

03062  
20.2



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional  
y de Postgrado del Colegio de Ciencias y  
Humanidades

CARACTERIZACION DE LOS RNA MENSAJEROS QUE CODIFICAN  
PARA TRH Y LHRH EN EL HIPOTALAMO DE LA RATA

## T E S I S

Que para obtener el Título de  
MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

presenta

SUSANA COHEN CORY

Centro de Investigación sobre Ingeniería  
Genética y Biotecnología

1987

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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 está 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
TU CUMÁN

CARACTERIZACION DE LOS RNA MENSAJEROS QUE CODIFICAN

PARA TRH Y LHRH EN EL HIPOTALAMO DE LA RATA

TESIS

que para obtener el título de Maestra en

Investigación Biomédica básica

presenta la

Q.F.B. Susana Cohen Cory

1987.

Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación  
Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología , U.N.A.M. ,  
bajo la dirección del Dr. Jean Louis Charli , con el  
financiamiento del CONACyT (ICSAXNA/030915 y PCCBBNA/  
001926).

## INDICE

INTRODUCCION.....	1
Generalidades sobre Neuropeptidos.....	1
Biosíntesis de Neuropeptidos.....	1
Regulación de la Biosíntesis de Neuropeptidos.....	5
Generalidades sobre TRH.....	5
Generalidades sobre LHRH.....	7
OBJETIVOS.....	10
ENFOQUE EXPERIMENTAL.....	11
METODOLOGIA.....	13
I.- Purificación de RNA.....	13
II.- Traducción en Sistema Libre de Células e Inmunoprecipitación con anticuerpos anti-LHRH.....	17
III.- Creación de un banco de DNA complementario al RNA mensajero de hipotálamo de rata.....	18
IV.- Síntesis y purificación de un oligonucleótido de secuencia 100% homóloga a un fragmento del cDNA de TRH.....	25
V.- Hibridización del RNA mensajero con rastreadores específicos (Northern).....	27
VI.- Ovariectomía de ratas hembra postpúberes y tratamiento con estrógenos y progesterona.....	29
RESULTADOS.....	30
I.- Obtención de RNA.....	30
II.- Traducción en sistema libre de células e inmunoprecipitación con anticuerpos anti-LHRH.....	31

III.- Síntesis y clonación del DNA complementario.....	32
IV.- Síntesis y purificación del oligonucleótido de secuencia 100% homóloga a un fragmento del cDNA de TRH de hipotálamo de rata.....	38
V.- Hibridización del mRNA con rastreadores específicos (Northern).....	39
DISCUSION DE RESULTADOS.....	42
CONCLUSIONES.....	45
TABLAS.....	46
FIGURAS.....	48
APENDICES.....	68
REFERENCIAS.....	70

## GENERALIDADES SOBRE LOS NEUROPEPTIDOS

El concepto clásico de la neurona neurosecretora (1) describe a esta como la neurona especializada en la producción de mediadores químicos de carácter peptídico, que son secretados hacia el sistema hemal en respuesta a cierto estímulo, para de esta manera transmitir una señal distinta a la transmisión sináptica común. Sin embargo, en la actualidad es claro que la neurona peptidérgica también va a liberar sus productos hacia el espacio sináptico, en donde la función del neuropéptido va a ser distinta en cierta manera a la función que ejerce como neurohormona (2). Es así que, ciertas neuronas del sistema nervioso central son capaces de sintetizar péptidos que al ser liberados de la terminal nerviosa ejercen una función específica, ya sea como neurohormonas, como neuromoduladores o como neurotransmisores de la función cerebral. Estos neuropéptidos se sintetizan en el soma o cuerpo neuronal generalmente en forma de una molécula precursora de alto peso molecular, son almacenados dentro de vesículas en donde se lleva a cabo el procesamiento, y se transportan hacia la terminal nerviosa, de donde van a ser liberados bajo un estímulo dado.

El hipotálamo, en el sistema nervioso central, es el órgano responsable de transducir las señales químicas y neurológicas que convergen a él en señales neuroendócrinas. La forma en que se llevan a cabo estas acciones es a través de la producción de factores o neurohormonas que van a ser liberados al sistema porta hipotálamo adenohipofisiario, para que al alcanzar sus receptores específicos en las células blanco induzcan o inhiban la liberación de las hormonas adenohipofisiarias correspondientes. Entre estos péptidos hipotálámicos de liberación se encuentran la hormona liberadora de la tirotrópina o TRH (3), la hormona liberadora de la hormona luteinizante o LHRH (4), el factor inhibitorio de la liberación de la hormona del crecimiento o Somatostatina (5), la hormona liberadora de la hormona del crecimiento o GHRH (6) y la hormona liberadora de la Corticotropina o CRF (7). Se ha descrito, que además de ejercer su función como neurohormonas, estos neuropéptidos pueden actuar como neuromoduladores en otras áreas del cerebro (8,9,10). Otros neuropéptidos hipotálámicos ya caracterizados y cuya función más conocida dentro del sistema nervioso central es la de actuar como neuromoduladores o neurotransmisores, son la Substancia P (11), las encefalinas (12) y la dinorfina (13) entre otras.

## BIOSINTESIS DE NEUROPEPTIDOS

El conocimiento de los mecanismos que regulan la producción y liberación de neuropéptidos es de suma importancia en el entendimiento de los procesos fisiológicos en los cuales la neurona peptidérgica participa. Dentro del metabolismo de la neurona peptidérgica, la biosíntesis de neuropéptidos es uno de los procesos que pudiera estar sujeto a mecanismos finos de regulación. La regulación a nivel de la biosíntesis puede estar dada como una respuesta a la demanda funcional del subsistema neuronal, dado por la estimulación celular.

Los primeros estudios sobre la biosíntesis de neuropéptidos sugerían la posibilidad de que para péptidos pequeños como el TRH (3 aminoácidos) (14) y el LHRH (10 aminoácidos) (15), la síntesis se llevara a cabo a través de un mecanismo de síntesis no ribosomal. Estos estudios postulaban la existencia de enzimas responsables de la síntesis como la TRH sintetasa y la LHRH sintetasa. Sin embargo, estudios posteriores demostraron la invalidez de estos postulados y sugirieron la existencia de mecanismos de síntesis ribosomal a partir de precursores de alto peso molecular, como había sido descrito para la insulina (16).

Los estudios realizados durante la última década demuestran que la biogénesis de neuropéptidos involucra la síntesis de un precursor polipeptídico de alto peso molecular, del cual el péptido activo se genera mediante el procesamiento adecuado del precursor dentro del axón (17). La biosíntesis está dada, primeramente por la transcripción del gene específico, seguido por el procesamiento post-transcripcional del RNA generado (poliadenilación, escisión de intrones) dentro del núcleo. Una vez en el citoplasma, el mRNA es traducido en los ribosomas, generándose así el péptido precursor, que mediante el procesamiento y modificaciones post-traduccionales necesarias, da lugar al péptido activo. Todos estos procesos podrían estar sujetos a mecanismos de regulación, lo que finalmente se traduciría en un cambio en la tasa neta de biosíntesis del neuropéptido.

#### Evidencias a Nivel de Biosíntesis.

Hasta el momento, existen pocas evidencias de la existencia de más de un gene que codifique para un mismo neuropéptido. Se ha observado únicamente la existencia de dos posibles precursores para la Leu-enkefalina que provienen de genes distintos. Estos precursores son la Proencefalina A (18) y la Proencefalina B o Prodinorfina, en cuyo extremo carboxi-terminal se encuentra codificada la secuencia de este neuropéptido (19). La similitud entre estos dos precursores sugiere que ambos genes se originaron a partir de un gene ancestral común, mediante una duplicación genética.

En ciertos casos se ha observado la existencia de más de un RNA mensajero que codifique para la síntesis de más de un neuropéptido. En el caso de la biosíntesis de la Substancia P, se ha observado la existencia de dos mensajeros que darían lugar a dos tipos de precursores (20). Estos precursores, llamados  $\beta$ -preprotaquikina y  $\alpha$ -preprotaquikina contienen la secuencia de la Substancia P, sin embargo, el primero contiene una secuencia adicional de 18 aminoácidos que corresponde a la secuencia de la Substancia K (o  $\omega$ -neurokinina). Excepto por esta secuencia, los precursores son idénticos en cuanto a secuencia nucleotídica. Al parecer el mecanismo responsable de la producción de dos mensajeros distintos es un mecanismo diferencial de escisión de intrones en los dos tipos neuronales que los sintetizan.

Los neuropéptidos, como péptidos de secreción, son sintetizados como parte de precursores de mayor tamaño en el retículo endoplásmico rugoso, en donde la "peptidasa señal" cumple con el primer paso en el procesamiento (21). Esta enzima es la encargada de cortar la secuencia señal del producto de traducción inicial (pre-pro-forma) de los

péptidos de secreción, así como de las proteínas de membrana (22). El procesamiento del pre-péptido parece ocurrir como un evento contradireccional, al tiempo en que la cadena nascente del polipéptido entra a la cisterna del retículo endoplásmico rugoso. El corte proteolítico generalmente ocurre en el sitio carboxi-terminal del último residuo de la cadena hidrofóbica, de generalmente 15 a 30 residuos de aminoácidos. La endopeptidasa que cataliza esta reacción parece ser una metaloenzima microsomal.

#### Evidencias a Nivel de Procesamiento.

El precursor del neuropéptido (o pro-forma) continúa siendo, procesado para dar lugar al péptido activo. Los mecanismos involucrados en el control del procesamiento específico del neuropéptido están siendo elucidados en la actualidad. Sin embargo, el problema parece ser complejo ya que se ha observado que el procesamiento proteolítico puede ser tejido específico, a pesar de existir ciertas características comunes entre los tipos de procesamiento en distintos tejidos. En el caso de precursores que se procesan de manera distinta en distintos tejidos, el sitio y grado de glicosilación del pro-péptido parece ser una de las señales que permiten reconocer o distinguir los sitios específicos de corte. Este es el caso observado para precursores como el de la Pro-opiomelanocortina cuyo procesamiento dentro de la hipófisis anterior es distinto al que se da en el lóbulo intermedio de la hipófisis (23). Por otra parte, modificaciones del tipo de la acetilación de ciertos residuos dentro de la cadena polipeptídica parecen influir en la actividad biológica del péptido una vez procesado, como ocurre para el caso de la  $\alpha$ -MSH y la  $\beta$ -endorfina (24). Ambos tipos de eventos en el procesamiento de precursores parecen iniciarse en el aparato de Golgi, continuándose con la maduración del péptido dentro de las vesículas de secreción durante el transporte axonal.

Dentro de los precursores, la secuencia biológicamente activa se encuentra usualmente formando una pequeña parte del precursor total. En algunos casos puede estar presente más de un producto biológicamente activo dentro de un mismo polipéptido, como sucede para los precursores de ACTH (23), las encefalinas (18), la vasopresina (25) y oxitocina (26) y las taquikininas (20). En otros casos se ha observado la existencia de más de una copia del mismo péptido biológicamente activo dentro de un mismo precursor, como ocurre para las encefalinas y el TRH (27). Asimismo, ha sido posible identificar péptidos no antes conocidos que poseen actividad biológica y que se encuentran codificados dentro del mismo precursor que da lugar a neuropéptidos de función conocida (20, 28).

La formación de productos peptídicos correctos requiere de sistemas de regulación eficientes a nivel de procesamiento del precursor. Característicamente, los sitios de ruptura de las pro-hormonas están marcados por pares de residuos de aminoácidos básicos (Lys o Arg) en ambos extremos de las secuencias biológicamente activas. Ha sido propuesto que los pares de residuos básicos representan señales para el procesamiento proteolítico de las pro-hormonas para liberar la hormona u hormonas codificadas. Dado el procesamiento diferencial de los pro-péptidos, debe existir una familia de enzimas convertidoras

(proteasas) de alta especificidad. Varias evidencias experimentales indican que la proteólisis post-traduccion de los pro-peptidos ocurre dentro de la vesicula de secrecion, en donde parecen estar localizadas las enzimas de procesamiento. Ciertas enzimas (de actividad parecida a la tripsina), han sido caracterizadas para el procesamiento de ciertos precursores neuropeptidicos. La enzima encargada del procesamiento de la Pro-opiomelanocortina en el l6bullo intermedio de la hip6fisis de rat6n, es una tiol-proteasa que actua a pH 6ptimo de 5.1 a 5.6, lo cual corresponde al pH intravesicular (29). A pesar de que la liberacion del neuropeptido del precursor generalmente involucra la hidr6lisis en pares de residuos Lys-Arg, existen ejemplos en que la prote6lisis ocurre en sitios en donde unicamente se encuentra un residuo de aminoacido b6sico, como ocurre para la liberacion de la dinorfina de la prodinorfina (19), y del glicopeptido carboxi terminal del precursor de la vasopresina (25). Algunos neuropeptidos pueden contener un par interno de residuos b6sicos como por ejemplo ocurre para el ACTH, el CRF y la somatostatina o OHRH. La estructura conformacional del precursor puede contribuir a la especificidad de hidr6lisis por estas enzimas de procesamiento. El corte de un precursor neuropeptidico en los sitios de reconocimiento Lys-Arg y Arg-Arg da lugar a un peptido en cuyo extremo carboxi terminal contiene un residuo b6sico restante. La hidr6lisis de este residuo requiere de la accion de una enzima procesadora, que ha sido descrita como una enzima del tipo de la Carboxipeptidasa B. En la actualidad, ha sido posible caracterizar la enzima encargada de hidrolizar residuos b6sicos en el extremo carboxilo de la encefalina. Esta "encefalina-convertasa" ha sido caracterizada como una metaloproteasa, presente en gr6nulos de secrecion, cuya actividad parece ser no especifica, actuando sobre una variedad de sustratos neuropeptidicos (30).

Una gran variedad de neuropeptidos biologicamente activos estan protegidos en su extremo carboxilo por un grupo amido. Entre estos peptidos se encuentran el LHRH, el TRH, la  $\alpha$ -MSH y la Substancia P. El residuo donador del grupo amino durante la reaccion de amidacion es la glicina (Gly) carboxi terminal a la secuencia del neuropeptido. En todos los casos en que se ha determinado la secuencia del precursor, la secuencia del peptido activo va seguida inmediatamente de un residuo Gly y uno o dos residuos de aminoacidos b6sicos. Para el caso del TRH, se ha caracterizado una actividad enzimatica presente en gr6nulos de secrecion que es capaz de convertir el piroGlu-His-Pro-Gly en TRH, siendo mayor su actividad cuando el sustrato utilizado es el Glu-His-Pro-Gly-Lys-Arg (31). Esta enzima parece requerir cobre y acido ascorbico como cofactores enzimaticos (32).

Algunos peptidos biologicamente activos, adem6s estan protegidos en su extremo amino terminal, como ocurre para el TRH, el LHRH y la Neurotensina. La proteccion del extremo amino terminal involucra la ciclizacion del residuo Glutamina (Gln), para dar lugar al grupo piroglutamilo. La reaccion de ciclizacion puede ocurrir espontaneamente y no se ha descrito una actividad enzimatica involucrada en este proceso. Otro tipo de modificaciones post-traduccion descritas son, la metilacion, fosforilacion y la tirosil-O-sulfonacion.

## REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE NEUROPEPTIDOS

Hasta el momento, existen pocas evidencias sobre cuales son los mecanismos responsables de la regulación de la biosíntesis de neuropéptidos a nivel de transcripción y traducción. Esto se debe a que, si bien ya se conoce la secuencia de varios de los RNA mensajeros que codifican para estos péptidos, los niveles en que son sintetizados en el sistema nervioso central no son lo suficientemente altos como para realizar ciertos estudios de la regulación de la biosíntesis.

Ciertos estudios muestran que estímulos depolarizantes como la estimulación por iones  $K^+$  o la apertura de canales de  $Na^+$ , inhiben la transcripción del mRNA de la proencefalina en cultivos de explante de médula adrenal (33), esto se observa por una disminución en los niveles del mRNA específico, lo que correlaciona con la disminución en el contenido de Leu-encefalina posterior al cambio en los niveles de mensajero. Por otro lado se ha observado que en neuronas del estriado de la rata, en donde coexisten el neurotransmisor GABA y el neuropéptido Met-encefalina, ocurre un aumento en los niveles de mRNA y en el contenido del precursor de las encefalinas en respuesta a un aumento crónico en los niveles de GABA (34). Este cambio ocurre posterior al decremento drástico de los niveles de Met-encefalina. El aumento en la transcripción y en la traducción del mensajero esta dado como una respuesta a la mayor demanda del neuropéptido.

Estudios más finos sobre la regulación de la biosíntesis de vasopresina (35), demuestran un aumento en los niveles del mRNA específico en ciertas neuronas del hipotálamo, como respuesta a un estímulo osmótico crónico. Este aumento se observó únicamente en el núcleo paraventricular y en el núcleo supraóptico, neuronas cuyas prolongaciones llegan a la hipófisis posterior. El aumento en los niveles de mensajero de vasopresina no fue observado en las neuronas del núcleo supraquiasmático, neuronas que proyectan hacia otras regiones extrahipotálamicas en el cerebro y médula espinal. Esto demuestra que bajo un mismo estímulo va a existir una respuesta distinta en cuanto a regulación de la biosíntesis de un mismo neuropéptido, que va a depender del tipo celular de que se trate.

## GENERALIDADES SOBRE EL TRH

La hormona liberadora de la Tirotropina TRH, de estructura piroglu-His-Pro-NH<sub>2</sub> fue caracterizada en base a su función como hormona reguladora de la liberación de TSH o tirotropina, pero además de la función neuroendócrina que ejerce sobre la adenohipofisis, se ha postulado que puede actuar como neuromodulador del sistema nervioso central. El TRH liberado de las terminales nerviosas de la eminencia media pasa al sistema porta hipotálamo adenohipofisiario, para llegar al tirotripo, donde promueve la liberación de TSH mediante la unión a su receptor específico y activación del sistema del fosfatidil inositol (36) (figura 1). Se ha observado que el TRH estimula también la liberación de Prolactina, así como la transcripción de su mensajero en el lactotrofo (37). Asimismo se ha observado que el TRH tiene efecto sobre la liberación de la Hormona del Crecimiento en células tumorales

in vitro (38).

En el hipotálamo, el TRH se encuentra principalmente en la eminencia media (3-5ng/mg de tejido), en el núcleo paraventricular, núcleo supraquiasmático, núcleo dorsomedial, región perifornical e hipotálamo basolateral. Fuera del hipotálamo se ha descrito la presencia de TRH en la neurohipófisis formando un sistema tuberuloinfundibular separado. En mamíferos se ha observado que fuera del hipotálamo el TRH está presente en varias regiones del sistema nervioso central incluyendo la médula espinal. Se ha descrito la presencia de material inmunoreactivo a TRH en tallo cerebral, puente, médula oblongada y mesencefalo, núcleo accumbens, lóbulo olfatorio, amígdala, hipocampo y glándula pineal. Los cuerpos neuronales que contienen material TRH-inmunoreactivo se han descrito en el núcleo paraventricular, en el núcleo dorsomedial, área perifornical y área preóptica en el hipotálamo, y en médula oblongada y células supraespinales (38).

Otros tejidos periféricos en donde ha sido descrita la presencia de TRH son varias regiones del tracto gastrointestinal, en próstata y en testículo, en mamíferos. Aun no se conoce cual es la función del TRH en estos tejidos, pero se cree que en la placenta podría regular la liberación de Lactógeno placentario o de Gonadotropina Coriónica (38). Se ha descrito la presencia de TRH en especies inferiores como en la rana (39).

Se ha demostrado que el TRH produce otros efectos fisiológicos diferentes a los observados en el eje endócrino, como por ejemplo, excitación o inhibición de la actividad neural, aumento en el recambio de noradrenalina en el cerebro, potenciación del efecto excitatorio de la acetilcolina sobre las neuronas corticales (39), efectos sobre la conducta motora, sed y hambre, antagonismo de los efectos del etanol, los barbitúricos y otros agentes depresivos (41). Todo esto ha permitido sugerir al TRH como posible neuromodulador.

Se ha observado que el TRH es liberado bajo concentraciones depolarizantes de  $K^+$  en forma dependiente de  $Ca^{++}$  (41). Varios estudios se han enfocado a definir cuales son los neurotransmisores responsables de la liberación de TRH a nivel hipotalámico; sin embargo, en muchos de los casos los resultados han sido contradictorios (42). Las únicas circunstancias fisiológicas en que se ha descrito un aumento en la liberación del péptido son la succión en la rata lactante (43) y la exposición al frío (38).

En la actualidad se han descrito varias enzimas capaces de degradar al TRH y sus metabolitos, las cuales se han determinado en homogenados de cerebro (44) e hipófisis (45). Hasta el momento solo la proglutamato aminopeptidasa membranar (PGAM) pudiera ser la enzima directamente responsable del catabolismo extracelular de este neuropéptido (46).

En 1984 fue posible la clonación del DNA complementario a la porción 5' terminal del mRNA que codifica para TRH en la piel de *Xenopus laevis*. Dentro de esta porción del mensajero se encuentra la secuencia que codifica para cuatro copias del TRH flanqueadas por pares

de residuos de aminoácidos básicos, y péptidos intermedios de secuencias similares entre ellos (47). La secuencia nucleotídica del cDNA sugiere que evolutivamente ocurrió una duplicación del gene que codifica para el TRH. No fue sino hasta principios de 1986 que R. Goodman publicó la secuencia del cDNA que codifica para TRH en el hipotálamo de la rata (27). Este mensajero de 1,700 bases codifica para la síntesis de un péptido precursor de 29,250 daltones que contiene 5 copias de la secuencia que daría lugar a 5 moléculas del TRH una vez procesado el precursor. De la secuencia de este mensajero se observa que existe cierta divergencia nucleotídica entre las 5 secuencias que dan lugar a las 5 copias del TRH, presentándose una mayor conservación entre la primera y quinta copias. Existe una gran divergencia entre los péptidos intermedios codificados dentro del precursor hipotalámico, lo que no ocurre para el precursor de TRH de piel de *X. laevis* (figura 2). A su vez, se observa la gran divergencia nucleotídica entre los mensajeros en estas dos especies.

#### GENERALIDADES SOBRE EL LHRH

La existencia de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) fue postulada al observar la existencia de cierta actividad en extractos de hipotálamo capaz de estimular la liberación de la hormona luteinizante o LH (48). Posteriormente fue posible aislar esta hormona de hipotálamo porcino con lo que se demostró su estructura peptídica constituida por 10 residuos de aminoácidos bloqueados en ambos extremos: piroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

El LHRH es el neuropéptido encargado de ejercer el control neuroendocrino del sistema hipotálamo-hipofisario-gonadal. Este neuropéptido es liberado de la eminencia media, de donde pasa al sistema porta hipotálamo adenohipofisario para alcanzar el gonadotropo. El LHRH es capaz de estimular la liberación de LH y de la Hormona Foliculo Estimulante, mediante la unión a receptores específicos en el gonadotropo, y mediante la utilización de Ca<sup>++</sup> como segundo mensajero (49).

En el hipotálamo, el LHRH se encuentra concentrado principalmente en la eminencia media, núcleo arcuato, organum vasculosum de la lamina terminalis y región preóptica supraquiasmática. Fuera del hipotálamo ha sido descrita la presencia de LHRH en el lóbulo olfatorio (51). Asimismo, se ha descrito la presencia de terminales nerviosas LHRGérgicas en la sustancia gris mesencefálica (52). La presencia de LHRH en otros tejidos en la periferia, como placenta (53), y testículo (54) ha sido documentada, demostrándose además la presencia de receptores específicos a LHRH en estos tejidos. La existencia de péptidos de estructura semejante a LHRH, con actividad liberadora de la hormona luteinizante, ha sido descrita para otros vertebrados como aves (55), peces (56) y reptiles (57).

Se ha observado que ciertos neurotransmisores, en particular las aminas biogénicas, regulan la liberación de LHRH (58). Asimismo se ha observado que los esteroides gonadales juegan un papel muy importante en la regulación de LHRH, pudiendo ser su acción directamente sobre la neurona peptidérgica o a nivel de neurotransmisores que a su vez modulan la liberación de LHRH (59).

La variación en los niveles de LHRH en ciertas condiciones fisiológicas está altamente relacionada con procesos sexuales como son la diferenciación sexual, la pubertad, el ciclo menstrual y la reproducción. Se ha postulado que además de actuar como neurohormona, el LHRH puede actuar como neuromodulador de la actividad del sistema nervioso central. Se ha observado que el LHRH está directamente relacionado con el control del comportamiento sexual en roedores (60). Este neuropéptido es capaz de potenciar el reflejo de lordosis en roedores, lo cual es un elemento esencial en el comportamiento reproductivo en esta especie. Existen además evidencias que demuestran que el LHRH es capaz de modular la actividad eléctrica de ciertas neuronas en el sistema nervioso central (61).

Por más de una década, una gran variedad de estudios se han enfocado a elucidar el mecanismo de biosíntesis de LHRH. Las primeras especulaciones sobre la biosíntesis de LHRH sugerían, como para el IRH, un mecanismo de síntesis no ribosomal (15). Sin embargo, posteriormente, en base a estudios de incorporación in vivo de precursores de aminoácidos radioactivos seguido de la purificación del péptido radioactivo a una actividad específica constante, fue sugerida la existencia de un mecanismo de síntesis a partir de un precursor de mayor peso molecular sintetizado en los ribosomas (62). La existencia de una especie inmunoreactiva a LHRH de más de 5,000 daltones de peso molecular fue sugerida en base al análisis radioinmunológico de fracciones cromatográficas de extractos de hipotálamo porcino (63). Estudios posteriores realizados con extractos de hipotálamo de rata sugerían que mediante inmunoensayos de ciertas fracciones cromatográficas era posible determinar la presencia de dos especies inmunoreactivas a LHRH de mayor peso molecular. Una especie de aproximadamente 26,000 daltones y una especie intermedia de 1,900 daltones que podría ser el precursor directo de LHRH (64). Posteriormente, mediante estudios de traducción de RNA mensajero de hipotálamo de rata e inmunoprecipitación de los productos de traducción marcados con [3-H]-Leucina, G. Hank observó la presencia de un péptido de 28,000 daltones reconocido por anticuerpos anti-LHRH (65,66). Este péptido no fue detectado al incorporar [35-S]-Metionina como marcador, ni al incubarlo con el mismo anticuerpo los productos de traducción del mRNA de hipotálamo de ratones hipogonadales.

P. Seeburg reportó (67) la secuencia del cDNA que codifica para la síntesis del LHRH en placenta humana. Este cDNA codifica para la síntesis de un péptido de 10,000 daltones que contiene la secuencia que daría lugar al LHRH seguida de un péptido de 59 residuos de aminoácidos. No fue sino hasta principios de 1986 que fue publicada la secuencia del cDNA de hipotálamo de rata y de hipotálamo de humano, así como de los genes que codifican para este péptido en ambas especies (68). En cuanto a secuencia nucleotídica, existe un 80% de homología en la región codificadora en los cDNA de estas dos especies, y un 60% de homología en la región 3' no traducible, existiendo mayor homología en la región 5'. En placenta, el mRNA contiene una región 5' terminal extendida por 1000 bases con respecto al mRNA hipotalámico, lo que parece corresponder a un intrón no escindido durante el procesamiento. En cuanto a la secuencia del precursor proteico, se observa que en ambas especies es de 10,000 daltones, presentando un 72% de homología.

El precursor proteico consta de tres dominios principales que son, la secuencia señal de 23 residuos de aminoácidos seguido de la secuencia de LHRH completamente conservada entre estas especies, y un péptido de 56 aminoácidos. Estudios preliminares (69) sugieren que el péptido carboxi-terminal de 56 residuos de aminoácidos posee actividad inhibidora de la liberación de prolactina in vitro, así como actividad estimuladora de la liberación de LH, sin embargo esto no ha sido comprobado in vivo. R. Millar ha demostrado que ciertos fragmentos del péptido carboxi-terminal del precursor de LHRH (70) poseen actividad liberadora de LH en ciertas especies, y se ha postulado su posible acción como segundo factor regulador de la liberación de LH. La existencia de un factor responsable de la liberación de FSH distinto al LHRH ha sido postulada (71), sin embargo, este factor no parece estar incluido dentro de la secuencia del precursor de LHRH, como habría sido postulado en cierto momento (67).

## OBJETIVOS

El estudio de la biosíntesis de neuropéptidos es de suma importancia en el entendimiento de los mecanismos que regulan el metabolismo de la neurona peptidérgica. La hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH) son los neuropéptidos hipotalámicos que han sido elegidos por el grupo como modelos en el estudio del metabolismo de la neurona peptidérgica, ya que su fisiología ha sido extensamente estudiada.

Los objetivos principales de este trabajo fueron en un principio el caracterizar los precursores proteicos de estos péptidos hipotalámicos, así como la caracterización de los RNA mensajeros que codifican para su síntesis, desarrollando a su vez la metodología necesaria para la cuantificación de estos mensajeros bajo condiciones experimentales diversas.

La caracterización de los precursores peptídicos así como de los RNA mensajeros de TRH y LHRH se presentó como una etapa necesaria para entender los procesos que regulan la biosíntesis de estos neuropéptidos, debido a que el estudio de la biosíntesis de novo de estos péptidos se ve dificultada dado que la tasa de biosíntesis es muy baja.

## ENFOQUE EXPERIMENTAL

La utilización de una serie de estrategias experimentales ha llevado a la identificación de varios precursores neuropeptídicos. Entre estas estrategias cabe mencionar los experimentos de pulso y caza, técnicas de traducción en sistema libre de células e inmunoprecipitación, y técnicas de DNA recombinante. La biosíntesis de LHRH y TRH se presenta como un aspecto de gran interés en el estudio integrativo de la neurona peptidérgica.

Como primer objetivo en el estudio de la biosíntesis de LHRH, se planteó la necesidad de determinar el peso molecular del precursor de este neuropeptido en el hipotálamo de la rata. Este dato sería de gran utilidad para el enriquecimiento del mRNA que codifica para este péptido, para su posterior caracterización. El enfoque experimental utilizado con el propósito de determinar el peso molecular del precursor de LHRH, se basó en la obtención de RNA mensajero de hipotálamo de rata y su traducción en sistemas libres de células. Los productos de traducción fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-LHRH dirigidos contra la parte central de la molécula. La visualización de los productos de traducción reconocidos por el anticuerpo, se realizó mediante cromatografía de afinidad en Proteína A seferosa, seguida de electroforesis en gel desnaturalizante. Como un enfoque alternativo en la determinación del peso molecular del precursor de LHRH, se generaron anticuerpos monoclonales anti-LHRH (tesis de licenciatura del G.F.B. Rafael Saavedra D. (72)) esperando que entre los anticuerpos generados uno o más fueran capaces de reconocer la secuencia del LHRH dentro de un péptido de mayor peso molecular. Ha sido propuesto que en modelos animales en que se simula el ciclo ovárico mediante ovariectomía y tratamiento con estrógenos y progesterona, se estimula la biosíntesis de novo del LHRH, lo que probablemente incluye la síntesis del péptido precursor (73). Con el objeto de aumentar la probabilidad de detectar este precursor, se utilizó RNA mensajero de ratas ovariectomizadas para la inmunoprecipitación de los productos de traducción con anticuerpos monoclonales anti-LHRH.

Con el objeto de estudiar la biosíntesis de TRH en el hipotálamo de la rata, se planteó la utilización de la metodología de DNA recombinante para la caracterización del RNA mensajero que codifica para este péptido. Para la caracterización de este mensajero se propuso primeramente crear un banco de DNA complementario enriquecido en las secuencias únicas del hipotálamo para facilitar la búsqueda del RNA en cuestión. Un vez caracterizado, el cDNA se utilizaría en la elucidación de la secuencia total del precursor, y como o detector en el estudio in vivo e in vitro de la regulación de la biosíntesis de TRH. La creación del banco de cDNA enriquecido en secuencias únicas del hipotálamo, se puede realizar mediante la clonación del cDNA exclusivo del hipotálamo, purificado mediante la hibridización de substracción selectiva con mRNA de cerebro extrahipotalámico, o mediante la clonación del cDNA sintetizado a partir de una población de RNA enriquecida. La creación de un banco de cDNA de alto número de recombinantes facilitaría a su vez la búsqueda del cDNA en cuestión, ya que se aumenta la probabilidad de que al menos una clona contenga el cDNA buscado.

Con el objeto de aumentar la probabilidad de identificar la clona que contenga el cDNA que codifica para TRH, se planteó como estrategia experimental de clonación del cDNA de hipotálamo de rata, un protocolo de síntesis y clonación que diera lugar a la obtención de un banco de alto número de recombinantes. La figura 3 muestra un esquema del protocolo de síntesis y clonación del cDNA.

Para la búsqueda del cDNA que contiene la secuencia que codifica para TRH, se propuso utilizar como rastreador específico, el cDNA de TRH de piel de *Xenopus laevis* (47) (generosamente donado por el Dr. G. Krell). Esto, esperando cierta conservación entre los dos mensajeros que codifican para TRH en estas dos especies.

Dado que al momento de obtener el banco de cDNA hipotalámico fue reportada la secuencia del cDNA que codifica para la síntesis de TRH en el hipotálamo de la rata (27), y en base a la divergencia existente entre las secuencias que codifican para el TRH en el hipotálamo y en la piel de *X. laevis*, se determinó sintetizar un oligonucleótido complementario a un fragmento del cDNA de TRH de hipotálamo, para utilizarlo como detector específico en la búsqueda de la clona de TRH en el banco de cDNA. A su vez este oligonucleótido serviría junto con el cDNA como detector específico en la cuantificación del mRNA que codifica para TRH, en estudios de hibridización tipo "Northern".

La secuencia del oligonucleótido complementario al cDNA de TRH es:

```

5' -----AAA-CGC-CAG-CAT-CCT-GCC-AAA-AAA-----3' cDNA
-----Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg----- Peptido
3' -----TTT-GCC-GTC-GTA-GGA-CCG-TTT-TTC-----5' Oligonucleótido
  
```

Con el objeto de determinar los niveles del RNA mensajero de TRH en sujetos bajo distintas condiciones fisiológicas y experimentales, mediante la realización de estudios de hibridización tipo "Northern" (RNA-rastreadores específicos) (74), se planteó como necesaria la optimización de la metodología de purificación de RNA a partir de un mínimo de sujetos experimentales. En el presente trabajo se realizó la comparación entre cuatro micrométodos de purificación de RNA total, ampliamente utilizados para diversos tejidos, incluyendo el tejido nervioso.

La determinación de los niveles del mRNA de TRH en estudios de la regulación de su biosíntesis, se realizará mediante el análisis por hibridización RNA - rastreadores específicos. En el presente trabajo se utilizó la metodología de hibridización en soporte sólido tipo "Northern", para la detección del mRNA de TRH en el hipotálamo de la rata, utilizando como detectores específicos tanto el oligonucleótido de secuencia complementaria a un fragmento del cDNA hipotalámico, así como el cDNA de hipotálamo de rata (27), que fue generosamente donado por el Dr. R.H. Goodman al final de la realización de estos estudios.

## METODOLOGIA

### I.- PURIFICACION DE RNA

Todas las manipulaciones en que se involucró el uso de RNA se realizaron a 4°C con soluciones preparadas con agua desionizada tratada previamente con dietilpirocarbonato o esterilizadas por autoclave. En todos los casos se utilizó material de plástico esterilizado por autoclave, o de vidrio esterilizado en horno a 180°C por 12 horas. Para la purificación del RNA, generalmente se utilizaron ratas macho adultas, de la cepa Wistar, sacrificadas por decapitación, cuyos hipotálamos y cerebros extrahipotalámicos fueron disecados, transferidos a tubos estériles y congelados inmediatamente a -70°C hasta el momento de la purificación del RNA.

### A) METODOS DE OBTENCION DE RNA

#### METODO I.- Cloruro de Guanidina - Extracción Cloroformo/Butanol (75).

Diversas cantidades de tejido se homogenizaron en solución A de Cloruro de Guanidina (cloruro de guanidina 7M, acetato de sodio 20mM, DTT 1mM, pH 5.0) sin descongelar el tejido, utilizando el homogenizador Polytron a máxima velocidad por 30 segundos. El homogenado fue centrifugado a 11,000 g por 30 min a -10°C, y el sobrenadante fue filtrado a través de una gasa estéril para eliminar lípidos agregados. Se adicionaron 0.55 volúmenes de etanol a -20°C a el homogenado, y el RNA se dejó precipitar por 12-24 horas a -20°C. El RNA se sedimentó por centrifugación a 11,000 g por 30 min a -10°C, el sobrenadante se eliminó, y la pastilla de RNA se resuspendió en un mínimo de volumen de solución B de Cloruro de Guanidina (cloruro de guanidina 7M, acetato de sodio 20mM, DTT 1mM, EDTA 20mM, pH 7.0). El RNA se homogenizó manualmente con un homogenizador de vidrio tipo Dounce, se transfirió a un tubo corex estéril y se precipitó por la adición de 0.55 volúmenes de etanol a -20°C. Después de 12-24 horas a -20°C, el RNA fue sedimentado por centrifugación a 11,000 g por 30 min a -10°C, y la pastilla de RNA se resuspendió en un mínimo de volumen de solución B. La homogenización y precipitación con etanol fueron repetidas dos veces más bajo las mismas condiciones.

La pastilla final de RNA se resuspendió en 1-2 ml de EDTA 20mM pH 7.5 y se extrajo con un volumen de una mezcla cloroformo/butanol (4:1). La fase orgánica fue reextraída con un volumen más de EDTA 20mM pH 7.5 y ambas fases acuosas fueron colectadas y precipitadas en presencia de cloruro de sodio 0.25M y 2.5 volúmenes de etanol a -20°C. Después de 15 horas a -20°C, el RNA se recolectó por centrifugación a 11,000 g por 30 min a -10°C, el sobrenadante se eliminó completamente, y la pastilla se secó por evaporación con flujo de gas nitrógeno (filtrado a través de un filtro Millipore 0.45mm). El RNA fue resuspendido en agua

desionizada estéril).

#### METODO 2.- Cloruro de Guanidina - Proteinasa K (76).

De uno a diez hipotálamos de rata fueron homogenizados en solución A de Cloruro de Guanidina, utilizando el homogenizador Polytron a máxima velocidad por 30 segundos. El homogenado se transfirió a un tubo estéril y se centrifugó a 11,000 g por 30 min a -10°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y el RNA se precipitó mediante la adición de 0.55 volúmenes de etanol a -20°C por 1hr para el micrométodo de purificación y de 12 a 24 hrs para el macrométodo. El RNA fue centrifugado a 11,000 g por 30 min a -10°C y el sobrenadante se eliminó por decantación y por inversión del tubo sobre una gasa estéril para la eliminación total del líquido restante. El RNA se resuspendió en un mínimo de volumen de solución B de Cloruro de Guanidina (900ul/50mg tejido, peso húmedo), homogenizando con vortex, y se precipitó en presencia de 0.55 volúmenes de etanol a -20°C por 1hr para el micrométodo de purificación, y por 12 a 24 hrs para el macrométodo. El RNA fue sedimentado por centrifugación a 11,000 g por 30 min a -10°C. La homogenización en solución B de Cloruro de Guanidina y la precipitación con 0.55 volúmenes de etanol fueron repetidas una vez más bajo las mismas condiciones.

La pastilla de RNA se resuspendió en una solución de Proteinasa K (400ug/ml) en Tris-HCl 30mM pH 7.4, cloruro de sodio 0.1M, EDTA 1mM, SDS 0.5% (400ul/50mg de tejido) preincubada a 37 C por 15 min, y se incubó por 1hr a 37 C. El RNA tratado con Proteinasa K se extrajo con un volumen de una mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (50:50:1) (fenol saturado en Tris-HCl 30mM pH7.4, cloruro de sodio 0.1M, EDTA 1mM), la fase acuosa se transfirió a un tubo estéril y el RNA se precipitó en presencia de cloruro de sodio 0.25M y 2.5 volúmenes de etanol a -20°C por 12-24 hrs. El RNA se sedimentó por centrifugación a 11,000 g por 30 min a -10°C. La pastilla se secó con flujo de gas nitrógeno.

#### METODO 3.- Tioocianato de Guanidina - Gradiente de Cloruro de Cesio (77).

El tejido se homogenizó a máxima velocidad por 30 segs. con el homogenizador Polytron en una solución de Tioocianato de Guanidina 4.2M, lauril sarcosinato de sodio 17mM, citrato de sodio 25mM pH 7.0 y 2-mercaptoetanol 0.7% (16ml/gr de tejido). El homogenado se transfirió a un tubo estéril (polialomero) para ultracentrifuga, conteniendo un cuarto de volumen de una solución de cloruro de cesio 5.66M en EDTA 60mM pH 7.0, y se centrifugó a 36,000 rpm por 18 hrs a 20°C (rotor SW 50.1 Beckman). Al término de la centrifugación, la solución de cloruro de cesio se eliminó poco a poco con pipeta pasteur, lavando las paredes del tubo con agua estéril, sin llevarse la pastilla de RNA. El cloruro de cesio restante se eliminó, se lavó el fondo del tubo con 0.5 ml de etanol al 70% a -20°C, y el RNA se resuspendió en 200ul de EDTA 2mM pH 7.4 con calentamiento a 60°C por 10 min. El RNA se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5ml y se precipitó en presencia de cloruro de sodio 0.25M y 2.5 volúmenes de etanol a -20°C por 12-24 hrs. El RNA se

sedimentó por centrifugación a 12,000 rpm por 15 min a 4°C en microcentrifuga (Beckman 12). El sobrenadante fue eliminado, el RNA se resuspendió en agua desionizada estéril y la precipitación etanólica fue repetida bajo las mismas condiciones. La pastilla final de RNA se secó por evaporación al vacío (en concentrador rotatorio de marca Savant) y se resuspendió en agua desionizada estéril.

#### METODO 4.- RNA Citoplásmico (78).

De uno a tres hipotálamos de rata fueron homogenizados en 200ul de Tris-HCl 50mM pH 7.4, cloruro de sodio 25mM, cloruro de magnesio 5mM, mecánicamente con un homogenizador Bellico Glas Inc. utilizando vástago de teflón. El homogenado se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5ml y se adicionaron 5ul de RNAsin (30 U/ul) y 5ul de Triton X-100 al 25%, mezclando vigorosamente con vortex. Con el objeto de precipitar núcleos, se adicionaron 100ul de una solución de sacarosa al 72% y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C en microcentrifuga. El sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf estéril de 1.5ml, y 100ul de una solución de cloruro de sodio 0.4M, EDTA 40mM pH 7.5, SDS 0.6% fueron adicionados. El RNA se extrajo 3 veces con una mezcla fenol/cloroformo (1:1) (fenol saturado en Tris-HCl 25mM pH 7.4, cloruro de sodio 0.1M, EDTA 10mM) transfiriendo cada vez la fase acuosa a tubos estériles. El RNA se precipitó en presencia de cloruro de sodio 0.25M y 2.5 volúmenes de etanol a -20°C por 12-24 hrs y se sedimentó por centrifugación a 12,000 rpm por 15 min a 4°C en microcentrifuga. La pastilla de RNA fue lavada con etanol al 70% y el resto de líquido se evaporó a sequedad en un liofilizador rotatorio marca "Savant". El RNA se resuspendió en agua estéril.

La concentración y pureza de todas las preparaciones de RNA fue determinada mediante lectura de densidad óptica a 230, 260 y 290 nm y por electroforesis en geles de Acrilamida 5%, Urea 8M en solución TBE 1X (79).

#### B) CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN OLIGO-dT CELULOSA

Con el objeto de purificar el RNA mensajero poli(A), el RNA total se sometió a cromatografía de afinidad en oligo-dT celulosa (80). Para esto, de 50 a 100mg de resina (capacidad 123 OD<sub>260</sub>/gr de resina, equivalente a aproximadamente 5mg de RNA poli(A)/gr de resina) fueron previamente hinchados en agua estéril, la resina fue montada en una columna de 5ml de volumen, y lavada 3 veces con hidróxido de sodio 0.1M para liberarla de ribonucleasas. Posteriormente la resina se equilibró lavando con 4 volúmenes de solución alta en sal 1X (Tris-HCl 10mM pH 7.5, cloruro de sodio 0.5M, EDTA 1mM).

El RNA a purificar (de 0.5 a 5mg de RNA total) fue resuspendido en EDTA 2mM pH 7.5 (2mg/ml), desnaturalizado a 65°C por 10 min, e inmediatamente después fue transferido a un baño de hielo. El RNA se diluyó con un volumen de solución alta en sal 2X y se aplicó a la columna. Se colectó el primer eluado (volumen muerto) que se volvió a aplicar a la columna, y la resina se lavó con 12ml de la solución alta

en sal. El RNA poli(A) se eluyó con 3ml de la solución baja en sal (Tris 10mM pH 7.5, EDTA 1mM) a 65°C. y la densidad óptica del eluado fue determinada a 230, 260 y 280nm para corroborar la presencia del RNA. El RNA poli(A) se precipitó mediante la adición de un décimo de volumen de acetato de potasio 20% pH6.0 y 2.5 volúmenes de etanol a -20°C. Después de 12-24 horas a -20°C el RNA se sedimentó por centrifugación a 11,000 g por 30 min a -10°C, el resto de etanol se evaporó a sequedad con flujo de nitrógeno gas, y el RNA se resuspendió en agua desionizada estéril. La concentración final del RNA poli(A) fue determinada por lectura de la densidad óptica de una alícuota a 230, 260 y 280nm.

## II.- TRADUCCION EN SISTEMA LIBRE DE CELULAS. INMUNOPRECIPITACION CON ANTICUERPOS ANTI-LHRH.

### A) TRADUCCION EN SISTEMA LIBRE DE CELULAS.

Para la traducción del RNA poli(A) se utilizaron principalmente dos sistemas libres de células; el lisado de reticulocito de conejo preparado en el laboratorio del Dr. Lino Díaz de León (ver artículo anexo), o adquirido de la casa comercial New England Nuclear, y el extracto de Germen de Trigo donado por la Dra. Marcelle Morrison.

### B) INMUNOPRECIPITACION CON ANTICUERPOS ANTI-LHRH.

#### 1) Anticuerpos policlonales anti-LHRH (ver artículo).

#### 2) Anticuerpos monoclonales anti-LHRH.

Para la utilización de anticuerpos monoclonales anti-LHRH, primeramente se caracterizaron las moléculas presentes en extractos de hipotálamo reconocidas por el anticuerpo monoclonal anti-LHRH BKL2 obtenido en el laboratorio (trabajo de tesis de licenciatura del G.F.B. Rafael Saavedra Durán, (72)). Se obtuvieron extractos de hipotálamo de rata macho adulto que fueron separados en base a su peso molecular mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50. Cada una de las fracciones eluidas fueron analizadas mediante radioinmunoensayo (RI) utilizando el anticuerpo monoclonal anti-LHRH BKL2. De estos experimentos se observó que dicho anticuerpo es capaz de reconocer una(s) especie(s) molecular(es) que coeluye(n) con el LHRH sintético, sin embargo no fue posible observar el reconocimiento de alguna especie de mayor peso molecular. Para comprobar que la única molécula que cruza con el anticuerpo en la fracción que comigra con LHRH sintético es el LHRH, se cromatografió esta fracción por cromatografía líquida de alta resolución, encontrándose que más del 90% de la inmunoreactividad tiene el mismo tiempo de retención que el LHRH (trabajo realizado en el laboratorio por el G.F.B. Rafael Saavedra, el G.F.B. Miguel Cisneros y el Dr. Jean Louis Charli).

La traducción de RNA poli(A) se realizó en lisado de reticulocito de conejo el cual fue adquirido comercialmente de la casa New England Nuclear. La traducción se llevó a cabo en un volumen final de 25 $\mu$ l en presencia de 10 $\mu$ l del lisado, acetato de potasio 200mM, acetato de magnesio 3.75mM y 20 $\mu$ Ci de [<sup>35</sup>S]-Metionina (1050 Ci/mmol), por 1 hr a 37°C. Los productos de traducción fueron incubados con 120ng/ml del anticuerpo monoclonal anti-LHRH BKL2 (purificado por precipitación con sulfato de amonio y por cromatografía de intercambio iónico (72)), en presencia o ausencia de 10 $\mu$ g de LHRH sintético. El análisis de los productos inmunoprecipitados se realizó como se describe para la inmunoprecipitación con anticuerpos policlonales (ver artículo).

### III.- CREACION DE UN BANCO DE DNA COMPLEMENTARIO AL RNA MENSAJERO DE HIPOTALAMO DE RATA.

#### A) SINTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE DNA COMPLEMENTARIO.

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) se utilizaron 5ug de RNA poli(A)<sup>++</sup> de hipotálamo de rata como templado, previamente desnaturalizado en presencia de hidróxido de metil mercurio 10mM, por 10 min a temperatura ambiente en un volumen final de 10ul (79). Al cabo de este tiempo se adicionó un volumen de 2-mercaptoetanol 200mM y RNAsin a una concentración de 0.5U/ul final en el volumen total de reacción (79). La reacción de síntesis de la primera cadena del cDNA se llevó a cabo en un volumen total de 100ul en una solución de Tris-HCl 50mM pH8.3, cloruro de magnesio 10mM, cloruro de potasio 70mM, en presencia de dATP, dGTP, TTP 1mM cada uno, dCTP 0.25mM, 15uCi de  $^{32}$ P-dCTP (7000 Ci/mmol), 10ug/ml de Oligo dT<sub>12-18</sub>, 50ug/ml de Actinomicina D y 20U/ug de ARN de la enzima Transcriptasa Inversa de virus de mieloblastosis de ave (79,82). Después de incubar a 42°C por 1 hr, la enzima fue inactivada mediante la adición de 4ul de EDTA 0.5M pH 8.0. Aliquotas de 2.5ul fueron tomadas a los tiempos 0 y 60 min de incubación para la determinación del rendimiento de síntesis de cDNA, mediante incorporación de marca a filtros de intercambio iónico DE81 (79) y análisis electroforético en gel de Acrilamida 5% Urea 8M en solución TBE 1X (TBE 1X: Tris-HCl 0.089M, ácido bórico 0.089M, EDTA 2mM) (79).

El cDNA cadena sencilla se extrajo con un volumen de una mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (50:50:1) y la fase orgánica se reextrajo con un volumen de Tris-HCl 10mM pH8.0, EDTA 1mM (TE pH 8.0) y ambas fases acuosas fueron colectadas. El ARN se digirió incubando a 65°C por 20 min con 20ul de hidróxido de sodio 1M. La neutralización se realizó adicionando 20ul de ácido clorhídrico 1M y 20ul de una solución de Tris-HCl 1M pH 7.5. El cDNA se precipitó con un volumen de acetato de amonio 4M, 2 volúmenes de etanol y 10ul de tRNA como acarreador, por 15 min a -70°C. El cDNA fue colectado por centrifugación a 12,000rpm por 15 min a 4°C en microcentrífuga, la pastilla lavada una vez con etanol al 70% y el etanol restante evaporado a sequedad en evaporador rotatorio de marca Savant. El cDNA cadena sencilla (cDNA-cs) fue resuspendido en 25ul de agua desionizada estéril.

#### B) SINTESIS DE LA SEGUNDA CADENA DE DNA COMPLEMENTARIO

La reacción de síntesis de la segunda cadena de cDNA se llevó a cabo en un volumen de 100ul conteniendo Hepes 0.1M pH 6.9, cloruro de magnesio 10mM, cloruro de potasio 70mM, DIT 2.5mM, dATP, dGTP, TTP 0.5mM cada uno, dCTP 0.25mM, 15uCi de  $^{32}$ P-dCTP (7000 Ci/mmol) y 50 unidades del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I por microgramo de cDNA cadena sencilla (79). La reacción se incubó por 16 hrs a 15°C al cabo de las cuales se agregaron 10ul de Tris-HCl 1M pH 8.2 y 20 unidades de

Transcriptasa reversa y se incubó por una hora más a 42°C. Aliquotas de 2.5ul fueron tomadas antes y después de la reacción para la determinación del rendimiento de síntesis de la segunda cadena de cDNA y análisis en gel de Acrilamida 5% Urea 8M. La reacción fue detenida mediante la adición de 2ul de EDTA 0.5M pH 8.0. El cDNA se extrajo con un volumen de una mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (50:50:1) y se precipitó con un volumen de acetato de amonio 4M pH 8.0 y 2 volúmenes de etanol, a -70°C por 15 min. El cDNA doble cadena fue colectado por centrifugación a 12,000 rpm por 15 min a 4°C en microcentrífuga, la pastilla lavada con etanol al 70% y el etanol restante evaporado a sequedad en el evaporador rotatorio Savant. El cDNA doble cadena (cDNA-dc) fue resuspendido en 10ul de agua desionizada estéril.

#### C) TITULACION Y DIGESTION DEL DNA COMPLEMENTARIO CON NUCLEASA S1

La Nucleasa S1 (casa comercial BRL) fue titulada a concentración variable de enzima utilizando aproximadamente 5ng de cDNA doble cadena (~4,000cpm) como sustrato por reacción (79,83). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen total de 10ul en acetato de sodio 50mM pH 4.5, sulfato de zinc 1mM, cloruro de sodio 0.2M, glicerol 0.5%, con 0.005, 0.05, 0.5, 5 y 10 unidades de enzima, por un minuto a 37°C. La reacción fue detenida mediante la adición de 0.5ul de EDTA 0.5M pH8.0. La eficiencia de hidrólisis de DNA cadena sencilla fue determinada como el decremento en radioactividad de cDNA por acoplamiento a filtros de intercambio iónico DE81, y por análisis electroforético en gel de Acrilamida 5% Urea 8M en TBE 1X.

Una vez titulada la Nucleasa S1, el cDNA fue digerido con la enzima a una concentración de 200 U/ug de cDNA doble cadena en un volumen final de 50ul, bajo las condiciones anteriores. Aliquotas de 1ul fueron tomadas a los tiempos 0 y 1 min de incubación, y fueron analizadas como se describe anteriormente. El cDNA se extrajo con un volumen de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (50:50:1), fase que se reextrajo con un volumen de solución TE pH 8.0 y ambas fases acuosas se colectaron y reextrajeron 2 veces con eter saturado en solución TE pH 8.0. El cDNA doble cadena se precipitó en presencia de acetato de amonio y etanol bajo las condiciones anteriores y se resuspendió en 20ul de agua desionizada estéril.

#### D) METILACION DEL cDNA EN LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN Eco RI.

Los sitios de restricción reconocidos por la enzima Eco RI, presentes dentro de las secuencias del cDNA, fueron protegidos mediante la metilación con la enzima Metilasa de Eco RI (18ug/ml) y S-Adenosil Metionina (10uM). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 22.5ul, en presencia de Tris-HCl 50mM pH 7.5, EDTA 1mM, DTT 5mM, incubando por 15 min a 37°C y se inactivó por calentamiento a 70°C por 10 min (84).

#### E) POLIMERIZACION DE LOS EXTREMOS DEL cDNA DOBLE CADENA.

Con el objeto de obtener moléculas de cDNA doble cadena de extremos rasurados y susceptibles a la ligación posterior, los extremos 5' y 3' cadena sencilla restantes se polimerizaron con 10U de DNA polimerasa I fragmento Klenow en un volumen total de 25ul en presencia de cloruro de magnesio 10mM y dATP, dUTP, dCTP, TTP 20uM cada uno, incubando por 30 min a temperatura ambiente. La enzima fue inactivada con 1ul de EDTA 0.5M pH 8.0 (84).

El cDNA se extrajo con un volumen de una mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (50:50:1) y la fase orgánica se reextrajo con un volumen de solución TE pH 8.0. Ambas fases acuosas fueron colectadas y el cDNA fue precipitado con un volumen de acetato de amonio 4M y 2 volúmenes de etanol a -70°C por 15 min. El cDNA se colectó por centrifugación a 12,000 rpm por 15 min a 4°C en microcentrífuga, el sobrenadante se eliminó y el etanol restante se evaporó a sequedad en evaporador rotatorio Savant. El cDNA se resuspendió en 10ul de agua desionizada estéril.

#### F) FOSFORILACION DE LOS ADAPTADORES DE Eco RI. LIGACION DE LOS ADAPTADORES AL cDNA.

Diez picomoles de oligomero de secuencia nucleotídica reconocida por la enzima de restricción Eco RI (1pmol/ul), fueron fosforiladas con 10uCi de  $\gamma$ -[32-P]-ATP (7000 Ci/mmol) y 10 Unidades de la enzima Polinucleotido cinasa de T4. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 15ul en presencia de Tris-HCl 30mM pH7.8, cloruro de magnesio 10mM, DTT 1mM, por 20 min a 37°C. Al cabo de este tiempo se adicionó 1ul de ATP 10mM y se incubó por 20 min adicionales (79). La enzima fue inactivada por calentamiento a 65°C por 10 min.

Los oligomeros fosforilados fueron ligados al cDNA doble cadena mediante el uso de la enzima DNA Ligasa de T4. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25ul en solución de Ligasa (Tris 30mM pH 7.8, cloruro de magnesio 10mM, DTT 10mM, ATP 5mM) con 10 Unidades de enzima, incubando por 15 hrs a 16 C (79,85). La enzima fue inactivada por calentamiento a 65°C por 10 min. Aliquotas de 1ul fueron tomadas antes y después de la incubación para la determinación de la eficiencia de fosforilación y ligación de los oligomeros, mediante análisis electroforético en gel de Acrilamida 20% Urea 8M en solución TBE IX.

#### G) DIGESTION CON LA ENZIMA DE RESTRICION Eco RI.

Con el objeto de obtener moléculas de cDNA susceptibles de ligarse al DNA del vector de clonación, se generaron extremos cohesivos y complementarios en el cDNA mediante su digestión con la enzima de restricción Eco RI. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 30ul en Tris-HCl 50mM pH 7.5, cloruro de magnesio 10mM, cloruro de sodio 100mM, DTT 1mM con 10 unidades de la enzima, incubando por 5 hrs

a 37°C. La enzima se inactiva por calentamiento a 65°C por 10 min (79).

El cDNA doble cadena de extremos cohesivos se purificó de los oligómeros y  $\gamma$ [32-P]-ATP restantes mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50, con solución TE pH 7.5 como eluyente. Las fracciones correspondientes al primer pico de radioactividad eluida fueron colectadas y precipitadas en presencia de cloruro de sodio 0.25M y 2.5 volúmenes de etanol a -20°C por 12 hrs. El cDNA fue sedimentado por ultracentrifugación a 25,000 rpm (rotor SW 50.1, Beckman) por 1 hr a 4°C. El sobrenadante fue eliminado, la pastilla lavada con etanol al 70% y el líquido restante fue evaporado a sequedad en evaporador rotatorio Savant. El cDNA listo para ligarse al vector de clonación fue resuspendido en 15ul de agua estéril.

#### H) EFICIENCIA DE LIGACION AL DNA DEL BACTERIOFAGO $\lambda$ gt11. EFICIENCIA DE EMPACAMIENTO E INFECCION.

El DNA del bacteriófago  $\lambda$ gt11 digerido con la enzima de restricción Eco RI y desfosforilado fue adquirido comercialmente (estuche "Protoclone", Promega Biotech). Para comprobar la capacidad de ligación de un DNA pasajero al DNA del bacteriófago  $\lambda$ gt11, se incubaron 0.5ug del DNA de gt11 y 0.2ug de DNA de plásmido (control del estuche, 3kb) con 0.5U de DNA Ligasa de T4, en solución de Ligasa en un volumen total de 5ul, a 16°C por 15 hrs (85). Una alícuota de 1ul fue sometida a electroforesis en minigel de agarosa al 1% en solución TBE 0.25x para el análisis de la eficiencia de reacción.

Para el empacamiento del DNA recombinante dentro de cápsidas de bacteriófago de tipo lambda, se adquirió comercialmente el extracto de empacamiento para bacteriófagos tipo lambda (estuche "Packagen", Amersham), y la reacción se llevó a cabo bajo las condiciones descritas por el proveedor. Los tubos de extracto se descongelaron en baño de hielo y el DNA se mezcló inmediatamente con ambos componentes del extracto. La mezcla se centrifugó por 50 seg en microcentrífuga a 12,000 rpm a temperatura ambiente, y se incubó por 2 hrs a 22°C. Al cabo de este tiempo se diluyó la mezcla a un volumen final de 500ul con solución SM (SMs Iris 50mM pH 7.5, cloruro de sodio 100mM, sulfato de magnesio 10mM, gelatina 0.01%) agregando 20ul de cloroformo, se mezcló con vortex y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min a temperatura ambiente. El sobrenadante con los bacteriófagos se mantuvo a 4°C para conservar su estabilidad.

Con el objeto de comprobar la eficiencia de empacamiento e infección por los bacteriófagos recombinantes, se efectuaron diluciones de la mezcla de empacamiento para su titulación mediante infección de la cepa lítica E. coli Y1090 (79,84). Para la infección, se creó un cultivo líquido de la cepa Y1090 en 5 ml de medio CY (ver apéndice II) con maltosa al 0.2% como inductor de la síntesis de receptores de superficie. Cien microlitros del la cepa crecida por 8 hrs a 37°C con agitación, se infectaron con 5ul de cada dilución de bacteriófagos en presencia de cloruro de calcio 5mM, cloruro de magnesio 5mM, por 15 min a 37°C. Al cabo de este tiempo se adicionaron 20ul del inductor del gene de  $\beta$ -galactosidasa, IPTG (20mg/ml) (ver apéndice I), 50ul del

sustrato cromogénico X-Gal (20mg/ml en dimetilformamida) (ver apéndice I), y 5ml del medio NYZCM-agar suave (ver apéndice II) a 50°C para inocular sobre medio NYZCM sólido en caja petri (ver apéndice II). Las bacterias infectadas fueron incubadas a 42°C por 12 horas en posición invertida, para favorecer la lisis por bacteriófagos. El número de bacteriófagos recombinantes fue determinado contando las unidades formadoras de placas transparentes y por corrección de dilución y volumen.

#### I) CLONACION DEL cDNA.

Aproximadamente 0.5µg de cDNA doble cadena fueron ligados a 8µg del DNA de fago  $\lambda$ gt11 con 3U de la enzima DNA ligasa de T4, en presencia de solución de Ligasa y ATP 10mM en un volumen final de 50µl (85). La reacción se llevó a cabo por 15 hrs a 16°C y la enzima se inactivó por calentamiento a 65°C por 10 min. Para comprobar que la reacción se llevó a cabo en su totalidad, alícuotas de 1µl fueron tomadas antes y después de la reacción y fueron analizadas mediante electroforesis en minigel de agarosa al 6% en solución TBE 0.25X.

Para comprobar la eficiencia de empaquetamiento e infección del cDNA ligado al fago, un décimo del DNA recombinante se empaquetó en cápsidas de bacteriófagos de tipo lambda utilizando una reacción del extracto de empaquetamiento (estuche "Packagene"), bajo las condiciones descritas anteriormente. Con el objeto de obtener el título final del banco de cDNA se tomaron alícuotas de 5 y 50µl de diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  de la mezcla de empaquetamiento para infectar la cepa E. coli Y1090 y titular en presencia de IPTG y X-Gal, y de esta manera obtener el título de placas de lisis recombinantes (transparentes) contra las no recombinantes (azules, inducción del gen de  $\beta$ -galactosidasa y degradación del sustrato cromogénico).

Una vez comprobada la eficiencia de ligación, empaquetamiento e infección del cDNA recombinante, se empaquetó el DNA restante utilizando 4µg de DNA recombinante por reacción de empaquetamiento. La eficiencia de empaquetamiento y la capacidad de infección, así como el título de bacteriófagos recombinantes se determinó como se describe anteriormente.

#### J) PURIFICACION DE DNA DE BACTERIOFAGOS RECOMBINANTES.

Con el objeto de determinar tanto la presencia como el tamaño de los insertos de cDNA, se purificó DNA de bacteriófagos recombinantes a partir de bacteriófagos amplificados por infección en la cepa Y1090 de E.coli. Para amplificar y seleccionar un número representativo de bacteriófagos recombinantes, se infectaron 100µl de un cultivo de la cepa Y1090 en medio CY + maltosa 0.2% con una alícuota adecuada de una dilución  $10^{-4}$  de los bacteriófagos para obtener un título final de 100-200 unidades formadoras de placas por caja. La infección se llevó a cabo como se describe anteriormente. De las placas de lisis

transparentes (recombinantes) se seleccionaron 45 placas aisladas y se recolectaron por aspiración del agar con pipeta pasteur estéril. Los bacteriófagos se eluyeron en conjuntos de 3 fragmentos de agar (3 placas distintas) en 1ml de medio SM con 20ul de Cloroformo a 4°C por 24 hrs.

#### 1) Purificación de DNA de bacteriófagos recombinantes en pequeña escala (79).

Para la amplificación de los bacteriófagos recombinantes seleccionados, se infectaron 100ul de la cepa Y1090 previamente crecida a 37°C en medio CY + maltosa por 8 hrs con agitación, con 100ul de los bacteriófagos eluidos en medio SM (aproximadamente  $2 \times 10^8$  pfu/ml). La infección se llevó a cabo por 15 min a 37°C, y la amplificación se efectuó adicionando 5ml de medio NYZCM suave profundo, y sembrando sobre cajas con agar NYZCM duro. Las cajas fueron incubadas en posición invertida por 12 hrs a 42°C, y los bacteriófagos amplificados se eluyeron con 5 ml de medio SM a 4°C por 24 hrs. El medio SM de cada caja fue transferido a un tubo corex de 15ml para eliminar los restos bacterianos por centrifugación a 8,000g por 10min a 4°C. El líquido sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se adicionó Ribonucleasa A (RNasa A) y Desoxirribonucleasa I (DNasa I) para tener una concentración final de 1ug/ml de cada una de estas enzimas. La digestión se llevó a cabo por 30 min a 37°C y al cabo de esta se añadió un volumen de una solución de Polietilenglicol al 20% y cloruro de sodio 2M en medio SM y se incubó por 3 horas en un baño de hielo-agua.

Las partículas de bacteriófagos se precipitaron por centrifugación a 10,000g por 20 min a 4°C y el sobrenadante fue eliminado por aspiración e inversión del tubo. Los bacteriófagos fueron resuspendidos en 0.5 ml de medio SM, fueron transferidos a tubos eppendorf de 1.5 ml y los restos bacterianos fueron eliminados por centrifugación en microcentrifuga a 4°C por 2 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf limpio y se incubó a 68°C por 15 min en presencia de SDS 0.1%, EDTA 5mM pH 8.0. El DNA se extrajo una vez con un volumen de Fenol, una vez con un volumen de una mezcla Fenol/Cloroformo (1:1) y una vez con un volumen de Cloroformo. El DNA en fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol a -70°C por 20 min centrifugando a 12,000rpm por 15min a 4°C en microcentrifuga. El sobrenadante se eliminó y la pastilla de DNA se lavó 3 veces con 50ul de etanol al 70% y el líquido restante fue evaporado a sequedad en evaporador rotatorio Savant. El DNA fue resuspendido en 20ul de agua desionizada estéril. 3 veces con 50ul de etanol al 70% y el líquido restante fue evaporado a sequedad en Savant. El ADN fue resuspendido en 20ul de agua desionizada estéril.

#### 2) Purificación de DNA de fagos recombinantes en gran escala (79).

Cien mililitros de medio líquido Luria con ampicilina y 0.2% de maltosa fueron crecidos con la cepa E. coli Y1090 (100ul a partir de un glicerol) por 12 hrs a 37°C. El medio fue centrifugado a 11,000 g por 10 min a 4°C y las células fueron resuspendidas en 20 ml de medio SM a una concentración final de  $0.6 \times 10^8$  células/ml. Aliquotas de 200ul de

cada pool de bacteriófagos eluidos en SM (aproximadamente  $4 \times 10^4$  ofu) fueron utilizadas para infectar 200ul de células de E. coli Y1090 (aproximadamente  $1.2 \times 10^8$  células) en 200ul de cloruro de calcio 10mM, cloruro de magnesio 10mM. Las células se incubaron por 20 min a 37°C para su infección por fagos, e inmediatamente después se inocularon en 100 ml de medio NZDM líquido con ampicilina para su amplificación. Los bacteriófagos fueron amplificados incubando por 12 hrs a 42°C con agitación, y se agregaron 5 ml de cloroformo para favorecer la lisis total, incubando por 30 min adicionales con agitación. Al cabo de este tiempo se adicionaron 20ug/ml de Ribonucleasa A y Desoxiribonucleasa I, incubando a temperatura ambiente por 30 min. Una vez digeridos el ARN y el DNA bacterianos, se adicionó cloruro de sodio en cristales para tener una concentración final de 1M. El cloruro de sodio se disolvió suavemente y el medio se incubó por una hora en baño de hielo-agua para eliminar posteriormente los restos bacterianos mediante una centrifugación a 11,000 g por 30 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un matraz limpio y los bacteriófagos fueron precipitados en presencia de Polietilenglicol al 10%, incubando en baño de hielo-agua por 4 hrs. Los bacteriófagos fueron sedimentados por centrifugación a 11,000 g por 10 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó totalmente, la pastilla se resuspendió suavemente en 3 ml de medio SM y se realizó una extracción con un volumen de cloroformo. Finalmente, los bacteriófagos se purificaron una vez más sedimentándolos por ultracentrifugación a 25,000 rpm por 2 hrs a 4°C (rotor SW 50.1) en medio SM. El medio SM restante se eliminó por aspiración y la pastilla de bacteriófagos se resuspendió en 0,5 ml de medio SM fresco, con agitación suave por 12 hrs a 4°C. Los bacteriófagos resuspendidos se transfirieron a tubos eppendorf de 1,5ml para digerir con 50ug/ml de Proteinasa K (preincubada por 15min a 37°C) en presencia de EDTA 20mM pH 7.5 y SDS al 0.5%, por 1hr a 65°C. El DNA se extrajo una vez con fenol, 3 veces con una mezcla fenol/cloroformo (1:1) y una vez con cloroformo, y fue precipitado adicionando un volumen de isopropanol e incubando a -70°C por 20 min. El DNA se sedimentó por centrifugación a 12,000 rpm por 15 min a 4°C en microcentrifuga, la pastilla se resuspendió en 20ul de Solución TE pH 8.0. El DNA se precipitó 2 veces consecutivas con un volumen de acetato de amonio 4M pH 8.0 y 2 volúmenes de etanol a -70°C por 15 min. La pastilla final se lavó 2 veces con etanol al 70% y el líquido restante se evaporó a sequedad en evaporador rotatorio Savant. El DNA se resuspendió en 25ul de Solución TE pH 8.0.

#### K) DIGESTION DEL DNA RECOMBINANTE CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN EcoRI. CARACTERIZACION DE LOS INSERTOS DE cDNA.

Aproximadamente 10ug de DNA recombinante fueron digeridos con 24U de la enzima de restricción EcoRI, en presencia de Tris 50mM pH 7.5, cloruro de magnesio 10mM, cloruro de sodio 100mM, DTT 1mM y Espermidina 1mM, en un volumen de 30ul, por 15 hrs a 37°C (79). Para la visualización de los fragmentos de DNA de alto peso molecular generados por la digestión (DNA del bacteriófago  $\lambda$ gt11), una veintea parte del DNA fue sometida a electroforesis en gel vertical de agarosa al 0.6% en Solución TBE 1X, corrido a bajo voltaje (50 volts). El análisis de los fragmentos de cDNA restringidos se realizó mediante electroforesis en gel vertical de

Acrilamida al 5% en Solución TBE IX de 0.75mm de grosor, y por tinción del gel con Bromuro de Etidio (0.5ug/ml en agua destilada) (79).

#### IV-.SINTESIS Y PURIFICACION DE UN OLIGONUCLEOTIDO DE SECUENCIA 100% COMPLEMENTARIA A UN FRAGMENTO DEL cDNA DE TRH.

La síntesis del oligonucleótido de secuencia complementaria a un fragmento del mRNA que codifica para la síntesis de TRH en el hipotálamo de la rata, se efectuó siguiendo el método de fosfortriester en soporte sólido (86). En la síntesis química de oligonucleótidos por el método de fosfortriester en soporte sólido, el nucleótido 3' terminal de la secuencia deseada se acopla inicialmente al soporte para posteriormente acoplar sucesivamente los dinucleótidos o trinucleótidos que van a dar lugar a la secuencia deseada. La síntesis del oligonucleótido comprende tres reacciones principales:

##### a) Eliminación del grupo protector 5' (Reacción de destrilación).

Cincuenta miligramos de resina de poliestireno a la cual se acopló previamente el nucleótido Timidina (resina T) fueron colocados en un filtro reactor para inchar la resina en presencia de 1ml de piridina por 1 hr a temperatura ambiente. La piridina fue eliminada por filtración, la resina se lavó una vez con cloroformo a -20°C y una vez con una mezcla cloroformo/metanol y el grupo protector DMT 5' (ver apéndice I) se eliminó tratando la resina 2 veces consecutivas con ácido benzensulfónico en cloroformo/metanol por 1 min. El ácido restante fue lavado con cloroformo/metanol, y la resina fue equilibrada lavando 2 veces con piridina y 2 veces con tetrahidrofurano (THF). El filtro reactor se tapó con septum y la resina se secó eliminando el líquido restante por succión con vacío.

##### b) Reacción de acoplamiento.

El dímero o trímero a ser acoplado (20 veces en exceso molar sobre la cantidad de resina) se trató con una mezcla piridina (1.5ml) /trietilamina (0.5ml) /agua (0.5ml) por 20 min a temperatura ambiente para eliminar el grupo protector cianoetil 3'. La mezcla de solventes fue evaporada a sequedad con vacío y agitación en baño a 60°C. La evaporación se repitió tres veces con 0.5ml de piridina para deshidratar el dímero o trímero, y el tubo se tapó con septum para mantener el medio deshidratado. Cuarenta miligramos del catalizador 2-(mesitilbensulfonil)-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) fueron mezclados con el dímero o trímero y disueltos con 0.5 ml de piridina (adicionada con jeringa hipodérmica para mantener las condiciones de deshidratación). La mezcla dímero o trímero - catalizador se aspiró con jeringa y se inyectó sobre la resina, manteniendo las condiciones de deshidratación. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo durante 90 min a temperatura ambiente, y al cabo de este tiempo se eliminó la piridina por filtración. La resina se lavó 2 veces con piridina y una

vez con cloroformo y una pequeña parte de la resina fue utilizada para comprobar la reacción mediante el desbloqueo del grupo DMF con ácido bencensulfónico (reacción colorida - acoplamiento positivo).

c) Acetilación de los grupos 5' que no hayan reaccionado.

Los grupos 5' que no reaccionaron (libres) fueron protegidos mediante la acetilación en presencia de una mezcla de piridina (2.1 ml), THF (0.6 ml), dimetilaminopiridina (10-20mg) y anhídrido acético (0.3ml). Esta mezcla se dejó reaccionar con la resina por 5 min, se eliminó por filtración y la resina se lavó una vez con piridina para repetir la reacción de destrifilación y proseguir con el siguiente acoplamiento.

Una vez finalizado el último acoplamiento, el oligodeoxinucleótido fue desacoplado de la resina haciéndolo reaccionar con 300ul de una solución de 2-piridinaldoxima-tetrametilguanidina en una mezcla piridina-agua (9:1) por 24 hrs a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se agregaron 2 ml de hidróxido de amonio, el tubo se tapó fuertemente y se incubó a 50°C por 2 hrs. Los disolventes fueron evaporados a sequedad con vacío, la resina y el oligonucleótido libre se resuspendieron en 1 ml de Solución TEAB 20mM (Bicarbonato de trietilamonio 20mM) y el oligonucleótido soluble se separó de la resina mediante filtración a través de una malla de algodón.

El oligonucleótido libre se purificó de residuos contaminantes por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50 con Solución TEAB 20mM como eluyente. Las fracciones que corresponden al primer pico de absorbancia a 260nm fueron colectadas y evaporadas a sequedad para posteriormente eliminar los grupos protectores restantes del oligonucleótido incubando 20 min a temperatura ambiente en presencia de 2 ml de ácido acético. El disolvente fue evaporado a sequedad con vacío, y el oligonucleótido se purificó por electroforesis en gel de Poliacrilamida al 20%, Urea 8M en solución TBEIX, eluyendo el fragmento de gel que contiene la banda de mayor peso molecular, incubando en 1 ml de agua a 37°C por 15 hrs. El oligonucleótido se sometió a cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa, la resina se lavó con solución de Trietilamina 0.1M pH 9.0, y el oligonucleótido se eluyó con una mezcla de Trietilamina 2.1M pH 9.0 / Etanol 30%. Los disolventes se evaporaron a sequedad, lavando 3 veces con agua estéril para eliminar totalmente los residuos de trietilamina. Finalmente el oligonucleótido se resuspendió en 200ul de Solución TE pH 8.0 y se determinó la concentración por lectura de densidad óptica a 260nm.

El marcaje del oligonucleótido sintético se realizó utilizando [<sup>32</sup>P]-ATP (7000 Ci/mmol) como isótopo radioactivo, y la enzima Polinucleótido cinasa de T4 (87). La purificación de los oligonucleótidos marcados se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (88).

## V. HIBRIDIZACIÓN RNA MENSAJERO CON RASIREADORES ESPECÍFICOS (NORTHERN).

### A) Electroforesis del RNA en condiciones desnaturalizantes sobre geles de agarosa - formaldehído (89).

Para la separación del RNA mensajero de hipotálamo de rata en base a su peso molecular, se efectuó la electroforesis en gel de agarosa en presencia de formaldehído (89). De 10 a 20 µg de RNA fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, formaldehído 2.2M en solución de fosfatos 20mM pH 8.0. Las muestras de RNA fueron precalentadas a 65°C en presencia de formamida 50% (desionizada sobre resina AG501-X8), formaldehído 2.2M, solución de fosfatos 20mM pH 8.0, 0.002% de azul de bromofenol, 0.002% de xilen cianol, inmediatamente antes de aplicar al gel. Los geles de 3mm de grosor se corrieron a 20 volts durante 11 hrs con solución de fosfatos 20mM pH 8.0 como solución de electroforesis, reciclada a una velocidad de 5 ml/min.

### B) Transferencia a Nitrocelulosa e Hibridización (74).

Los geles desnaturalizantes para RNA fueron transferidos por capilaridad a membranas de nitrocelulosa, sin previo tratamiento del gel antes de transferir. La membrana de nitrocelulosa se lavó 2 veces con agua estéril y se equilibró con solución SSC 20X (cloruro de sodio 3M, citrato de sodio 0.3M) antes de transferir el RNA. La transferencia se efectuó a temperatura ambiente con solución SSC 20X por aproximadamente 32 hrs y al cabo de este tiempo la nitrocelulosa se secó al aire y se horneó a 80°C por 2 hrs con vacío.

### 1) Hibridización con el cDNA de TRH de hipotálamo de rata.

La prehibridización se llevó a cabo por 12 hrs a 42°C en solución de formamida al 50%, SSC 5X, Denharts 5X (Denharts 50X; ficoll 2%, polivinil pirrolidona 2%, albumina sérica bovina 2%), SDS 1%, fosfato de sodio y potasio 50mM pH 6.9 y 100µg/ml de DNA de esperma de salmón (sonicado y desnaturalizado a 100°C por 10 min) (90). La hibridización se realizó en la misma solución con aproximadamente 0.5 a 1.0X 10<sup>6</sup> cpm/ml del cDNA marcado con <sup>32</sup>P]-dCTP por "nick translation" (de 10 a 20ng/ml, ver abajo) (inserto de cDNA purificado por la D.F.B. Rosa M. Uribe V.) incubando a 42°C por 48 hrs con agitación. La membrana se lavó a temperatura ambiente 2 veces por 10 min con solución SSC 2X, SNS 0.1X y 2 veces con solución SSC 0.1X, SDS 0.1X y se expuso a autorradiografía por tiempo variable a -70°C con pantalla intensificadora.

### 2) La hibridización del RNA con el oligonucleótido sintético 100% homólogo al cDNA de TRH.

La hibridización se llevó a cabo por 24 hrs a 37°C en solución SET 6X (Cloruro de sodio 0.9M, EDTA 6mM, Tris-HCl 90mM pH 7.5), Denharts 5X, SDS 0.5% y 1.2 x 10<sup>6</sup> cpm/ml del oligonucleótido marcado con <sup>32</sup>P]-PIAIP. Antes de hibridizar, la membrana fue prehibridizada a 37°C por 3 hrs bajo las mismas condiciones, exceptuando el oligonucleótido marcado. Una vez hibridizada, la membrana se lavó 2 veces por 1 min con

solución SSC 6X a distintas temperaturas (91). La membrana se expuso a autorradiografía por tiempo variable a  $-70^{\circ}\text{C}$  con pantalla intensificadora, entre cada lavado.

Como controles de peso molecular, 6 $\mu\text{g}$  de RNA ribosomal de eucariotes (RNA de cerebro de rata, fracción que eluye con alta sal de oligo-dT celulosa) y RNA ribosomal de procariotes (*E. coli.*) fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa - formaldehído y transferidos a nitrocelulosa. Una vez horneada la nitrocelulosa el RNA se tifo con una solución de Azul de metileno al 0.004% en acetato de sodio 0.5M pH 4.0, por 5 min a temperatura ambiente (79).

i) Marcaje del cDNA por "nick translation" (92).

Cien nanogramos del inserto de cDNA puro (purificado por la Q.F.B. Rosa Ma. Uribe V.) fueron marcados por "nick translation" (estuche comercial de Amersham) utilizando 75 $\mu\text{Ci}$  de  $[\text{32-P}]-\text{dCTP}$  (7000 Ci/mmol), 5 $\mu\text{l}$  de una mezcla de dATP, dGTP y TTP (1:1:1) y 2.5 $\mu\text{l}$  de la enzima DNA polimerasa I y DNAasa I en un volumen final de 25 $\mu\text{l}$ . La reacción se incubó a  $15^{\circ}\text{C}$  por 2 hrs y la reacción se paró adicionando 10 $\mu\text{l}$  de EDTA 0.5M pH 8.0. El cDNA se purificó de los nucleótidos restantes mediante cromatografía en columna de Sephadex G-50 eluyendo con una solución de Tris-HCl 50mM pH 7.5, cloruro de sodio 150mM, EDTA 10mM, SDS 0.1%.

VI.- OVARIECTOMIA DE RATAS HEMBRA POSTPUBERES Y TRATAMIENTO CON ESTROGENOS Y PROGESTERONA.

Debido a los resultados negativos, obtenidos con la inmunoprecipitación del precursor de LHRH sintetizado a partir de mRNA de hipotálamo de rata macho, se trató de incrementar la proporción del mRNA de LHRH sometiendo ratas hembras al tratamiento con estrógenos y progesterona, condiciones en las cuales se ha podido detectar la biosíntesis in vivo de LHRH (73).

Cien ratas hembra postpuberes de la cepa Mistar se sometieron a intervención quirúrgica bajo anestesia con éter. La ovariectomía se practicó bilateralmente, eliminando totalmente el tejido ovárico y ligando el útero. A las tres semanas de la operación se inyectaron 0.02mg de benzoato de estradiol en aceite mineral (200ul) por vía subcutánea y a las 48 hrs de la dosis de estradiol se administraron 2mg de progesterona en aceite mineral (200ul) por vía subcutánea. A las 6 horas del último tratamiento, los animales se sacrificaron por decapitación, se extrajeron los cerebros y se disecaron los hipotálamos, dividiéndolos en área preóptica (área en donde se encuentran la mayor parte de los cuerpos neuronales a LHRH) e hipotálamo posterior. Los tejidos fueron almacenados a -70°C hasta el momento de realizar la preparación de RNA.

## RESULTADOS

### I.- OBTENCION DE RNA

#### A).- MACROMETODO DE OBTENCION DE RNA.

Con el objeto de obtener RNA mensajero tanto de hipotálamo como de cerebro extrahipotalámico en cantidad suficiente y de pureza e integridad necesarias para la realización de experimentos de traducción, síntesis de cDNA e hibridización, se obtuvieron varias preparaciones de RNA. Para la purificación de RNA a partir de una alta cantidad de tejido se utilizaron dos metodologías principalmente: El método de purificación de RNA que utiliza precipitaciones seriadas en presencia de hidrocloreuro de guanidina seguido de una extracción cloroformo/butanol, y el método que utiliza precipitaciones en presencia de hidrocloreuro de guanidina y tratamiento con Proteinasa K. De ambos métodos el que resulta ser más eficiente en cuanto a rendimientos es el método de purificación con hidrocloreuro de guanidina - Proteinasa K obteniéndose rendimientos de 500 a 800ug de RNA total por gramo de tejido (tabla 1).

La purificación de RNA poli(A) a partir de RNA total se realizó mediante cromatografía de afinidad en oligo-dT celulosa. Los rendimientos obtenidos varían de 50 a 100ug de RNA poli(A)+ por gramo de tejido (a partir de RNA total purificado por el método de hidrocloreuro de guanidina - Proteinasa K) lo que corresponde a aproximadamente el 10% del RNA total, y de 7 a 9. Sug de RNA poli(A)++ (purificado dos veces sucesivas por cromatografía en oligo-dT/celulosa) por gramo de tejido, lo que corresponde a aproximadamente el 1.5 al 2% del RNA total (tabla 1).

Al efectuar un análisis del RNA poli(A)++ mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de Poli(acrilamida 5X, Urea 8M, se observa que el RNA purificado por ambos métodos se obtiene íntegro (no degradado) y al parecer libre de DNA contaminante (determinado por digestión total del DNA con DNasa libre de RNAsa) (figura 4).

#### B).- OBTENCION DE RNA TOTAL EN PEQUEÑA ESCALA.

Uno de los objetivos en el estudio de la biosíntesis de neuropéptidos es la cuantificación de los niveles del mRNA específico que codifica para cada péptido, en hipotálamos de animales bajo distintas condiciones fisiológicas y experimentales. Para este estudio, se hace necesaria la optimización de la metodología de purificación de RNA a partir de tejido proveniente de un mínimo de sujetos experimentales. Para esto, se realizó un estudio comparativo de las técnicas descritas de purificación de RNA total, a partir del equivalente a un hipotálamo de rata. De este estudio, se observó que el método que resulta más eficiente en cuanto a rendimiento de RNA total, es el método de purificación de RNA citoplásmico, dando rendimientos finales de 1ug de RNA total por gramo de tejido (tabla 1). Sin embargo, debido a la

ausencia de inhibidores potentes de la actividad de ribonucleasas durante la purificación del RNA, se hace necesario realizar la técnica de una manera cuidadosa para prevenir la degradación del RNA (figura 5). El RNA resultante contiene una alta proporción de tRNA que se copurifica con el RNA mensajero y el RNA ribosomal, lo que no sucede mediante el uso de los otros métodos de purificación de RNA. Los rendimientos obtenidos con el método de Tiocianato de Guanidina / Gradiente de Cloruro de Cesio son ligeramente menores (tabla 1), sin embargo, el RNA se obtiene íntegro en todos los casos (figura 5), debido a la alta capacidad de inhibición de ribonucleasas. A pesar de que los métodos que utilizan hidrocloreuro de guanidina, y ya sea tratamiento con proteinasa K o extracción con cloroformo/butanol resultan ser eficientes para la purificación de RNA a partir de más de un gramo de tejido, no es este el caso cuando se parte de un hipotálamo de rata. Los rendimientos de RNA total se ven muy disminuidos (tabla 1), probablemente debido a pérdidas durante las precipitaciones seriadas; sin embargo, el RNA resultante se obtiene íntegro (figuras 5 y 6). El RNA purificado por estos 4 métodos se obtiene en todos los casos libre de DNA contaminante (figura 6).

Es posible purificar RNA poli(A) a partir del RNA citoplásmico resultante de la purificación a partir de un hipotálamo de rata, sin embargo, dada la baja cantidad de RNA poli(A) que se obtiene (1 a 5ug) no es posible realizar una cuantificación precisa del rendimiento mediante lecturas de densidad óptica en ultravioleta.

## II.- TRADUCCION DE RNA EN SISTEMA LIBRE DE CELULAS. INMUNOPRECIPITACION CON ANTICUERPOS ANTI-LHRH.

Con el objeto de determinar el peso molecular del precursor de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), RNA poli(A) de hipotálamo de rata y de placenta humana fueron traducidos en dos sistemas libres de células. Los productos de traducción fueron inmunoprecipitados con dos anticuerpos capaces de reconocer especies de LHRH de mayor peso molecular. Después del análisis electroforético en geles de Poliacrilamida-SDS del material inmunoprecipitado, nosotros detectamos en ambos tejidos la presencia de una proteína de 50,000 daltones reconocida por el anticuerpo No. 1076. Este péptido no fue desplazado por un exceso de LHRH adicionado durante la inmunoprecipitación, y pareció estar presente en ciertas especies en donde no se ha reportado la presencia de LHRH. Estos datos demuestran que el mRNA de LHRH está presente en proporción muy baja en hipotálamo y placenta, y que la sensibilidad de este ensayo no es lo suficientemente alta para detectar este precursor ("Attempts to Immunoprecipitate the LHRH Precursor Synthesized in Cell-Free Systems", Cohen, S., J.L. Charli, L. Díaz de León, R.P. Millar, A. Arimura, M.R. Morrison y P. Joseph-Bravo, Brain Res. Bull., 16, 309-314, 1986).

Debido a los resultados negativos, decidimos intentar la inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-LHRH utilizando el mRNA proveniente de tejido en condiciones en las cuales parece estar enriquecido el mRNA para LHRH (73).

Se ha postulado que la biosíntesis de novo del LHRH se ve estimulada en

la rata hembra posterior a la ovariectomía y tratamiento con estrógenos y progesterona (73), esto, debido a la inducción artificial del ciclo ovárico. Este aumento en la biosíntesis de novo del LHRH podría ser un reflejo de un aumento en la síntesis de su precursor y su procesamiento. Con el objeto de aumentar los niveles del precursor de LHRH y facilitar de esta manera su detección con anticuerpos específicos, se ovariectomizaron 100 ratas hembra postpuberes y se trataron con estrógenos y progesterona. El RNA del área preóptica (región del hipotálamo en donde están la mayor parte de los cuerpos neuronales a LHRH (93)) de las ratas ovariectomizadas fue utilizado en los estudios de inmunoprecipitación de productos de traducción con anticuerpos monoclonales.

Para la inmunoprecipitación de los productos de traducción de RNA de hipotálamo con el anticuerpo monoclonal anti-LHRH BKL-2, primeramente se titularon las preparaciones de RNA poli(A)+ de área preóptica de ratas ovariectomizadas, de hipotálamo de rata macho adulto y de cerebro extrahipotalámico de rata macho adulto. La traducción se llevó a cabo utilizando lisado de raticulocito de conejo comercial (New England Nuclear) y  $^{35}\text{S}$ -Metionina como aminoácido marcador. En la figura 7 se observa el patrón proteico y la integridad de los productos de traducción de estos 3 RNA mensajeros. La actividad de traducción de estas preparaciones de RNA, expresada como radioactividad incorporada a proteína precipitable por TCA, es cuatro veces mayor que la incorporación que se presenta al no adicionar RNA exógeno al sistema de traducción (actividad basal). Para la inmunoprecipitación de los productos de traducción con el anticuerpo monoclonal BKL-2, se tradujeron 10 $\mu\text{g}$  de RNA poli(A)+ de área preóptica de ratas ovariectomizadas, 10 $\mu\text{g}$  de RNA poli(A)+ de hipotálamo de rata macho adulto y 5 $\mu\text{g}$  de RNA poli(A)+ de cerebro extrahipotalámico de rata macho adulto. Los productos de traducción de cada RNA se dividieron en 2 partes iguales (el equivalente a  $2 \times 10^6$  cpm incorporadas a proteína) y se incubaron con 120ng/ml del anticuerpo monoclonal anti-LHRH BKL-2 puro, en presencia o ausencia de 10 $\mu\text{g}$  de LHRH sintético (Brain. Res. Bull. 16, 309-314, 1986). Después de 8 semanas de exposición del gel a fluorografía, no se observa banda alguna que pudiera corresponder al péptido precursor de LHRH (10,000 daltones) o a otra especie molecular reconocida por el anticuerpo monoclonal dentro de los productos de RNA de área preóptica de ratas tratadas, de hipotálamo de rata, o de cerebro extrahipotalámico (figura 8).

### III.-SÍNTESIS Y CLONACIÓN DEL DNA COMPLEMENTARIO.

Con el objeto de estudiar la biosíntesis de neuropéptidos hipotalámicos, se planteó la utilización de la metodología de DNA recombinante para poder caracterizar los mensajeros que codifican para la síntesis de TRH así como de LHRH en el hipotálamo de la rata. El protocolo de síntesis y clonación del DNA complementario de hipotálamo de rata se ilustra en la figura 9. Una vez establecido, se propuso optimizar ciertos puntos del protocolo inicial, entre los cuales está la síntesis de la primera cadena del cDNA.

#### A).- PRIMERA CADENA DEL cDNA.

Para tener un alto número de recombinantes dentro del banco de cDNA, se propuso establecer las condiciones para obtener un rendimiento alto en la síntesis de la primera cadena del cDNA, para de esta manera comenzar con una cantidad suficiente de cDNA para su clonación. Ciertos reportes (82) sugieren que al efectuar la síntesis de la primera cadena del cDNA en presencia de Actinomicina D, se obtienen moléculas de cDNA de mayor tamaño, ya que la transcripción se favorece hacia el extremo 3' terminal del RNA que se utiliza como templado. Para la optimización de la reacción de síntesis de la primera cadena del cDNA, primeramente se probó la enzima transcriptasa reversa del virus de mieloblastosis avial, en ausencia y presencia de 100ug/ml de Actinomicina D. Para esta titulación, se utilizó un microgramo de RNA poli(A)<sup>++</sup> de hipotálamo de rata como templado y 10 unidades de enzima (transcriptasa reversa, Boehringer Manh.) por microgramo de RNA bajo las condiciones descritas en la sección de métodos. Mediante el análisis de la eficiencia de reacción por incorporación de radioactividad a DNA acoplado a filtros de intercambio iónico DE81, se observa que en presencia de Actinomicina D se obtienen aproximadamente 100ng de cDNA/ug de mRNA, es decir se obtiene un rendimiento del 10% de síntesis del cDNA, mientras que los rendimientos de transcripción en ausencia de Actinomicina D, son de 50ng de cDNA/ug de mRNA, es decir el 5% de eficiencia de síntesis de cDNA. Apparently el tamaño promedio del cDNA sintetizado en presencia de Actinomicina D es ligeramente mayor que en ausencia de Actinomicina D (figura 9).

Dado que la eficiencia de la reacción no es lo suficientemente alta, se realizó una titulación de la transcriptasa reversa a concentración variable de enzima, utilizando enzimas de distintas casas comerciales. Para la titulación de las enzimas, se utilizó un microgramo de RNA poli(A)<sup>++</sup> de hipotálamo de rata como templado, y todas las reacciones se realizaron en presencia de 50ug/ml o 100ug/ml de Actinomicina D. En la tabla 2 se muestran los resultados de esta titulación. Se observa que el rendimiento en síntesis de la primera cadena de cDNA aumenta proporcionalmente a la concentración utilizada de la enzima. Se observó que la actividad transcripcional de cada enzima es variable en cada ensayo, y que la actividad transcripcional más alta por unidad de enzima se obtiene con la transcriptasa reversa de virus de mieloblastosis de ave proveniente de la casa comercial Biotech. En general, los rendimientos variaron de un 10 a un 30% de síntesis de la primera cadena de cDNA, siendo ligeramente mayores cuando la concentración de Actinomicina D en la reacción es de 50ug/ml. La figura 10 muestra el análisis electroforético de las distintas preparaciones de cDNA cadenas sencillas (cDNA-cs), obteniéndose en todos los casos moléculas de alto peso molecular (más de 1,500 nucleótidos en promedio).

Para la creación del banco de cDNA de hipotálamo de rata, la primera cadena del cDNA se sintetizó a partir de 5ug de RNA poli(A)<sup>++</sup> en presencia de 50ug/ml de Actinomicina D, 15uCi de <sup>32</sup>P- $\alpha$ -dCTP (7000 Ci/mmol) y 10U de transcriptasa reversa (Life Sci.) por microgramo de RNA, en un volumen final de 100ul. El rendimiento de síntesis fue del

18%, obteniéndose 865ng de cDNA-cs a una actividad específica de  $1.02 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ g ( $0.586 \mu$ Ci/ $\mu$ g de cDNA). Mediante el análisis electroforético en gel de Acrilamida 5%, Urea 8M, se observó que el cDNA es mayor de 1,500 nucleótidos en promedio (figura 11).

#### B).-SINTESIS DE LA SEGUNDA CADENA DEL cDNA.

La síntesis de la segunda cadena del cDNA se llevó a cabo utilizando aproximadamente 860ng de cDNA cadena sencilla como templado. La reacción se llevó a cabo primeramente mediante la polimerización del DNA con el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I, en presencia de  $15 \mu$ Ci de  $^{32}$ P- $\alpha$ -dCTP, seguido de la incubación en presencia de 22 unidades de transcriptasa reversa (Life Sci.) para favorecer la extensión hacia el extremo 5' del DNA. El rendimiento de síntesis de la segunda cadena del cDNA fue del 45%, obteniéndose aproximadamente 310ng de DNA con una actividad específica de  $0.578 \mu$ Ci/ $\mu$ g de DNA. Para aumentar la cantidad de moléculas completas de cDNA doble cadena, se realizó una segunda reacción de polimerización del DNA con el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I, por 20 hrs a  $15^{\circ}$ C en presencia de dATP, dCTP, dGTP y TTP no radioactivos. El análisis electroforético en gel de Acrilamida 5%, Urea 8M en solución TBE 1X muestra la eficiencia de síntesis de la segunda cadena de cDNA, observándose moléculas de cDNA doble cadena de alto peso molecular (figura 11).

#### C).-DIGESTION CON NUCLEASA S1.

Para obtener moléculas de cDNA doble cadena de extremos rasurados, se hace necesario eliminar las secuencias cadena sencilla que restan dentro de estas moléculas (por ejemplo, la horquilla cadena sencilla que se forma como artefacto de la síntesis de la primera cadena del cDNA). La eliminación de las secuencias cadena sencilla se efectuó mediante la digestión con Nucleasa S1. Para determinar la cantidad óptima de enzima necesaria para hidrolizar las secuencias cadena sencilla en los extremos del cDNA doble cadena, se tituló la Nucleasa S1 (BRL, 500 U/ $\mu$ l, una unidad hidroliza  $\mu$ g de DNA desnaturalizado en 1 min a  $37^{\circ}$ C) a concentración variable de enzima, utilizando aproximadamente 5ng de cDNA-dc como sustrato ( $4,000$  cpm incorporadas a DNA). Los resultados obtenidos en cuanto a decremento de radioactividad incorporada a DNA (por acoplamiento a filtros de intercambio iónico DE81) muestran que a partir de una concentración de  $10$  U/ $\mu$ g de DNA, hasta  $500$  U de enzima / $\mu$ g de DNA disminuye en todos los casos en un 10% la radioactividad incorporada a DNA con respecto al DNA no digerido, se. Mediante análisis electroforético en gel de Acrilamida 5%, Urea 8M, se observa que a partir de una concentración de enzima de  $50$  U/ $\mu$ g de DNA, disminuye la intensidad de la banda de cDNA de alto peso molecular, sin embargo no se observa el barrido en el gel, lo que posiblemente se deba a la hidrólisis parcial del DNA doble cadena (figura 12).

Una vez titulada la enzima, se digirió el cDNA restante con  $250$  U de Nucleasa S1, en un volumen final de  $50 \mu$ l (aproximadamente  $2000$  U/ $\mu$ g de cDNA-dc). Mediante el análisis de los productos de digestión en gel desnaturalizante de Acrilamida al 5%, Urea 8M, se observa que la distribución en tamaño del cDNA se ve disminuido al digerir con la

Nucleasa S1. debido a la separación de ambas cadenas del cDNA por la hidrólisis de las secuencias cadena sencilla (figura 13). La eficiencia de la reacción fue corroborada mediante la determinación de radioactividad incorporada a DNA antes y después de la digestión por Nucleasa S1. La radioactividad incorporada a DNA disminuyó únicamente un 5% al digerir con la enzima, lo que sugiere que el cDNA doble cadena permanece íntegro.

#### D).-METILACION DEL cDNA EN LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN EcoRI.

Para proteger al cDNA de la restricción por la enzima EcoRI cuando este se digiere para generar los extremos cohesivos sobre los adaptadores sintéticos, se metiló el cDNA en sus sitios de restricción EcoRI mediante el uso de la enzima Metilasa de EcoRI y S-Adenosil Metionina. Para comprobar la eficiencia de la reacción, se metiló lug de DNA de plásmido pBR322 superenrollado bajo las mismas condiciones de reacción, para posteriormente digerirlo con 10U de la enzima de restricción EcoRI por 12hrs a 37°C. Mediante el análisis del DNA en electroforesis en minigel de agarosa, se observó que el DNA se protegió totalmente de la digestión por EcoRI (figura 14).

#### E).-FOSFORILACION DE LOS ADAPTADORES DE EcoRI. UNION DE LOS ADAPTADORES AL cDNA.

Los adaptadores de secuencia de reconocimiento por la enzima de restricción EcoRI (sintetizados por la Unidad de Síntesis de Macromoléculas del Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM) fueron fosforilados en presencia de 10Uci de [32-P]-ATP con la enzima Polinucleótido Cinasa de T4. Para comprobar la eficiencia de fosforilación y ligación, los adaptadores se ligaron entre sí utilizando 10 unidades de DNA ligasa de T4 (Boehringer Mannheim). Mediante el análisis electroforético en geles de Acrilamida al 20%, Urea 8M, se observó que a pesar de fosforilar los adaptadores de EcoRI, ciertos lotes de la enzima Polinucleótido Cinasa de T4 inhiben la reacción posterior con la enzima DNA ligasa. Asimismo, se observó que la eficiencia de la reacción con la DNA ligasa depende del lote de adaptadores de EcoRI así como de su pureza. Los rendimientos más altos en cuanto a unión de los adaptadores de EcoRI se obtuvieron mediante el uso combinado de las enzimas Polinucleótido Cinasa de T4 de la casa Biolabs, y la DNA ligasa de T4 de Boehringer Mannheim (resultados no mostrados).

Con el objeto de ligar secuencias terminales cohesivas de EcoRI al cDNA, 10 piconomas de adaptadores de EcoRI (cuyos extremos fueron previamente fosforilados con  $\gamma$ [32-P]-ATP) fueron ligados al cDNA bajo las condiciones descritas en la sección de métodos. Mediante el análisis electroforético del cDNA en geles de Acrilamida al 20%, Urea 8M, se observa la unión de los adaptadores de EcoRI al cDNA, que se denota por el aumento en la intensidad de la banda que corresponde al cDNA radioactivo, observándose también la ligación de los adaptadores entre sí, formando multímeros (figura 15).

#### F).-DIGESTION CON LA ENZIMA DE RESTRICCION EcoRI.

Dado que la union covalente de los adaptadores a los extremos del cDNA involucra la ligación de uno o más adaptadores en ambos extremos, se hace necesario digerir el producto de la reacción con la enzima de restricción EcoRI, para eliminar el exceso de adaptadores, así como para obtener moléculas de cDNA con extremos cohesivos. La digestión del cDNA-adaptadores EcoRI se llevó a cabo como se describe en la sección de métodos. Mediante el análisis electroforético de los productos de digestión, se observa que la digestión de los adaptadores de EcoRI parece ser total, ya que se observa la desaparición de los multímeros generados por la reacción con la DNA ligasa (figura 15).

Una vez digeridos los adaptadores de EcoRI, el cDNA de extremos cohesivos con secuencia de EcoRI fue purificado de los adaptadores en exceso mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephadex-G50, separándose dos picos de radioactividad eluida (fracciones de 4 gotas). Las fracciones correspondientes al primer pico de radioactividad eluida se colectaron y el cDNA fue precipitado y analizado por electroforesis en minigel de agarosa al 0.6% en solución TBE 0.25%, comprobando de esta manera su recuperación e integridad (resultados no mostrados).

#### G).-EFICIENCIA DE LIGACION AL DNA DEL BACTERIOFAGO $\lambda$ gt11. EFICIENCIA DE EMPACAMIENTO E INFECCION.

Dado que la abundancia de los RNA mensajeros específicos que codifican para la síntesis de TRN y de LHRN en el hipotálamo de la rata corresponde a una pequeña proporción del mRNA total de este tejido (posiblemente menos del 0.01% del mRNA total), se hace necesario obtener un banco de cDNA de alto número de recombinantes. El uso de bacteriófagos de tipo lambda como vector de clonación presenta varias ventajas sobre el uso de plásmidos, ya que se obtiene un mayor número de recombinantes debido a la alta eficiencia y reproducibilidad de empacamiento del DNA. La alta eficiencia de clonación de DNA hace posible la búsqueda de clones de cDNA de mRNA de baja abundancia. El bacteriófago  $\lambda$ gt11 es un vector de expresión capaz de producir en gran escala el péptido especificado por el fragmento de DNA insertado. Es posible de esta manera, hacer la búsqueda de la clona específica mediante el uso de anticuerpos específicos o mediante el uso de ácidos nucleicos complementarios (84).

En base a las características que presenta el bacteriófago  $\lambda$ gt11 como vector de clonación, se eligió realizar la clonación del cDNA en este vector, considerando la posibilidad de realizar la búsqueda de las secuencias específicas con ácidos nucleicos detectores (oligonucleótidos sintéticos o cDNA), o en el caso de ser negativa su detección, con anticuerpos específicos que reconocieran al péptido precursor.

Con el objeto de comprobar la eficiencia de ligación del DNA pasajero al DNA del bacteriófago  $\lambda$ gt11, así como la eficiencia de empacamiento del DNA recombinante y la infección por bacteriófagos, se ligó un fragmento de DNA de plásmido (3kb, control del estuche) al DNA digerido en su sitio EcoRI y desfosforilado. Mediante el análisis

electroforético de una alícuota de DNA en minigel de agarosa al 1% en solución TBE 0.25X y tinción del gel con bromuro de etidio, se observó que la reacción de ligación se llevo a cabo en su totalidad (resultados no mostrados). Una vez ligado el DNA, se empacó dentro de capsides de bacteriófago de tipo lambda (estuche "Packagene", Amersham), y una alícuota de la mezcla de empacamiento se utilizó para la infección de la cepa V1090 y la determinación del título de bacteriófagos recombinantes. El título de infección por bacteriófagos recombinantes (placas de lisis transparentes) fue de  $9 \times 10^6$  pfu/ug de DNA, lo que corresponde a un 95% de lo que indica el proveedor.

#### H).-CLONACION DEL cDNA.

El cDNA doble cadena listo para clonar, proveniente de Sug de RNA poli(A)<sup>++</sup> de hipotalamo de rata (aproximadamente 0.5ug de cDNA-dc), fue ligado al DNA de bacteriófago  $\lambda$ gt11 manteniendo una relación equimolar de ambos DNA. Mediante el análisis del DNA por electroforesis en minigel de agarosa, se observó que el cDNA se ligó en su totalidad al DNA del vector de clonación (resultados no mostrados).

La eficiencia de clonación del DNA recombinante fue determinada utilizando un décimo del cDNA ligado al vector de clonación para su empacamiento en capsides de bacteriófago de tipo lambda (utilizando un extracto de empacamiento), y por infección de la cepa E. coli V1090 con una alícuota representativa de la mezcla de empacamiento. El título obtenido de bacteriófagos recombinantes fue de  $3.5 \times 10^6$  unidades formadoras de placas (ufp). Una vez comprobada la eficiencia de clonación, se empacó el DNA restante, utilizando para este propósito el equivalente a 2 extractos de empacamiento. El título de bacteriófagos recombinantes obtenido en este caso fue de  $9.2 \times 10^6$  ufp. La disminución en el título de bacteriófagos recombinantes, probablemente se debe a la saturación de los extractos, al variar la relación extracto de bacteriófago tipo  $\lambda$ : DNA.

De esta manera, fue posible obtener un banco de cDNA de hipotalamo de rata, de aproximadamente  $1.5 \times 10^6$  recombinantes, partiendo de 5ug de RNA poli(A)<sup>++</sup>.

#### I).-TAMAÑO DE LOS INSERTOS DE cDNA.

Para asegurar que los bacteriófagos identificados como recombinantes contuvieran insertos de cDNA, se purificó DNA de 15 bacteriófagos formadores de placas transparentes escogidos al azar, para la detección de los insertos mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI.

Para la visualización de los insertos de cDNA, se utilizaron dos métodos de purificación de DNA de bacteriófagos. De ambos métodos, el que resulta ser más eficiente es el método de purificación de DNA en gran escala, ya que el DNA resultante se obtiene libre de contaminantes, lo que permite la digestión total con la enzima de restricción EcoRI. Para la visualización de los insertos de cDNA, se digirió al equivalente a 10 $\mu$ g de DNA recombinante con la enzima de restricción EcoRI y se sometió a electroforesis en gel de Acrilamida al 5% (figura 16). De esta manera fue posible observar la presencia de fragmentos de DNA de tamaño promedio de 700 pares de bases (de aproximadamente 200 hasta 1600 pares de bases), observándose la presencia de insertos en más de el 50% de los bacteriófagos recombinantes analizados.

#### IV.-SINTESIS Y PURIFICACION DEL OLIGONUCLEOTIDO DE SECUENCIA 100% HOMOLOGA A UN FRAGMENTO DEL cDNA DE TRH DE HIPOTALAMO DE RATA.

El oligonucleótido, de secuencia 100% homologa al cDNA de TRH, corresponde a la secuencia complementaria a la quinta copia de la secuencia que codifica para la síntesis del octapéptido que corresponde al tri péptido TRH, a los pares de residuos de aminoácidos básicos de procesamiento y al residuo glicina que daría lugar al extremo carboxi-terminal amidado en la secuencia del TRH. Esta secuencia de 24 nucleótidos se eligió en base a que es muy similar en cuanto a secuencia nucleotídica a otra de las secuencias que codifican para TRH presenta una mayor conservación nucleotídica dentro del mismo mensajero, y debido a que es la secuencia que presenta un mayor número de pares de bases G-C, lo que le confiere una mayor estabilidad de formación de híbridos.

A partir de 50 mg de resina T utilizada para la síntesis, se obtuvieron aproximadamente 9 nmolas del oligonucleótido puro, de 24 bases. La pureza del oligonucleótido fue comprobada mediante el análisis espectrofotométrico en ultravioleta lejano (320 a 230nm), obteniéndose un pico único de absorbancia a 260nm. El oligonucleótido fue fosforilado en presencia de un exceso de  $\gamma$  [32-P]-ATP, obteniéndose una actividad específica de 1.5 x 10<sup>8</sup> cpm/ $\mu$ g a 2.3 x 10<sup>8</sup> cpm/ $\mu$ g. La figura 17 muestra que mediante el análisis electroforético en gel de Acrilamida al 20%, Urea 8M y exposición del gel a autorradiografía, es posible observar que el oligonucleótido de TRH resultante coincide con oligonucleótidos control de 24 nucleótidos, y que no se observan fragmentos de menor tamaño como contaminantes de la preparación.

V.-HIBRIDIZACION DEL mRNA CON RASTREADORES ESPECIFICOS (NORTHERN).  
CUANTIFICACION DE LOS NIVELES MINIMOS DETECTABLES DEL MENSAJERO DE TRH.

Con el objeto de determinar el peso molecular del mRNA que codifica para la síntesis de TRH en el hipotálamo de la rata, se realizaron ciertos experimentos preliminares de hibridización mRNA de hipotálamo - cDNA de piel de *X. laevis*, ya que en un principio se esperaba cierta homología entre los mensajeros que codifican para la síntesis de TRH en el hipotálamo de la rata y en la piel de *Xenopus laevis*. se propuso realizar la búsqueda del cDNA hipotalámico utilizando como detector el cDNA de piel de *X. laevis*. Con este propósito se sometió RNA poli(A) a electroforesis en geles desnaturalizantes de hidróxido de metilmercurio (89), se transfirió a papel diazo-activado (DBM, con grupos diazonio reactivos (94)) y se hibridizó en condiciones relajadas (a 37°C con 25% formamida, que permite la formación de híbridos con un 33% de no homología) con el cDNA de TRH de piel de *X. laevis* marcado por "nick translation". Los resultados obtenidos de estos experimentos fueron negativos en todos los casos, no observándose hibridización alguna entre el detector y el mRNA de hipotálamo de rata. Esto indicaba que posiblemente existiera una gran divergencia entre ambos mensajeros, o que el mensajero específico de TRH estuviera presente en una pequeña proporción dentro de los mensajeros totales del hipotálamo, por lo que la sensibilidad del ensayo no permitiera su detección.

Una vez publicada la secuencia del RNA mensajero que codifica para la síntesis de TRH en el hipotálamo de la rata (27), se comprobó que existe una gran divergencia nucleotídica entre este mensajero y el mensajero de TRH de piel de *X. laevis*. Únicamente las unidades repetidas (y dispersas en la secuencia precursora) que codifican para el TRH se encuentran mantenidas en ambas especies (figura 2).

Con el objeto de realizar la búsqueda del cDNA de TRH dentro del banco de cDNA hipotalámico, se plantearon ciertos experimentos preliminares de hibridización DNA genómico de rata - oligonucleótido sintético (trabajo realizado por la O.F.B. Rosa Ma. Uribe V.), así como la estrategia de búsqueda en el banco de cDNA. Sin embargo, antes de obtener los primeros resultados mediante la hibridización con el DNA genómico, fue donado a nuestro grupo el cDNA de TRH de hipotálamo de rata aislado e identificado por el Dr. R.M. Goodman (27). En base a esto, se propuso proseguir con los experimentos preliminares para la detección y cuantificación del mRNA de hipotálamo de rata, para su posterior utilización en estudios de regulación de la biosíntesis mediante hibridizaciones mRNA - cDNA tipo Northern. Dada la disponibilidad del cDNA de TRH de hipotálamo de rata, se decidió dejar por un lado la búsqueda de este cDNA dentro del banco creado durante este trabajo; sin embargo, el banco de cDNA hipotalámico será utilizado en un futuro para la búsqueda e identificación de los mensajeros que codifican para otros péptidos y enzimas de interés para nuestro grupo, como por ejemplo el de la enzima Piroglutamato Aminopeptidasa membranal.

Para la detección del mRNA de TRH mediante hibridizaciones tipo Northern, 20ug de RNA poli(A)+ de hipotálamo de rata, 20ug de RNA poli(A)+ de cerebro extrahipotalámico, así como 20ug de RNA total de hipotálamo de rata (RNA citoplásmico) y 20ug de RNA total de *E. coli*

fueron sometidos a electroforesis en gel desnaturalizante de Agarosa-Formaldehído y transferidos a membrana de nitrocelulosa. El RNA acoplado a la membrana se hibridizó con 100ng del fragmento de cDNA de TRH marcado por "nick translation", a una actividad específica de  $6 \times 10^6$  cpm/ug, a una concentración final de  $1.2 \times 10^7$  cpm/ml. La hibridización se llevó a cabo por 48 hrs. bajo condiciones estrictas de fuerza iónica y temperatura (ver sección de métodos). En la figura 18 se observa que después de 2 días de exposición del gel a autorradiografía, es posible observar una banda intensa de hibridización con el RNA poli(A)+ de hipotálamo de rata, de 1,700 bases, lo que corresponde al tamaño molecular descrito para el mRNA de TRH en esta especie (27). Asimismo, es posible observar una banda tenue de hibridización entre el RNA total de hipotálamo de rata y el cDNA, siendo que no se observa banda alguna con el RNA poli(A)+ de cerebro extrahipotalámico.

Para determinar la cantidad mínima necesaria de RNA poli(A)+ para poder detectar el mRNA de TRH, se sometieron a electroforesis en gel de Agarosa-Formaldehído, cantidades variables de RNA poli(A)+ de hipotálamo de rata, ajustando la concentración total de la muestra a 10ug de RNA con RNA poli(A)+ de cerebro extrahipotalámico. La transferencia e hibridización se realizaron bajo las mismas condiciones, excepto que la actividad específica del cDNA fue en este caso de  $4.5 \times 10^6$  cpm/ug, estando presente a una concentración final de  $4.5 \times 10^6$  cpm/ug. En la figura 19 se observa que después de 2 días de exposición de la membrana a autorradiografía, es posible detectar una banda específica de hibridización hasta con 0.1ug de RNA poli(A)+ de hipotálamo de rata (0.1ug de RNA de hipotálamo + 9.9ug de RNA de cerebro extrahipotalámico).

Con el objeto de determinar la posibilidad de detectar el mRNA de TRH de hipotálamo de ratón, mediante la hibridización con el cDNA de hipotálamo de rata, 10ug de RNA poli(A)+ de hipotálamo de ratón fueron sometidos a electroforesis en gel de Agarosa-Formaldehído, y fueron transferidos e hibridizados dentro del experimento anterior de titulación del RNA de hipotálamo de rata. En la figura 19 se observa que es posible detectar una banda específica de hibridización de 1,700 bases, lo que coincide con el tamaño del mensajero de hipotálamo de rata, sin embargo la intensidad de la banda es mucho menor de lo que se obtiene al utilizar la misma cantidad de mRNA de hipotálamo de rata, lo que puede sugerir una menor abundancia del mensajero en el ratón, o mayor divergencia en cuanto secuencia nucleotídica entre los mensajeros de ambas especies.

En los experimentos en que se utilizó el oligonucleótido sintético de TRH como rastreador en hibridizaciones tipo Northern, 20ug de RNA poli(A)+ de hipotálamo de rata y de cerebro extrahipotalámico fueron sometidos a electroforesis en gel de Agarosa-Formaldehído y fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa bajo las mismas condiciones que en los experimentos anteriores. La prehibridización e hibridización se llevaron a cabo como se describe en la sección de métodos para el uso de oligonucleótidos sintéticos, con el oligonucleótido de TRH marcado a una actividad específica de  $2.3 \times 10^6$  cpm/ug. En la figura 20 se observa un alto grado de hibridización no específica del oligonucleótido con los RNA ribosomales, no siendo

posible la observación de la banda de hibridización del mRNA específico de TRH, a pesar de realizar los lavados a altas temperaturas.

## DISCUSION DE RESULTADOS

Los estudios realizados con el objeto de inmunoprecipitar el precursor de LHRH mediante el uso de anticuerpos policlonales anti-LHRH, demostraron la dificultad para identificar este péptido de entre los productos de traducción de RNA tanto de hipotálamo de rata como de placenta humana. Los resultados obtenidos con respecto a la sensibilidad del ensayo, sugieren que el RNA mensajero de LHRH es menor al 0.01% del mRNA hipotalámico. Estos datos sobre la baja abundancia del mensajero de LHRH se correlacionan con observaciones de otros grupos sobre la existencia de pocos cuerpos neuronales de LHRH en el cerebro, y con datos de estudios in vivo que sugieren un bajo nivel de biosíntesis y recambio de LHRH (73,93,95), así como con estudios preliminares de nuestro grupo en el uso de oligonucleótidos sintéticos para detectar el mRNA de LHRH. Sin embargo, existe la posibilidad de que aunado al problema de sensibilidad del ensayo, el reconocimiento de los anticuerpos por la secuencia del LHRH dentro del precursor sea de tan baja afinidad que impida la detección de dicho péptido aun enriqueciendo el mRNA que codifica para este péptido. Asimismo, hemos observado que ciertos anticuerpos policlonales anti-LHRH reconocen inespecíficamente una proteína de alto peso molecular (50,000 daltones) presente en varias especies y tejidos, lo que resultó ser una señal falsa positiva durante la realización de este estudio. G. Fink ha demostrado en varios estudios (65,66) que mediante el uso de anticuerpos policlonales anti-LHRH, es capaz de reconocer un péptido de 28,000 daltones dentro de los productos de traducción de mRNA de rata y ratón bajo distintas condiciones fisiológicas. Sin embargo, este péptido es reconocido únicamente dentro de los productos de traducción marcados con Leucina tritiada, y no corresponde el peso molecular del precursor identificado a partir de la secuencia del cDNA (68). Es posible que las observaciones del grupo de G. Fink se deban también a artificios del sistema de detección con anticuerpos policlonales.

Como otro enfoque en la búsqueda del péptido precursor de LHRH, se generaron en el laboratorio anticuerpos monoclonales anti-LHRH (72) esperando que entre los anticuerpos generados uno o más fueran capaces de reconocer la secuencia del LHRH dentro de un péptido de mayor peso molecular. Esto sería más probable si el sitio antigénico correspondiera a la parte central de la molécula, generándose así un anticuerpo de alta especificidad y pureza, con lo que posiblemente se facilitaría la detección del precursor. Entre los anticuerpos monoclonales generados, se obtuvo únicamente un tipo de monoclonal cuyo sitio antigénico o epítipo principal corresponde al extremo carboxi terminal del decapéptido, sin embargo reconoce con mayor afinidad la estructura conformacional de doblamiento de la molécula de LHRH. A pesar de esto, se podría esperar que este anticuerpo monoclonal anti-LHRH pudiera reconocer esta secuencia dentro de una molécula de mayor tamaño. Es por esto que se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de los productos de traducción de RNA mensajero, obtenido de hipotálamos de animales bajo condiciones experimentales en que se ha sugerido un aumento en la biosíntesis de novo del LHRH. Sin embargo, los resultados fueron negativos, sugiriendo que o bien el anticuerpo no es capaz de reconocer péptidos precursores debido a su alta especificidad hacia el extremo carboxi terminal del decapéptido

y/o que la sensibilidad del ensayo no es lo suficientemente alta como para detectar péptidos sintetizados en tan baja abundancia. Asimismo, este trabajo confirma que el uso de anticuerpos policlonales en este tipo de estudios puede dar lugar a resultados falsos, debido a la unión no específica de péptidos radioactivos a las proteínas y anticuerpos que componen el suero.

Experimentos preliminares de hibridización de mRNA de hipotálamo de rata con oligonucleótidos sintéticos para la detección del mRNA de LHRH (96) dieron resultados negativos en todos los casos. Esto, junto con lo observado por el grupo de P.H. Seeburg en que no es posible detectar el mRNA de LHRH hipotalámico mediante hibridizaciones tipo "Northern" con el cDNA específico (comunicación personal), confirma la baja proporción en que este mensajero está presente en el hipotálamo, lo que impide realizar estudios de la regulación de la biosíntesis utilizando estos métodos convencionales en este tipo de estudios. Una de las alternativas a este estudio es detectar los cambios en los niveles del mensajero específico de LHRH directamente dentro de la neurona LHRHérgica, lo que es posible mediante hibridizaciones in situ (97).

Por esta razón decidimos abandonar el intento de identificar el cDNA de LHRH de hipotálamo de rata, así como la obtención de rastreadores específicos para la realización de estudios de regulación de la biosíntesis de este neuropéptido. A partir de este momento, nuestros esfuerzos fueron enfocados al estudio de la biosíntesis de TRH ya que existían evidencias sugiriendo una mayor riqueza de su mRNA (98).

Con el objeto de poder caracterizar tanto el precursor peptídico como el RNA mensajero que codifican para la síntesis de TRH, se propuso crear un banco de DNA complementario enriquecido en las secuencias del hipotálamo, para facilitar la búsqueda del cDNA en cuestión. La utilización de Actinomicina D durante la síntesis de la primera cadena del cDNA dió lugar a la obtención de moléculas de al parecer mayor extensión hacia el extremo 5' del mRNA utilizado como templado (RNA-polii(A)<sup>++</sup> de hipotálamo de rata), obteniéndose a su vez mayores rendimientos de síntesis. Se ha postulado que en presencia de Actinomicina D se sintetiza una horquilla corta en el extremo 3' de la primera cadena del cDNA, que sirve como iniciador para la DNA polimerasa I (82).

Con el propósito de enriquecer el cDNA en secuencias exclusivas del hipotálamo, se propuso hibridizar el cDNA hipotalámico con mRNA de cerebro de rata para eliminar las secuencias comunes entre estos dos tejidos. Mediante el análisis de la literatura (99,100), se llegó a la conclusión de que dada la complejidad del RNA mensajero de cerebro, que es de  $2.5 \times 10^6$  nucleótidos (150,000 mensajeros distintos de aproximadamente 1500 bases en promedio), es necesario hibridizar a un valor de Rot teórico de 82.8 moles nucl. seg/lt para eliminar el 50% de las secuencias comunes, que representa las secuencias de abundancia intermedia. En base a esto, se estableció hibridizar a valores intermedios (50 y 500 moles nucl. seg/lt) para tener una curva experimental en la cual basarse. El cDNA cadena sencilla (de secuencias

de hipotálamo enriquecidas y secuencias de baja abundancia) fue separado del híbrido cDNA-RNA mediante cromatografía en hidroxipatita (101). Los resultados obtenidos no reflejaron lo esperado teóricamente, y mostraron la necesidad de una alta cantidad de cDNA cadena sencilla para obtener rendimientos suficientes para continuar con la síntesis del cDNA enriquecido y su clonación.

Es por esta razón, que se establecieron las condiciones para crear un banco de cDNA total, no enriquecido que diera lugar a un alto número de recombinantes para aumentar la probabilidad de obtener al menos una clona que contuviera el cDNA de TRH. Uno de los problemas generados durante la creación del banco de cDNA fue el optimizar las reacciones que involucran la utilización de las enzimas Transcriptasa reversa, DNA polimerasa I y Nucleasa S1. Sin embargo, el paso más problemático y crítico durante la síntesis resultó ser la fosforilación y ligación de los adaptadores de EcoRI al cDNA, para su posterior ligación al vector de clonación. El protocolo establecido de síntesis y clonación del cDNA dió resultados exitosos, dando lugar así a la creación de un banco de alto número de recombinantes ( $1.5 \times 10^6$  ufp recombinantes), con insertos de 700 pares de bases como promedio. En base a lo publicado posteriormente (27) para la caracterización del cDNA de TRH en hipotálamo de rata, este cDNA estaría representado de 2 a 10 veces en el banco generado en nuestro laboratorio (4 copias del cDNA por cada  $3 \times 10^6$  recombinantes).

Ciertos resultados preliminares de nuestro grupo (96) parecían sugerir una baja conservación nucleotídica entre las secuencias del mRNA de TRH de hipotálamo de rata y de piel de *Xenopus laevis*, dado que no fue posible identificar el mRNA de TRH de hipotálamo de rata mediante hibridizaciones tipo "Northern" utilizando el cDNA de *X. laevis* como rastreador. Esto fue comprobado al publicarse la secuencia del cDNA de hipotálamo de rata (27) antes de iniciarse la búsqueda de este cDNA dentro del banco de cDNA generado en el laboratorio. Debido a que cronológicamente a este momento no era accesible a nuestro grupo la clona del cDNA ya caracterizado por R.H. Goodman, decidimos sintetizar un oligonucleótido sintético 100% homólogo a una de las secuencias de TRH dentro de la secuencia del cDNA reportado. Este oligonucleótido sería utilizado para el rastreo del banco de cDNA hipotalámico, así como para la detección del mRNA específico, en estudios preliminares de hibridización tipo "Northern".

Hemos observado que mediante hibridizaciones DNA genómico-oligonucleótido de TRH ("Southern") y de tipo "Northern", no fue posible detectar alguna señal de hibridización específica. Esto probablemente se deba a la baja sensibilidad que se obtiene mediante el uso del oligonucleótido dado su pequeño tamaño (24mero) y su baja proporción de residuos G-C dentro de la secuencia, lo que da una menor estabilidad en formación de híbridos. A su vez, se observa un alto nivel de pegado inespecífico a los RNA ribosomales, que podría estar enmascarando una señal positiva. Asimismo, el no detectar una señal positiva se podría deber a la actividad específica resultante al fosforilar el oligonucleótido, que podría no ser lo suficientemente alta como para proporcionar una alta sensibilidad al ensayo, lo que se correlaciona con el hecho de no observar banda alguna de hibridización con el DNA genómico (resultados no mostrados).

En base a los resultados anteriores, se pensó que la búsqueda y rastreo del cDNA de TRH con el oligonucleótido se verían complicados debido a la inestabilidad del híbrido que forma el 24mero. Existen ciertos reportes del uso de oligonucleótidos sintéticos para la hibridización con mRNAs abundantes como el de la vasopresina, en que es posible detectar el mensajero específico tanto en hibridizaciones tipo Northern como en hibridización in situ, sin embargo, esto se facilita por el tamaño del oligonucleótido, así como por el porcentaje de residuos G-C y la abundancia del mRNA (35). Gracias a la donación del cDNA de TRH por el Dr. R.H. Goodman, se decidió proseguir con la realización de los experimentos preliminares de hibridización tipo "northern", utilizando este cDNA como rastreador, para posteriormente continuar con la cuantificación de los niveles del mRNA en estudios de la regulación de la biosíntesis de TRH.

Hemos determinado que es posible purificar cantidades suficientes de RNA total a partir de únicamente un hipotálamo de rata mediante la obtención de RNA citoplásmico, pudiéndose a su vez detectar el mRNA específico de TRH a partir de 20ug de esta preparación de RNA por hibridización con el cDNA hipotalámico. El hecho de que sea posible detectar específicamente el mRNA de TRH partiendo de únicamente 0.1ug de RNA-poli(A)<sup>+</sup> de hipotálamo de rata, sugiere la posibilidad de realizar experimentos de regulación a nivel transcripcional, utilizando el mínimo de sujetos experimentales, con la posibilidad de poder detectar cambios en los niveles del mensajero entre una y otra condiciones experimentales.

## CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo experimental, pudimos darnos cuenta de la dificultad que implica el tratar de determinar el mecanismo de síntesis de neuropéptidos presentes en tan baja proporción en un tejido dado, como es el caso del LHRH y del TRH hipotalámicos. A pesar de haber utilizado varios enfoques metodológicos no nos fue posible llegar a la caracterización final de los mRNAs que codifican para ambos péptidos, antes de que esto fuera publicado por otros grupos en el extranjero. Sin embargo, hemos aportado algunos datos en cuanto al estudio de la biosíntesis de LHRH (artículo), y hemos sido capaces de generar un banco de cDNA de hipotálamo de rata, que si bien no será utilizado para la caracterización del mRNA de TRH, será de gran utilidad para la caracterización de otras moléculas de interés para nuestro grupo, como por ejemplo el de la enzima Piroglutamato Aminopeptidasa membranar, responsable de la degradación del TRH.

Actualmente, en el laboratorio se están iniciando los estudios de regulación de la biosíntesis de TRH a nivel transcripcional, mediante la determinación de los niveles del mensajero en animales bajo distintas condiciones fisiológicas en las que se ha sugerido que puede ocurrir un cambio en la biosíntesis de este neuropéptido.

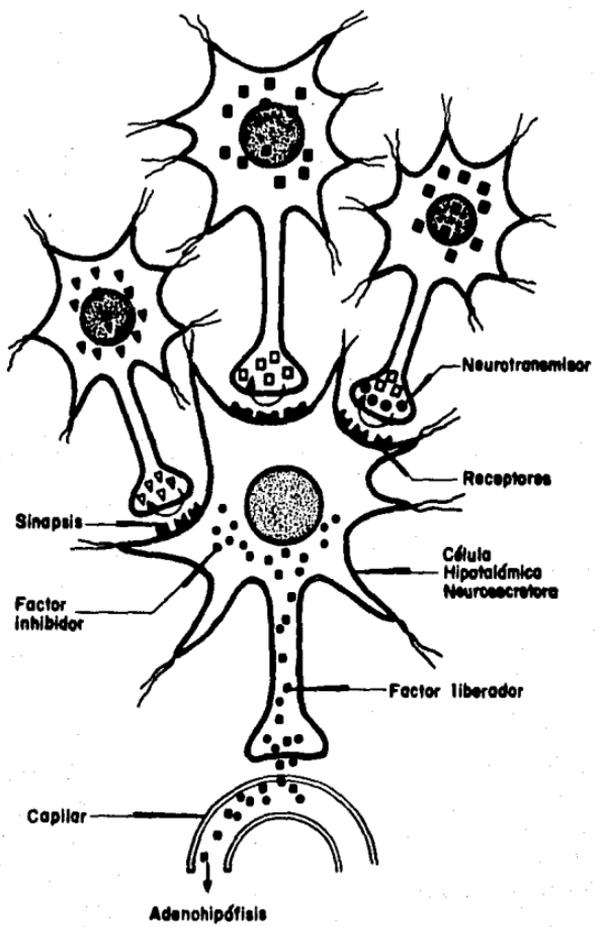
METODO DE PURIFICACION	RNA TOTAL	RENDIMIENTO (ug de RNA/gr de tejido) RNA POLI(A)+	RNA POLI(A)++	PRESENCIA DE:	
				tRNA	DNA
GnHCl-Proteinasa K (Macrométodo)	1000 ug/g	50-100 ug/g (100 ug/mg RNA total)	9-12 ug/g	NO	NO
GnHCl-Cloroformo/butanol (Macrométodo)	700 ug/g	30-70 ug/g (100 ug/mg RNA total)	5-7 ug/g	NO	NO
GnHCl-Proteinasa K (Micrométodo)	360 ug/g	---	---	NO	NO
GnHCl-Cloroformo/butanol (Micrométodo)	27 ug/g	---	---	NO	NO
GnSCN-CsCl	625 ug/g	---	---	NO	NO
RNA citoplasmico	1100 ug/g	---	---	SI	NO

**TABLA 1.- COMPARACION ENTRE DISTINTAS PREPARACIONES DE RNA**

Notas: GnHCl.- Hidrocloruro de Guanidina.  
 GnSCN.- Tiocianato de Guanidina.  
 CsCl.- Cloruro de Cesio

ENZIMA	CONCENTRACION ( U/ug de RNA)	ACTINOMICINA D (ug/ml)	CONC. RNA (ug/reacción)	RENDIMIENTO (ug cDNA)	EFICIENCIA DE REACCION
Boehringer M.	10 U/ug	---	1 ug	0.090 ug	5X
Boehringer M.	10 U/ug	100 ug/ml	1 ug	0.102 ug	10X
Boehringer M.	10 U/ug (90 min)	100 ug/ml	1 ug	0.135 ug	13X
Boehringer M.	25 U/ug	100 ug/ml	1 ug	0.236 ug	23X
Boehringer M.	50 U/ug	100 ug/ml	1 ug	0.324 ug	32X
Boehringer M.	50 U/ug	100 ug/ml	5 ug	1.00 ug	20X
Promega Biotech. (lote 1)	10 U/ug	100 ug/ml	1 ug	0.218 ug	21X
Promega Biotech. (lote 2)	10 U/ug	100 ug/ml	1 ug	0.117 ug	11X
Promega Biotech. (lote 1)	10 U/ug	100 ug/ml	5 ug	0.939 ug	18X
Promega Biotech. (lote 1)	10 U/ug	50 ug/ml	5 ug	1.425 ug	28X
Life Science	10 U/ug	50 ug/ml	5 ug	0.900 ug	19X

**TABLA 2. COMPARACION ENTRE DISTINTAS ENZIMAS PARA LA SINTESIS DEL cDNA CADENA SENCILLA**



**Fig 1 Interacción de la Neurona Neurosecretora con su órgano blanco**



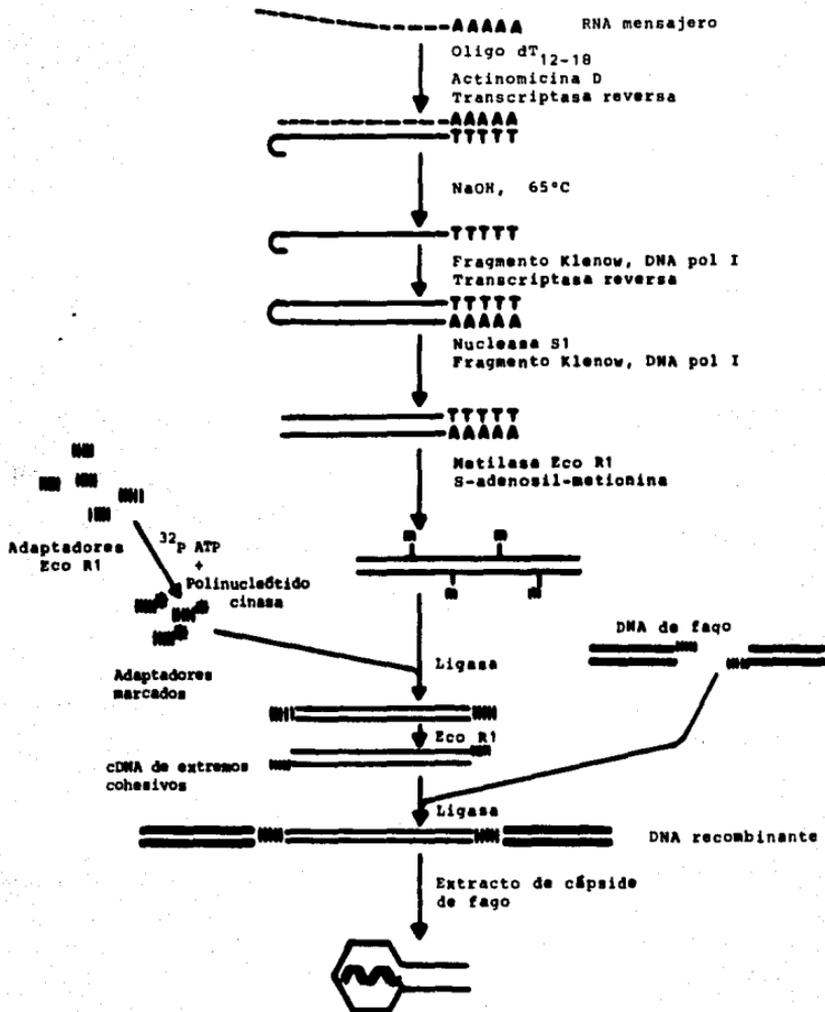
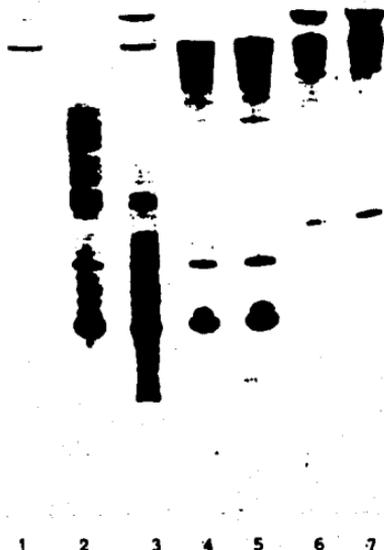


FIGURA 3 .- Esquema de Síntesis y Clonación del cDNA Hipotalámico



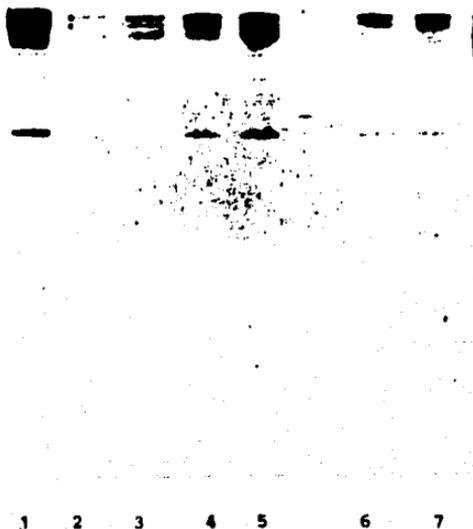
**Figura 4.- Análisis electroforético de RNA poli(A)<sup>++</sup>. Macrométodo de purificación de RNA total.**

Tres microgramos de cada preparación de RNA fueron ya sea tratados con DNasa libre de RNasa, o sometidos directamente a electroforesis en gel de Acrilamida al 5%, Urea 8M en solución TBE 1X. Los ácidos nucleicos fueron teñidos con bromuro de etidio al 0.01% en agua, y el gel fue fotografiado bajo iluminación con luz ultravioleta.

- 1) Iug de DNA del plásmido pBR322 sin digerir.
- 2) RNA total de E. coli + Iug de DNA de pBR322. Tratado con DNasa.
- 3) RNA total de E. coli + Iug de DNA de pBR322.
- 4) RNA total de E. coli. Tratado con DNasa.
- 5) RNA total de E. coli.
- 6) RNA poli(A)<sup>++</sup> de hipotálamo de rata (GnHCl-Prot K). Tratado con DNasa
- 7) RNA poli(A)<sup>++</sup> de hipotálamo de rata (GnHCl-Prot K)

**Notas:** En 2 y 3 se observa la degradación parcial del RNA debido a RNasas presentes como contaminantes en la preparación de DNA del plásmido pBR322.

GnHCl-Prot K.- Método de purificación de RNA total, hidrocloreuro de guanidina - tratamiento con Proteinasa K.

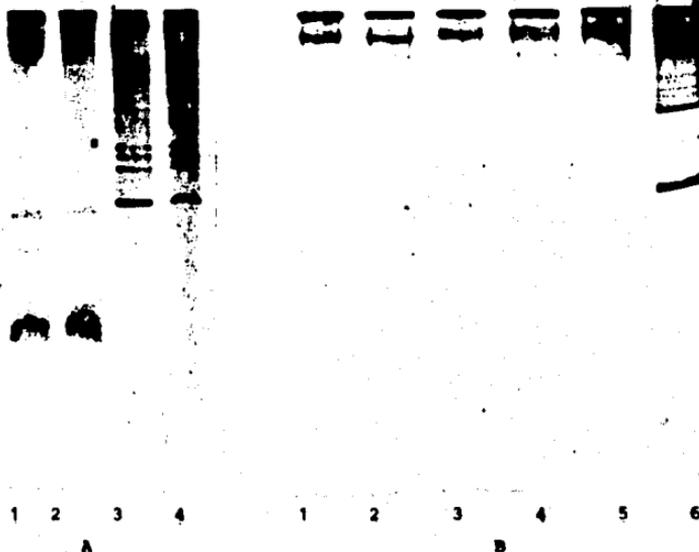


**Figura 5.- Análisis electroforético de RNA total de hipotálamo de rata.**

De 1 a 6  $\mu$ g de RNA total de hipotálamo de rata obtenido por distintos métodos de purificación fueron sometidos a electroforesis en gel de Acrilamida al 6%, Urea 6M en solución TBE 1X. La tinción se realizó con bromuro de etidio y el gel se fotografió bajo iluminación con luz ultravioleta.

- 1) 6 $\mu$ g de RNA purificado por el método de GmSCN-CsCl.
- 2) 1 $\mu$ g de RNA purificado por el método de GmHCl-Prot K.
- 3) 3 $\mu$ g de RNA purificado por el método de GmHCl-Prot K.
- 4) 5 $\mu$ g de RNA purificado por el método de GmHCl-Prot K.
- 5) 3 $\mu$ g de RNA purificado por el método de RNA citoplasmico (preparacion 1)
- 6) 3 $\mu$ g de RNA purificado por el método de RNA citoplasmico (preparacion 2).
- 7) 3 $\mu$ g de RNA purificado por el método de RNA citoplasmico (preparacion 3).

Notas: GmSCN-CsCl.- método de purificación con tiocianato de guanidina - gradiente de cloruro de cesio, GmHCl-Prot K.- método de hidrocioruro de guanidina - tratamiento con Proteinasa K.



**Figura 6.- Análisis electroforético de RNA total de cerebro extrahipotalámico e hipotálamo de rata.**

Distintas preparaciones de RNA (3ug) fueron sometidas a electroforesis en gel de Acrilamida al 6%, Urea 8M en solución TBE 1X, antes y después de la digestión con DNAsa libre de RNAsas. La tinción se realizó con bromuro de etidio y el gel se fotografió bajo iluminación con luz ultravioleta.

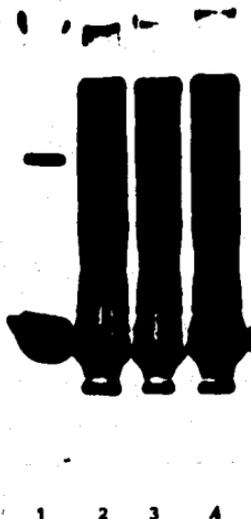
A.-

- 1) RNA de hipotálamo (RNA citoplásmico).
- 2) RNA de hipotálamo (RNA citoplásmico). Tratado con DNAsa.
- 3) RNA de hipotálamo (GnSCN-CsCl)
- 4) RNA de hipotálamo (GnSCN-CsCl). Tratado con DNAsa.

B.-

- 1) RNA de cerebro (GnHCl-Prot K).
- 2) RNA de cerebro (GnHCl-Prot K). Tratado con DNAsa.
- 3) RNA poli(A)+ de hipotálamo (GnHCl-Prot K)
- 4) RNA poli(A)+ de hipotálamo (GnHCl-Prot K). Tratado con DNAsa.
- 5) RNA poli(A)+ de hipotálamo (GnHCl- Cloroformo/Butanol)
- 6) Sug de RNA no poli(A) de cerebro de rata (fracción que eluye con alta sal de la columna de oligo-dT celulosa).

Notas: GnHCl-Prot K.- método de purificación con hidrocloreuro de guanidina y tratamiento con Proteinasa K. GnHCl-Cloroformo/Butanol.- método de purificación con hidrocloreuro de guanidina y extracción cloroformo/butanol. GnSCN-CsCl método de purificación con tiocianato de guanidina - gradiente de cloruro de cesio.



**Figura 7.- Análisis electroforético de los productos de traducción totales de mRNA de hipotálamo y de cerebro de rata.** Diversas preparaciones de RNA fueron traducidas en lisado de reticulocito de conejo suplementado con  $[^{35}\text{-S}]\text{-Metionina}$ . Alicuotas de 10 $\mu\text{l}$  fueron sometidas a electroforesis en gel de Poliacrilamida - SDS al 15%, y el gel fue tratado para fluorografía. Tiempo de exposición 3 días.

- 1) No RNA
- 2) RNA poli(A) de área preóptica de ratas ovariectomizadas.
- 3) RNA poli(A) de hipotálamo total de ratas macho.
- 4) RNA poli(A) de cerebro extrahipotalámico de ratas macho.

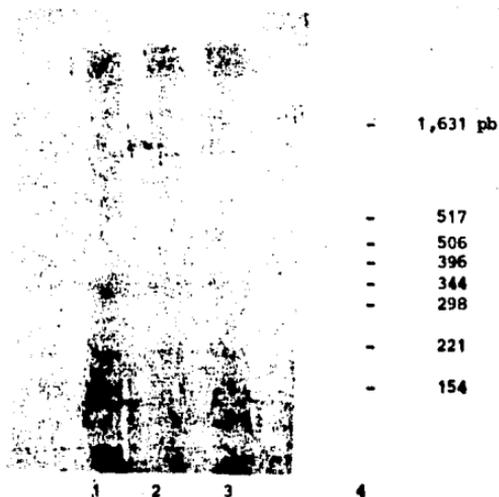


**Figura 8.- Análisis electroforético de los productos de traducción inmunoprecipitados con el anticuerpo monoclonal BKL-2.**

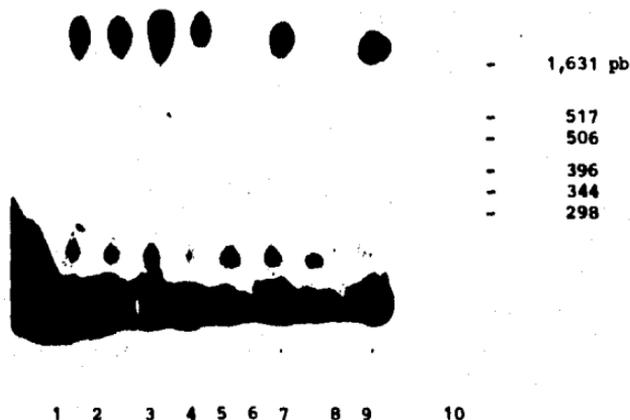
Diversas preparaciones de RNA fueron traducidas en lisado de reticulocito de conejo suplementado con  $[^{35}\text{S}]\text{-Metionina}$ . El equivalente a  $2 \times 10^6$  cpm de productos de traducción fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo monoclonal anti-LHRH BKL2 (120ng/ml) en presencia o en ausencia de LHRH sintético. Los productos inmunoprecipitados fueron purificados y sometidos a electroforesis en gel de Poliacrilamida - SDS al 15%. Tiempo de exposición 8 semanas.

**Productos de:**

- 1) RNA de área preóptica de ratas ovariectomizadas
- 2) RNA de área preóptica de ratas ovariectomizadas, +10ug de LHRH.
- 3) RNA de hipotálamo de rata macho.
- 4) RNA de hipotálamo de rata macho, + 10ug de LHRH.
- 5) RNA de cerebro extrahipotalámico de rata macho.
- 6) RNA de cerebro extrahipotalámico de rata macho, +10ug de LHRH.
- 7) Marcadores de peso molecular (ver artículo).



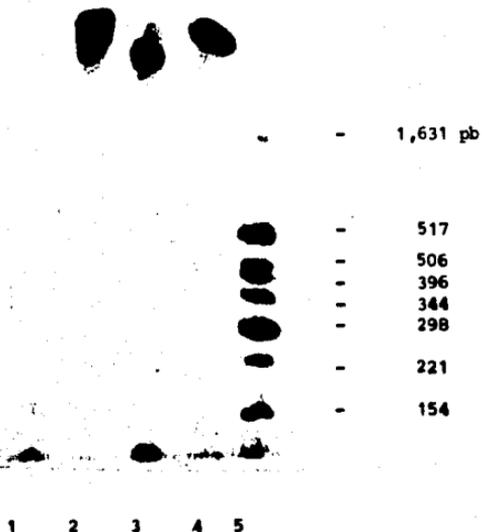
**Figura 9.- Análisis electroforético del cDNA cadena sencilla.**  
 Aproximadamente un décimo de volumen de la mezcla de reacción de síntesis de cDNA cadena sencilla, realizada en ausencia (1 y 2) y presencia (3) de Actinomicina D (100ug/ml), fueron sometidos a electroforesis en gel de Acrilamida al 5%, Urea 8M en solución TBE 1X. (4) DNA del plásmido pBR322 digerido con *Hin* I. Tiempo de exposición del gel a autorradiografía 15 hrs.



**Figura 10.- Análisis electroforético de distintas preparaciones de cDNA cadena sencilla.**

El cDNA cadena sencilla en cada reacción, fue sintetizado a partir de lug de RNA poli(A)<sup>++</sup> utilizando enzimas de distintas casas comerciales. Un décimo de volumen de cada mezcla de reacción fue sometido a electroforesis en gel de Acrilamida 5%, Urea 8M en solución TBE 1X. Tiempo de exposición del gel a autorradiografía 12 hrs.

- 1) 10 U de enzima de Boheringer Manheim. Tiempo de reacción 0 min.
- 2) 10 U de enzima de Boheringer Manheim. Tiempo de reacción 60 min.
- 3) 10 U de enzima de Boheringer Manheim. Tiempo de reacción 90 min.
- 4) 50 U de enzima de Boheringer Manheim. Tiempo de reacción 60 min.
- 5) 25 U de enzima de Boheringer Manheim. Tiempo de reacción 60 min.
- 6) 10 U de enzima de Promega Biotech (lote 1). Tiempo de reacción 0 min.
- 7) 10 U de enzima de Promega Biotech (lote 1). Tiempo de reacción 60 min.
- 8) 10 U de enzima de Promega Biotech (lote 2). Tiempo de reacción 0 min.
- 9) 10 U de enzima de Promega Biotech (lote 2). Tiempo de reacción 60 min.
- 10) DNA de plásmido pBR322 diseñado con Hin f.



**Figura 11.- Análisis electroforético del cDNA cadena sencilla y cDNA doble cadena.**

El cDNA cadena sencilla fue sintetizado a partir de 5µg de RNA poli(A)<sup>++</sup> como se describe en la sección de métodos. Alicuotas de 2.5 µl fueron tomadas a los tiempos 0 (1) y 60 (2) minutos de reacción. La segunda hebra del cDNA fue sintetizada como se describe en la sección de métodos, a partir del cDNA cadena sencilla resultante de la reacción anterior. Alicuotas de 2.5 µl fueron tomadas al principio (3) y final (4) de la reacción. El análisis electroforético se llevó a cabo en gel desnaturizante de Acrilamida al 5%, Urea 8M en solución TBE 1X. Tiempo de exposición a autorradiografía 24 hrs. (5) DNA de plásmido pBR322 digerido con Hin f.

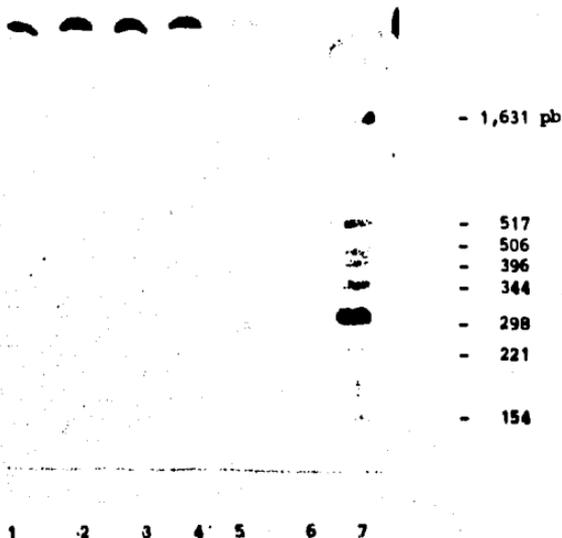
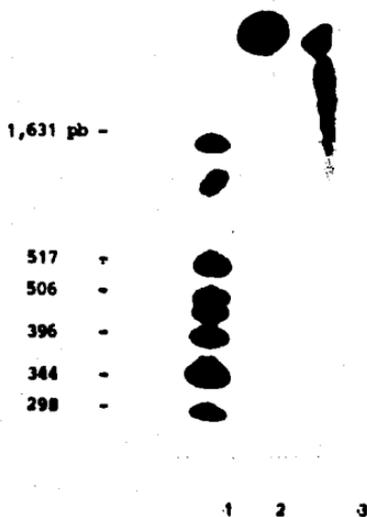


Figura 12.- Titulación de la Nucleasa S1.

Aproximadamente 5ng de cDNA doble cadena (~ 4,000cps) fueron utilizados para la titulación de la Nucleasa S1, por reacción, a concentración variable de enzima bajo las condiciones descritas en la sección de métodos. El análisis se realizó mediante electroforesis en gel de Acrilamida al 5%, Urea 8M en solución TBE IX. Tiempo de exposición del gel a autorradiografía 15 hrs.

- 1) sin enzima
- 2) 0.005 U de enzima (1 U/ug)
- 3) 0.05 U de enzima (10 U/ug)
- 4) 0.5 U de enzima (100 U/ug)
- 5) 5 U de enzima (1000 U/ug)
- 6) 10 U de enzima (2000 U/ug)
- 7) DNA de plásmido pBR322 digerido con Hinf I.



**Figura 13.- Análisis electroforético del cDNA tratado con Nucleasa S1**

Alicuotas de 1ul de la mezcla de reacción con la Nucleasa S1 (volumen final 50ul) fueron tomadas a los tiempos 0 (2) y 1 min (3) , para el análisis electroforético en gel de Acrilamida 5X, Urea 8M en solución TBE 1X. Tiempo de exposición del gel a autorradiografía 15 hrs.

(1) DNA de plásmido pBR322 digerido con *Hin* I.



1 2 3

**Figura 14.- Metilación del DNA en los sitios de restricción EcoRI y protección de la digestión por esta enzima de restricción.**

Un microgramo de DNA del plásmido pBR322 fue ya sea (1) digerido directamente con la enzima de restricción EcoRI o (2) metilado con la Metilasa de EcoRI y S-Adenosil metionina e incubado en presencia de la enzima de restricción EcoRI bajo las mismas condiciones que para el anterior. (3) DNA de plásmido pBR322 sin digerir. El análisis electroforético se realizó en minigel de agarosa al 1% en solución TBE 0.25X. El DNA fue teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo iluminación con luz ultravioleta.



**Figura 15.- Análisis electroforético del cDNA ligado a los adaptadores de EcoRI y digestión con la enzima de restricción EcoRI.**

El cDNA fue ligado a los adaptadores de EcoRI bajo las condiciones descritas en la sección de métodos y posteriormente fue digerido con la enzima de restricción EcoRI. Aliquotas de 1ul antes (2) y después (3) de la digestión con EcoRI fueron analizadas mediante electroforesis en gel de Acrilamida al 20%, Urea 8M en solución TBE 1X. (1) Oligonucleótido de 16 bases utilizado como control (lémero). Tiempo de exposición del gel a autorradiografía 2 días.



**Figura 16.- Caracterización de los insertos de cDNA.**

Aproximadamente 10 $\mu$ g de DNA de bacteriófagos recombinantes (conjuntos de 3 placas aisladas) fueron digeridos con la enzima de restricción EcoRI y sometidos a electroforesis en gel de Acrilamida al 5% en solución TBE 1X. El DNA se tifo con Bromuro de etidio y el gel se fotografió bajo iluminación con luz ultravioleta.

- 1) DNA del plásmido pBR322 digerido con Hinf I.
- 2) DNA de  $\lambda$ titII con inserto control (fragmento de plásmido de 3kb).
- 3) DNA de bacteriófagos recombinantes (conjunto 1)
- 4) DNA de bacteriófagos recombinantes (conjunto 2)
- 5) DNA de bacteriófagos recombinantes (conjunto 3)
- 6) DNA de bacteriófagos recombinantes (conjunto 4)
- 7) DNA de bacteriófagos recombinantes (conjunto 5)
- 8) DNA de bacteriófagos recombinantes sin digerir (conjunto 5).

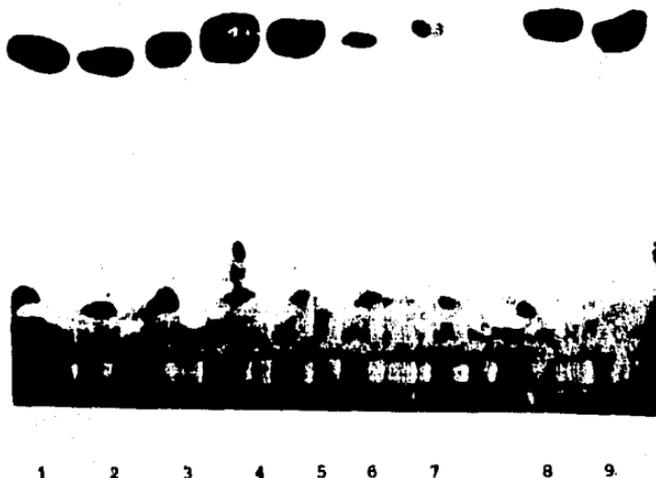


Figura 17.- Marcaje y tamaño del oligonucleótido sintético de TRH.

De 3 a 10 pmolas de distintos oligonucleótidos sintéticos fueron fosforilados con 1 $\mu$ Ci de  $\gamma$ (<sup>32</sup>P)-ATP y 0.1U de la enzima Polinucleótido cinasa de T4, bajo las condiciones descritas en la sección de métodos. El análisis se realizó mediante electroforesis en gel de Acrilamida al 20%, Urea 8M en solución TBE 1X. Tiempo de exposición del gel a autorradiografía 2 hrs.

- 1) 22mero control (3 pmolas)
- 2) 22mero control (1 pmola)
- 3) 22mero de TRH (3 pmolas)
- 4) 24mero de TRH (10 pmolas)
- 5) 24mero control 1 (5pmolas)
- 6) 24mero control 2 (3 pmolas) (no se fosforila eficientemente)
- 7) 27mero control 1 (3 pmolas)
- 8) 27mero control 2 (3 pmolas)
- 9) 27mero control 2 (3 pmolas)

28 S -  
23 S -  
18 S -  
16 S -

1 2 3

**Figura 10.- Detección del mRNA de TRH por hibridación tipo Northern.**

Veinte microgramos de cada preparación de RNA fueron sometidos a electroforesis en gel desnaturalizante de Agarosa 1.5% - Formaldehído 2.2M y fueron transferidos a nitrocelulosa. La hibridación se realizó con 100ng del cDNA de TRH de hipotálamo de rata ( $1.2 \times 10^6$  cpm/ml) como se describe en la sección de métodos. Tiempo de exposición de la membrana a autorradiografía 2 días.

- 1) RNA total de E. coli
- 2) RNA total de hipotálamo de rata (RNA citoplásmico)
- 3) RNA poli(A)+ de hipotálamo de rata

Como marcadores de peso molecular se utilizaron los RNA ribosomales de eucariotes y procariotes, tenidos como se describe en la sección de métodos.

1 2 3 4 5 6 7 8

**Figura 19.- Cuantificación de la cantidad mínima de RNA poli(A)+ de hipotálamo, necesaria para la detección del mensajero de TRH por hibridización tipo Northern.**

Cantidades variables de RNA de hipotálamo de rata y de ratón (ajustando la concentración final del RNA a 10 $\mu$ g con RNA de cerebro extrahipotálamico) fueron sometidas a electroforesis en gel desnaturalizante de Agarosa-Formaldehído y fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa. La hibridización se llevó a cabo utilizando 100ng del cDNA de TRH marcado por "nick translation" (4.5 x 10<sup>6</sup> cpm/ml). Tiempo de exposición de la membrana a autorradiografía 2 días.

- 1) 10 $\mu$ g de RNA poli(A)+ de cerebro extrahipotálamico de rata.
- 2) 10 $\mu$ g de RNA poli(A)+ de hipotálamo de ratón.
- 3) 5 $\mu$ g de RNA poli(A)+ de hipotálamo de rata.
- 4) 1 $\mu$ g de RNA poli(A)+ de hipotálamo de rata.
- 5) 0.5 $\mu$ g de RNA poli(A)+ de hipotálamo de rata.
- 6) 0.1 $\mu$ g de RNA poli(A)+ de hipotálamo de rata.
- 7) 0.05 $\mu$ g de RNA poli(A)+ de hipotálamo de rata.
- 8) 10 $\mu$ g de RNA total de E. coli.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron los RNA ribosomales de eucariotes y procaríotes, tenidos como se describe en la sección de métodos.



- 28 S

- 18 S

1 2

Figura 20.- Caracterización del mRNA de TRH mediante hibridización con el oligonucleótido 100% homólogo (Northern).

Veinte microgramos de RNA poli(A)<sup>+</sup> de cerebro extrahipotalámico (1) y de hipotálamo (2) de rata fueron sometidos a electroforesis en gel desnaturalizante de Agarosa-Formaldehído y fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa. La hibridización se llevó a cabo con el oligonucleótido de TRH marcado a una actividad específica de  $2.3 \times 10^8$  cpm/ug (aproximadamente  $4.5 \times 10^5$  cpm/ml). La membrana fue lavada 2 veces por 5 min a temperatura ambiente y a 37°C. Tiempo de exposición de la membrana a autorradiografía 5 días.

## APENDICE I

### ABREVIATURAS

ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica
CRF	Factor Liberador de la Hormona Adrenocorticotrópica
DNA	Acido desoxiribonucleico
cdNA	DNA complementario al RNA mensajero
DMT	Dimetoxitritilo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilen diamino tetracetico
FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	Acido gama amino butírico
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
LN	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
HEPES	Acido N-2-hidroxi-etilpiperazin N'-2-etansulfónico
IPTS	Isopropil $\beta$ -D-Tiogalactopiranosido
RNA	Acido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
RNA poli(A)	RNA mensajero con cadenas de poliadenina en el extremo 3'
tRNA	RNA de transferencia
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCA	Acido tricloroacético
THF	Tetrahidrofurano
TSH	Tirotrópina u hormona estimulante del tirotropo
IGal	5-bromo-4-cloro-3-indolil $\beta$ D-galactopiranosido

## APENDICE II

### MEDIOS DE CULTIVO.

#### Medio Luria

Triptona	1gr	
Extracto de Levadura	0.5gr	
Cloruro de Sodio	1gr	
Volumen total	100ml	pH 7.5

#### Medio NZYCM

NI Amina	10gr	
Cloruro de magnesio	2gr	
Extracto de Levadura	5gr	
Cloruro de sodio	5gr	
Volumen total	1000ml	pH 7.5

#### Medio Cf

Casaminoácidos	10gr	
Extracto de Levadura	5gr	
Cloruro de sodio	3gr	
Cloruro de potasio	2gr	
Tris-HCl	3gr	
Sulfato de magnesio	1.25gr	
Volumen total	1000ml	pH 7.4

#### Medio SM

Cloruro de sodio	0.1M	
Sulfato de magnesio	0.01M	
Tris-HCl pH7.5	0.05M	
Gelatina	0.01%	

## REFERENCIAS

- 1.- Scharrer B. Peptidergic neurons: Facts and trends. *General and Comparative Endocrinology* 34: 50-62, 1978.
- 2.- Gainer H. The biology of neurosecretory neurons, en: Neurosecretion and Brain Peptides, editado por J.B. Martin, S. Reichlin y K.L. Bick. Raven Press, New York. pp 5-20, 1980.
- 3.- Guillemin R. et al. In vitro secretion of thyrotropin (TSH) stimulation by an hypothalamic peptide TRF. *Endocrinology* 73: 564-572, 1963.
- 4.- Schally A.V., Nair R.G.H., Redding T.W., Arimura A. Isolation of the luteinizing hormone and follicle stimulating hormone - releasing hormone from porcine hypothalamus. *J. Biol. Chem.* 246: 7230-7236, 1971.
- 5.- Brazeau P. et al. Hypothalamic polipeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79, 1973.
- 6.- Guillemin R., Brazeau P., Bohlen P., Esch F., Ling N., Mehseberg M.B. Growth hormone releasing factor from human pancreatic tumor that causes acromegaly. *Science* 218: 585-587, 1982.
- 7.- Rivier J., Spiers J., Thorner M., Vale M. Characterization of a growth hormone releasing factor from a human pancreatic islet tumor. *Nature* 300: 276-278, 1982.
- 8.- Biggins J.A., Das S., Dodd P.R., Edwardson J.A., Hardy J.A., McDermott J.R., Smith A.I. Studies on the release, degradation and presynaptic actions of thyrotropin-releasing hormone, en: Thyrotropin Releasing Hormone editado por E.C. Griffiths y G.W. Bennett, Raven Press, New York pp 241-252, 1983.
- 9.- Sakuma Y., Pfaff D. LHRH in the mesencephalic central gray can potentiate lordosis reflex on female rats. *Nature* 293: 566-567, 1980.
- 10.- Renaud L.P., Martin J.B., Brazeau P., Depressant action of TRH, LHRH and Somatostatin on activity of central neurons, *Nature* 255: 233-235, 1975.
- 11.- Krujevic K., Morris M.E. An excitatory action of Substance P on cuneate neurons. *Can J. Physiol. Pharmacol* 52: 736-744, 1974.
- 12.- Hughes J., Smith T.W., Kosterlitz H.W., Fothergill L.A., Morgan B.A., Morris H.R. Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-579, 1975.

- 13.- Goldstein A., Tachibana S., Lowney L.I., Hunkapiller M., Hood L. Dynorphin (1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6666-6670, 1979.
- 14.- Mitnick M., Reichlin S. Thyrotropin releasing hormone: Biosynthesis by rat hypothalamic fragments in vitro. Science 172: 1241-1243, 1971.
- 15.- Reichlin S., Mitnick M. Biosynthesis of hypophysiotropic hormones, eni Frontiers in Neuroendocrinology editado por W.F. Ganong y L. Martini, New York; Oxford University Press, pp 61-68, 1973.
- 16.- Kennler W., Peterson J.D., Steiner D.F. J. Biol. Chem. 246: 6786-6791, 1971.
- 17.- Herbert E., Uhler M. Polyprotein Precursors to regulatory peptides. Cell 30: 1-2, 1982.
- 18.- Comb M., Rosen M., Seeburg P., Adelman J., Herbert E. Primary structure of the human pro-enkephalin gene. DNA 2: 213-229, 1983.
- 19.- Kakidani H., Furutani Y., Takahashi H., Noda H., Motimoto Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Nakanishi S., Numa S. Cloning sequence analysis of cDNA for porcine -neendorphin/dynorphin precursor. Nature 298: 245-249, 1982.
- 20.- Nava M., Hirose T., Takashima M., Inayama S., Nakanishi S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for two types of bovine Substance P precursor. Nature 306: 32-36, 1983.
- 21.- Walter P., Blobel G. Signal recognition peptide contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. Nature 299: 691-698, 1982.
- 22.- Lingappa M., Katz F.N., Lodish H.F., Blobel G. A signal sequence for the insertion of a transmembrane glycoprotein. J. Biol. Chem. 253: 8667-8670, 1978.
- 23.- Herbert E. Discovery of pro-opiomelanocortin, a cellular polypeptide. TIBS 184-188, 1981.
- 24.- Smith D.G. Massey D.E., Zakarian S., Finnie M.D. Endorphins are stored in biologically active and inactive forms; isolation of N-acetyl peptides. Nature 279: 252-254, 1979.
- 25.- Land H., Schutz G., Schmale H., Richter D. Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding bovine arginine vasopressin - neurophysin II precursor. Nature 295: 299-303, 1982.
- 26.- Land H., Gretz M., Ruppert S., Schmale H., Reibtein M., Richter D., Schutz G. Deduced amino acid sequence from the bovine oxytocin-neurophysin I precursor cDNA. Nature 302: 342-344, 1983.

- 27.- Lechan R.M., Jackson I.M.D., Wolf H., Cooperman S., Mandel G., Goodman R.H. Thyrotropin Releasing Hormone precursors: Characterization in rat brain. *Science* 231; 159-161, 1986.
- 28.- Miller R.P., Wormald P.J., Milton R.C.L. Stimulation of gonadotropin release by a non-GnRH precursor. *Science* 232 ; 68-70, 1985.
- 29.- Peng-Loh Y., Parish D.C., Tuteja R. Purification and characterization of a paired basic residue - specific Pro-opiomelanocortin converting enzyme from bovine pituitary intermediate lobe secretory vesicles. *J. Biol. Chem.* 260; 7194-7205, 1985.
- 30.- Fricker L.D. Neuropeptide biosynthesis: focus on the carboxypeptidase processing enzyme. *TINS* 210-214, 1985.
- 31.- Gomez S., diBello C., Hung L.T., Genet R., Morgan J.L., Fromaget P., Cohen P. C-terminal amidation of neuropeptides.- Gly-Lys-Arg extension an efficient precursor of C-terminal amide. *FEBS letters* 167, 160-164, 1984.
- 32.- Glembocki C.C., Manaker S., Minokur A., Gibson T.R. Ascorbic acid increases the Thyrotropin releasing hormone content of hypothalamic cell cultures. *J. Neurosci.* 6; 1796-1802, 1986.
- 33.- La Gamma E.F., White J.D., Adler J.E., Krause J.E., McKelvy J.F., Black I.B.. Depolarization regulates adrenal preproenkephalin mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82;8252-8255, 1985.
- 34.- Sivan S.P., Hong J.S. GABAergic regulation of enkephalin in rat striatum: Alterations in Met -Enkephalin level, precursor content and proenkephalin messenger RNA abundance. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* 237; 326-331, 1986.
- 35.- Sherman T.S., McKelvy J.F., Watson S.J. Vasopressin mRNA regulation in individual hypothalamic nuclei: A Northern and in situ hybridization analysis. *J. Neurosci.* 6 ; 1685-1694, 1986.
- 36.- Imai A., Gershengern M.C. Evidence for tight coupling of thyrotropin-releasing hormone receptors to stimulated inositol triphosphate formation in rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 260; 10536-10540, 1985.
- 37.- Potter E., Nicolaisen A.K., Ong E.S., Evans R.M., Rosenfeld H.G. Thyrotropin releasing hormone exerts rapid nuclear effects to increase production of the primary prolactin mRNA transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78; 6662-6666, 1981.
- 38.- Jackson I.M.D., Lechan R.M. Thyrotropin releasing hormone. *En: Brain Peptides* Editorial Wiley, pp 661-. 1983.
- 39.- Jackson I.M.D., Reichlin S. Thyrotropin releasing hormone : Abundance in the skin of the frog. *Science* 198; 414-415, 1977.

40.- Faden A.I., Jacobs T.P., Holaday J.W. Thyrotropin releasing hormone improves neurologic recovery after spinal trauma in cats. *N. Engl. J. Med.* 305; 1063-1067, 1981.

41.- Mendez M., Joseph-Bravo P., Vargas M.A., Cisneros M. y J.L. Charli. Sometido a la revista *Peptides*.

42.- Joseph-Bravo P., Charli J.L., Palacios J.M., Kordon C. Neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 104; 801-806, 1979.

43.- Grosvenor C., Mens F. Evidence that thyrotropin-releasing hormone and hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology* 107; 863-867, 1980.

44.- Bauer K., Lipman F. Attempts toward biosynthesis of the thyrotropin releasing hormone studies on its breakdown in hypothalamic tissue preparations. *Endocrinology* 99; 230-242, 1976.

45.- Bauer K., Kleinkauf H. *J Biochem.* 106; 107- , 1980.

46.- Milk S., Friedman T., Milk E.K. FASEB Abstracts de Abril de 1986 y resultados del grupo del Dr. Jean Louis Charli sometidos a publicación.

47.- Richter K., Kawashima E., Egger R., Kreil G. Biosynthesis of thyrotropin releasing hormone in the skin of *Xenopus laevis*: partial sequence of the precursor deduced from cloned cDNA

48.- Sandov J. The regulation of LHRH action at the pituitary and gonadal receptor levels: a review. *Psychoneuroendocrinology* 8; 277-297, 1983.

49.- Andrews W.V., Conn P.M. Gonadotropin releasing hormone stimulates mass changes in phosphoinositides and diacylglycerol accumulation in purified gonadotrope cell cultures. *Endocrinology* 118; 1148-1158, 1986.

50.- Conn M. The molecular basis of gonadotropin releasing hormone action. *Endocrine Reviews* 7; 3-10, 1986.

51.- Witkin J.W., Silverman A.J. Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in rat olfactory systems. *J. Comp. Neurol.* 218; 426-432, 1983.

52.- Sakuma Y., Pfaff D.W. LHRH in the mesencephalic central gray can potentiate lordosis reflex in female rats. *Nature* 283; 566-567, 1980.

53.- Khodr G.S., Siler Khodr T.M. Placental luteinizing hormone releasing factor and its synthesis. *Science* 207; 315-317, 1980.

54.- Sharpe R.M., Fraser N.M. HCG stimulation of testicular LHRH activity. *Nature* 287; 642-643, 1980.

55.- Miyamoto K., Hasegawa Y., Nomura M., Igarashi M., Kangawa K., Matsuo H. Identification of the second GnRH in chicken hypothalamus:

Evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin releasing hormones in avian species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81; 3874-3878, 1984.

56.- King J.A., Millar R.P., Multiple molecular forms of Gonadotropin releasing hormone in Teleost fish brain. Peptides 6; 689-694, 1985.

57.- Powell R.C., King J.A., Millar R.P. [Irp7, Leu8] LHRH in reptilian brain. Peptides 6; 223-227, 1985.

58.- Goddard E.A., Millar R.P., Berman M.C. Factors affecting luteinizing hormone releasing hormone and somatostatin release from rat hypothalamus in vitro. En: Neuropeptides, Biochemical and Physiological Studies. Editado por R.P. Millar, 1981.

59.- Fink G. Feedback actions of target hormones on the hypothalamus and pituitary with special reference to gonadal steroids. Ann. Rev. Physiol. 41; 571-585, 1979.

60.- Moss R.L., McCann S.M. Induction of the mating behavior in rats by luteinizing hormone releasing factor. Science 181; 177-179, 1973.

61.- Kastin A.J., Miller L.H., Sandman C.A., Schally A.V., Plotnikoff N.P. CNS and pituitary effects of hypothalamic peptides and MSH. En: Youdin NH Essays in Neurochemistry and Neuropharmacology 1, London pp139-176, 1977.

62.- McKelvy J.F., Lin C., Chan L., Joseph-Bravo P., Charli J.L., Pacheco M., Paulo M., Neale J., Baker J. Biosynthesis of brain peptides. En: Brain Peptides. A New Endocrinology. Editado por A.M. Gotto Jr. y A.E. Boyd III. Amsterdam/Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp183-196, 1979.

63.- Millar R.P., Wegener I., Schally A.V. Putative prohormonal luteinizing hormone releasing hormone. En: Neuropeptides, Biochemical and Physiological Studies. Editado por R.P. Millar, Churchill Livingstone, Edinburg, pp111-130, 1981.

64.- Gautron J.P., Patton E., Kordon C. Occurrence of higher molecular forms of LHRH in fractionated extracts of rat hypothalamus, cortex and placenta. Mol. Cell. Endocrinol. 24; 1-15, 1981.

65.- Curtis A., Fink G. A higher molecular weight precursor of luteinizing hormone releasing hormone from rat hypothalamus. Endocrinology 112; 390-393, 1983.

66.- Curtis A., Lyons J., Fink G. The human hypothalamic LHRH precursor is the same size as that in rat and mouse hypothalamus. Biochem. Biophys Res. Commun. 117; 872-877, 1983.

67.- Seeburg P.H., Adelman J.P. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. Nature 311; 666-668, 1984.

- 68.- Adelman J.P., Mason A.J., Haytlick J.S., Seeburg P.H. Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of GnRH and prolactin release inhibiting factor in human and rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83; 179-183, 1986.
- 69.- Nikolic K., Mason A.J., Szonyi E., Ramachandran J., Seeburg P.H. A prolactin inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. Nature 316; 511-517, 1985.
- 70.- Millar R.P., Wormald P.J., Milton R.C.L. Stimulation of gonadotropin release by a non GnRH peptide sequence of the GnRH precursor. Science 232; 68-70, 1986.
- 71.- Culler M.D., Negro Vilar A. Evidence that pulsatile follicle stimulating hormone secretion is independent of endogenous luteinizing hormone releasing hormone. Endocrinology 118; 609-612, 1986.
- 72.- Tesis de licenciatura del Q.F.B. Rafael Saavedra Duran. Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales contra el factor liberador de la hormona luteinizante LHRH, 1985.
- 73.- Krause J.E., Advis J.P., McKelvy J.F. Luteinizing hormone releasing hormone biosynthesis in the hypothalamus of free running individual female rats. Endocrinology 111; 344-346, 1982.
- 74.- Thomas P.S. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77; 5201-5205, 1980.
- 75.- Deeley R.O., Gordon J.I., Burns A.T.H., Mulliux K.P., Stein M.B., Golderger R.F. Primary activation of the vitellogenin gene in the rooster. J. Biol. Chem. 252; 8310-8319, 1977.
- 76.- Basado en: Morrison M.R., Brodeur R., Pardue S., Baskin F., Hall C.L., Rosenberg R.N. Differences in the distribution of poly(A) size classes in individual messenger RNA's from neuroblastoma cells. J. Biol. Chem. 254; 7675-7683, 1979. (con ciertas modificaciones).
- 77.- Lizardi P. Methods for preparation of messenger RNA. Methods in Enzymology Vol. 96 (Biomembranes). Academic Press, pp38-49, 1983.
- 78.- Chrgwin J.M., Pizybyla A.E., McDonald R.J. and Rutter W.S. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18; 5294-5299, 1979.
- 79.- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- 80.- Aviv H., Leder P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidilic acid cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69; 1408-1411, 1972.
- 81.- Nett T.H., Akbar A.M., Niswender G.D., Hedlund M.F., White H.F. A radioimmunoassay for gonadotropin releasing hormone (GnRH) in serum. J. Clin. End. and Med. 36; 880-885, 1973.

82.- Davis M.M., Cohen D.I., Nielsen E.A., Steinmetz M., Paul W.E., Hood L. Cell type specific cDNA probes and the murine I region: the localization and orientation of A . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2194-2198, 1984.

83.- Instrucciones del proveedor. Boheringer Mannheim.

84.- Huynh T.V., Young R.A., Davies R.W. Constructing and screening cDNA libraries in  $\phi$ 10 and  $\phi$ 11. En: DNA cloning, a practical approach, Vol.1 Editado por D.M. Glover, IRL Press, 1985.

85.- Instrucciones y protocolo del proveedor. Estuche Protocolone de Promega Biotech.

86.- Basado en Itakura K. Synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the Phosphotriester solid phase method. Trabajo desarrollado en la Unidad de Síntesis de macromoléculas del Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología. UNAM.

87.- Maxam A., Gilbert W. Sequencing end labeled DNA with base specific chemical cleavages. Methods in Enzymology 65, 499, 1980.

88.- O'Farrel F.H., Kutter E., Malanish H. A restriction map of the bacteriophage T4 Genome. Mol. Gen Genet. 174; 121- ,1980.

89.- Lerach H., Wenzel J.M., Bodtker H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions; a critical reexamination. Biochemistry 16; 4743-4751, 1977.

90.- Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98; 503-517,

91.- Agarwal K., Brunstedt J., Noyes E. A general method for detection and characterization of an mRNA using an oligonucleotide probe. J. Biol. Chem. 256; 1023-1028, 1981.

92.- Rigby P.W., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113; 237- ,1977.

93.- Shivers B.D., Harlan P.E., Morrel J.I., Pfaff D.W. Immunocytochemical localization of luteinizing hormone releasing hormone in male and female rat brains. Neuroendocrinology 36; 1-12, 1983.

94.- Alwine J.C., Kemp P.J., Stark G.R. Methods for detection of specific RNAs in agarose gel by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes. Proc. Natl Acad. Sci. USA 74; 5350-5354, 1977.

95.- Jutisz M., Counis R., Corbani M. Biosynthesis of gonadotropin releasing hormone (GNRH): present status. Psychoneuroendocrinology 8; 251-258, 1983.

96.- Tesis de la Q.F.B. Rosa Ma. Uribe Villegas. Optimización de la metodología para la caracterización del peso molecular del AKN mensajero de péptidos hipotalámicos, 1986.

97.- Shivers B.D., Harlan R.E., Hejtmanck J.F., Conn P.M., Pfaff D.W. Localization of cells containing LHRH-like mRNA in rat forebrain using in situ hybridization. *Endocrinology* 118: 883-885, 1986.

98.- McKelvy J.F., Charli J.L., Joseph-Bravo P., Sherman T., Loudes C. Cellular biochemistry of brain peptides, biosynthesis, degradation, packaging, transport and release. En: The Endocrine Functions of the Brain Editado por Marcella Motta, Raven Press, pp171-193, 1980.

99.- Chikaraishi D.M. Complexity of cytoplasmic polyadenilated and non-polyadenilated rat brain ribonucleic acids. *Biochemistry* 18: 3249-3254, 1979.

100.- Bantle J.A., Hahn W.E. Complexity and characterization of poliadenilated RNA in the mouse brain. *Cell* 5: 139-150, 1976.

101.- Britten R.J., Graham D.E., Neufeld B.R. Methods in Enzymology, Vol. 29. Editado por Grossman L. y Moldave K., Academic Press, London, N.Y., p 363, 1974.

# Attempts to Immunoprecipitate the LHRH Precursor Synthesized in Cell Free Systems<sup>1</sup>

S. COHEN,\* J. L. CHARLI,\* L. DÍAZ DE LEÓN,† R. P. MILLAR,‡  
A. ARIMURA,§ M. R. MORRISON AND P. JOSEPH-BRAVO\*\*

\*Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología  
UNAM, Apartado Postal 70479, México, D. F. 04510, México  
†Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D. F. 04510, México  
‡University of Capetown Medical School, Observatory 7295, Cape Town, South Africa  
§Tulane University Hebert Research Center, Belle Chase, LA 70037  
¶University of Texas, Health Science Center, Dallas, TX 75235

Received 3 June 1985

COHEN, S., J. L. CHARLI, L. DÍAZ DE LEÓN, R. P. MILLAR, A. ARIMURA, M. R. MORRISON AND P. JOSEPH-BRAVO. Attempts to immunoprecipitate the LHRH precursor synthesized in cell free systems. BRAIN RES BULL 16(3) 309-314, 1986.—In order to determine the molecular weight of the Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) precursor, poly(A)-RNA from rat hypothalamus and human placenta were translated in two mRNA dependent cell free translation systems. Total translation products were immunoprecipitated with two antisera that recognized LHRH high molecular weight forms. After SDS-polyacrylamide slab gel electrophoretic analysis of the immunoprecipitated material and fluorography, we detected in both tissues a protein of 50,000 daltons with the No. 1076 antiserum. This protein was not immunoprecipitated by the No. 743 anti-LHRH antiserum or by non-immune rabbit serum. However, this protein was not displaced by excess LHRH added during the immunoprecipitation and seemed to be present in species where LHRH has not been reported. These data demonstrated that the LHRH mRNA is present in very low amounts in hypothalamus or placenta and that the sensitivity of the assay is not high enough to recognize it.

LHRH biosynthesis      Immunoprecipitation      Cell free translation      mRNA      Hypothalamus      Placenta

THE isolation [27] and structural characterization [17] of the hypothalamic decapeptide Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH, pglu-his-trp-ser-tyr-gly-leu-arg-pro-gly-NH<sub>2</sub>) has led to the knowledge of the mechanism of action of this hormone with regard to the control of Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone secretions [26]. Nevertheless, little is known about the biosynthesis and processing of the peptide, although many attempts to elucidate the mechanism of its biosynthesis have been done. In the Central Nervous System of the rat a very scarce set of cell bodies (around 500) in the preoptic area and anterior hypothalamus contain LHRH immunoreactivity [30]. Very few isolated LHRH immunoreactive cell bodies have been identified in other brain areas [31]. LHRH is also present in placenta, where it is biosynthesized *in situ* [11], and in testis [29].

The first experiments on LHRH biosynthesis suggested a non-ribosomal mechanism of biosynthesis [24]. Although these speculations were refuted by a stronger evidence that suggested a ribosomal mode of biosynthesis [18], informa-

tion about the hypothalamic precursor is still very scarce. The existence of high molecular weight LHRH immunoreactive species (one of more than 5,000 daltons and one of intermediate molecular weight) was first suggested by analysis of fractions from gel filtration chromatography of hypothalamic extracts [20]. Other authors [8] using a similar approach observed LHRH immunoreactive species of 26,000 and 1,800 daltons, both present in hypothalamic and placental extracts. In regard to the primary product of translation, a protein of 28,000 daltons has been observed by immunoprecipitation of hypothalamic mRNA cell free translation products [4]. In contrast to these results, a human placental cDNA clone that codes for a 10,000 daltons peptide containing the LHRH sequence in between a leader peptide and a pair of basic residues followed by 56 amino acids was isolated and sequenced [28].

In this communication we report the results of our attempts to identify the LHRH precursor (primary product of translation) using two different antisera for immunoprecipitation analysis of cell free translation products as was previ-

<sup>1</sup>This work was partly funded by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. PCCBNA 001926).

<sup>2</sup>Requests for reprints should be addressed to Dra. P. Joseph-Bravo.

ously done for somatostatin [9]. We studied the translation products of mRNA isolated from rat hypothalamus, human placenta and control tissues.

#### MATERIALS

Guanidine-HCl and Extract-gel were obtained from Pierce; oligo-dT cellulose from Collaborative Research; protein A sepharose CL4B, trypsin, clostripain, phenylmethyl-sulphonyl fluoride (PMSF) and pancreatic bovine trypsin inhibitor (type I-P) from Sigma Chemical Co.; synthetic LHRH from Peninsula; L-[<sup>35</sup>S]-methionine (1,059 Ci/mmol) and L-[<sup>3</sup>H]-proline (130 Ci/mmol) from Amersham, and L-[<sup>14</sup>C]-proline (250 mCi/mmol) and L-[<sup>3</sup>H]-leucine (110 Ci/mmol) from New England Nuclear. The two LHRH antisera were No. 1076 that recognizes the internal sequence ser-tyr-gly-leu-arg and permitted to demonstrate the presence of high molecular weight LHRH immunoreactive species in the hypothalamus [20,21] and 743 for which the amino acids trp-ser-tyr and arg are essential for binding to the antiserum and allowed the detection of high molecular weight forms and LHRH cell bodies in the hypothalamus [12,21]; in preliminary experiments we confirmed their capacity to bind protein A-sepharose.

#### METHOD

##### RNA Preparation

Male Wistar rat hypothalami including the preoptic area, preoptic area alone or extrahypothalamic brain were dissected and immediately frozen at -70°C until RNA preparation. Total *Entamoeba histolytica* [19] and *Trypanosoma cruzi* [2] cell culture extracts were used for RNA extraction and purification. Human placenta were obtained at term of pregnancy, cut in pieces and frozen in liquid nitrogen immediately. RNA from all these sources was extracted by the Guanidine-HCl procedure [6] with some modifications [16] (0.3-0.4 mg of RNA were obtained per gram of tissue). Hypothalamic, preoptic area and extrahypothalamic brain and placental poly(A)-RNAs were prepared by one passage over oligo-dT cellulose [1] (recovery: 30-60 µg poly(A)-RNA per gram of tissue).

##### Cell Free Translation

Each RNA preparation was titrated for translational activity in either rabbit reticulocyte lysate or wheat germ extracts. Aliquots of RNA (0.5-2.5 µg) were translated in a nuclease treated rabbit reticulocyte lysate as described [23]. Total reaction mixture (15 µl) contained lysate (5 µl), 40 mM potassium chloride, 100 mM potassium acetate and 10 µCi of labeled aminoacid. The mixture was incubated for 60 min at 30°C and synthesis was terminated by addition of 5 µg of pancreatic ribonuclease followed by an additional 15 min of incubation at 30°C [5]. When the wheat germ cell free system was used, wheat germ obtained from General Mills, Vallejo, CA was prepared as described [25]. Translation was performed under sub-saturating concentration of mRNA using 25 µCi of [<sup>35</sup>S]-methionine or [<sup>3</sup>H]-leucine in 5 µl for 90 min at 25°C [22].

In either system, the translation mixture was centrifuged at 15,000 g for 15 min and for analysis of total translation products an aliquot (5-10 µl) of the supernatant was mixed with 10 µl Laemmli buffer [14], boiled for 5 min and subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide electrophoresis on 0.5 M urea, 12% acrylamide, 0.3% bisac-

rylamide (for reticulocyte lysate products) or 0.5 M urea, 15% acrylamide 0.4% bisacrylamide (for wheat germ products) slab gels for 2.5 hr at 30 mA [14]. Gels were prepared for fluorography [15], dried and exposed with Kodak XRP-5 films and intensifying screens at -70°C for 4 days. Those RNA preparations that synthesized high molecular weight proteins and incorporated 4 times more counts into TCA precipitable material than the endogenous RNA in rabbit reticulocyte lysate or 10 times more in wheat germ extracts were used for immunoprecipitation purposes.

##### Immunoprecipitation Experiments

Ten to 20 µg of RNA were translated in either of the two cell free systems. At the end of the translation, the mixture was immediately diluted 1:1 with 2 X immunoprecipitation buffer (1 X: 0.05 M sodium phosphate pH 8.0, 0.15 M sodium chloride, 0.002% sodium azide, 0.002 M PMSF, 0.5% Triton X 100, 1 mg/ml of bovine serum albumin) and centrifuged at 8,500 g for 15 min at 4°C in a microcentrifuge. Aliquots of the supernatant were incubated with the anti-LHRH antisera or with non-immune rabbit serum (NRS) (1:500 or 1:750 final dilution) in the presence or absence of 10 µg of LHRH. After 24 hours at 4°C, the incubation mixture was passed through a 100 µl (wet volume) protein A-sepharose column which was previously equilibrated with immunoprecipitation buffer. After 3 washes of one ml with this buffer and 10 more with phosphate buffered saline (PBS) at pH 8.0, the immunoprecipitated material was eluted in 1 ml of 0.1 M acetic acid [16]. The acidic eluates were collected, lyophilized, dissolved in Laemmli buffer [14] and boiled for 5 min in the presence of 0.1 M dithiothreitol prior to SDS-polyacrylamide slab gel electrophoretic analysis (see legends of Figs. 2 and 3). After electrophoresis, fluorography was performed as indicated for the analysis of total translation products for the time indicated in the legends of the figures.

##### Immunoprecipitation After Electrophoresis and Peptidase Digestion

In order to increase the possibility that the LHRH antisera recognized part of the LHRH sequence in a precursor, we followed a second approach: translation products were separated through SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis (15% acrylamide, 0.4% bisacrylamide); the products were eluted from the gel matrix by cutting the gel in 0.5 cm long, 3.5 cm wide pieces and incubating each one in 0.5 ml of 0.1% sodium bicarbonate and 0.5% SDS at 37°C with agitation for a total of 48 hours (2 buffer changes) [8]. The eluates were made SDS-free with Extract-gel, concentrated by lyophilization, dissolved in 200 µl of water and incubated for 2 hours at 37°C with 50 µg of trypsin or 5 µg of clostripain (total volume 500 µl). After enzyme inactivation with 0.4 µg of trypsin inhibitor at 37°C for 30 min, the digested material was incubated at 4°C for 24 hours with No. 1076 or No. 743 antisera or NRS at 1:1000 final dilution in the presence or absence of 10 µg of LHRH (500 µl final volume). After this, 20 µl (wet volume) of protein A-sepharose were added and the mixture was incubated at room temperature for 2 hours with continuous gentle shaking. The resin was sedimented by centrifugation at 1500 g for 15 min, washed 3 times with immunoprecipitation buffer and 4 times with PBS pH 8.0 (10 min for each washing period). The immunoprecipitated material was then eluted with 2 ml 0.1 M acetic acid and radioactivity of the acidic eluates determined by liquid scintillation counting.

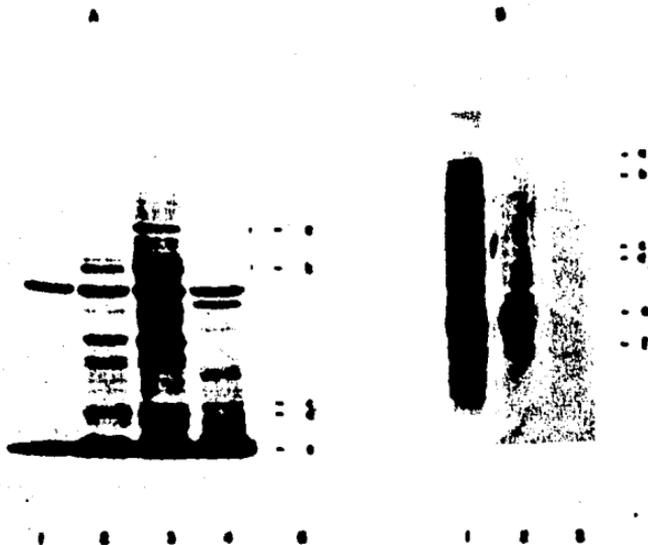


FIG. 1. Photographs of SDS-polyacrylamide slab gel electrophoretic analysis of total cell-free translation products. A. RNAs were translated in a rabbit reticulocyte lysate cell free system supplemented with [ $^{35}$ S]-methionine. Ten  $\mu$ l of each reaction mixture were subjected to electrophoretic analysis at 4°C in SDS-polyacrylamide slab gels. Proteins formed: (1) in the absence of exogenous RNA; (2) with 1.5  $\mu$ g of extrahypothalamic brain poly(A)-RNA (3.5 fold stimulation over endogenous levels); (3) with 1.5  $\mu$ g of hypothalamic poly(A)-RNA (4.5 fold stimulation over endogenous levels); (4) with 3  $\mu$ g of *E. histolytica* RNA (4.3 fold stimulation over endogenous levels); (5) molecular weight standards: (a) bovine serum albumin (66,000 da.), (b)  $\gamma$ -globulin heavy chain (56,000 da.), (c) carbonic anhydrase (30,000 da.), (d)  $\gamma$ -globulin light chain (26,000 da.), (e)  $\beta$ -actin/globulin (18,000 da.), (f) cytochrome C (12,500 da.), and (g) insulin chain A (3,400 da.). Exposure time: 4 days. B. Poly(A)-RNAs were translated in a wheat germ extract cell free system supplemented with [ $^{14}$ C]-leucine. Five  $\mu$ l of the reaction mixture were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins formed: (1) with 1.5  $\mu$ g of hypothalamic RNA (7 fold stimulation over endogenous levels); (2) with 1.5  $\mu$ g of proeopic area RNA (6 fold stimulation over endogenous levels); (3) in the absence of exogenous RNA. Molecular Weight Standards as in A. Exposure time: 4 days.

## RESULTS

As shown in Fig. 1A, translation of rat hypothalamic and extrahypothalamic brain poly(A)-RNA and *E. histolytica* RNA preparations in [ $^{35}$ S]-methionine supplemented rabbit reticulocyte lysate gave rise to labeled proteins that cover a wide molecular weight range. The intensities of the bands observed are dependent on the translational activity of each RNA preparation. Translation in [ $^{14}$ C]-leucine supplemented wheat germ extract gave similar results (Fig. 1B).

In order to determine the molecular weight of the LHRH precursor, we immunoprecipitated rat hypothalamic, and human placental [ $^{35}$ S]-methionine labeled translation products with No. 1976 anti-LHRH antiserum. In both tissues, the antiserum immunoprecipitated a 50,000 dalton protein (Fig. 2). This protein was seen whether translation was performed in the rabbit reticulocyte lysate (Fig. 2A) or in the wheat germ extracts (Fig. 2B); in both cases this signal was not observed when immunoprecipitating the translation

products with NRS (Fig. 2). The protein of 50,000 daltons was observed whether or not 5 mM methionine was added during the incubation with the antiserum and was not observed when endogenous or *T. cruzi* translation products were immunoprecipitated with No. 1976 antiserum (data not shown).

However, the band observed with hypothalamic translation products was not displaced by synthetic LHRH (Fig. 3) and although very few LHRH immunoreactive cell bodies are present outside the hypothalamus, a faint band was observed when incubating the extrahypothalamic brain poly(A)-RNA translation products with the No. 1976 antiserum (Fig. 3). In contrast, we only observed a weak band in the proeopic area in spite of the high concentration of LHRH cell bodies. Furthermore, the same signal was observed with *E. histolytica* translation products (Fig. 3).

We were never able to see the 50,000 dalton band when we supplemented the reticulocyte lysate with either [ $^{14}$ C]-proline or [ $^3$ H]-leucine and immunoprecipitated with No.

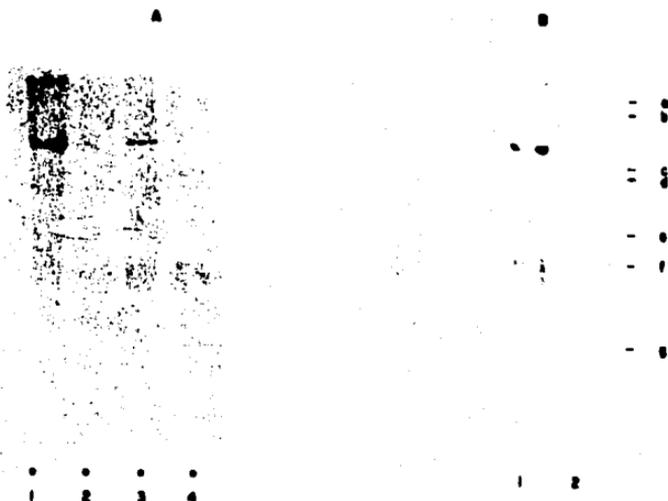


FIG. 2. Fluorograph of SDS-polyacrylamide slab gel analysis of immunoprecipitated cell free translation products (15% acrylamide, 0.4% bisacrylamide, 0.5 M urea). A: hypothalamic poly(A)-RNA (10  $\mu$ g) and human placental poly(A)-RNA (12  $\mu$ g) were translated in rabbit reticulocyte lysate, and B: rat hypothalamic poly(A)-RNA (20  $\mu$ g) was translated in wheat germ extract. The [ $^{35}$ S]-methionine labeled products were incubated with No. 1076 antiserum or with NRS at 1:750 final dilution. Immunoprecipitation of A: (1) hypothalamic RNA products with No. 1076 antiserum; (2) hypothalamic RNA products with NRS; (3) human placental RNA products with No. 1076 antiserum; (4) human placental RNA products with NRS; B: (1) hypothalamic RNA products with No. 1076 antiserum; (2) hypothalamic products with NRS. Molecular Weight Standards as in Fig. 1. Exposure time: 3 weeks.

1076 antiserum rat hypothalamic, rat preoptic area or human placental cell free products. Only once the No. 1076 antiserum immunoprecipitated a peptide of 11,000 daltons from [ $^3$ H]-leucine labeled translation products of rat preoptic area RNA. However, this was only seen after more than 3 months of fluorography (data not shown) and the peptide appeared not to be detected among rat hypothalamic or human placental products, or when supplementing the cell free system with [ $^{35}$ S]-methionine or [ $^{14}$ C]-proline (data not shown).

No band was observed when we performed the immunoprecipitation of rat hypothalamic translation products with No. 743 anti-LHRH antiserum in spite of 2 to 3 months of fluorography (data not shown). With both No. 1076 or No. 743 antisera we never detected a 28,000 daltons peptide (data not shown) as was previously reported among hypothalamic [ $^3$ H]-leucine labeled products with another anti-LHRH antiserum [4].

On the other hand, because of these negative results, we intended another approach: we separated the rat hypothalamic or human placental translation products (labeled with [ $^3$ H]-proline or [ $^{14}$ C]-proline or [ $^3$ H]-leucine) by SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis, cut the gel in pieces, eluted and digested the proteins present in each fragment and performed immunoprecipitation as described

in the Method section. By a graphic analysis of the immunoprecipitable radioactivity, we detected various peaks in each case; they were not displaced by excess LHRH, and were present even when incubating with NRS (data not shown). These peaks corresponded to fragments that contained the highest amount of radioactivity and were therefore due to non-specific precipitation in spite of the extensive washes of the protein A-sepharose prior to elution of the bound material.

#### DISCUSSION

We have previously reported [3] that the No. 1076 anti-LHRH antiserum immunoprecipitates a protein of 50,000 daltons among the cell free translation products of rat hypothalamic mRNA. This protein was also recognized among human placental products, but its molecular weight differed from the reported one (10,000 daltons) from the human placenta cDNA bank [28]; we would have expected the antiserum to recognize, at least in the placental mRNA translation products, the 10,000 daltons product as well. The results of the experiments reported in this communication confirm the fact that this antiserum recognizes a protein of 50,000 daltons; however, while the band seen did not seem to be an artifact of the cell free system, it did not follow all the

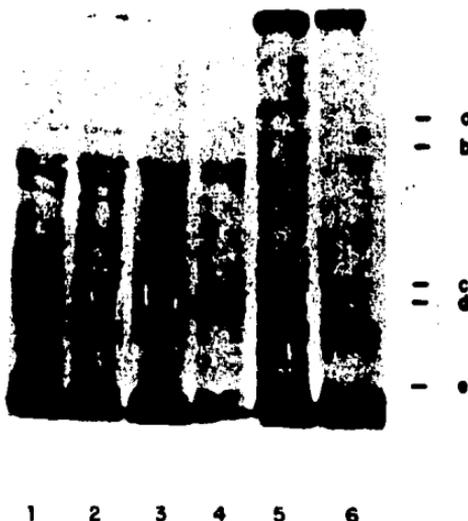


FIG. 3. Fluorograph of SDS-polyacrylamide slab gel analysis of immunoprecipitated cell free translation products (12% acrylamide, 0.3% bisacrylamide, 0.5 M urea). Rat hypothalamic poly(A)-RNA, extrahypothalamic brain poly(A)-RNA and *E. histolytica* RNA were translated in a rabbit reticulocyte lysate supplemented with [<sup>35</sup>S]-methionine. The equivalent of  $1.5 \times 10^6$  counts per minute of the cell-free products were immunoprecipitated with each serum at 1:500 final dilution. (1) hypothalamic RNA products incubated with No. 1076 antiserum; (2) hypothalamic RNA products incubated with No. 1076 antiserum and 10  $\mu$ g of LHRH; (3) extrahypothalamic brain RNA products incubated with No. 1076 antiserum; (4) extrahypothalamic brain RNA products incubated with NRS; (5) *E. histolytica* RNA products incubated with No. 1076 antiserum; (6) *E. histolytica* RNA products incubated with NRS. Molecular Weight Standards as in Fig. 1. Exposure time: 5 weeks.

criteria that would suggest that its sequence is related to LHRH. In fact, this protein was present at higher levels in the hypothalamus than in the preoptic area (where most of the rat LHRH cell bodies are concentrated) and the band was not displaced by LHRH. Moreover, this signal could also be seen when immunoprecipitating the extrahypothalamic brain products with No. 1076 antiserum. These data, together with the fact that it is also observed when immunoprecipitating the translation products of *E. histolytica* RNA suggest that the No. 1076 antiserum binds non-specifically to some proteins as shown by the constantly higher background observed on the fluorographs, as well as on total TCA precipitable counts. This antiserum binds either a 50,000 daltons non-characterized protein with some affinity for this antibody, or a protein that is abundant in hypothalamic, placental and *E. histolytica* tissues (although this later explanation seems less likely because we did not observe a major protein in this molecular weight range in the total translation products of wheat germ and the one observed in reticulocyte lysate corresponds to 53,000 daltons). Given the negative

results also obtained with the No. 743 antiserum (that has been used to recognize LHRH perikarya), the data suggest that the level of LHRH mRNA is less than 0.01% of the hypothalamic mRNA (the minimum level of detection of our assay). The data obtained with the digestion with trypsin or clostripain make unlikely the possibility that the negative results are simply due to the fact that the LHRH sequence within the precursor molecule would be unavailable to the antibodies used in this study. These data which suggest a very low level of LHRH mRNA are consistent with similar reports from other groups [10], with the very low number of LHRH cell bodies in the Central Nervous System [30], with *in vivo* data suggesting a very low level of LHRH biosynthesis and turnover [13] and with preliminary data from our laboratory using synthetic oligonucleotides to detect hypothalamic LHRH mRNA. The results reported in this communication suggest that the 28,000 daltons precursor peptide reported [4] may represent an artifact, in spite of the controls used. The methodology they reported does not seem adequate enough to detect a message present at such a low

level). An earlier report suggesting the existence of a 28,000 daltons LHRH precursor in hypothalamic and placental extracts [7] should also be considered with extreme caution because of the expected very low level of the precursor in these tissues.

The only strong candidate for a LHRH precursor in the hypothalamus is the peptide which sequence was derived from the human placenta cDNA clone [28]. We were able to see once a band that could represent a 11,000 daltons peptide; however, the identity of this band could not be confirmed.

In conclusion, we demonstrated that the LHRH mRNA is present in very low amounts in the tissues studied and that the methodology we used is not performant enough to analyze such mRNA. It is then necessary to use methods which amplify the message; analysis of hypothalamic cDNA banks may be the most appropriate strategy.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the excellent technical assistance of Lourdes Arcos and the skillful typing of the manuscript by H. Anzures and T. Morán.

#### REFERENCES

- Aviv, H. and P. Leder. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidilic acid cellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1408-1411, 1972.
- Castro, C., R. Hernández and M. Castañeda. *Tripanosoma Cruzi* ribosomal RNA: Internal break in the large molecular mass species and number of genes. *Mol Biochem Parasitol* 2: 219-233, 1981.
- Charli, J. L., S. Cohen, L. Diaz de León, R. P. Millar, A. Arimura and P. Joseph-Bravo. Molecular weight of a putative LHRH precursor peptide synthesized in cell free systems. *Abstracts of the 7th International Congress of Endocrinology* 466, 1984.
- Curtis, A. and G. Fink. A higher molecular weight precursor of luteinizing hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology* 112: 390-397, 1983.
- Diaz de León, L., L. Arcos and K. Wilms. The use of cell free systems for the characterization of *Cytosine Cellulose* antigens. In: *Cytosine Cellulose: Present State of Knowledge and Perspectives*, edited by A. Blaser, K. Wilms, J. P. Laccette, C. Laroche, C. Ridaura and F. Beltran. New York: Academic Press, 1982, pp. 463-475.
- Desley, R. G., J. I. Gordon, A. T. H. Burns, K. P. Mullin, M. B. Stein and R. F. Goldberg. Primary activation of the vitellogenin gene in the rooster. *J Biol Chem* 252: 8310-8319, 1977.
- Gastrow, J. P., E. Patow and C. Kordon. Occurrence of higher molecular weight forms of LHRH in fractionated extracts of rat hypothalamus, cortex and placenta. *Mol Cell Endocrinol* 24: 1-5, 1981.
- Hames, B. D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, edited by B. D. Hames and D. Rickwood. London: IRL Press Limited, 1981, pp. 1-86.
- Joseph-Bravo, P., J. L. Charli, T. Sherman, M. Boyer, F. Bolivar and J. F. MacKelvy. Identification of a putative hypothalamic mRNA coding for Somatostatin and of its product in cell free translation. *Biochem Biophys Res Commun* 94: 1004-1012, 1980.
- Jutisz, M., R. Counis and M. Corbani. Biosynthesis of gonadotropin releasing hormone (GnRH): present status. *Psychoneuroendocrinology* 8: 251-258, 1983.
- Khodr, G. S. and T. M. Siler-Khodr. Placental Luteinizing hormone-releasing factor and its synthesis. *Science* 207: 315-317, 1980.
- Knigge, K. M., S. A. Joseph and G. E. Hoffman. Organization of LRF and SRIF-neurons in the endocrine hypothalamus. In: *The Hypothalamus*, edited by S. Reichlin, R. J. Baldessarini and J. B. Martin. New York: Raven Press, 1978, pp. 49-67.
- Krause, J. E., J. P. Advis and J. F. MacKelvy. In vivo biosynthesis of hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone in individual free-running female rats. *Endocrinology* 111: 344-346, 1982.
- Laemmli, V. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- Laskey, R. A. and A. D. Mills. Quantitative film detection of <sup>3</sup>H and <sup>14</sup>C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur J Biochem* 56: 335-341, 1975.
- Lin, C., P. Joseph-Bravo, T. Sherman, L. Chan and J. F. MacKelvy. Cell-free synthesis of putative neurophysin precursors from rat and mouse hypothalamic poly(A)-RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 89: 943-950, 1979.
- Matsuo, H., Y. Baba, R. M. G. Nair, A. Arimura and A. V. Schally. Structure of the porcine LHRH and FSH releasing hormone. Part I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43: 1334-1339, 1971.
- McKelvy, J. F., C. Lin, L. Chan, P. Joseph-Bravo, J. L. Charli, M. Pacheco, M. Paulo, J. Neale and J. Baker. Biosynthesis of brain peptides. In: *Brain Peptides: A New Endocrinology*, edited by A. M. Gotto, Jr., E. J. Peck, Jr. and A. E. Boyd, III. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979, pp. 183-190.
- Mendoza, F., L. Arcos, L. Ortiz and L. Diaz de León. Protein biosynthesis by *Entamoeba histolytica* culture. *Arch Invest Med* 13: 71-76, 1982.
- Millar, R. P., C. Achnell and G. Rossier. Higher molecular weight immunoreactive species of luteinizing hormone releasing hormone: possible precursors of the hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 74: 720-731, 1977.
- Millar, R. P., I. Wegner and A. V. Schally. Putative pro-hormonal luteinizing hormone releasing hormone. In: *Neuropeptides, Biochemical and Physiological Studies*, edited by R. P. Millar. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1981, pp. 111-130.
- Morrison, M. R., R. Brodeur, S. Pardue, F. Baskin, C. L. Hall and R. N. Rosenberg. Differences in the distribution of poly(A) size classes in individual messenger RNAs from neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 254: 7675-7683, 1979.
- Penhale, H. R. B. and R. J. Jackson. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* 67: 247-256, 1976.
- Reichlin, S. and M. Mitnick. Biosynthesis of hypothalamic hypophysiotropic factor. In: *Frontiers in Neuroendocrinology, 1973*, edited by W. F. Ganong and L. Martini. New York: Oxford University Press, 1973, pp. 61-68.
- Roberts, B. E. and B. M. Paterson. Efficient translation of tobacco mosaic virus and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 2330-2334, 1973.
- Sandow, J. The regulation of LHRH action at the pituitary and gonadal receptor level: a review. *Psychoneuroendocrinology* 8: 277-297, 1983.
- Schally, A. V., R. M. G. Nair, T. W. Redding and A. Arimura. Isolation of the luteinizing hormone and follicle stimulating hormone releasing hormone from porcine hypothalamus. *J Biol Chem* 246: 7230-7236, 1971.
- Seeburg, P. H. and J. P. Adelman. Characterization of cDNA for precursor human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature* 311: 666-668, 1984.
- Sharpe, R. M. and H. M. Fraser. HCG stimulation of testicular LHRH activity. *Nature* 287: 642-643, 1980.
- Shivers, B. D., R. E. Hartan, J. I. Morel and D. W. Pfaff. Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone in male and female rat brains. *Neuroendocrinology* 36: 1-12, 1983.
- Witkin, J. W. and A. J. Silverman. Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in rat olfactory systems. *J Comp Neurol* 218: 426-432, 1983.