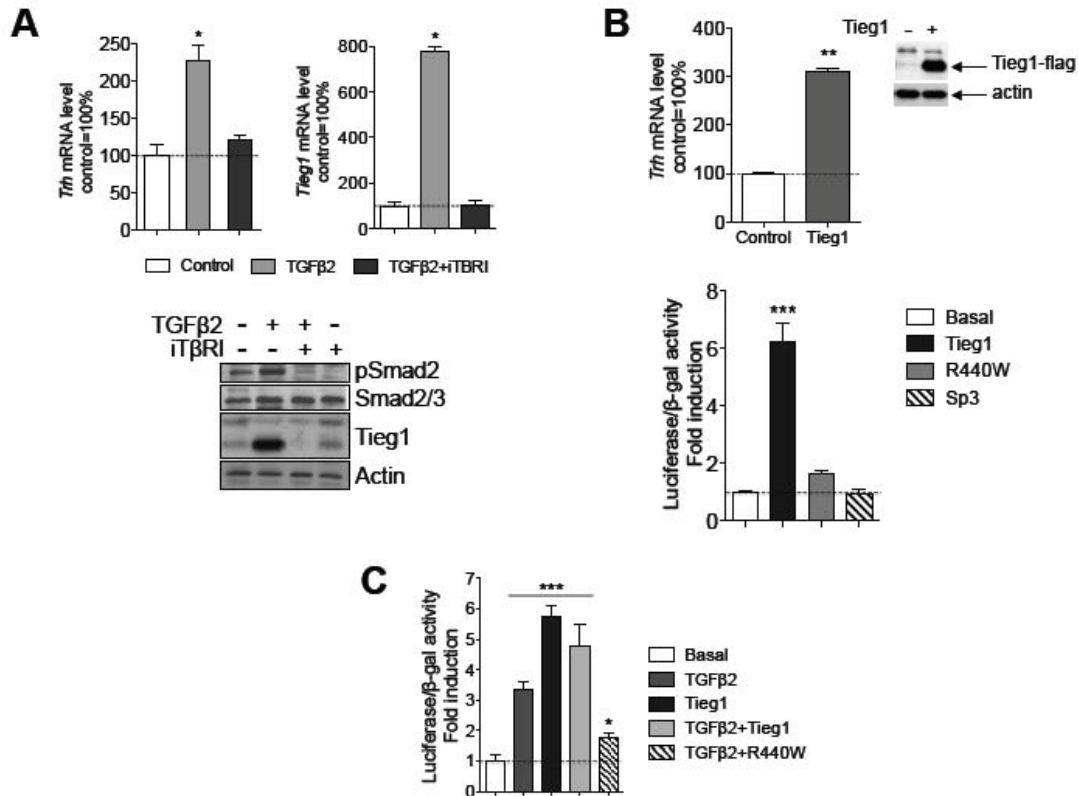


Figura 8. TGF-β2 A TRAVÉS DE TIEG1 REGULA LA EXPRESIÓN DEL GEN DE TRH EN LA LÍNEA CELULAR CA-77. A) TGF-β2 regula a través del receptor específico TβRI la expresión del gen de *Trh*. En el panel superior se muestran los niveles de expresión del mRNA de *Trh* y *Tieg1* en la línea CA-77 48 h después del tratamiento con TGF-β2 (5 ng/ml), sólo o en combinación con el inhibidor específico SB4358 (0.3 μM). Los niveles del mRNA se determinaron por RT-PCR y se cuantificaron por densitometría asistida por computadora en unidades arbitrarias. Los valores se corrigieron contra los niveles del mRNA de *Ciclofilina* como control interno y se expresan como porcentajes del control (células no tratadas = 100%). Cada barra representa el promedio ±EE de tres experimentos independientes realizado por duplicado. * p<0.05. El panel inferior muestra una imagen representativa de Western blot realizado a partir de los mismos cultivos y empleando anticuerpos específicos contra pSmad2, Smad2/3 y Tieg1. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-actina. B) Expresión del mRNA de *Trh* al sobreexpresar *Tieg1* en células CA-77. La línea celular CA-77 fue transfectada de manera transitoria con el vector pcDNA4TO/*Tieg1* o el control pcDNA4TO/vacío y mantenidas en cultivo durante cuatro días *in vitro* (DIV). Se preparó RNA total para analizar, mediante RT-PCR, la expresión de los genes *Trh* y *Ciclofilina* -como control interno-. El producto de PCR se resolvió en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. La intensidad de las bandas se determinó mediante densitometría asistida por computadora y se normalizó respecto a la expresión de *Ciclofilina*. En la gráfica, cada barra expresada como porcentaje respecto al control (100%) de células sin *Tieg1*, corresponde al promedio ±EE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ** p<0,005 (panel superior). Las mismas células fueron co-

transfectadas con el gen reportero de luciferasa dirigido por el promotor mínimo de TRH (TRH-Luc) en combinación con el vector pcDNA4TO/TIEG en su forma silvestre o mutada, o el vector SP3. 48 h post transfección se determinó la actividad de luciferasa a partir de extractos totales. Los datos fueron corregidos contra la actividad de β -Galactosidasa por μg de proteína y graficados como porcentaje respecto al control TRH-Luc. Los datos corresponden a dos experimentos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni $*p < 0.01$ significativo respecto al control. C) TGF- β a través del Tieg1 regula la actividad del promotor de *Trh* *in vitro*. Las células CA-77 fueron transfectadas con el vector vacío o la mutante R440W. 4 días post-transfección, las células fueron tratadas con TGF- β 2 durante 48 h. La actividad relativa de luciferasa fue normalizada respecto a la actividad de β -galactosidasa. Las veces de inducción se calcularon respecto a las células TRH-Luc+ pcDNA4TO/vacío. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. $*p < 0.01$ vs. TRH-Luc.

Nuestros resultados apoyan fuertemente la idea de que TGF- β 2 regula la expresión de *Trh* a través de un mecanismo que involucra al factor Tieg1, sin embargo, el efecto inductor de sobreexpresar Tieg1 y tratar con TGF- β de manera simultánea es el mismo que se observa con ambas señales de manera independiente, lo cual apunta a que Tieg1 y TGF- β actúan a través de la misma vía (Figura 8C).

Para determinar el papel que Tieg1 juega en el aumento de la tasa de transcripción mediada por TGF- β , analizamos la habilidad de la mutante R440W para regular la actividad del promotor de *Trh* en respuesta a TGF- β 2. Para esto, las células CA-77 fueron transfectadas de manera transitoria con el vector vacío, el vector de expresión *Tieg1* o la mutante R440W-Tieg1. Tal y como esperábamos, las células transfectadas con la mutante R440W fueron incapaces de responder al tratamiento con TGF- β 2 (Figura 8C), lo cual demuestra que TGF- β 2 ejerce su efecto sobre la actividad transcripcional de *Trh* a través de la unión al DNA del factor de transcripción Tieg1.

9.2 LA EXPRESIÓN DE TIEG1 EN EL HIPOTÁLAMO DE RATA COINCIDE CON EL ESTABLECIMIENTO DE LAS NEURONAS DE TRH IN VIVO

Con el fin de determinar el papel de Tieg1 en el hipotálamo *in vivo*, quisimos determinar el patrón de expresión de este factor de transcripción durante el desarrollo del hipotálamo de *Rattus norvegicus* mediante qRT-PCR (Figura 9A) y ensayos de Western-blot

(Figura 9C). El mRNA de *Tieg1* es detectable desde etapas tempranas del desarrollo embrionario (E15), y muestra una tendencia a disminuir previo al nacimiento (E21); sin embargo, la expresión de *Tieg1* vuelve a incrementarse al día post-natal (P)0 para mantener niveles relativamente constantes hasta la edad adulta (Figura 9A, panel izquierdo). A diferencia de lo observado a nivel de mensajero, la proteína de *Tieg1* detectada al día E15 se incrementa paulatinamente durante el desarrollo hasta alcanzar niveles máximos de expresión en el adulto (Figura 9C). Estos datos coinciden con los obtenidos recientemente por la base de datos del GENSAT, que reporta niveles de expresión moderados para *Tieg1* en el hipotálamo murino a los días E15.5, P7 y en la edad adulta (<http://www.gensat.org>).

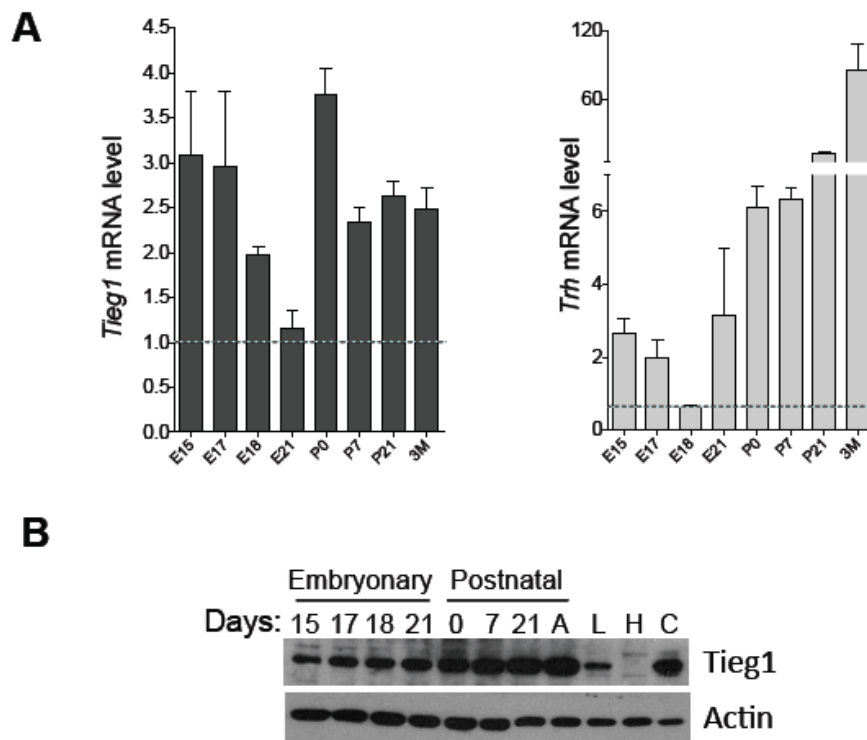


Figura 9. EXPRESIÓN DE TIEG1 DURANTE EL DESARROLLO HIPOTALÁMICO. (A) Patrón de expresión del mRNA de *Tieg1* en el hipotálamo en desarrollo. Hipotálamos de los estadios indicados, fueron procesados mediante qRT-PCR. La expresión del gen de *Tieg1* o *Trh* (respecto a actina -control interno-) al día embrionario (E) 21 se estableció como 1 y los valores del resto de la ontogenia están referidos a este punto. Cada barra representa la media \pm EE de dos experimentos independientes realizados por triplicado. B) Niveles de la proteína de *Tieg1* durante el desarrollo del hipotálamo. Proteína total en los estadios indicados fue utilizada en ensayos tipo Western blot. Los niveles de actina fueron empleados como control de carga. (E) embrionario (PN) postnatal (A) adulto (L) pulmón (H) HEK-293 (C) CA-77.

De igual forma, decidimos analizar la expresión de *Trh* en los mismos estadios (Figura 9B). Como podemos observar, los niveles del mRNA de *Trh* son detectables desde el día E15 y se incrementan conforme avanza el desarrollo, alcanzando niveles máximos de expresión en el adulto, tal y como se ha reportado previamente (Pérez-Martínez et al. 2001). En conjunto, estos datos apoyan la idea de que Tieg1 pudiese jugar un papel importante no sólo en la expresión del gen de *Trh in vivo*, sino de manera más general durante el desarrollo del hipotálamo.

9.3 LA EXPRESIÓN DEL GEN DE TRH EMBRIONARIO DEPENDE DE LA EXPRESIÓN DE TIEG1.

Estudios previos han demostrado que al igual que otros KLFs, el Tieg1 es capaz de regular la expresión de múltiples genes a través de la unión directa a la secuencia consenso CACCC o a cajas ricas en GC presentes en la región regulatoria de sus genes blanco (Girdhari L et al. 2008). El análisis bioinformático de la región promotora del gen de *Trh* de rata con el programa MatInspector (Cartharius K et al. 2005) reveló la presencia de cuatro posibles sitios de unión para miembros de la familia de los KLFs: dos sitios CACCC (-332/-328 y -92/-88) y dos cajas GC (-652/-646 y -119/-88), los cuales denominamos como KEM1, KEM2, GCA y GCB respectivamente (Figura 10A).

Para determinar si Tieg1 regula la actividad transcripcional del gen *Trh* a través de la unión a los sitios CACCC o cajas GC presentes en el promotor mínimo de *Trh*, se mutaron de manera independiente estos sitios en la construcción TRH-Luc. Las mutaciones fueron diseñadas para abolir la unión de factores de transcripción tipo KLF (Higaki Y et al. 2002) o SP1 (Li M y RE Kellems 2003), sobre los elementos KEM o GC, respectivamente. Cultivos primarios de hipotálamo fetal fueron co-transfectados con el promotor silvestre (TRH-Luc), o con las versiones mutadas de los siguientes elementos: KEM1 (Δ KEM1-Luc), KEM2 (Δ KEM2-Luc), GC-A (Δ GCA-Luc) o GC- B (Δ GCB-Luc), sólo o en combinación con el vector de expresión pcDNA-Tieg1.

La mutación del sitio de GC-A no alteró la actividad basal del promotor de *Trh*; sin embargo, el efecto transactivador de Tieg1 sobre el promotor de *Trh* fue abolido con dicha

mutación si se compara con el TRH-Luc silvestre. Por otra parte, en la construcción Δ GCB-Luc observamos que la mutación en esta caja es capaz de abolir tanto la inducción mediada por Tieg1 como la actividad basal del promotor de *Trh* (Figura 10B). Estos resultados sugieren que en cultivos de células fetales de hipotálamo las cajas GC son necesarias para la regulación positiva de la actividad del promotor de *Trh*.

Por otro lado, observamos que el sitio KEM2 resulta irrelevante para la actividad transcripcional del promotor de *Trh*, ya que ni el efecto mediado por Tieg1 ni la actividad basal del promotor se vieron afectadas con la mutación Δ KEM2-Luc. Finalmente, detectamos que la mutación en el sitio KEM1 incrementa en aproximadamente dos veces la actividad basal del promotor de *Trh* respecto a su contraparte silvestre (Figura 10B). A diferencia de lo observado con las cajas GC, nuestros datos apuntan a que si bien las cajas CACCC no son necesarias para la actividad transactivadora mediada por Tieg1, si pueden tener un efecto represor sobre la actividad basal del promotor de *Trh in vitro*.

Para analizar la ocupación de Tieg1 en el promotor de *Trh in vivo* realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) a partir de hipotálamos de rata (E17) empleando un anticuerpo específico α -Tieg1. Posteriormente realizamos PCR semicuantitativa con oligonucleótidos específicos que abarcan los sitios KEM1 y GCA (P1) (Figura 10A) así como los sitios KEM2 (P2) y GCB (P3) –datos no mostrados- todos ellos presentes en el promotor del gen de *Trh* en la rata. Encontramos que el uso del anticuerpo α -Tieg1 permite un enriquecimiento de las tres regiones genómicas (P1, P2 y P3) analizadas dentro del promotor de *Trh* (Figura 10C), pero no de la región 1010-1204 del receptor II de TGF- β (T β RII), la cual carece de sitios CACCC o GC (datos no mostrados). De igual forma, observamos un enriquecimiento en el promotor de *Trh* con los anticuerpos α -AcH3 y α -AcH4 (Figura 10c), ambas marcas de genes transcripcionalmente activos. En conjunto, estos datos muestran que Tieg1 se une *in vivo* a la región promotora del gen de *Trh* al día E17 y que la unión específica a la región -119/-88 (caja GC-A) es necesaria para la expresión del gen de *Trh* mediada por Tieg1, en la etapa de diferenciación terminal de este fenotipo hipotalámico.

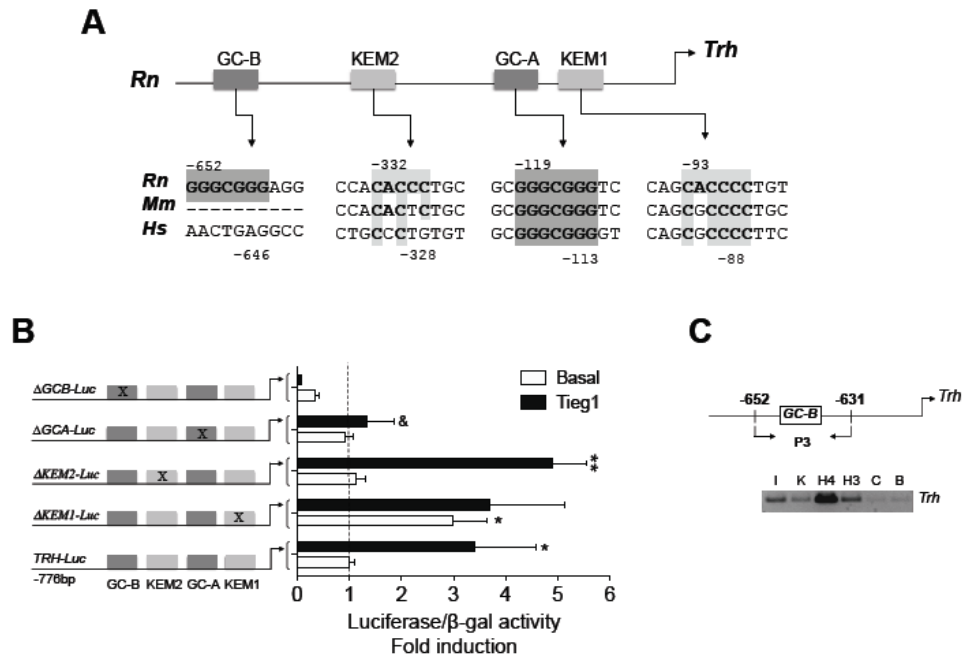


Figura 10. TIEG1 REGULA LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE *Trh*. A) Representación esquemática de la región promotora del gen de *Trh* de *Rattus norvegicus* (Rn) donde se indica la posición relativa –respecto al sitio de inicio de la transcripción– de las cajas CACCC y GC. (*) muestra las secuencias conservadas en los promotores de *Mus musculus* (Mm) y *Homo sapiens* (Hs). B) C) Tieg1 es reclutado en el promotor de *Trh* de rata *in vivo*. El panel A muestra las posiciones relativas de los oligonucleótidos (P1, P2 y P3) utilizados para amplificar mediante RT-PCR la región promotora del gen de *Trh*. En este panel se muestra el producto de PCR procedente del DNA genómico de hipotálamo fetal de 17 días de gestación (E17), enriquecido mediante ChIP. Esta imagen es representativa de tres experimentos independientes realizados por triplicado. I: input; K: anticuerpo α -Tieg1; H3: anticuerpo α -Histona 3 acetilada; H4: anticuerpo α -Histona 4 acetilada; C: control IgG; P: control perlas.

9.4 TIEG1 ES NECESARIO PARA LA EXPRESIÓN DE TRH EN EL HIPOTÁLAMO DEL RATÓN

Finalmente, para demostrar que Tieg1 es un importante regulador de la expresión de *Trh in vivo*, analizamos los niveles del mRNA de *Trh* en ratones Tieg1^{-/-}. La carencia de Tieg1 fue corroborada mediante qRT-PCR (datos no mostrados). Como podemos observar, los niveles de expresión de *Trh* disminuyen en aproximadamente cincuenta por ciento en el hipotálamo de ratón E17 Tieg1^{-/-} respecto a su contraparte silvestre (Figura 11A). La reducción en los niveles del mRNA se ven reflejadas a nivel de péptido, ya que al analizar los niveles del péptido maduro mediante RIA, se observa una disminución aproximada del 35%

en el hipotálamo del ratón $Tie1^{-/-}$ comparado con el ratón $Tie1^{+/+}$ (Figura 11B). Estos datos demuestran que la correcta expresión de $Tie1$ durante el desarrollo es necesaria para la expresión máxima del gen de Trh durante el desarrollo hipotalámico.

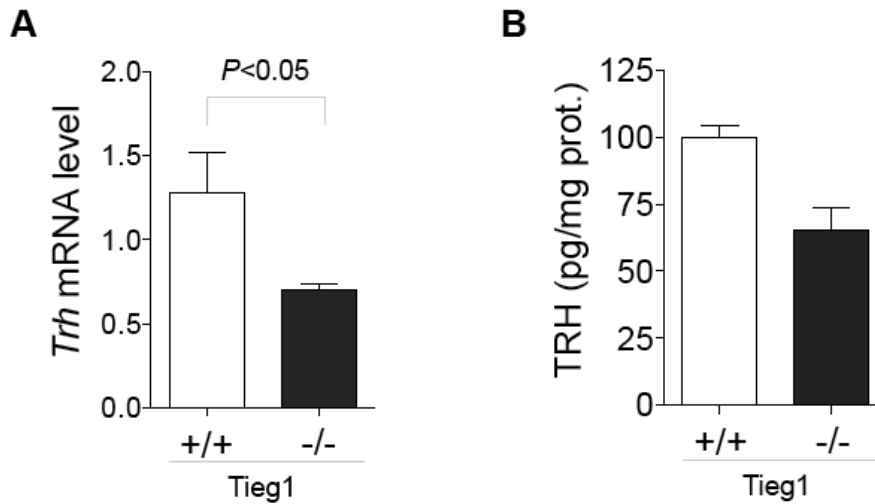


Figura 11. TIEG1 ES NECESARIO PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN DE TRH IN VIVO. Los niveles del mRNA de Trh y su proteína fueron determinados mediante qRT-PCR (A) Radioinmunoensayo (B), respectivamente. Se preparó RNA total o extractos peptídicos a partir de hipotálamos de ratón (E17) provenientes de ratones silvestres ($+/+$) y knockout ($-/-$). Para los qRT-PCR los niveles de expresión relativa se determinaron utilizando actina como un gen constitutivamente activo y normalizando contra la expresión en el ratón silvestre. Los resultados representan la media \pm EE de tres experimentos independientes o dos RIA, cada uno por triplicado.

La neurogénesis es un proceso altamente coordinado que involucra, de manera general, la salida del ciclo celular, proyección de dendritas y axones, migración, establecimiento de sinapsis y finalmente la expresión del marcador específico para cada fenotipo neuronal en específico –diferenciación terminal-. En el cerebro, todo esto ocurre en respuesta a múltiples señales, como la neurotrofina BDNF (Lin et al. 1998) u otras citocinas (Tao et al., 1997, Angley et al. 2003).

Gracias al uso de timidina [3H] y bromodeoxiuridina (BrdU), se ha podido establecer *in vivo* el nacimiento de poblaciones neuronales específicas. En la rata, cinco fenotipos neuroendócrinos, incluyendo a las neuronas TRHérgicas, son generados a partir del tercer ventrículo, con periodos de formación parcialmente sobrelapados entre los días E11-E17. (Markakis y Swanson, 1997); sin embargo, la identidad de las señales que participan en este proceso aún se desconocen.

En ese contexto, el presente estudio constituye la primera caracterización de un mecanismo bioquímico fundamental, la señalización mediada por TGF- β para la regulación de la expresión de un neuropéptido hipotalámico, el gen de *Trh*. Dentro de este mecanismo determinamos que *in vitro* TGF- β 2 regula de manera específica los niveles del mRNA de *Trh* a través de regular la actividad transcripcional de su promotor mínimo. De manera interesante, el efecto observado sobre la actividad del gen depende de la activación del T β R-I, ya que al bloquearlo con el inhibidor específico SB431542, se abate la inducción en los niveles del mRNA de *Trh* observada previamente. Adicionalmente, mostramos, por primera vez en un contexto neuronal, que TGF- β 2 regula la expresión de *Tieg1*, y que éste es capaz de reconocer, unirse y regular la expresión de *Trh* a través de una caja rica en GC (nucleótidos -119-/-113). Finalmente, determinamos que la carencia de *Tieg1*, resulta necesaria para la expresión, tanto del mRNA de *Trh* como para los niveles del péptido maduro.

Nuestro trabajo resulta relevante ya que si bien diversos estudios han demostrado un papel fundamental de TGF- β dentro del sistema nervioso central, su función durante el

desarrollo del hipotálamo no se había descrito hasta el momento (Kane et al. 1996; Cameron et al 1998). A pesar de que observamos un efecto específico de TGF- β 2 sobre la regulación del gen de *Trh* en la etapa de diferenciación terminal, no podemos descartar que TGF- β tenga otro efecto sobre este fenotipo hipotalámico. Considerando que la expresión de las diferentes isoformas es detectable desde etapas muy tempranas del desarrollo (E12-17) – datos no mostrados-, que dicha ventana de tiempo coincide con el nacimiento del fenotipo TRHérgico, y que reportes previos indican que TGF- β induce la salida del ciclo celular de progenitores neuronales en hipocampo y cerebelo (Lu J et al. 2005; Alvarez-Rodríguez R et al. 2007), es posible que el TGF- β participe en eventos tempranos de la neurogénesis hipotalámica.

Por otro lado, si bien encontramos que la activación del T β RI es necesaria para el efecto de TGF- β sobre el gen de *Trh*, aún es necesario determinar si dicha activación utiliza la señalización clásica de TGF- β a través de la fosforilación de las proteínas R-Smad o una vía Smad-independiente, sin embargo, el hecho de que la expresión de Smad2/3 se detecte a lo largo del desarrollo hipotalámico –datos no mostrados- nos sugiere que estas proteínas pudiesen estar participando en el efecto transactivador mediado por TGF- β .

Asimismo, logramos determinar que el factor de transcripción Tieg1, blanco de la vía clásica de señalización mediada por TGF- β , es capaz de regular la expresión del gen de *Trh*, a través de la unión específica al elemento GC-A (-119/-113) el cual es crucial para la expresión mediada por dicho factor. Si bien otros miembros de la familia de los KLFs, como el Klf7, Klf9 y Klf4 participan en la morfogénesis neuronal (revisado en McConnel B y Yang VW 2010), este es el primer reporte en el que se identifica un papel transactivador de Tieg1 sobre un fenotipo neuronal específico.

Klf10 pertenece a una subfamilia dentro de los KLFs caracterizada por la presencia de tres dominios únicos de represión (R1-3), a través de los cuales es capaz de interactuar con el co-represor mSin3A (Zhang JS et al. 2001) o con la demetilasa JARID1B (Kim J et al. 2010); sin embargo, a pesar de que diversos estudios lo han descrito como un regulador positivo de la actividad transcripcional en diferentes tipos celulares, no fue recientemente

que se describió su interacción con PCAF para regular la expresión de *Foxp3* en células Treg (Xiong Y et al. 2012). Por lo anterior, consideramos que la interacción de Tieg1 con PCAF u otros co-activadores pudiesen estar involucrados en la regulación del gen de *Trh*. Este escenario se torna más complejo aún, si consideramos que la unión del complejo Klf4-Sp1 al elemento GC-A es capaz también de regular la expresión de *Trh* en la misma ventana de tiempo (Pérez-Monter et al. 2011), por lo que resulta interesante determinar la secuencia de unión y el papel que dicha unión juega en la regulación de la expresión del gen de *Trh*.

Adicionalmente identificamos a los elementos KEM1 y la caja GC-B como importantes reguladores de la actividad del promotor de *Trh*, los cuales parecen funcionar como inhibidor y transactivador respectivamente de la actividad basal del promotor mínimo, por lo que la caracterización *in vivo* de dichos elementos resulta sumamente interesante.

En conjunto, nuestros datos no sólo proveen nueva evidencia del papel de TGF- β y el factor de transcripción Tieg1 en la diferenciación terminal del fenotipo TRHérgico hipotalámico, sino que sientan la base de futuros estudios para determinar el mecanismo de acción de Tieg1 en este fenotipo y analizar funciones adicionales en otras etapas del desarrollo hipotalámico.

- ✿ Las isoformas TGF- β 1, β 2 y β 3, los receptores T β RI y II y el factor de transcripción Tieg1 se expresan a lo largo del desarrollo del hipotálamo de la rata, así como en los cultivos primarios de hipotálamo fetal (E17).
- ✿ En un contexto neuronal, TGF- β 2 regula los niveles del mRNA tanto de *Tieg1* como de *Trh*.
- ✿ De manera específica, TGF- β 2 regula la actividad transcripcional del promotor mínimo de *Trh in vitro*.
- ✿ La vía clásica canónica de TGF- β , a través de la activación del T β RI, regula la expresión del mRNA de *Trh* en la línea celular CA-77.
- ✿ La sobreexpresión de Tieg1 incrementa los niveles del mRNA de *Trh* al regular la actividad transcripcional de su promotor mínimo.
- ✿ TGF- β 2 regula la expresión de *Trh* a través del factor Tieg1
- ✿ Tieg1 regula la expresión del gen de *Trh*, uniéndose a la caja GC (-119/-113) de su promotor mínimo
- ✿ Tieg1 es necesario para la expresión de *Trh* durante el desarrollo embrionario

- ✿ Determinar si el efecto transactivador de la TGF β y Tieg1 sobre el gen de *Trh* utiliza la vía de señalización clásica de TGF β
- ✿ Determinar el efecto de Tieg1 en etapas tempranas del desarrollo hipotalámico, en particular sobre el fenotipo TRHérgico.

- Acampora D, MP Postiglione, V Avantiaggiato, M Di Bonito, FM Vaccarino, J Michaud and A Simeone (1999). Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. *Genes Dev.* 13:2787-800
- Alvarez-Rodríguez R, Barzi M, Berenguer J, Pons S. (2007) Bone morphogenetic protein 2 opposes Shh-mediated proliferation in cerebellar granule cells through a TIEG-1-based regulation of Nmyc. *J Biol Chem.* 282:37170-80
- Balkan W, MA Tavianini, PJ Gkonos, BS Roos (1998) Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology.* 139:252-259
- Cartharius K, K Frech, K Grote, B Klocke, M Haltmeier, A Klingenhoff, M Frisch, M Bayerlein, T Werner (2005) *Bioinformatics.* 21:2933-2943 et 2005
- Chen ZY, Shie J, Tseng C. (2000) Up-regulation of gut-enriched krüppel-like factor by interferon-gamma in human colon carcinoma cells. *FEBS Lett.* 477:67-72.
- Chiang C, Y Litingtung, E Lee, KE Young, JL Corden, H Westphal and PA Beachy . (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* 383:407-413.
- Chrisman HR and DJ Tindall. (2003) Identification and characterization of a consensus DNA binding element for the zinc finger transcription factor TIEG/EGR α . *DNA Cell Biol* 22:187-199
- Cook, T and R. Urrutia. (2000) TIEG proteins join the Smads as TGF- β -regulated transcription factors that control pancreatic cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278:513-521
- Dang DT, J Pevsner and VW Yang (2000) The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol.* 32:1103-1121
- De La Rosa-Velázquez IA, H Rincón-Arano, L Benítez-Bribiesca, F Recillas-Targa. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res.* 67:2577-2585.
- Delgado MR (2008) Fol. Me once, shame on you; Fol. Me twice, shame on oxytocin. *Neuron.* 58:470-471
- Dijkmans TF, van Hooijdonk LW, Schouten TG, Kamphorst JT, Fitzsimons CP, Vreugdenhil E. Identification of new Nerve Growth Factor-responsive immediate-early genes. *Brain Res.* 16:19-33.

- Evans PM, W Zhang, X Chen, J Yang, KK Bhakat, C Liu (2007) Krüppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation. *J Biol Chem.* 282:33994-4002.
- Guerra-Crespo M, C Pérez-Monter, SC Janga, S Castillo-Raírez, RM Gutiérrez-Rios, P Joseph-Bravo, L Pérez-Martínez, JL Charli (2011) Transcriptional profiling of fetal hypothalamic TRH neurons. *BMC Genomics.* 12:222
- Ghaleb AM, MO Nnandan, S Chanchevalap, WB Dalton, IM Hisamuddin, VW Yang (2005) Krüppel-like factors 4 and 5: the yin and yang regulators of cellular proliferation. *Cell Res.* 15:92-96.
- Goshu E, H Jin, J Lovejoy, JF Marion, JL Michaud, CM Fan. (2004) Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. *Mol Endocrinol.* 18:1251-1262.
- Hattori S, T Murotani, S Matsuzaki, T Ishizuka, N Kumamoto, M Takeda, M Tohyama, A Yamatodani H Kunugi, R Hashimoto (2008) *Biochem Biophys Res Commun.* 373:298-302
- Hefferan TE, GG Reinholz, DJ Richard, SA Johnsen KM Waters, M Subramaniam and TC Spelsberg (2000a). Overexpression of a nuclear protein, TIEG mimics transforming growth factor-beta action in human osteoblast cell. *J Biol Chem.* 275:2025-20259
- Hefferan TE, M Subramaniam, S Khosla, BL Riggs and TC Spelsberg (2000b). Cytokine-specific induction of the TGF-beta inducible early gene (TIEG): regulation by specific members of the TGF-beta family. *J Cell Biochem.* 78:380-390.
- Joseph-Bravo P, JL Charli, JM Palacio y C Córdón (1979) Effect of neurotransmitters on the in Vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinol* 104:801-806
- Johnsen SA, M Subramaniam, R Janknecht, and TC Spelsberg (2002a). TGFbeta inducible early gene enhances TGFbeta/Smad-dependent transcriptional responses. *Oncogene* 21:5783-5790
- Johnsen SA, M Subramaniam, T Katagiri, R Janknecht and TC Spelsberg (2002b) Transcriptional regulation of Smad2 is required for enhancement of TGFbeta/Smad signaling by TGFbeta inducible early gene. *J Cell Biochem* 87:233-242
- Kaczynski J, T Cook y R Urrutia (2003) Sp1 and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol* 4:206-216
- Kang Y, CR Chen, J Massagué (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 11:915-926.

- Kapsimali M, L Caneparo, C Houart and SW Wilson (2004) Inhibition of Wnt/Axin/ β -catenin pathway activity promotes ventral CNS midline tissue to adopt hypothalamic rather than floorplate identity. *Development* 131:5923-5933
- King KE, VP Iymere, PL Weissberg and CM Shanahan (2003). Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor β 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *J Biol Chem.* 278:11661-11669
- Lee JE, SF Wu, LM Goering and RI Dorsky (2006) Canonical Wnt signaling through Lef1 is required for hypothalamic neurogenesis. *Development* 22:445-441
- Lee PR, DL Brady, RA Shapiro, DM Dorsa, JI Koenig (2007). Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: reversal by oxytocin. *Brain Res.* 1156:152-167
- Lomberk G y R Urrutia (2005) The family feud: turning off Sp1 by sp1-like KLF proteins. *Biochem J* 392:1-11
- Marín O and JLR Rubenstein (2002). Patterning, regionalization and cell differentiation in the forebrain. En Mouse development. Patterning, morphogenesis and organogénesis. Ed. Janet Rossant. Academia Press.
- Markakis E and LW Swanson (1997). Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvicellular neuroendocrine system. *Brain Res Brain Res Rev* 24 :255-291
- Markakis EA (2002). Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* 23:257-291
- Mathieu J, A Barth, FM Rosa, SW Wilson and N Peyriéras. (2002) Distinct and cooperative roles for Nodal and Hedgehog signals during hypothalamic development. *Development.* 129:3055-3065.
- Michaud JL, T Rosenquist, NR May and C Fan (1998). Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.* 15:3264-75.
- Michaud JL, C DeRossi, NR May, BC Holdener and C Fan (2000) ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech Dev.* 90:253-261.
- Noti JD, AD Jonson, JD Dillon (2004) The zinc finger transcription factor transforming growth factor beta-inducible early gene-1 confers myeloid-specific activation of the leukocyte integrin CD11d promoter. *J Biol Chem* 279:26948-26958
- Ohyama K, P Ellis, S Kimura and M Placsek (2005) Directed differentiation of neural cells to hypothalamic dopaminergic neurons. *Development* 132:5185-5197
- Ou XM, K Chem and JC Shih (2004). Dual functions of transcription factors, transforming growth factor-beta-inducible early gene (TIEG)2 and Sp3, are mediated by CACCC element and Sp1 sites of human monoamine oxidasa (MAO) B gene. *J Biol Chem* 279:21021-21028

- Philipsen S y K Suske (1999) A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acid Res* 27:2991-3000
- Rao S, E Procko y MF Shannon (2001) Chromatin Remodeling, Measured by a Novel Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay, Across the Proximal Promoter Region of the IL-2 Gene. *J Immunol* 167:4494-4503
- Rajamannan NM, M Subramaniam, TP Abraham, VC Vasile, MJ Ackerman, DG Monroe, TL Chef, TC Spelsberg (2007) TGFbeta inducible early gene-1 (TIEG1) and cardiac hypertrophy: Discovery and characterization of a novel signaling pathway. *J Cell Biochem* 100:315-325
- Sanchez E, RM Uribe, G Corkidi, RT Zoeller, M Cisneros, M Zacarias, C Morales-Chapa, JL Charli, P Joseph-Bravo (1997) differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 74:407-422
- Schonemann MD, AK Ryan, RJ McEvelly, SM O'Connell, CA Arias, KA Kalla, P Li, PE Sawchenko y MG Rossenfeld. (1995) Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2. *Genes Dev* 9:3122-3135
- Sevarino KA, P Wu, IM Jackson, BA Roos, G Mandel, RH Goodman (1988). Biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone by a rat medullary thyroid carcinoma cell line. *J Biol Chem*. 263:620-623
- Subramaniam M, SA Harris, MJ Oursler, K Rasmussen, BL Riggs, TC Spelsberg (1995). Identification of a novel TGF-beta-regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res*. 23:4907-12.
- Subramaniam M, TE Hefferan, K Tau, D Peus, M Pittelkow, S Jalal, BL Riggs, P Roche, TC Spelsberg (1998) Tissue, cell type, and breast cancer stage-specific expression of a TGF-beta inducible early transcription factor gene. *J Cell Biochem*. 68:226-236
- Subramaniam M, G Gorny, SA Johnsen, DG Monroe, GL Evans, DG Fraser, DJ Richard, K Rasmussen JM van Deursen, RT Turner, MJ Oursler and TC Spelsberg (2005). TIEG1 null mouse-derived osteoblasts are defective in mineralization and in support of osteoclast differentiation in vitro. *Mol Cell Biol*. 25:1191-1199
- Subramaniam M, JR Hawse, SA Johnsen and TC Spelsberg (2007). Role of TIEG1 in biological processes and disease states. *J Cell Biochem*. 102:539-548
- Tachibana I, N Imoto, PN Adjei, GJ Gores, M Subramaniam, TC Spelsberg and R Urrutia (1997). Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J Clin Invest* 99:2365-2374

- Takahashi K and S Yamanaka (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Tau KR, TE Hefferan, MK Waters, JA Robinson, M Subramaniam, BL Riggs and TC Spelsberg (1998) Estrogen regulation of a transforming Growth Factor- β Inducible Early Gene that inhibits deoxyribonucleic acid synthesis in human osteoblasts. *Endocrinology*. 139:1346-1353
- Wang W and T Lufkin (2000). The murine Otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol* 227:432-49.
- Wernig M, A Meissner, R Foreman, T Brambrink, M Ku, K Hochedlinger, BE Bernstein and R Jaenisch. (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448:318-324.
- Zhang JS, MC Moncreffe, J Kaczynski, E Ellenrieder, FG Prendergast and R Urrutia (2001) A conserved α -helical motif mediates the interaction of Sp1-like transcriptional repressors with the corepressor mSin3A. *Mol Cell Biol*. 21:5041-5049
- Zhang W, S Kadam, BM Emerson, JJ Bieker (2001) Site-specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulate erythroid krüppel-like factor transcriptional activity via its interaction with the SWI-SNF complex. *Mol Cell Biol* 21 :2413-2422
- Zigmond MJ, FE Bloom, SC Landis, JL Roberts and LR Squire (1999) *Fundamental Neuroscience*. Academic Press.