



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAestrÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN DE KLF10 EN EL
HIPOTÁLAMO EMBRIONARIO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

FABIÁN JOSUÉ CÁRDENAS LARA

TUTOR PRINCIPAL

Dra. LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. VIVIANA VALADEZ GRAHAM
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Dr. FÉLIX RECILLAS TARGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

ABRIL, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, financiado por donativos de DGAPA (IN209212e IN227510) y CONACYT (155290y 154542)

Durante la realización del mismo se contó con beca de CONACyT.

AGRADECIMIENTOS

A M.C. Concepción Valencia García, quien sin su ayuda no habría sido posible el término de esta tesis.

Al laboratorio de Dr. Luis Covarrubias, en especial a M.C. Concepción Valencia García, por apoyarnos mediante el préstamo de materiales y reactivos.

Al laboratorio de Dr. Mario Soberón Chávez y de Dra. María Alejandra Bravo de la Parra, en especial a Dra. Isabel Gómez Gómez, por apoyarnos permitiéndonos usar sus equipos.

Al laboratorio de Dra. Susana López Charretón y de Dr. Carlos Federico Arias Ortiz por apoyarnos permitiéndonos usar sus equipos.

A DGAPA y CONACYT por darnos financiamiento y beca para realizar este proyecto.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
La Regulación de la expresión génica	7
La Neurogénesis.....	8
Las señales extrínsecas durante el desarrollo del sistema nervioso	9
Las señales intrínsecas en el desarrollo del sistema nervioso	12
El desarrollo del hipotálamo	16
El factor de transcripción Klf10.....	18
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Análisis de la conservación del promotor de <i>Klf10</i>	23
Análisis de sitios posibles de unión para factores de transcripción sobre el promotor de <i>Klf10</i>	23
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
Electroforesis de DNA en geles de agarosa	25
Purificación del DNA	25
Digestiones y ligaciones del DNA	25
Transformación de las bacterias.....	26
Purificación de DNA a partir de bacterias	26
Cultivo de líneas celulares	26
Conteo celular	27
Congelación de líneas celulares	27
Descongelación de líneas celulares	28
Tratamiento de células en cultivo con moléculas señalizadoras.....	28

Transfección de células en cultivo	29
Purificación de RNA.....	29
Reacción de la retrotranscripción (RT).....	30
Extracción de proteínas totales	31
Análisis tipo Western Blot (WB).....	31
Lectura de actividad de luciferasa.....	32
Análisis de densitometría de geles de DNA	32
Análisis estadístico.....	32
RESULTADOS.....	34
El promotor del gen de <i>Klf10</i> está conservado entre los murinos y los primates	34
En el promotor del gen de <i>Klf10</i> existen sitios de unión para una variedad de factores de transcripción que participan en diversas vías de señalización	35
El NGF no altera los niveles del mRNA de <i>Klf10</i> en las células N1	36
Las células N1 sí son capaces de responder a los estímulos extracelulares.....	38
Activar a CREB o a AP1 no altera los niveles del mRNA de <i>Klf10</i> en las células N1	39
Generación de las construcciones del promotor del gen de <i>Klf10</i> de ratón	45
El DBcAMP y el TPA aumentan la actividad del promotor de <i>Klf10</i>	47
CREB y AP1 incrementan la actividad del promotor de <i>Klf10</i>	49
DISCUSIÓN.....	53
PERSPECTIVAS.....	60
APÉNDICE	61
1. Sitios putativos de unión de factores de transcripción sobre el promotor de <i>Klf10</i>	61
2. Secuencias consenso de factores de transcripción	67
REFERENCIAS	70

RESUMEN

La diferenciación celular en el sistema nervioso central está regulada por un programa de diferenciación coordinado tanto por las señales solubles extracelulares como por las cascadas de señalización intracelulares. Entre las señales solubles que actúan en el desarrollo del sistema nervioso central se encuentran las vías de los factores tróficos como el NGF, el TGF β y Wnt, los cuales regulan vías de señalización intracelular que finalizan con la activación de los factores de transcripción. El Klf10 es un factor de transcripción con participación en la diferenciación hacia diferentes tipos celulares, tales como los osteoblastos y los linfocitos T reguladores. En el grupo nos interesa el investigar el papel de Klf10 en el desarrollo del sistema nervioso central, específicamente, en el desarrollo del hipotálamo. Para esto, en el presente proyecto analizamos el efecto de diferentes señales sobre los niveles del RNA mRNA de *Klf10*, al igual que iniciamos la caracterización del promotor de *Klf10*.

Por medio del tratamiento de la línea celular mHypoE N1 con el DBcAMP y el TPA demostramos que las vías de señalización mediadas por CREB y ERK1/2 inducen la expresión del gen de *Klf10*. Para confirmar esto generamos construcciones con el gen de luciferasa bajo el control del promotor de *Klf10*. Mediante ensayos de transfección con estas construcciones demostramos que CREB y AP1 incrementan la actividad del promotor de *Klf10*, lo que sugiere que vías de señalización neurogénicas que impliquen a estos factores de transcripción podrían regular la expresión de *Klf10*.

ABSTRACT

The cellular differentiation in the central nervous system is regulated by a differentiation program coordinated by extracellular signals and by intracellular signaling cascades. Among the signals that act during the development of the central nervous system we find the pathways of the trophic factors NGF, TGF β and Wnt, which regulate intracellular signaling pathways that finalize on the activation of transcription factor. Klf10 is a transcription factor with participation in the differentiation towards different cell types, such as osteoblasts and regulatory T lymphocytes. In our group we are interested in investigate the role of Klf10 in the development of the central nervous system, specifically, in the hypothalamus. To achieve this, in this Project we analyzed the effect of different signals over the levels of the messenger RNA of *Klf10*. We also begun the characterization of the *Klf10* promoter.

With the treatment of the cell line mHypoE N1 with DBcAMP and TPA we demonstrated that the signaling pathways mediated by CREB and ERK1/2 induce the expression of *Klf10*. With transfection assays with construction of the luciferase reporter gene under the control of the *Klf10* promoter we demonstrated that CREB and AP1 increase the activity of the *Klf10* promoter, which suggests that neurogenic signaling pathways that imply these transcription factors could regulate the expression of *Klf10*.

INTRODUCCIÓN

La Regulación de la expresión génica

La regulación de la expresión génica es un proceso esencial para el desarrollo y el crecimiento normal. Las deficiencias en la regulación de la expresión génica pueden generar anomalías en el desarrollo y enfermedades [Schulze et al, 2007]. Existen varios mecanismos para la regulación de la expresión génica, entre los que encontramos a: el estado de la cromatina, que permite o impide el acceso de factores de transcripción y de la maquinaria de transcripción hacia los genes [Quina et al, 2006]; y los factores de transcripción, los cuales pueden activar o reprimir la transcripción [Spitz et al, 2012].

La transcripción es una etapa de la expresión génica y es un punto importante en el cual esta expresión puede ser regulada. La enzima encargada de la transcripción es la RNA polimerasa, la cual sintetiza el RNA a partir del DNA. En los mamíferos hay tres RNA polimerasas diferentes: la RNA polimerasa I está encargada de la transcripción de los RNAs ribosomales, la RNA polimerasa II transcribe los RNA mensajeros (mRNA), y la RNA polimerasa III transcribe los RNAs de transferencia [Lewin, 2008]. Los mRNA son los RNA que son utilizados en la síntesis de proteínas. Para que la RNA polimerasa II inicie la transcripción de un gen necesita primero ser reclutada al promotor del gen que se va a transcribir, este proceso es mediado por los factores de transcripción [Schramm et al, 2002].

Los factores de transcripción son unas proteínas que reconocen secuencias específicas del DNA dentro de los promotores de los genes. Al reconocer estas secuencias se unen al promotor y pueden activar o reprimir la transcripción [Whitfield et al, 2012]. Esto lo logran mediante el reclutamiento de los co-factores como por ejemplo, las metilasas de histonas, las desmetilasas de histonas y las acetilasas de histonas. Los cofactores pueden reclutar a la RNA polimerasa II hacia el promotor de un gen para que se inicie su transcripción [Thomas et al, 2006]. Los cofactores pueden actuar también reclutando a las proteínas remodeladoras de la cromatina [Fukuda et al, 2006].

El estado de la cromatina es una parte importante de la regulación de la expresión génica. Si la cromatina se encuentra firmemente empaquetada puede impedir la unión de los factores de transcripción al DNA y por consiguiente reprimir la expresión génica. Por otro lado, para que la expresión génica se lleve a cabo se requiere que la cromatina se encuentre en un estado abierto, que permita la unión al DNA de los factores de transcripción y de la RNA polimerasa [Schulze et al, 2007]. El estado de la cromatina se puede regular mediante las proteínas modificadoras de la cromatina entre las cuales se encuentran las acetilasas de histonas, las desacetilasas de histonas, las metilasas de histonas, y las desmetilasas de histonas. De manera general la acetilación de los residuos lisina de las histonas se relaciona con la activación génica y la metilación de estos mismos residuos con la represión génica [Lewin, 2008; Quina et al, 2006].

Los diversos mecanismos de la regulación génica en conjunto con las señales extrínsecas e intrínsecas coordinan un programa de diferenciación en diversos sistemas y tejidos celulares entre los que se encuentra el sistema nervioso central.

La Neurogénesis

La diferenciación neuronal involucra un programa de desarrollo controlado por las señales extrínsecas e intrínsecas. Durante el desarrollo, las células precursoras mitóticamente activas localizadas en el neuroepitelio dan lugar a todas las células gliales y neuronales del cerebro [Kandel et al, 2000]. Este proceso depende de una serie de mecanismos, entre los cuales encontramos: 1) las señales que controlan la proliferación de las células precursoras, como Sonic Hedgehog, que regula la proliferación de los precursores de las células granulares en el cerebelo [Wechsler-Reya et al, 1999]; 2) las señales que controlan la transición de las células pluripotentes hacia las células neuronales, como el ácido retinóico, el cual induce la diferenciación de las células troncales neurales [Jacobs et al, 2006]; 3) las señales que guían a las neuronas hacia su apropiada localización, como Slit, que dirige a las neuronas generadas en la zona subventricular hacia el bulbo olfatorio [Wu et al, 1999]; 4) las señales que guían a los axones de las neuronas hacia los sitios en donde deben establecer conexiones sinápticas, como Netrin, que permite el cruce de los axones a hemisferios opuestos a través de las comisuras del cerebro [Chilton, 2006] ; y 5) las señales para el establecimiento de las conexiones sinápticas, como Efrina, que induce la formación de la sinapsis en el desarrollo del hipocampo [Akaneya et al, 2010].

Las células progenitoras pasan por un proceso de especificación celular para finalmente adquirir un fenotipo celular específico. El punto clave en esta especificación celular es la interacción entre dos conjuntos generales de factores: 1) las señales provenientes del ambiente extracelular (extrínsecas); y 2) los componentes de cascadas intracelulares de transducción de señales (intrínsecas) [Yang, 2004]. Las células progenitoras acoplan la información extracelular y los eventos intracelulares de fosforilación, la expresión de genes y la producción de proteínas para inducir respuestas tales como el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis. En el cerebro en desarrollo, el coctel de señales extrínsecas e intrínsecas controla la diferenciación de los precursores neuronales mitóticamente activos a los diferentes tipos celulares del cerebro [Pérez-Martínez et al, 2006]. La diferenciación de las células neuronales no termina con la salida del ciclo celular y la expresión de genes neuronales, un punto fundamental en esta diferenciación terminal es la consolidación del fenotipo, la cual consiste en la inducción de la expresión de un transmisor específico y el mantenimiento de esa expresión [Kandel et al, 2000].

Las señales extrínsecas durante el desarrollo del sistema nervioso

Algunas de las señales extrínsecas importantes para el desarrollo del sistema nervioso son las neurotrofinas, Wnt y el TGF β . Un ejemplo de las señales extrínsecas lo constituye la familia de las neurotrofinas, formada por cuatro miembros: el NGF (factor de crecimiento neural), el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), la Neurotrofina3 y la Neurotrofina4. Una función de las neurotrofinas es el aumento de la expresión del mRNA de péptidos específicos en el sistema nervioso central en desarrollo. Por ejemplo el BDNF induce la expresión de la hormona liberadora de tirotrópina y la somatostatina [Sánchez-Muñoz et al, 2011; Ubieta et al, 2007]. El BDNF induce la diferenciación de las células troncales hacia un fenotipo neuronal mediante la activación de las vías de señalización MAPcinasa/ERK y PI3K/Akt [Lim et al, 2008].

Por otra parte, el NGF posee distintas funciones en el sistema nervioso central, tanto durante el desarrollo como en el adulto. Durante el desarrollo, el NGF promueve la diferenciación, el crecimiento y la supervivencia neuronal [Aloe et al, 1999]. El NGF posee dos diferentes receptores, TrkA, que tiene una alta afinidad para el NGF, y p75 que une al NGF y a las demás

neurotrofinas con baja afinidad [Holub et al, 2011]. Los efectos biológicos del NGF se han asociado a su interacción con el receptor TrkA. Esta interacción activa a la GTPasa pequeña Ras, que a su vez activa a la cinasa de serinas y treoninas Raf. Esta última activa la vía de las proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAP cinasas), donde a la activación de la MAPcinasa ERK, la cual puede inducir la activación del factor de transcripción Proteína Activadora 1 (AP1) [Kao et al, 2001].

La línea celular PC12 es una línea derivada de un feocromocitoma la cual se diferencia hacia un fenotipo neuronal en respuesta al NGF. Esta línea celular es un modelo empleado para investigar los mecanismos moleculares que rigen la diferenciación neuronal. En este modelo, el NGF induce su diferenciación hacia células neuronales con un fenotipo parecido a las neuronas simpáticas noradrenérgicas [Zhou et al, 2006]. También se ha encontrado que el NGF promueve la supervivencia de las neuronas simpáticas. En estas neuronas el NGF interacciona con el TrkA en las terminales sinápticas. El complejo NGF-TrkA se internaliza en la célula y se transporta hacia el cuerpo celular en donde induce la fosforilación y la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB). CREB induce la expresión de genes de supervivencia como *Bcl-2* [Bedogni, 2003; Riccio et al, 1999]. Estudios de ratones nulos para el *NGF* confirmaron que éste influye en la supervivencia de las neuronas simpáticas *in vivo*. Estos ratones presentan una pérdida severa de las neuronas simpáticas y sensoriales y mueren a las pocas semanas después del nacimiento [Barker et al, 2001]. Los ratones que carecen del receptor TrkA presentan además, una disminución en las proyecciones de las neuronas colinérgicas hacia el hipocampo y la corteza, lo que demuestra que el NGF juega un papel en el crecimiento axonal [Einarsdottir et al, 2004].

Otra señal extrínseca que actúa en el sistema nervioso central lo componen la familia de proteínas Wnt. En los mamíferos la familia Wnt consta de 19 miembros. La función de algunos de los miembros es importante para el desarrollo del sistema nervioso central. Los ratones nulos para *Wnt1* carecen del cerebelo y de una porción del cerebro medio y mueren 24 horas después del nacimiento, mientras que los ratones nulos para *Wnt3a* tienen niveles reducidos de las células precursoras neuronales, carecen del hipocampo y mueren en las etapas embrionarias. [Galceran et al, 2000; Logan et al, 2004].

Un ejemplo de la importancia de Wnt en el desarrollo del sistema nervioso central es Wnt7a, que induce la sinaptogénesis al unirse a su receptor Frizzled5 (Fz5). En el hipocampo, la expresión de Fz5 aumenta durante el periodo de sinaptogénesis. La proteína Fz5 se localiza hacia los sitios en donde se formarán nuevas uniones sinápticas. En estos sitios Fz5 se une a Wnt7a, lo que lleva a la represión de la cinasa GSK-3 β . Esto conduce al remodelamiento del axón y a la acumulación de la proteína synapsin I en ese sitio, eventos que son preliminares para la formación de la sinapsis [Hall et al, 2000; Sahores et al, 2010].

Para que se lleve a cabo la neurogénesis del hipotálamo en el pez *Danio rerio* se requiere la señalización por Wnt8b. Wnt8b señala a través de β -catenina e induce la translocación del factor de transcripción Lef1 al núcleo donde induce la expresión del gen Sox3 [Lee et al, 2006;]. Sox3 participa en los procesos de la neurogénesis al activar “enhancers” (región génica encargada de la regulación de un grupo de genes) de algunos genes neuronales como nestina, lo que lleva a la generación de los progenitores neurales [Tanaka et al, 2004; Wegner, 2011].

Los factores de crecimiento transformante β (TGF β) forman una familia de citocinas multifuncionales. Estos factores actúan como los reguladores clave en algunos eventos del desarrollo. Los miembros de esta familia incluyen al TGF β 1, el TGF β 2, el TGF β 3, la proteína morfogénica de hueso 2 (BMP2), BMP4, el factor neurotrófico derivado de glía, entre otros. Entre las funciones tisulares y celulares del TGF β encontramos el control del ciclo celular, la regulación del desarrollo temprano, la formación de la matriz extracelular y las funciones inmunes [Kriegelstein et al, 2002]. Durante el desarrollo del sistema nervioso central, podemos encontrar al TGF β 1, 2 y 3 en varias de las poblaciones neuronales, con una mayor señal en las zonas en donde ocurre la diferenciación neuronal y una menor señal en las zonas donde se da la proliferación [Kriegelstein et al, 2002]. Sin embargo el TGF β también promueve la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio, al igual que de las neuronas ganglionares ciliadas [Roussa et al, 2004].

El TGF β ejerce sus efectos a través de la interacción con los receptores para TGF β tipo I y II los cuales forman un tetrámero conformado por dos receptores tipo I y dos receptores tipo II. El

receptor tipo II se activa al unirse al TGF β y fosforila al receptor tipo I, el cual propaga la señal a través de la fosforilación de las proteínas Smad reguladas por receptor (R-Smads: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8). Las proteínas R-Smad fosforiladas forman complejos con Smad4. Estos complejos se acumulan en el núcleo, donde controlan la expresión génica. Existen además proteínas Smad inhibitorias (Smad6 y Smad7), que antagonizan a las R-Smad y bloquean su señalización [Dobolyi et al, 2012]. Sin embargo, el TGF β puede señalizar por otras vías independientes de Smad, como por ejemplo la vía PI3K-Akt-mTOR y la vía Ras-ERK-MAPK [Mu et al, 2012].

Las señales intrínsecas en el desarrollo del sistema nervioso

Algunos tipos celulares, como los neuronales, se vuelven progresivamente independientes de la señalización extrínseca al basar su desarrollo únicamente en los programas intrínsecos de señalización [Edlund et al, 1999]. Esto sugiere que las señales intrínsecas son las que controlan más finamente los programas de especificación de los diferentes fenotipos neuronales. Como ejemplos de las señales intrínsecas tenemos a los factores de transcripción. Estos permiten y controlan la transcripción y son el punto final en las cascadas de señalización iniciadas por las señales extracelulares. Los factores de transcripción determinan el compendio molecular que expresa la célula, el cual es necesario para un desarrollo apropiado y para la función de una célula en particular [Burbach et al, 2001].

Un factor de transcripción con funciones en el desarrollo del sistema nervioso es CREB. CREB contiene tres dominios: un dominio C terminal básico, el cual media su unión al DNA; un dominio de cremallera o “zipper” de leucinas, el cual facilita su dimerización; y un dominio inducible por cinasas (KID). Por medio de la generación de los ratones nulos se ha identificado que CREB es importante para el crecimiento axonal. Los ratones que carecen de *CREB* mueren perinatalmente y presentan una disminución del *corpus callosum* y de las comisuras anteriores, lo que sugiere un defecto en el crecimiento axonal [Nonaka, 2009]. Este defecto se corroboró mediante los cultivos neuronales derivados de estos ratones; estas células presentan una disminución en el crecimiento axonal [Lonze et al, 2002]. CREB también promueve la supervivencia de las células neuronales *in vitro* [Bonnie et al, 2002; Walton et al, 1999].

La actividad de CREB se regula por varias señales, tales como el AMP cíclico, el calcio y las MAP cinasas. La fosforilación en la serina 133 es un punto clave en la regulación de la actividad transcripcional de CREB. Esta fosforilación lleva a su activación [Xiao et al, 2010]. La fosforilación de la serina 133 puede ser regulada por diferentes señales, tales como la actividad eléctrica, los factores de crecimiento, algunos neurotransmisores y las neurotrofinas [Mayr B et al, 2001]. La actividad de CREB también se regula por la fosforilación en otros sitios además de la serina 133, tales como las serinas 129, 142 y 143. La fosforilación de las serinas 142 y 133 por la cinasa dependiente de calmodulina (CaMK) conlleva a la represión de CREB [Chawla et al, 2001]. Estas serinas se encuentran en el dominio KID, el cual contiene sitios de unión consenso para una variedad de cinasas, tales como: PKA, PKC, CaMK, GSK3 β , ERK1/2 y Akt; de éstas, PKA, PKC, ERK1/2 y Akt pueden aumentar la actividad transcripcional de CREB, mientras que CaMK y GSK3 β la disminuyen [Sheena et al, 2002].

CREB se une a las secuencias de DNA denominadas elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE). La secuencia consenso del elemento CRE es TGACGTCA, aunque existen variantes de esta secuencia, la mayoría conserva la secuencia núcleo CGTCA [Bonnie et al, 2002]. CREB transactiva al unirse con la proteína de unión a CREB (CBP). CBP activa la transcripción por medio de dos mecanismos diferentes: 1) en los sitios CRE ocupados por CREB, CBP recluta a la maquinaria de transcripción (dentro de la cual se encuentra la RNA polimerasa II), y 2) CBP acetila a las histonas, lo que lleva a la relajación de la cromatina volviéndola más accesible [Fukuda et al, 2006].

Otro factor de transcripción muy estudiado por su participación en un amplio rango de vías de señalización es AP1. AP1 es el término con que se denomina al heterodímero formado por las proteínas pertenecientes a las familias de Fos y Jun. Estas proteínas se heterodimerizan mediante un dominio de cremallera de leucinas y se unen al DNA por medio de un motivo bZIP [Hess et al, 2004]. Estudios de la diferenciación de la línea celular PC12 sugieren que AP1 juega un papel en la diferenciación neuronal. La diferenciación de éstas células en respuesta a NGF se da por medio de la activación de Jun, lo cual se demostró al sobre-expresar dos versiones diferentes de Jun: una versión constitutivamente activa (en la cual los residuos serina 63 y 73, cuya fosforilación es

necesaria para la actividad de Jun, se encuentran mutados por aspartatos); y una dominante negativa, en la cual los mismos residuos se encuentran mutados por alaninas. La expresión de la versión de Jun constitutivamente activa es capaz de inducir la formación de las neuritas en ausencia del NGF, mientras que la expresión de la dominante negativa de Jun inhibe la formación de las neuritas en presencia del NGF. Estos estudios sugieren que AP1 juega un papel en la diferenciación neuronal. [Leppä et al, 2001]. Este grupo demostró además, que la activación de Jun por medio del NGF es dependiente de la MAPcinasa ERK.

La actividad transcripcional de AP1 puede ser regulada por un amplio rango de estímulos fisiológicos y patológicos, tales como las citosinas, algunos factores de crecimiento, algunos estímulos oncogénicos, y algunas señales de infección y de inflamación [Hess et al, 2004]. Estas señales pueden regular la actividad de AP1 ya sea alterando los niveles de sus subunidades o por medio de la fosforilación de Fos o Jun. Una manera de regular los niveles de las subunidades de AP1 es por la ubiquitinación. Por ejemplo la fosforilación de Jun por MAPquinasas reduce su ubiquitinación, y por lo tanto, su degradación [Kim et al, 2006]. Un ejemplo de regulación por la fosforilación es la cinasa JNK, la cual fosforila a Jun en las serinas 63 y 73, aumentando su actividad [Kim et al, 2006]. Otro ejemplo de la regulación por la fosforilación es la MAP cinasa ERK, la cual fosforila a Fos, incrementando su actividad [Monje et al, 2005]. AP1 regula la transcripción de sus genes blanco a través de su unión con los elementos de DNA llamados elemento de respuesta a TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), cuya secuencia consenso es TGACGTCA, aunque también se puede unir a los sitios CRE [Seldeen et al, 2009].

Otro grupo de factores transcripcionales son aquellos que contienen el motivo de unión al DNA de tres dedos de zinc. Un dedo de zinc es un domino peptídico cuya estructura secundaria se estabiliza por un ión zinc unido a residuos cisteína e histidina dentro del mismo dominio. En los factores transcripcionales los residuos que se unen al ión zinc son generalmente dos residuos de cisteína y dos de histidina, por los que se les denomina dedos del tipo C₂H₂ [Luchi et al, 2001]. El gen Krüppel, responsable de la segmentación del embrión en *Drosophila melanogaster*, fue uno de los primeros factores de transcripción con tres dedos de zinc del tipo C₂H₂ que se describió [Wieschaus et al, 1984]. Los factores de transcripción que contienen tres dedos de zinc se pueden clasificar en subfamilias basadas en sus respuestas características o en su homología de secuencia.

Dentro de estas subfamilias se encuentran los factores parecidos a Krüppel (Klf) y la subfamilia Sp1 [Christman et al, 2003]. Existen Klfs en diferentes organismos, tales como *Danio rerio*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus*, *Caenorhabditis elegans*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens*, entre otros [Basu et al, 2004; Huber et al, 2001; Oates et al, 2001; Wieschaus et al, 1984].

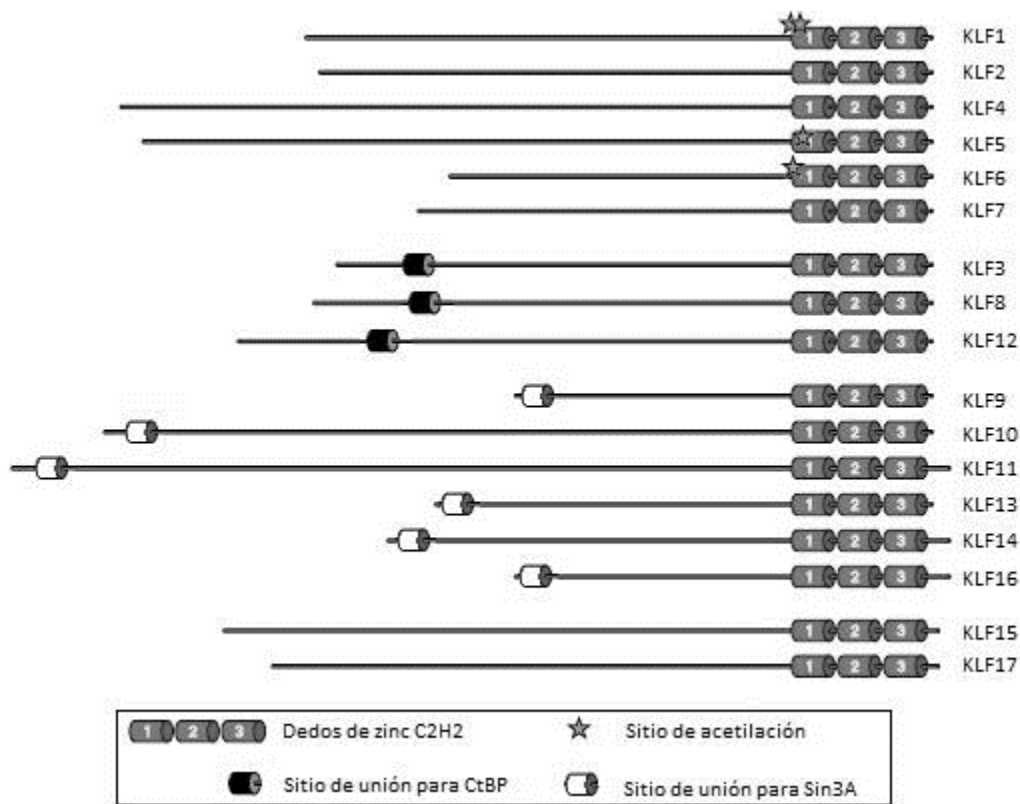


Figura 1: Diagrama de la estructura proteica de los miembros de la familia Klf. Las proteínas están agrupadas de acuerdo a los dominios estructurales y funcionales comunes. La agrupación está basada en: 1) la habilidad de unirse a acetilasas (Klf 1, 2, 4, 5, 6 y 7), 2) la presencia de sitios de unión para CtBP (Klf 3, 8 y 12), y 3) la presencia de un sitio de unión para Sin3A (Klf 9, 10, 11, 13, 14 y 16). Todos los miembros de la familia son altamente homólogos en la región de los dedos de zinc. Modificado de McConnel et al, 2010.

La subfamilia de los Klfs contiene 17 miembros en el humano, el dominio que contiene los dedos de zinc tiene un alto grado de homología entre los miembros de la subfamilia, mientras que el dominio N terminal es variable (Figura 1): algunos tienen dominios de activación, otros de represión y otros tienen dominios duales [Chen et al, 2010]. Se ha encontrado que los Klfs ejercen diversos papeles durante el desarrollo, tales como la diferenciación, la proliferación y el

mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre [Bieker et al, 2001]. Algunos de los integrantes de esta subfamilia son: Klf4, involucrado en la proliferación, la diferenciación y la apoptosis [Zhu et al, 2009]; Klf9, necesario para la neurogénesis hipocampal en el adulto [Scobie et al, 2009]; Klf10, involucrado en la diferenciación y la proliferación de los osteoblastos humanos [Cook et al, 2000]; Klf1, encargado de regular la eritropoyesis [Chen et al, 2003]; Klf2, Klf4 o Klf5 indispensables para el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre junto con otros factores de transcripción como Sox2, Oct4 y Nanog [Jiang et al, 2008]. De acuerdo con lo anterior, se han identificado a Klf4 y a Klf10 como genes de respuesta temprana durante la diferenciación de las células PC12 [Dijkmans et al, 2009]. Adicionalmente, los estudios previos realizados en nuestro grupo mostraron la presencia del mRNA de *Klf4* y de *Klf10* en el hipotálamo en el desarrollo, con un perfil de expresión que coincide con el tiempo de la neurogénesis de los diferentes fenotipos hipotalámicos [Guerra-Crespo et al 2011; Martínez-Armenta, manuscrito en preparación].

El desarrollo del hipotálamo

El hipotálamo es una estructura del sistema nervioso central localizada en la base del cerebro. Integra los procesos fisiológicos esenciales para la supervivencia y la reproducción, al tiempo que actúa como la interface entre los sistemas endócrino y autónomo [Michaud et al, 2001]. Regula varios procesos biológicos, tales como la presión sanguínea, la termorregulación, el balance energético y la expresión de los comportamientos sexual y maternal [Purves et al, 2004].

El hipotálamo está conformado por diferentes tipos de neuronas, las cuales, en murinos, se desarrollan entre los días embrionarios 10 y 16 y se agrupan en núcleos anatómicamente definidos [Kandel et al, 2000; Markaris 2002]. Pese a que los aspectos clínicos y fisiológicos del hipotálamo se han estudiado intensamente, se conoce relativamente poco acerca de los procesos moleculares que rigen su desarrollo [Pérez-Martínez et al, 2005; Pérez-Monter et al, 2011]. El hipotálamo representa un modelo de diferenciación neuronal muy interesante, ya que en una ventana de tiempo relativamente corta y en un área relativamente pequeña se observan los diferentes fenotipos neuronales [Kandel et al, 2000]. Estos diferentes fenotipos neuronales pueden ser identificados a través de la determinación del neuropéptido que secretan.

Entre lo que se ha descrito acerca del desarrollo del hipotálamo se encuentran los estudios acerca del desarrollo de tres de los núcleos hipotalámicos: el núcleo paraventricular (NPV), el núcleo supraóptico (NSO) y el núcleo periventricular anterior (PVA). El estudio de los ratones nulos permitió la identificación de los factores de transcripción *Sim1*, *Sim2*, *Otp*, *Brn2* y *Arnt2* responsables de al menos cinco distintos fenotipos neuronales hipotalámicos. Estos factores son responsables de los fenotipos productores de los neuropéptidos vasopresina (VP), oxitocina (OT), la hormona liberadora de tirotropina (TRH), la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y somatostatina (SS) (Figura 2) [Michaud et al, 2001; Pérez-Martínez et al, 2006]. El factor de transcripción *Otp* se propone que está involucrado en la proliferación de los precursores neurales [Acampora et al, 1999]. El ratón nulo para *Otp* no logra generar el NPV, el NSO ni el núcleo PVA, y por consiguiente no genera ninguno de los neuropéptidos mencionados [Wang et al, 2000]. Los factores de transcripción *Sim1* y *Arnt2* forman heterodímeros entre ellos y están involucrados en el programa de diferenciación del hipotálamo [Michaud et al, 1998]. Los ratones nulos para *Sim1* y *Arnt2* muestran una disminución de las neuronas en el NSO y en el NPV, y tampoco generan ninguno de los neuropéptidos [Michaud et al, 2000]. La expresión del gen de *Brn2* se pierde en los ratones nulos para *Sim1* y *Arnt2* [Liu et al, 2003]. Ratones nulos para *Brn2* no generan el NSO ni el NPV, y no expresan VP, OT ni la CRH [Nakai et al, 1995]. Sin embargo, en estos ratones los niveles de la TRH y de SS son normales. El gen de *Sim2*, actúa río abajo de *Sim1* y *Arnt2*, y se sugiere que *Sim2* puede formar heterodímeros con *Arnt2* [Moffett et al, 2000]. Los ratones nulos para *Sim2* presentan menos células productoras de la TRH y de SS, y por lo tanto los niveles de estos dos neuropéptidos están disminuidos [Goshu et al, 2004]. Estos estudios sugieren que la diferenciación neuronal involucra diversas cascadas de los factores de transcripción. Sin embargo, se desconocen las señales que regulan la expresión de estos factores de transcripción. Tampoco se sabe si estos factores son parte de una vía de señalización que controla la expresión de los neuropéptidos o si los genes de los neuropéptidos son blancos directos.

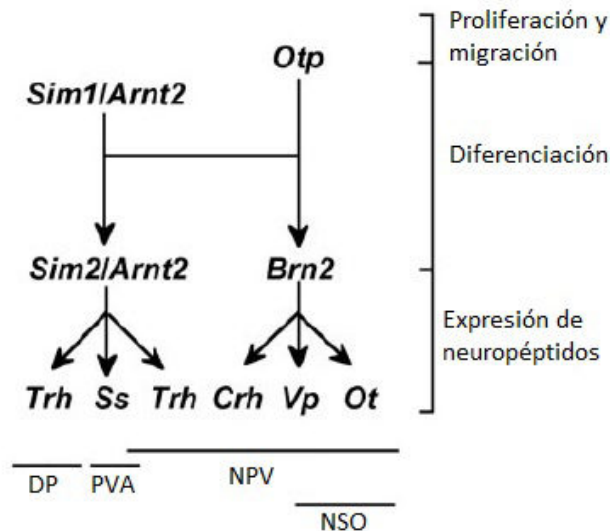


Figura 2: La regulación de los diversos neuropéptidos por los factores de transcripción. El modelo se basa en los fenotipos de los ratones nulos para los genes que codifican para los factores de transcripción indicados. DP: área dorsal preóptica, PVA: núcleo periventricular anterior, NPV: núcleo paraventricular, NSO: núcleo supraóptico. Modificado de Goshu et al, 2004.

El factor de transcripción Klf10

Con el propósito de estudiar con mayor detalle las señales que participan durante el desarrollo embrionario del hipotálamo, nuestro grupo caracterizó el transcriptoma del hipotálamo de embriones de ratón del día embrionario 17. Este análisis mostró que, entre otros genes, *Klf4* y *Klf10* se encuentran presentes desde etapas tempranas del desarrollo. De manera interesante, la etapa de aparición de estos factores de transcripción coincide con la etapa de diferenciación del hipotálamo. Dentro del mismo hipotálamo, se observó además una mayor expresión de ambos factores en las neuronas responsables de la liberación de la TRH [Guerra-Crespo et al, 2011]. Otro estudio dentro de nuestro grupo demostró que *Klf10* regula la expresión del gen de *TRH* [Martínez-Armenta, manuscrito en preparación].

Klf10 (también conocido como Gen 1 Tempranamente Inducido por TGFβ, o TIEG1) se identificó como un factor en respuesta al tratamiento con el TGFβ en los osteoblastos fetales humanos. En estas células, se incrementan los niveles del mRNA de *Klf10* 30 min después de un tratamiento con el TGFβ1, con un máximo (10 veces por encima de los controles) a los 120 min

[Subramaniam et al, 2007]. En este contexto celular, Klf10 funcionó como transductor de la señal de TGF β en la vía TGF β /Smad [Cook et al, 2000]. Esta transducción la logró reduciendo la retroalimentación negativa a través de la represión del inhibidor Smad7, a la vez que indujo la expresión del transductor de señal Smad2 [Subramaniam et al, 2007]. La sobreexpresión de Klf10, por medio de un vector de expresión para Klf10, mimetiza los efectos del TGF β en los osteoblastos humanos [Hefferan et al, 2000].

El gen de *Klf10* se compone de cinco exones y codifica para dos proteínas diferentes, Klf10 y EGR α (respuesta de crecimiento temprano α). Ambas proteínas comparten los últimos tres exones, usándose el exón 1 como primer exón para Klf10 y el exón 2 como primer exón para EGR α . Ambas proteínas tienen la misma secuencia, y se diferencian únicamente en que Klf10 presenta 12 aminoácidos más en su extremo N terminal [Fautsch et al, 1998]. Estas dos proteínas se regulan por promotores alternativos, que responden diferencialmente a las mismas señales. Esto se demostró en osteoblastos fetales con oligonucleótidos que reconocen específicamente los exones 1 ó 2. En estos experimentos se encontró que el TGF β y el EGF inducen preferencialmente el mRNA de *Klf10* y no el de *EGR α* [Fautsch et al, 1998]. Actualmente Klf10 y EGR α se consideran isoformas de un mismo gen. Hasta el momento no se han encontrado funciones diferenciales entre ambas proteínas.

A nivel de proteína Klf10 posee tres dedos de zinc del tipo C₂H₂ en su extremo C-terminal al igual que los demás miembros de la familia de los Klf. El extremo N-terminal, por su parte, contiene tres dominios represores, uno de los cuales se ha comprobado que interacciona con el corepresor mSin3a [Cook et al, 1999; Zhang et al, 2001]. Otro dominio importante para la actividad transcripcional de Klf10 es un dominio rico en prolinas, el cual interacciona con el factor de transcripción Sp1 [Gunther et al, 2000]. Además de estos dominios, se ha encontrado que Klf10 presenta un sitio de unión para la E3 ligasa de ubiquitina, SIAH. La unión de esta enzima a Klf10 induce su degradación por el proteasoma, limitando su acción a tiempos cortos [Johnsen et al, 2002].

En las ratonas nulas para *Klf10* se encontró que la densidad, el tamaño y la tasa de la formación de los huesos están significativamente reducidos. En los ratones machos nulos para *Klf10*, estas

afectaciones no están presentes [Subramaniam et al, 2010]. Sin embargo, desarrollan hipertrofia cardiaca que no se observa en las hembras [Rajamannan et al, 2007]. Estos hallazgos sugieren que Klf10 puede tener mecanismos de acción específicos y diferentes para cada sexo. Klf10 regula la osteoblastogénesis, la osteoclastogénesis, la proliferación celular en el corazón, la mama y otros tejidos [Subramaniam et al, 2007]. Klf10 actúa también en la apoptosis, inhibiendo la expresión del gen anti-apoptótico Bax Inhibitor-1 (BI-1), lo que lleva a una acumulación de la proteína proapoptótica Bax, y subsecuentemente a la apoptosis [Hsu et al, 2011]. Klf10 parece jugar papeles en el sistema nervioso central puesto que existen estudios que muestran que *Klf10* se induce en respuesta al factor neurotrófico derivado de glía, al BDNF, al NGF [Alme et al, 2007; Consales et al, 2007; Dijkmans et al, 2009]; además de que la expresión de Klf10 en el cerebro se altera tras una herida experimental en el cerebro y en respuesta al estrés [Alme et al, 2007; Kobori et al, 2002].

Los factores de transcripción de la familia Klf reconocen la secuencia CACCC o las cajas ricas en GC en la región promotora de sus genes blanco [Conkright et al, 1999; Cook et al, 1999; Tachibana et al, 1997]. Se ha reportado que Klf10 reconoce tanto la secuencia CACCC como las cajas GC [Bieker et al, 2001; Johnsen et al, 2002]. El reconocimiento de una u otra secuencia depende del contexto del promotor. En este aspecto, nuestro grupo ha demostrado que Klf10 se une preferencialmente a las secuencias ricas en GC en el promotor del gen de *TRH*, a pesar de que este promotor contiene también sitios CACCC [Martínez-Armenta, manuscrito en preparación]. Entre los genes blancos de Klf10 se han reportado *Smad7*, *Smad2*, *BARD1*, *BI-1* y *CD11d* [Hsu et al, 2011; Subramaniam et al, 2007; Noti et al, 2005].

Klf10 puede actuar como activador o como represor de la transcripción. Como ejemplos de esto tenemos que Klf10 induce la expresión de *Smad2*, mientras que reprime la de *Smad7*. Se ha demostrado, también, que reprime la expresión de *Osteoprotegerina* y *Nmyc* uniéndose e interrumpiendo el sitio de unión de Sp1 en el promotor de estos genes [Álvarez-Rodríguez, 2007; Subramaniam et al, 2010]. En los leucocitos, Klf10 lleva a la activación del promotor de *CD11d*, una integrina leucocitaria [Noti et al, 2005]. De manera interesante, el efecto de Klf10 sobre *CD11d* se reprime por otro miembro de la familia de los Klf: Klf4. Esto se debe a que Klf4 se

une al mismo sitio que Klf10 en el promotor de este gen, lo cual impide la unión física de este último y por lo tanto evita la transactivación [Noti et al, 2004].

En cuanto al mecanismo molecular por medio del cual Klf10 actúa en la célula, se ha encontrado que Klf10 puede interactuar con, al menos, dos co-represores transcripcionales: mSin3A y JARID1B [Kim et al, 2010; Zhang et al, 2001]. JARID1B ejerce función de represor mediante la remoción de los grupos metilo de las histonas; específicamente, los grupos metilo de la lisina 4 de la histona 3 [Kim et al, 2010], mientras que mSin3A ejerce su acción mediante el reclutamiento de las desacetilasas de histonas [Hassig et al, 1997]. Se ha propuesto que mediante su interacción con estas moléculas, y mediante el reconocimiento de elementos específicos del DNA es que Klf10 tiene un efecto represor sobre genes como *Smad7* o *BI-1*. En cuanto al mecanismo transactivador, se ha demostrado que Klf10 puede reclutar a la acetilasa de histonas PCAF para transactivar [Xiong et al, 2012]. Además Klf10 interactúa con el factor transcripcional Sp1. Se cree que estas interacciones pueden llevar a la activación transcripcional de genes como *Smad2* o *CD11d* [Chen et al, 2002; Gunther et al, 2000].

A pesar de que se conocen algunas de las señales que regulan a *Klf10* (el TGF β , la BMP2, el estradiol, entre otras [Álvarez-Rodríguez, 2007; Hsu et al, 2011, Subramaniam et al, 2010]), se ha descrito poco acerca de la región regulatoria del gen de *Klf10*. Se ha demostrado que la región de alrededor de 2000 pares de bases (pb) río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de *Klf10* es capaz de regular sus niveles de transcripción en respuesta al NGF [Spittau et al, 2010].

El hecho de que *Klf10* se encuentra expresado en el hipotálamo en el desarrollo [Guerra-Crespo et al, 2011], que su expresión coincide con el tiempo de la neurogénesis del hipotálamo, que tiene un papel en la diferenciación celular, y que regula la expresión del neuropéptido TRH [Martínez-Armenta, manuscrito en preparación] nos lleva a sugerir que Klf10 tiene un papel importante en el desarrollo de las neuronas hipotalámicas y que su expresión está regulada por las señales neurogénicas. En el presente proyecto, demostramos que el gen de *Klf10* es blanco de CREB y AP1, lo que sugiere que puede ser regulado por algunas señales neurogénicas como Wnt, el NGF y el BDNF.

HIPÓTESIS

Para que el hipotálamo se desarrolle correctamente se requiere de la inducción del factor de transcripción *Klf10* en respuesta señales neurogénicas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si las señales neurogénicas son capaces de regular la expresión de *Klf10* en neuronas hipotalámicas embrionarias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar mediante herramientas bioinformáticas qué señales podrían regular la expresión de *Klf10*.
2. Analizar la regulación de la expresión de *Klf10* en respuesta a señales extracelulares por medio de RT-PCR.
3. Analizar la regulación de la expresión de *Klf10* en respuesta a señales por medio del gen reportero de luciferasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de la conservación del promotor de *Klf10*

Primeramente se obtuvo la secuencia de 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de *Klf10* de *Mus musculus* de la base de datos Gene del NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>]. Esta secuencia se utilizó en la herramienta BLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] y se comparó contra la base de datos refseq_genomic.

A partir de la base de datos Gene se obtuvo la secuencia de 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de *Klf10* de los siguientes organismos: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Pan troglodytes*, *Canis lupus familiaris*, *Macaca mulatta*, *Ailuropoda melanoleuca* y *Bos Taurus*. Todas estas secuencias mostraron un alto nivel de apareamiento con la región de *Mus musculus*. Estas secuencias se analizaron después mediante la herramienta mVista [<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>], para determinar el nivel de conservación entre ellas.

Análisis de sitios posibles de unión para factores de transcripción sobre el promotor de *Klf10*

Se realizó el alineamiento de las secuencias de *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Pan troglodytes* previamente adquiridas mediante la herramienta Clustal X [<http://www.clustal.org/clustal2/>]. Este alineamiento se analizó después con la herramienta ConTra v1 [<http://bioit.dmbr.ugent.be/ConTra/index.php>], usando para el análisis las bases de datos de matrices de sitios consenso de factores de transcripción JASPAR [<http://jaspar.genereg.net/>] y TRANSFAC [<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>].

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para las reacciones de PCR se utilizó la enzima Amplificasa de BioTecMol, la cual es provista con buffer de reacción 10X y solución de MgCl₂ 20X.

Para obtener los dos fragmentos de la secuencia regulatoria de *Klf10* (516 y 1977 pb) se utilizaron los oligonucleótidos mencionados en la figura 12C, usando como templado el DNA genómico de la cepa de ratón C57BL/6J como el templado.

Para la obtención de la región de 516 pb se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos que consisten de 1 min a 95°C, 1 min a 64°C y 2 min a 72°C; finalizando con 10 min a 72°C. Por cada microlitro de reacción se utilizaron 1 ng del DNA templado y 0.5 pmol de cada oligonucleótido.

Para amplificar la región de 1977 pb se empleó el siguiente programa: 3 min a 95°C, seguidos por 35 ciclos de 1 min a 95°C y 3 min a 72°C, finalizando con 10 min a 72°C. Por cada microlitro de reacción se usaron 1 ng del DNA templado y 0.75 pmol de cada oligonucleótido.

Para amplificar el fragmento que permite la detección del mRNA de *Klf10*, se usaron los oligonucleótidos CACAGGGGAAAAACCTTTCA y ACTTCCATTTGCCAGTTTGG; utilizando el siguiente programa: 5 min a 94°C, seguidos por 35 ciclos que consisten en 45 s a 94°C, 45 s a 60°C y 1 min a 72°C; finalizando con 5 min a 72°. Por cada microlitro de reacción se usaron 0.12 µl del producto de la reacción de retrotranscripción y 0.5 pmol de cada oligonucleótido.

Para amplificar el fragmento que permite la detección del mRNA de *actina*, que nos sirvió como control interno para los ensayos de RT-PCR, se usaron los oligonucleótidos GGGTCAGAAGGACTCCTATG y GGTCTCAAACATGATCTGG; utilizando el siguiente programa: 27 ciclos que consisten en 45 s a 94°C, 45 s a 60°C y 1 min a 72°C; finalizando con 5 min a 72°C. Por cada microlitro de reacción se usaron 0.08 µl del producto de la reacción de retrotranscripción y 1 pmol de cada oligonucleótido.

Para amplificar el fragmento que permite la detección del mRNA de *cFos*, se usaron los oligonucleótidos CTCCTTCTCCAGCATGGG y GATCTTGCAGGCAGGTTCG; utilizando el siguiente programa: 5 min a 94°C, seguidos por 35 ciclos que constan de 45 s a 94°C, 45 s a 60°C y 1 min a 72°C; finalizando con 5 min a 72°C. Por cada microlitro de reacción se usaron 0.12 µl del producto de la reacción de retrotranscripción y 1 pmol de cada oligonucleótido.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris-Boratos-EDTA) (preparado según Sambrook et al, 2001). Como buffer de corrida se utilizó el buffer TBE diluido 1:1 en agua. Posterior a la electroforesis se colocó el gel en una solución de bromuro de etidio (1 $\mu\text{g/ml}$) durante diez min, agitando constantemente; tras los cuales se colocó por cinco min en agua destilada. Tras la tinción se obtuvieron las imágenes del DNA en un transiluminador UV (BioRad). Para saber el peso molecular de las bandas obtenidas se utilizaron los marcadores de pares de bases de 100 pb o de 1 kb (New England Biolabs), según se requería.

Purificación del DNA

Se corrieron los productos de la PCR en un gel de agarosa, se cortaron las bandas, se eluyeron y se purificó el DNA usando columnas (QUIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido se almacenó a 4°C.

Digestiones y ligaciones del DNA

Las regiones regulatorias del gen de *Klf10* obtenidas por PCR se clonaron en el vector pGL3-basic (Promega) para lo cual se hizo una digestión de los productos de la PCR. Se sometieron a digestión usando las enzimas *HindIII* y *XhoI* (New England Biolabs). Las mezclas de la reacción se prepararon según el protocolo del fabricante. Se realizó una misma mezcla de la reacción para *HindIII* y *XhoI* junto con el DNA a digerir en el Buffer 2 (New England Biolabs), adicionado con albúmina de suero bovino (BSA fracción V). Posteriormente se incubaron las mezclas a 37°C durante toda la noche. Estas enzimas se utilizaron para digerir tanto las regiones regulatorias de *Klf10* obtenidas por la PCR, como el vector pGL3-basic.

En el caso de las digestiones diagnósticas, las construcciones se sometieron a digestión utilizando la enzima *SalI* (Fermentas), la mezcla de la reacción se realizó utilizando el Buffer O (Fermentas).

Posteriormente se realizó la ligación de los fragmentos de la secuencia regulatoria de *Klf10* en el vector pGL3-basic. Se prepararon las mezclas del vector, digerido con *HindIII* y *XhoI*, ya sea con el fragmento de 516 pb o el de 1977 pb, también previamente digeridos. Se le añadió la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas) y se incubó a alrededor de 16°C durante toda la noche.

Transformación de las bacterias

A 100 µl de una suspensión celular de bacterias calcio competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5α se le agregaron 10 µl del vector a integrar (Klf10-2000-Luc, Klf10-500-Luc o el vector vacío). Se mantuvieron en hielo por al menos 20 min para después llevar a cabo el choque térmico, el cual consistió en 90 s a 42°C seguidos por 2 min en hielo. Posteriormente se incubó en agitación a 37°C durante 1 h después de añadir 500 µl de medio LB. Las células se sembraron después en cajas Petri con el medio LB-agar previamente adicionado con ampicilina 100µg/ml. Se incubaron a 37°C por 12 h o hasta observar las colonias. Se tomó una colonia independiente y se pasó a un tubo de ensayo estéril con medio LB líquido adicionado con ampicilina 100µg/ml. Este tubo se incubó toda la noche a 37°C.

Purificación de DNA a partir de bacterias

Se tomaron fracciones consecutivas del cultivo bacteriano en un tubo Eppendorf y se centrifugó 20 s a 15,000 rpm, esto con el fin de precipitar las células en suspensión en el tubo Eppendorf. Posteriormente se realizó el protocolo GeneJET Plasmid Miniprep kit (Thermo Scientific) según el fabricante. El DNA obtenido se cuantificó utilizando un NanoDrop (Thermo Scientific).

Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares que se utilizaron en este proyecto fueron: HEK 293, que proviene de riñón de embrión humano, y mHypoE-N1, que son neuronas derivadas de hipotálamo embrionario de ratón. Ambas líneas celulares se cultivaron en las mismas condiciones. Con medio de cultivo DMEM (Gibco) adicionado con penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 0.1 mg/ml, glutamina 2 mM y 10% suero fetal bovino (SFB) (Biowest). Las células en cultivo se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂. Para el mantenimiento y expansión de las líneas celulares, se

sembraron a una densidad de 3,500 células por cm^2 . Para las condiciones de cultivo y el número de células sembradas en cada experimento, ver la sección correspondiente.

Una vez que las células en cultivo llegaron a 80-90% de confluencia se realizó el pase. Primeramente se retiró el medio de cultivo y se lavó la caja Petri con 1 ml de PBS (preparado según Sambrook et al, 2001). Posteriormente se retiró el PBS y se añadió el volumen necesario de tripsina 0.5% (Gibco) (500 μl para las cajas Petri de 35 o 60 mm de diámetro o 1 ml para las cajas Petri de 100 mm de diámetro). Se incubaron las cajas de 2 a 6 min a 37°C hasta observar desprendimiento de las células. Se añadió el mismo volumen del medio de cultivo (adicionado con 10% SFB) que el volumen de tripsina usado. Se tomó una alícuota para contar las células como se describe a continuación y se sembraron 3,500 células por cm^2 en cajas Petri nuevas. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% CO_2 . Todas las soluciones que se utilizaron se atemperaron previo a su uso.

Conteo celular

Para el recuento de células se empleó una cámara de Neubauer, también llamada hematocitómetro. En un tubo Eppendorf de 0.5 ml se añadieron 20 μl de azul de tripano y 20 μl de la suspensión celular a cuantificar. Con el uso de un microscopio óptico se contaron todas las células que se encontraron dentro del cuadrante central de ambas cámaras de conteo. La sumatoria de ambas cuentas se multiplicó por un factor de 10, lo que nos dio el número de células por microlitro de suspensión celular.

Congelación de líneas celulares

Para su preservación, las líneas celulares se congelaron a -70°C en crioviales. Para congelar las células a partir de los cultivos celulares, primeramente se retiró el medio de cultivo a las cajas Petri y se lavó con 1 ml de PBS. Se retiró el PBS y se añadió el volumen necesario de tripsina 0.5% (500 μl para cajas Petri de 35 o 60 mm de diámetro y 1 ml para cajas Petri de 100 mm de diámetro). Se incubaron de 2 a 6 min a 37°C hasta observar desprendimiento celular. Se añadió el mismo volumen de medio de cultivo (adicionado con 10% SFB) que el volumen de tripsina usado

y se tomó una alícuota para el recuento de las células. Posterior a esto, la suspensión celular se colectó en un tubo Falcon de 15mL y se centrifugó por 5 min a 1,200 rpm. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en el volumen necesario de medio de congelación (1 ml por cada criovial a congelar). El medio de congelación consiste de SFB con dimetil sulfóxido al 8%. Se pasó la suspensión a los crioviales y se congelaron a -70°C . Se congelaron aproximadamente 1,000,000 de células en cada criovial. Todas las soluciones que se utilizaron se atemperaron previo a su uso.

Descongelación de líneas celulares

Para la descongelación de las líneas celulares primeramente se pusieron 4 ml de medio de cultivo en un tubo Falcon de 15 ml. Los crioviales se descongelaron hasta tener un hielo pequeño (los crioviales se mantienen en hielo seco hasta el momento de descongelarlos). Se vertió todo el contenido del criovial al interior del tubo Falcon. El criovial se lavó una vez con medio de cultivo con el fin de recuperar el mayor número de células posible. La suspensión celular se centrifugó durante 7 min a 1,500 rpm. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1ml de medio de cultivo. Se pasó la suspensión celular a una caja Petri con medio de cultivo y se incubó a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 . Todas las soluciones que se utilizaron se atemperaron previo a su uso.

Tratamiento de células en cultivo con moléculas señalizadoras

Para los diversos tratamientos con moléculas señalizadoras se utilizaron las líneas celulares mHypoE N1 y HEK 293. Se sembraron 200,000 células en cajas Petri de 35 mm, se mantuvieron de 6 a 8 h con medio DMEM suplementado con 5% SFB. Transcurrido este tiempo se retiró el medio y se añadió DMEM suplementado únicamente con 0.5% SFB. Tras 12 a 14 h, se retiró el medio y se añadió medio DMEM suplementado con 0.5% SFB y con la concentración necesaria de la molécula a probar. Como control se usó medio DMEM suplementado con 0.5% SFB. Para el caso del NGF, se añadió además albúmina de suero bovino a una concentración final de 0.1% como acarreador. En el caso del TPA, al control se le añadió PBS con 0.1% de etanol. El NGF se

usó a una concentración final de 100 ng/ml; el Dibutiril AMP cíclico (DBcAMP) a una concentración final de 1 mM; y el TPA a una concentración final de 100 μ M.

Transfección de células en cultivo

Para las transfecciones de células en cultivo se sembraron 220,000 células en las cajas Petri de 35 mm y se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 5% SFB durante 12 a 14 h. Al menos 1 h antes de la transfección se retiró el medio a las cajas y se colocaron 600 μ l de medio DMEM no suplementado. En un tubo Eppendorf se colocaron 3 μ l de lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se llevó a 50 μ l. En otro tubo Eppendorf se colocó el DNA a transfectar y se llevó a 50 μ l; a menos que se indique lo contrario, se utilizaron 800 ng del plásmido a transfectar, además de 80 ng de plásmido pRL-CMV (Promega) (donado por el Dr. Félix Recillas), el cual nos sirve como control de transfección ya que permite la expresión de la proteína luciferasa de *Renilla* bajo un promotor activo constitutivamente. Se dejó reposar la lipofectamina al menos 5 min a temperatura ambiente, tras los cuales se mezclaron la lipofectamina y el DNA a transfectar. Se incubó durante 25 min para después agregar la mezcla a la caja Petri. Las células se incubaron con la mezcla de transfección a 37°C en la incubadora durante 4 h. Transcurrido este tiempo se retiró la mezcla de transfección y se añadió medio DMEM suplementado con 5% de SFB. Las células transfectadas se incubaron durante 48 h y después se realizó la extracción de proteínas totales. En los casos en que las células transfectadas se trataran además con las moléculas señalizadoras, el medio se retiró 8 h después de la transfección y se añadió medio DMEM suplementado con 0.5% SFB. Tras 12 a 14 h, se retiró el medio y se añadió medio DMEM suplementado con 0.5% SFB y con la concentración necesaria de la molécula a probar. 48 h después se realizó la extracción de proteínas totales.

Purificación de RNA

La extracción de RNA se realizó a partir de las células en cultivo. Para este protocolo las muestras se mantuvieron en hielo en todo momento, a menos que se especifique lo contrario. Todas las soluciones para este protocolo se prepararon con agua con dietilpircarbonato (DEPC). Primeramente se retiró el medio de cultivo y se lavó la caja Petri dos veces con PBS (en este punto

se puede congelar la caja Petri a -70°C si se desea detener el protocolo). Se agregaron $400\ \mu\text{l}$ de Solución D (tiocianato de guanidina $4\ \text{M}$; citrato de sodio $25\ \text{mM}$ a $\text{pH}\ 7.0$; sarcosil, 0.5% ; β -mercaptoetanol $0.1\ \text{M}$) a la caja de cultivo, se raspó la caja con el émbolo de una jeringa estéril. Se pasó todo el líquido a un tubo Eppendorf de $1.5\ \text{ml}$ previamente etiquetado. Se agregaron $40\ \mu\text{l}$ de acetato de sodio $2\ \text{M}$ a $\text{pH}\ 4$ y se agitó en vórtex. Se agregaron $400\ \mu\text{l}$ de fenol saturado en agua DEPC y se agitó en vórtex. Se añadieron $100\ \mu\text{l}$ de una mezcla de cloroformo-cohol isoamílico $49:1$ y se agitó en vórtex por $1\ \text{min}$ hasta obtener un aspecto lechoso. Se mantuvo la muestra en hielo por $15\ \text{min}$, posteriormente se centrifugó a $13,000\ \text{rpm}$ por $17\ \text{min}$ a 4°C . Se retiró el tubo a temperatura ambiente y se pasó la fase cristalina superior a un tubo Eppendorf previamente etiquetado que tubo se volvió a poner en hielo. Se agregaron $450\ \mu\text{l}$ de isopropanol, se agitó en vórtex y se incubó $30\ \text{min}$ en hielo seco humedecido con etanol (alternativamente se puede incubar por $2\ \text{h}$ a -20°C). Posteriormente se descongeló la muestra en hielo, se agitó en vórtex y se centrifugó a $13,000\ \text{rpm}$ por $22\ \text{min}$ a 4°C . Se retiró el sobrenadante, y se dejó cerca de $50\ \mu\text{l}$ para evitar perturbar el precipitado. Se añadieron $300\ \mu\text{l}$ de solución D y $300\ \mu\text{l}$ de isopropanol, se agitó en vórtex y se incubó toda la noche a -20°C (en este paso se puede mantener $32\ \text{h}$). Posteriormente se descongeló en hielo, se agitó en vórtex y se centrifugó a $13,000\ \text{rpm}$ por $22\ \text{min}$ a 4°C . Después se retiró el sobrenadante dejando alrededor de $50\ \mu\text{l}$, se añadieron $400\ \mu\text{l}$ de etanol 70% previamente enfriado en a -20°C , se dejó reposar $1\ \text{min}$, se agitó en vórtex y se centrifugó a $13,000\ \text{rpm}$ por $22\ \text{min}$ a 4°C . Posteriormente se retiró todo el sobrenadante y se secó la pastilla a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla en 12 a $17\ \mu\text{l}$ de agua DEPC y se almacenó a -70°C . Al día siguiente se cuantificó el RNA en Nanodrop y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% para analizar la integridad del RNA (se espera una relación $2:1$ entre las bandas correspondientes a los RNA ribosomales $28\ \text{S}$ y $18\ \text{S}$).

Reacción de la retrotranscripción (RT)

Para la reacción de retrotranscripción se tomó $1\ \mu\text{g}$ de RNA y se llevó a $12\ \mu\text{l}$ con agua DEPC. La mezcla de reacción se preparó en un tubo Eppendorf. La mezcla de reacción se compone de $8.9\ \mu\text{l}$ de agua DEPC, $6\ \mu\text{l}$ de buffer RT, $3\ \mu\text{l}$ de DTT $0.1\ \text{M}$, $0.6\ \mu\text{l}$ de dNTPs, $1\ \mu\text{l}$ de oligo dT, y $0.5\ \mu\text{l}$ de la enzima RT. El RNA se descongeló en hielo, después se calentó a 65°C por $5\ \text{min}$, posteriormente se enfrió en hielo por $5\ \text{min}$. Se añadieron los $20\ \mu\text{l}$ de mezcla de reacción al tubo

con el RNA y se incubó a 37°C por 2 h. El cDNA obtenido se almacenó a 4°C si se usó ese mismo día, o a -20°C si se requirió almacenarlo por más tiempo.

Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas se realizó a partir de células en cultivo. Se retiró el medio de cultivo y se lavó la caja Petri dos veces con PBS. La caja Petri se puede guardar a -70°C en este paso. Se agregaron 100 µl de buffer pasivo de lisis (Promega) a la caja Petri y se raspó el fondo de la caja con el émbolo de una jeringa estéril. Se recuperó el líquido en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se incubó en hielo por 15 min. Se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 10 min y se recuperó el sobrenadante en un tubo Eppendorf. Las proteínas se pueden almacenar a -70°C. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford preparando una curva estándar con albúmina de suero bovino (BSA) al momento de la cuantificación. En los casos en que las proteínas se destinaron a ensayos de Western Blot, se concentraron a la mitad de su volumen inicial en un SpeedVac.

Análisis tipo Western Blot (WB)

Para los ensayos tipo WB se tomó el volumen necesario del extracto celular para tener de 25 a 30 µg de proteína y se llevó a 20 µl con agua estéril, se añadieron 4 µl de buffer de carga. Las muestras se hirvieron durante 5 min y se mantuvieron en hielo o a 4°C hasta el momento de cargarse en el gel de acrilamida. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10% corriendo las proteínas a 35 mA hasta que se observó que el marcador de peso molecular (Prestained Protein Ladder Plus de Fermentas) se separó. Las proteínas se transfirieron después a una membrana de nitrocelulosa usando una corriente de 100 V durante 90 min. A la membrana se le añadió rojo de Ponceau para poder visualizar las proteínas transferidas y se cortó el trozo de membrana en el cual se espera ver las proteínas de interés. Después de esto se bloqueó la membrana con TBS-T (Buffer de Tris salino con 0.05% de Tween) con 5% de leche sin grasa o con TBS-T con 5% de BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez bloqueada la membrana, se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en TBS-T con 5% de leche o de BSA, según el anticuerpo utilizado, a 4°C durante toda la noche. Después de esto se lavó la membrana

tres veces manteniéndola 5 min en agitación en TBS-T. Se incubó el anticuerpo secundario diluido en TBS-T con 5% de leche a temperatura ambiente durante 1 h. Se lavó la membrana tres veces con TBS-T manteniéndola en agitación durante 5 min. Se preparó una mezcla 1:1 de luminol y de agente oxidante (kit Western Lightning Plus-ECL de PerkinElmer). Se incubó la membrana en la mezcla de reacción durante 1 min bajo la luz roja, después se colocó la membrana entre dos plásticos. Dentro del cassette para autoradiografías se puso un trozo de film de autoradiografía sobre la membrana (este paso se repitió a diferentes tiempos de exposición para obtener una señal ideal de las proteínas). El film de autoradiografía expuesto se sumergió en solución reveladora (Kodak) por 1 min, se lavó con agua y se sumergió en solución fijadora (Kodak) 1 min. Los films de autoradiografía se escanearon después para obtener las imágenes usadas en las figuras.

Lectura de actividad de luciferasa

Para leer la actividad de luciferasa se utilizó el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) conforme instrucciones del fabricante. Se utiliza la actividad de luciferasa de *Renilla* provista por el vector pRL-CMV como control interno para normalizar los datos. Se determinaron las señales de luciferasa de luciérnaga y de *Renilla* de cada muestra y se realizó una relación luciérnaga/*Renilla*. Esta relación se usa para comparar los datos ajustando el control a un valor de 1.

Análisis de densitometría de geles de DNA

El análisis densitométrico de los geles de electroforesis de los productos de RT-PCR se realiza con el software ImageJ 1.45s (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Se obtuvo el valor de densidad de las bandas de los productos de PCR y se hizo una relación gen de interés (*Klf10* o *cFos*) entre gen control (*actina*). Esta relación se usó para comparar los datos de cada experimento, normalizando el tratamiento control a un valor de 1.

Análisis estadístico

La significancia estadística de los ensayos se determinó mediante el análisis estadístico de t de Student pareado, utilizando la herramienta web QuickCalcs de GraphPad (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>).

RESULTADOS

El promotor del gen de *Klf10* está conservado entre los murinos y los primates

Para identificar las posibles señales que podrían regular al gen de *Klf10* nos apoyamos inicialmente en las herramientas bioinformáticas. Nuestro primer enfoque fue el análisis de la secuencia de las 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (la cual ha sido propuesta como el promotor) del gen de *Klf10* de ratón (*Mus musculus*) [Spittau et al, 2010]. El análisis de esta secuencia por medio de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) mostró que varios organismos poseen secuencias homólogas río arriba del gen de *Klf10*, entre estos organismos se encuentran: el humano (*Homo sapiens*), el chimpancé (*Pan Troglodytes*), la rata (*Rattus norvegicus*), el macaco (*Macaca mulatta*), el toro (*Bos taurus*), el orangután (*Pongo abelli*), el perro (*Canis lupus domesticus*), el jabalí (*Sus scrofa*), el caballo (*Equus caballus*), el elefante (*Loxodonta africana*) y el panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*). Después decidimos hacer un alineamiento del promotor de *Klf10* de los organismos con los valores más altos de similitud. Los organismos cuyas secuencias se utilizaron en este alineamiento fueron: el ratón, la rata, el humano y el chimpancé.

Antes de realizar un análisis en busca de los posibles sitios de unión para los factores de transcripción, decidimos analizar el nivel de la conservación de esta región. Para ello utilizamos el software mVista (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>). Este software nos permite comparar las diferentes secuencias homólogas y nos indica de una manera gráfica el grado de la conservación entre estas secuencias. La figura 4 muestra los esquemas de la conservación obtenidos con el software mVista. En la figura 4A se utilizó como referencia el promotor de *Klf10* del humano y se comparó con la secuencia homóloga en el ratón, la rata y el chimpancé. Se puede apreciar que existe casi el 100% de conservación entre las secuencias del humano y del chimpancé, y que existe alrededor del 50% de conservación en varias zonas a lo largo de la secuencia entre el humano y el ratón, y entre el humano y la rata. En la figura 4B se utilizó como referencia el promotor de *Klf10* de ratón y se comparó con la secuencia homóloga en el humano, la rata y el chimpancé. En este caso podemos observar que existe aproximadamente el 90% de conservación entre las secuencias del ratón y de la rata, y que también existe alrededor del 50% de conservación a lo largo de varias zonas de la secuencia entre el ratón y el humano, y entre el ratón y el chimpancé. El hecho que

exista un grado relativamente alto de la conservación entre estas secuencias nos sugiere que se trata de una secuencia funcional. Esto también nos sugiere que la regulación del gen de *Klf10* es similar entre el ratón y el humano, por lo que decidimos trabajar con el promotor de *Klf10* de ratón, ya que nuestro modelo de estudio serán células de ratón.

En el promotor del gen de *Klf10* existen sitios de unión para una variedad de factores de transcripción que participan en diversas vías de señalización

El alineamiento generado anteriormente lo analizamos en busca de los sitios posibles de unión para los factores de transcripción. Para esto utilizamos el software ConTra v1 (<http://bioit.dnbr.ugent.be/ConTra/index.php>). Los factores de transcripción con sitios putativos de unión conservados entre las cuatro especies son: AP-1, Arnt, c-Ets, c-Myc, CREB, HIF1 α , Krox, Lef1, Myb, MyoD, NFAT, NF- κ B, BRCA1, HSF, p53, Smad3, Sox10, Sp1, ER y STAT1, entre otros (Apéndice 1). El apéndice 2 muestra las secuencias consenso para los diversos factores de transcripción.

Posteriormente, hicimos una revisión bibliográfica de las vías de señalización activadas por las señales neurogénicas en las cuales participan algunos de estos factores de transcripción. En esta búsqueda encontramos que Wnt, el TGF β , el NGF y el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), entre otras, activan vías de señalización que posiblemente regulen al gen de *Klf10*. La vía de Wnt finaliza en la translocación al núcleo de β -catenina, la cual se une después con TCF y Lef1 [Alberts et al, 2008; Angers et al, 2009]; la del TGF β implica al factor de transcripción Smad2/3 [Dobolyi et al, 2012]; el NGF puede activar tanto a CREB como a AP-1 [Segal et al, 1996]; el EGF señala mediante STAT1, a la vez que puede activar a Akt, la cual puede activar tanto a CREB como a NF κ B [Jorinsen et al, 2004; Karin et al, 1995; Song et al, 2005]. La figura 5 muestra un esquema de estas vías de señalización.

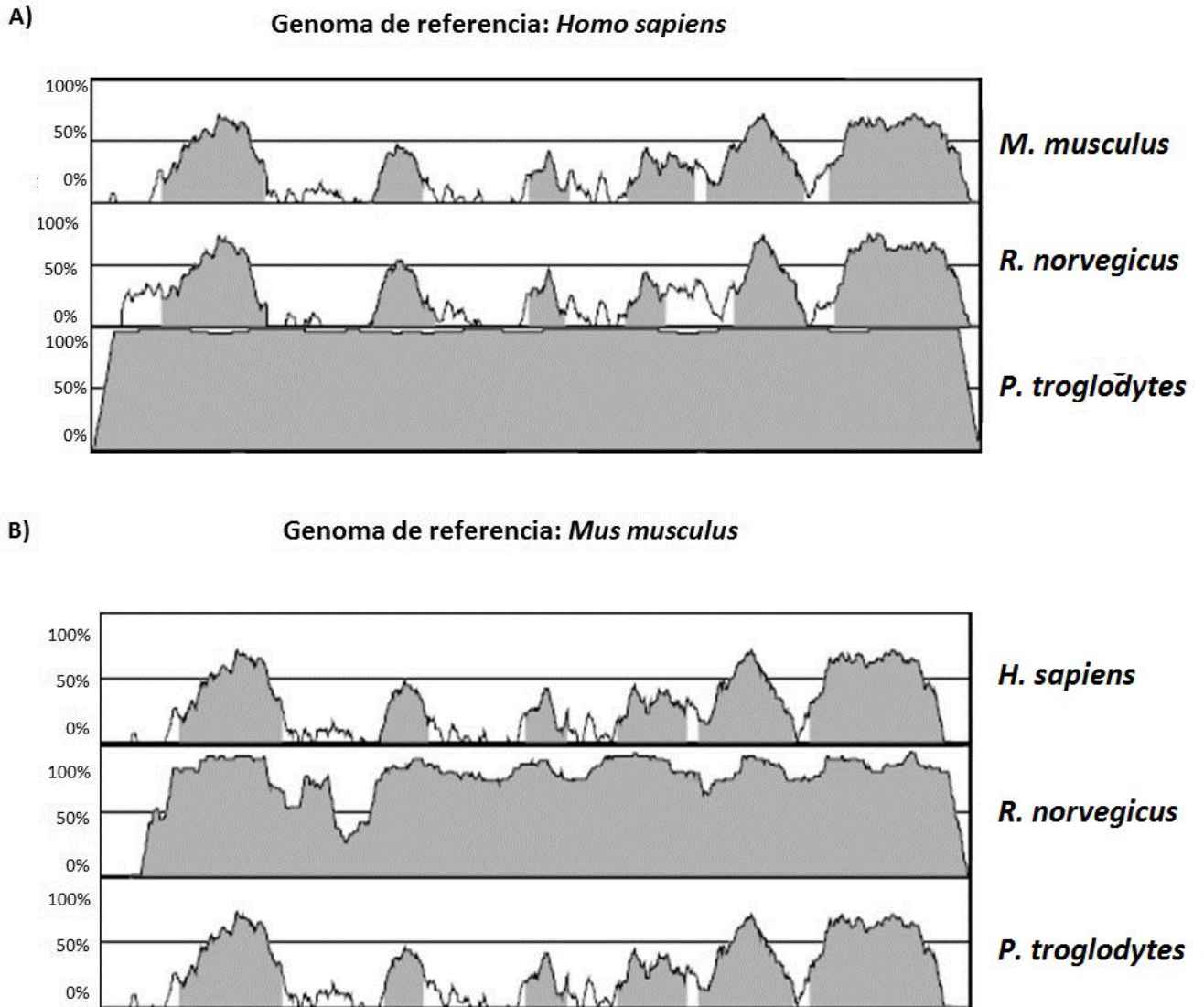


Figura 4: El análisis de la conservación de la secuencia del promotor de *Klf10*. Se muestran las gráficas de la conservación obtenidas con la herramienta *mVista*. El relleno gris indica que se trata de una secuencia anotada como no codificante. Se muestra la conservación de secuencia entre *H. sapiens*, *M. musculus*, *R. norvegicus* y *P. troglodytes*, usando como referencia la secuencia de *H. sapiens* (A) o de *M. Musculus* (B).

El NGF no altera los niveles del mRNA de *Klf10* en las células N1

El NGF induce la expresión de *Klf10* en la línea celular PC12 [Dijkmans et al, 2009; Spittau et al, 2010], además de que nuestro análisis bioinformático indica la presencia de sitios de unión para

los factores de transcripción que participan en la vía del NGF (CREB y AP1) en el promotor del gen de *Klf10*. Por lo tanto decidimos determinar el efecto del NGF sobre la expresión del gen de *Klf10* en el hipotálamo embrionario. Para este estudio utilizamos la línea celular mHypoE N1 (N1), ya que se trata de neuronas hipotalámicas embrionarias las cuales fueron immortalizadas mediante la inserción del oncogén del virus SV40.

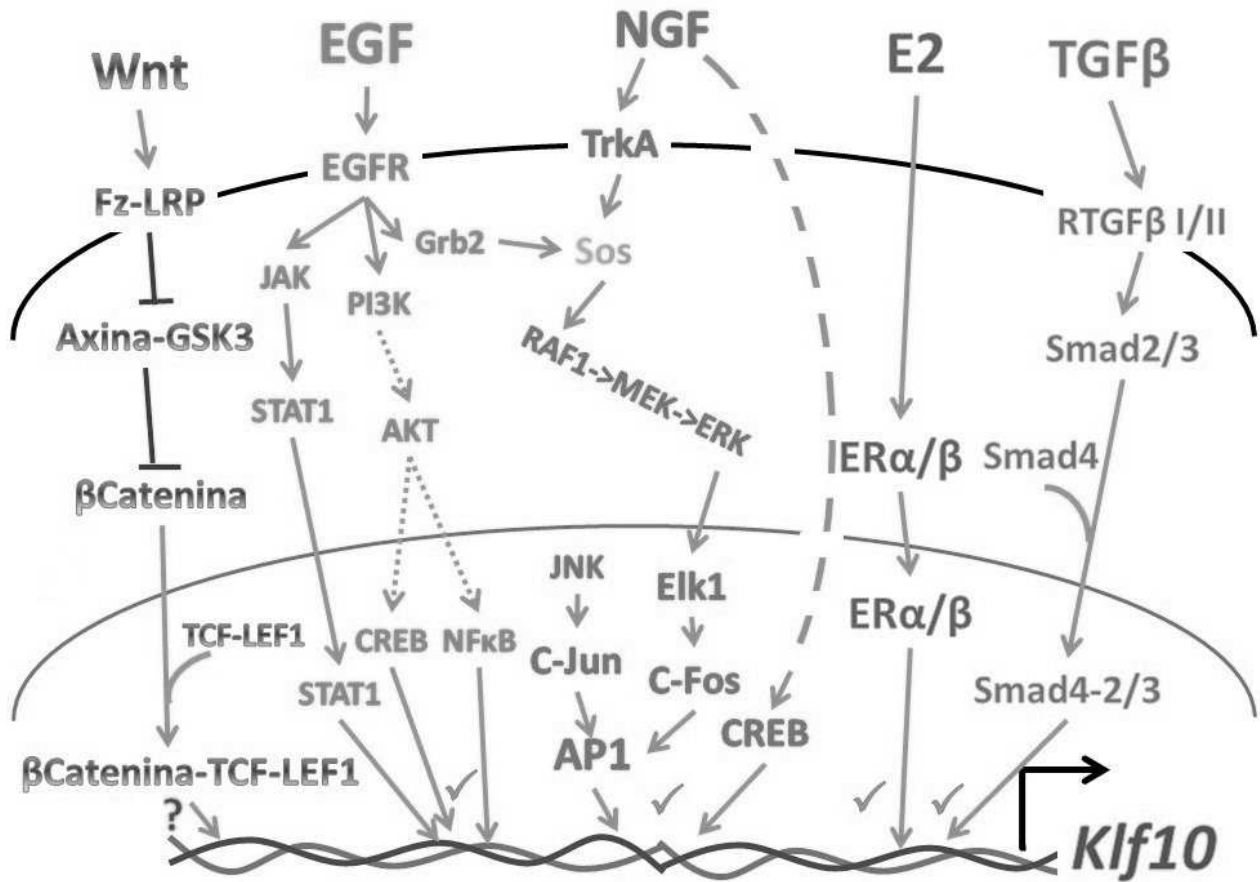


Figura 5: Las vías de señalización de las diferentes moléculas señalizadoras que podrían actuar sobre el promotor del gen de *Klf10*. El signo de interrogación denota que no se ha reportado que esa vía regule al gen de *Klf10*. El ángulo denota que hay reportes previos de que esa vía regula al gen de *Klf10*. Figura diseñada a partir de: Alberts et al, 2008; Angers et al, 2009; Dobolyi et al, 2012; Jorinsen et al, 2004; Karin et al, 1995; Segal et al, 1996; Song et al, 2005

Previo al tratamiento con el NGF se privó a las células N1 del suero con el propósito de disminuir a los niveles basales cualquier vía de señalización que pudieran ser inducida los componentes del suero [Yue et al, 2002]. Las células fueron tratadas con el NGF durante diferentes tiempos y después se purificó el RNA total para determinar el grado de expresión de *Klf10* a través de ensayos de RT-PCR. Las figuras 6A y 6B muestran que el NGF no tuvo efecto sobre los niveles del mRNA de *Klf10* en ninguno de los tiempos ensayados.

Estudios previos han mostrado que el NGF aumenta los niveles del mRNA de *Klf10* en las células PC12 [Dijkmans et al, 2009; Spittau et al, 2010], por lo que nos preguntamos si las células N1 estaban respondiendo a este factor trófico o no. El NGF activa la vía de las MAP cinasas. La activación de esta vía se puede determinar por los niveles de la fosforilación de ERK1/2, los cuales se aumentan cuando la vía está activa [Leppä et al, 1998]. Para esto repetimos el tratamiento pero esta vez a tiempos más cortos, ya que la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a NGF se ve más claramente a los 30 min del tratamiento. Tras el tratamiento de las células N1 con el NGF extrajimos las proteínas totales y realizamos un ensayo de WB con anticuerpos contra la forma fosforilada y no fosforilada de ERK1/2. Como control positivo utilizamos a las células PC12, en las cuales el NGF induce la fosforilación de ERK1/2 [Leppä et al, 2001]. La figura 6C muestra que en la células N1, el NGF no afectó los niveles de la fosforilación de ERK1/2; mientras que en las células PC12, el NGF induce la fosforilación de ERK1/2. En conclusión, estos experimentos nos indicaron que en las células N1 la vía de las MAP cinasas no se activó en respuesta al NGF (figura 6C).

Las células N1 sí son capaces de responder a los estímulos extracelulares

Ya que las células N1 no respondieron al NGF, antes de probar otros estímulos decidimos analizar si estas células son capaces de responder a los estímulos extracelulares. En las células HEK 293 se induce la fosforilación de las tirosinas en algunas proteínas en respuesta a un tratamiento con el SFB [Morla et al, 1986]. Por lo que tratamos a las células N1 con SFB y analizamos la fosforilación en tirosinas. Para estos ensayos privamos las células del suero previo a los tratamientos con el SFB al 10% o con el NGF (100ng/ml). Después del tratamiento se obtuvieron las proteínas totales y se realizó un ensayo de WB utilizando un anticuerpo que reconoce las

tirosinas fosforiladas. La figura 7 muestra que el tratamiento de las células N1, así como el de las células HEK 293, con SFB indujo la fosforilación de algunas proteínas. Esto se observa claramente en una banda de alrededor de 43kDa que no se observó en el extracto de las células sin tratar (punta de flecha en figura 7). Este ensayo también nos permitió comprobar que las células N1 no respondieron al tratamiento con el NGF, ya que no hubo cambio apreciable en el patrón de la fosforilación de las proteínas. Estos ensayos nos indican que las células N1 sí son capaces de responder a los estímulos extracelulares.

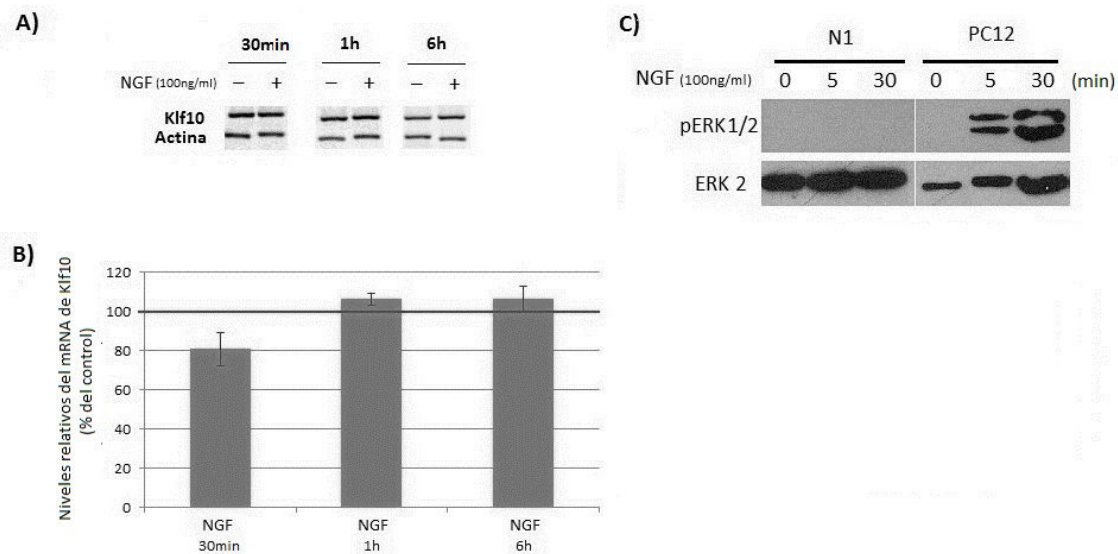


Figura 6: Los efectos del tratamiento con el NGF sobre las línea celular hipotalámica mHypoE N1. En (A) se muestra un gel representativo de los ensayos de RT-PCR. Se usaron las células no tratadas como control. Se utilizó el mRNA de actina como control de carga. (B) muestra la cuantificación de la densitometría de estos ensayos, se determinó el índice de la señal de Klf10 sobre la señal de actina normalizando el control al 100%. En (C) se muestra que NGF no induce la fosforilación de ERK1/2 en las células N1, mientras que en las células PC12 sí lo hace. Se usó la proteína total de ERK2 como control de carga.

Activar a CREB o a AP1 no altera los niveles del mRNA de *Klf10* en las células N1

Ya que demostramos que las células N1 son capaces de responder a estímulos extracelulares, analizamos la señalización por el NGF pero esta vez río abajo de su interacción con el receptor TrkA. Para esto analizamos el papel de dos factores de transcripción que participan en la vía de

señalización de NGF: CREB y AP1. Según nuestro análisis bioinformático, el promotor de *Klf10* posee dos sitios posibles de unión para AP1 y uno para CREB (Apéndice 1). Para analizar el efecto de estos factores de transcripción sobre la expresión del gen de *Klf10* tratamos las células con el DBcAMP o con el TPA. El DBcAMP es un análogo del AMP cíclico que activa a PKA, que a su vez activa a CREB al fosforilarlo en la serina 133 [Routes et al, 2000]. El TPA mimetiza al diacilglicerol, lo que conlleva a la activación de PKC y subsecuentemente, a la fosforilación y activación de ERK1/2. ERK 1/2 activado induce la transcripción del gen de cFos y la formación de AP1 [Cohen et al, 2006]. (Ver figura 5)

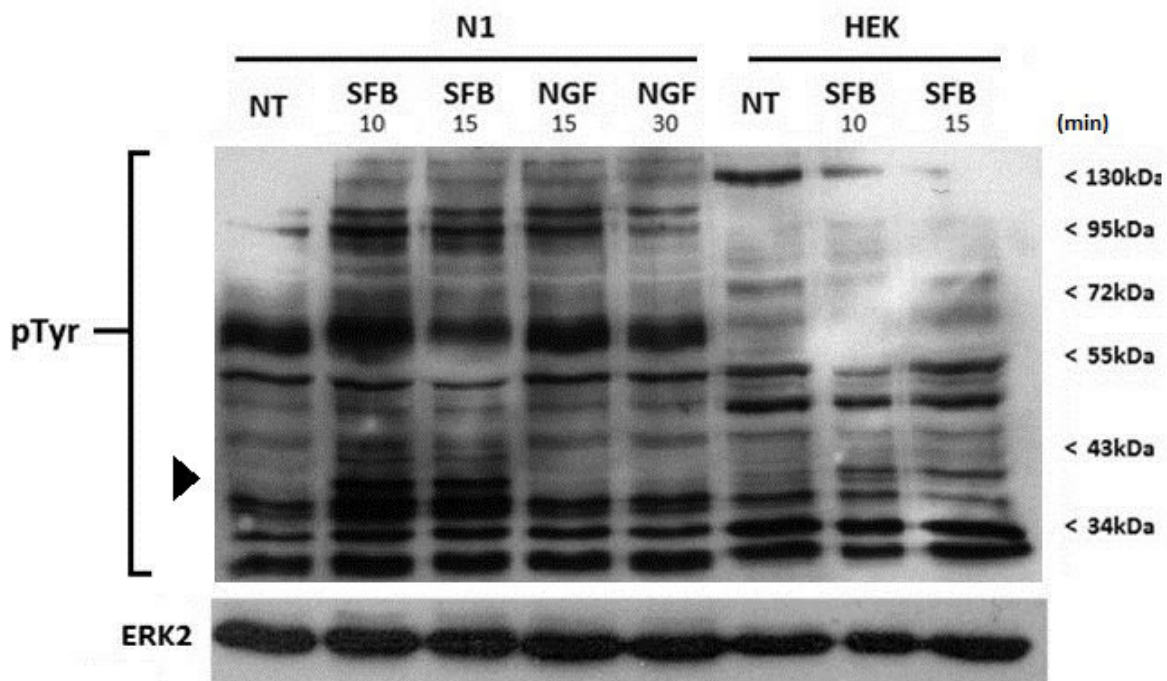


Figura 7: El suero fetal bovino (SFB) induce la fosforilación de las tirosinas en las células N1. Se muestra un WB usando un anticuerpo que reconoce las tirosinas fosforiladas. Se puede apreciar el cambio del patrón de la fosforilación en las células N1 tras un tratamiento de 10 y 15min con el SFB, mas no tras el tratamiento de 15 y 30min con el NGF. La punta de flecha denota las bandas en donde se aprecia el cambio del patrón en la fosforilación de las tirosinas. Como control positivo se incluyeron las células HEK 293 tratadas 10 y 15min con el SFB. Como control de carga se usó ERK 2. NT = no tratadas.

El DBcAMP induce la fosforilación de CREB, mientras que el TPA induce la fosforilación de ERK1/2 [Cohen et al, 2006; Routes et al, 2000]. Antes del análisis del efecto del DBcAMP y del

TPA sobre los niveles del mRNA de *Klf10*, realizamos los ensayos de WB para determinar si las células N1 respondían a estas dos señales. Con este fin se analizó la fosforilación de CREB y ERK1/2 en las células N1 en respuesta a DBcAMP y TPA en ensayos WB. Como control positivo se utilizaron a las células HEK 293 ya que se sabe que en estas células el DBcAMP induce la fosforilación de CREB y el TPA induce la fosforilación de ERK1/2[Gavala et al, 2008; Herbert et al, 2010]. Para estos ensayos privamos a las células del suero, tras lo cual las tratamos con los compuestos mencionadas durante 30 y 60 min. Después del tratamiento se prepararon los extractos de las proteínas totales y se realizaron los ensayos de WB con anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas y no fosforiladas de CREB y ERK1/2. En ambas líneas celulares el tratamiento con el DBcAMP indujo la fosforilación de CREB a los 30 min, la cual se mantuvo hasta los 60 min (Figura 8A). De manera similar, en ambas líneas celulares un tratamiento de 30 min con el TPA indujo la fosforilación de ERK1/2, manteniéndose esta fosforilación hasta los 60 min en las células N1 pero no en las células HEK 293 (Figura 8B). Estos resultados nos indican que los tratamientos con el DBcAMP ó con el TPA activan a sus moléculas blanco en nuestro modelo de estudio.

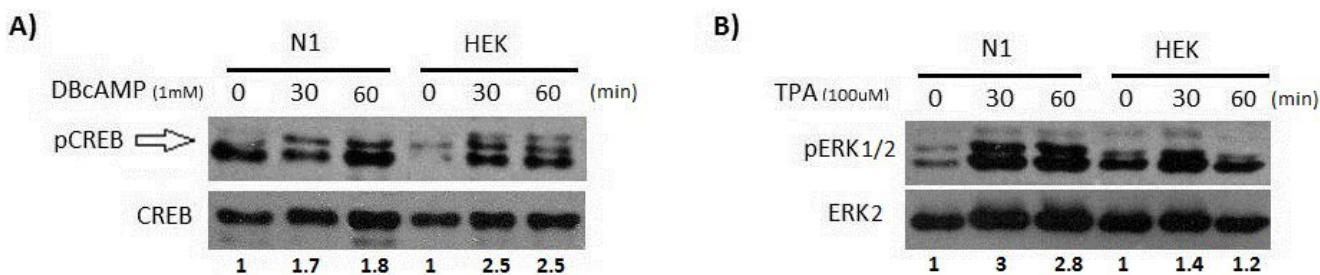


Figura 8: El efecto del DBcAMP y el TPA sobre la activación de CREB y ERK1/2, respectivamente.
A) el tratamiento con el DBcAMP induce la fosforilación de CREB en la serina 133 tanto en las células N1 como en las HEK 293. Como control de carga se utilizó CREB. B) el tratamiento con el TPA induce la fosforilación de ERK1/2 en la treonina 202 y la tirosina 204 tanto en las células N1 como en las HEK 293. Como control de carga se usó ERK2. Los números debajo de los carriles representan la cuantificación de la densitometría utilizando los niveles del control de carga para normalizar los datos y ajustando los controles correspondientes a un valor de 1.

Una vez que determinamos que las células N1 sí responden al DBcAMP y al TPA, se analizaron los niveles del mRNA de *Klf10* en células N1 tratadas con estos compuestos desde 1 hasta 72 h.

Después del tratamiento se extrajo el RNA total y se realizaron los ensayos de RT-PCR para determinar los niveles del mRNA de *Klf10*. Los resultados muestran que los niveles del mRNA de *Klf10* no cambiaron tras el tratamiento con el DBcAMP en ninguno de los tiempos analizados, al igual que con el tratamiento con el TPA (Figuras 9C y 9F).

Como control positivo del efecto del DBcAMP y el TPA en las células N1 se analizaron los niveles del mRNA de *cFos*, ya que este gen se induce en respuesta a los tratamientos con el DBcAMP y el TPA [Maruoka et al, 2010; Ying-Tang et al, 2000]. Con este fin se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR con oligonucleótidos que amplifican específicamente una región que corresponde al mRNA de *cFos*. Los resultados muestran que el DBcAMP y el TPA no alteran los niveles del mRNA de *cFos* (Figura 10A). Existen reportes en los cuales demuestran que los genes cuyos promotores poseen sitios de unión para CREB y para AP1, necesitan de ambos factores de transcripción para inducir sus niveles en respuesta a los estímulos; un ejemplo es el gen de la tirosina hidroxilasa [Nagamoto-Combs et al, 1997]. Con esto en mente, decidimos co-tratar a las células N1 con el DcAMP y el TPA. La figura 10B muestra que el co-tratamiento con el DBcAMP y el TPA durante 24 h sí tuvo efectos significativos sobre los niveles del mRNA de *cFos*.

Posteriormente se analizaron los niveles de mRNA de *Klf10* en respuesta al co-tratamiento con el DBcAMP y el TPA. De manera interesante, un co-tratamiento durante 24 h indujo un aumento significativo en los niveles de mRNA de *Klf10* (figura 11).

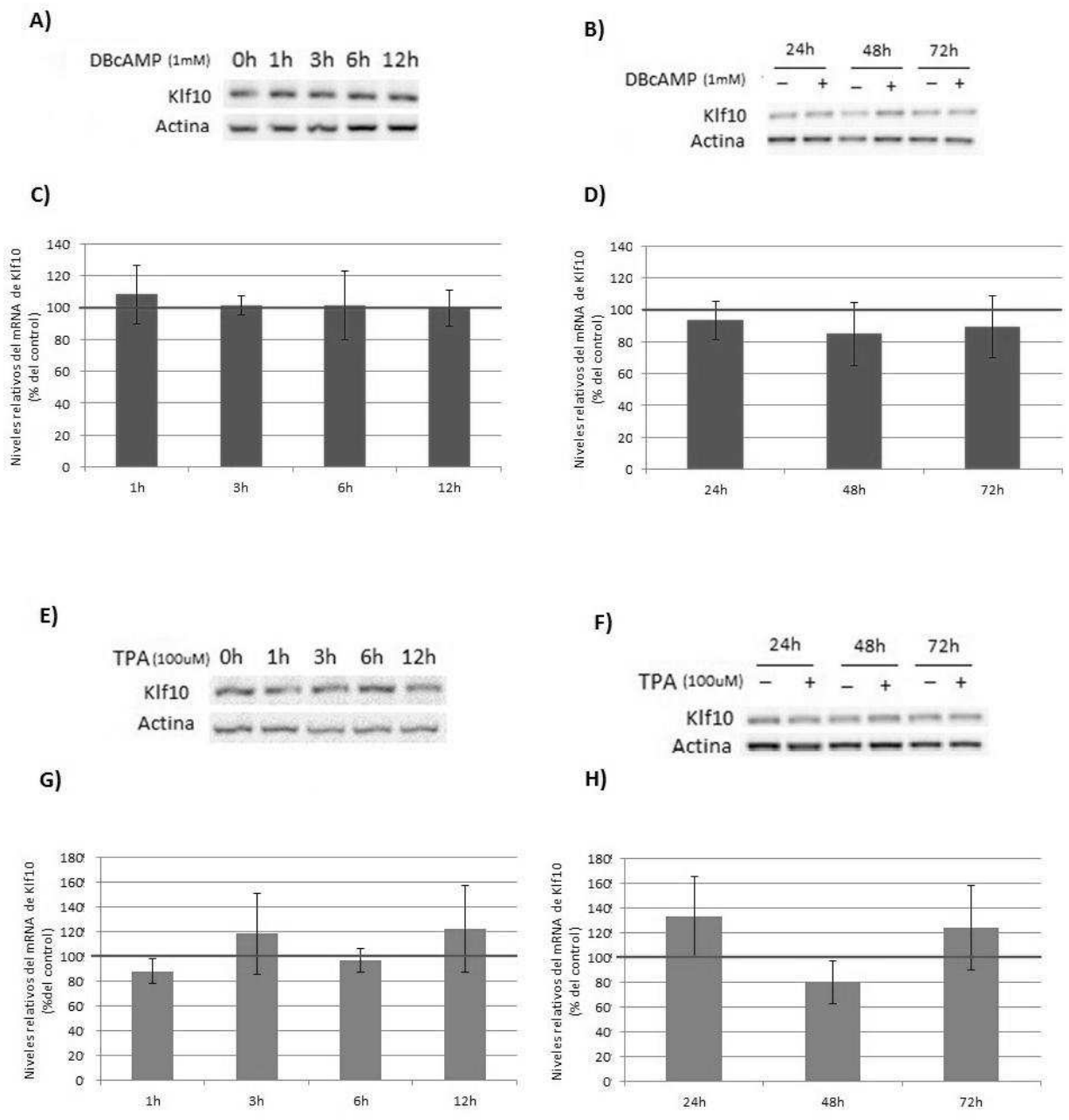


Figura 9: El DBCAMP y el TPA no alteran los niveles del mRNA de Klf10 en las células NI. (A) y (B) muestran los geles representativos de los ensayos de RT-PCR tras el tratamiento de células NI con el DBCAMP. La densitometría de estos ensayos se muestra en (C), donde se calculó el índice de la señal de Klf10 sobre la señal de actina y se normalizó el control al 100%. (D) y (E) muestran los geles representativos de los ensayos de RT-PCR tras el tratamiento de células NI con el TPA. La densitometría de estos ensayos se muestra en (F), el índice de la señal de Klf10 se calculó sobre la señal de actina y se normalizó el control al 100%.

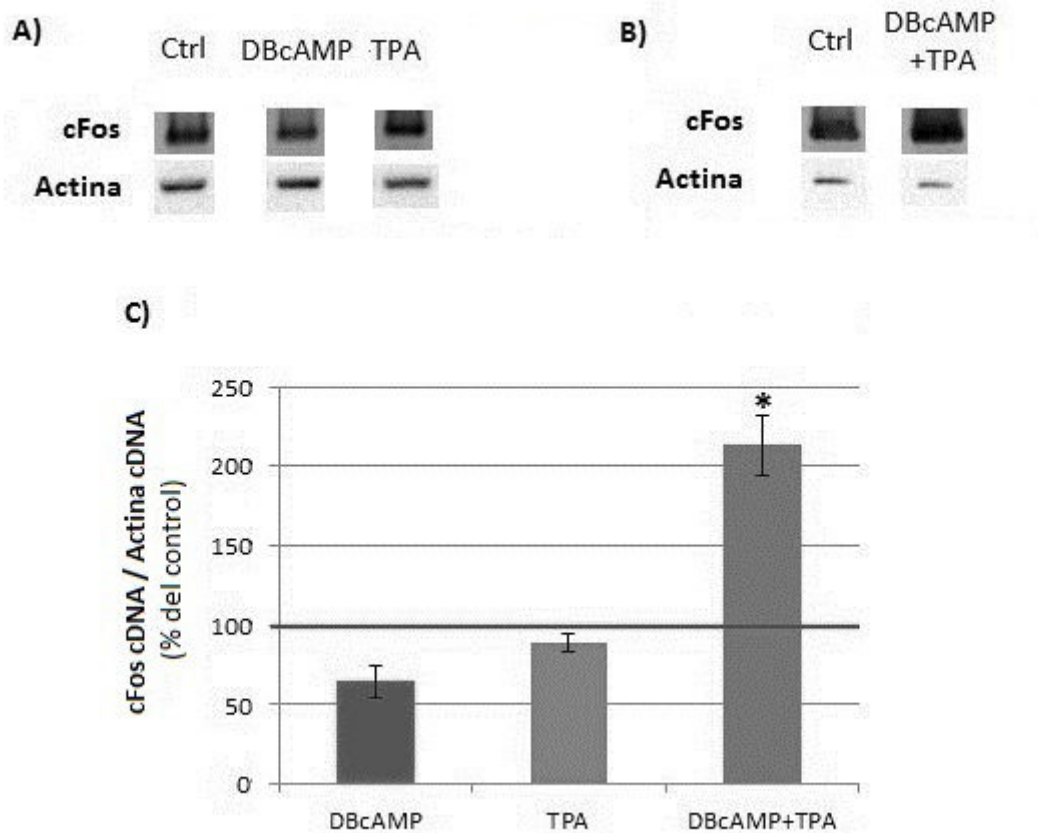


Figura 10: El co-tratamiento con el DBcAMP y el TPA por 24 h aumenta los niveles del mRNA de cFos. (A) muestra un gel representativo del ensayo de RT-PCR tras el tratamiento de las células NI con el DBcAMP o con el TPA, mientras que (B) muestra un gel representativo del tratamiento con el DBcAMP y el TPA. En ambos geles se usó actina como control de carga. (C) muestra la cuantificación de estos ensayos, se calculó el índice de la señal de cFos sobre el índice de la señal de actina y se normalizó el control al 100%. * indica un valor de $p < 0,05$ comparado contra su control.

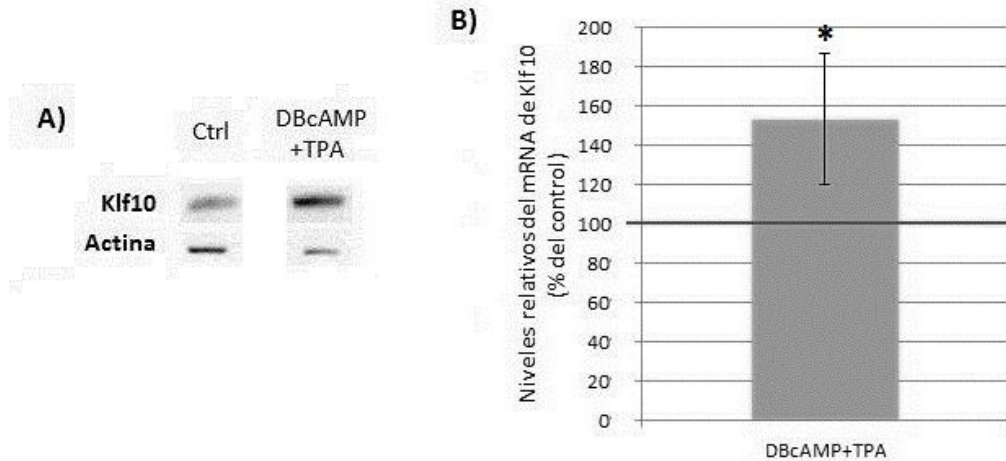


Figura 11: El co-tratamiento con el DBcAMP y el TPA induce un aumento en los niveles de mRNA de *Klf10*. (A) muestra un gel representativo del ensayo de RT-PCR tras el tratamiento de las células N1 con el DBcAMP, el TPA o ambos. Se usó actina como control de carga. (B) muestra la cuantificación de este ensayo, se calculó el índice de la señal de *Klf10* sobre el índice de la señal de actina y se normalizó el control al 100%. * indica un valor de $p < 0,05$ comparado contra su control.

Generación de las construcciones del promotor del gen de *Klf10* de ratón

El hecho de que los niveles del mRNA de *Klf10* y *cFos* se incrementaron en respuesta al co-tratamiento con el DBcAMP y el TPA nos hace suponer que en esta línea celular un solo estímulo no es suficiente para poder observar sus efectos, si no que se necesita de ambos estímulos. Es por esto que decidimos utilizar un método más sensible para analizar los efectos de CREB y AP1 sobre el promotor de *Klf10*. Para esto generamos construcciones con el gen de luciferasa bajo el control del promotor de *Klf10*

En primera instancia, amplificamos por PCR la región de 1977 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de *Klf10* a partir del DNA genómico de ratón (Figura 12A y 12B). Esta región fue previamente descrita como la región regulatoria del gen de *Klf10* en respuesta al NGF [Spittau et al, 2010]. En este mismo reporte se encontró que de los 1977 pb, la región comprendida hasta 516 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción confiere la responsividad a NGF para la actividad transcripcional de *Klf10*. Por lo tanto, para tener una versión truncada del promotor también amplificamos la región de las 516 pb río arriba al sitio de inicio de la transcripción (Figura 12A y 12B). Tomando en cuenta que estas regiones serían posteriormente clonadas en el

vector pGL3-basic, a los oligonucleótidos se les añadieron sitios de restricción específicos para las enzimas *Hind*III y *Xho*I (Figura 12C). Nos referiremos de aquí en adelante a estas construcciones como Klf10-Luc-2000 y Klf10-Luc-500 (Klf10-Luc en conjunto).

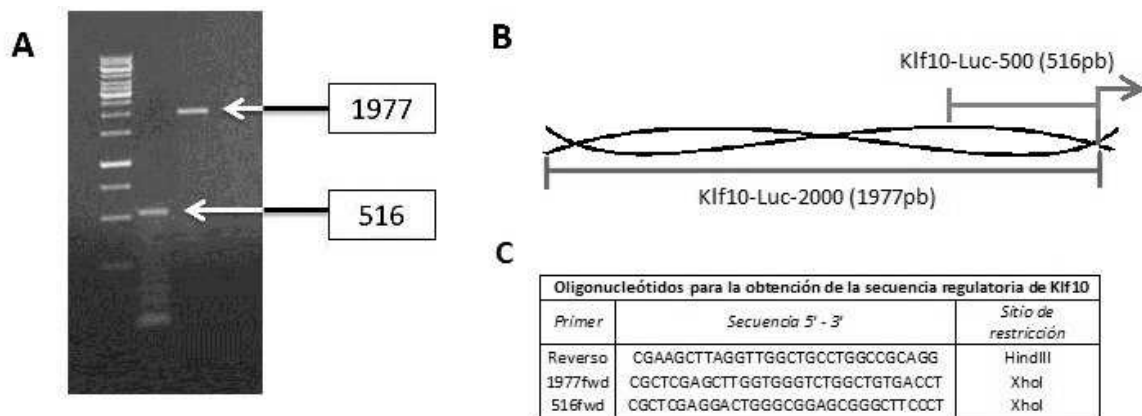


Figura 12: La amplificación de la región regulatoria del gen de Klf10. En (A) se muestran las bandas correspondientes a 516 y 1977 pb obtenidas por la PCR a partir del DNA genómico de ratón C57BL/6J. En el carril de la izquierda se corrió el marcador de peso molecular de 1kb. El diagrama (B) representa el promotor de Klf10 (2000 pb); la flecha denota el sitio de inicio de la transcripción; las líneas representan las regiones clonadas en las construcciones Klf10-Luc-2000 y Klf10-Luc-500. La tabla (C) muestra los oligonucleótidos utilizados para la obtención de estas regiones.

Con el fin de confirmar que las clonaciones se realizaron correctamente, llevamos a cabo digestiones de las construcciones con la enzima de restricción *Sal*I. El vector tiene un sólo sitio de corte para esta enzima, mientras que el inserto contiene dos sitios de corte cerca de su extremo 3'. El patrón de digestión con *Sal*I para las dos construcciones fue el esperado. Estos patrones así como los sitios de corte de *Sal*I dentro del vector se muestran en la figura 13. Posterior a estos cortes diagnósticos, se secuenciaron ambas construcciones usando los oligonucleótidos que fueron diseñados para los ensayos de la PCR. Debido a las limitantes intrínsecas de la técnica de la secuenciación, no es posible secuenciar más de 1000 nucleótidos con fidelidad, por lo que para obtener la secuencia completa del inserto de 1977 pb se diseñaron además oligonucleótidos que permitieran iniciar la secuenciación desde un punto aproximadamente a 900 nucleótidos del sitio donde se unen los oligonucleótidos anteriormente mencionados. Los ensayos de secuenciación corroboraron las construcciones.

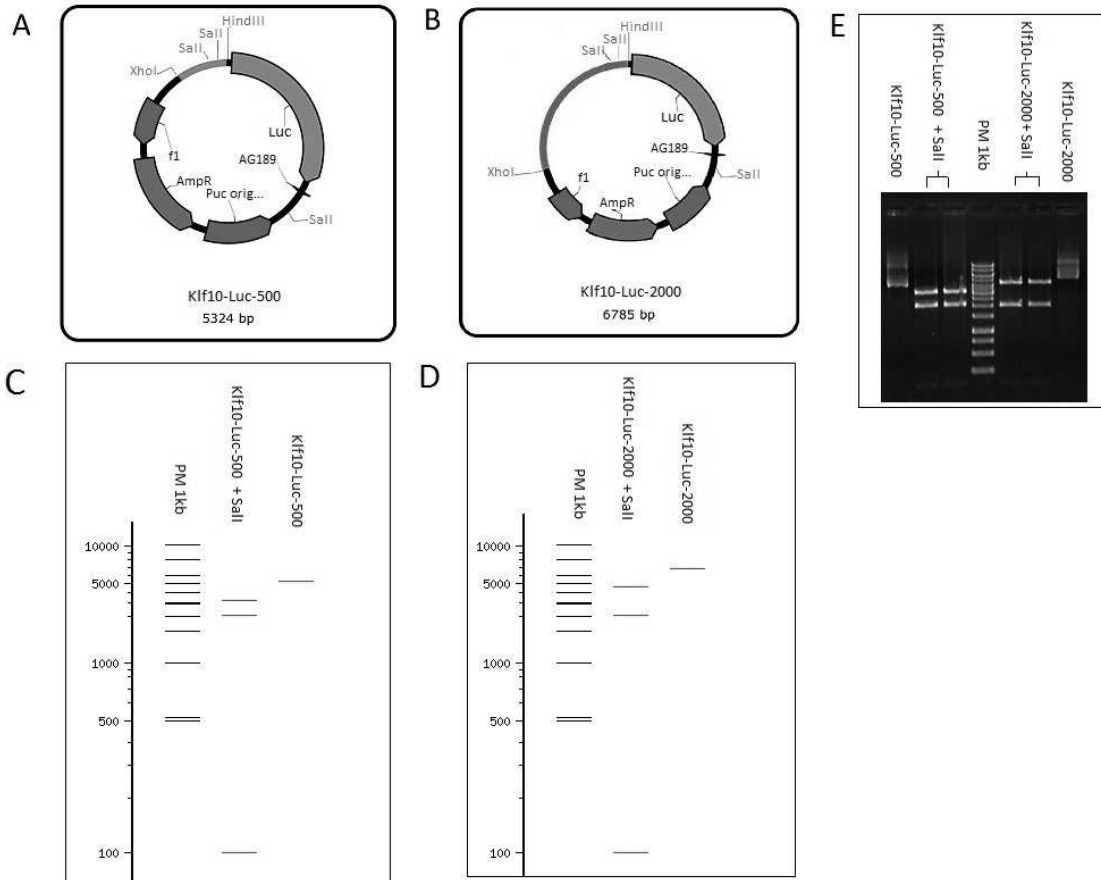


Figura 13: Los cortes diagnósticos de las construcciones *Klf10-Luc*. En (A) y (B) se muestran los mapas de *Klf10-Luc-500* y *Klf10-Luc-2000*, respectivamente. Los sitios de corte con las enzimas *HindIII*, *XhoI* y *SalI* se encuentran anotados al igual que los diversos elementos génicos. (C) y (D) muestran los patrones de corte con *SalI* de *Klf10-Luc-500* y *Klf10-Luc-2000*, respectivamente. Estos patrones fueron obtenidos con la herramienta *NEBcutter v2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). En (E) se muestran las bandas obtenidas tras digerir *Klf10-Luc-500* y *Klf10-Luc-2000* con *SalI*. Los carriles 1 y 7 contienen las construcciones sin digerir; los carriles 2, 3, 5 y 6 contienen las construcciones digeridas con *SalI*; y el carril 4 contiene el marcador de peso molecular de 1 kb.

El DBcAMP y el TPA aumentan la actividad del promotor de *Klf10*

Las construcciones *Klf10-Luc* se transfectaron en las células N1 a una confluencia del 80-90%. Después de la transfección las células fueron mantenidas en ausencia de suero para después tratarlas con las diferentes moléculas señalizadoras. Al final del tratamiento se prepararon los extractos protéicos y se midió la actividad de luciferasa. En todas las transfecciones incluimos

como control de transfección al vector pRL-CMV, el cual expresa la luciferasa de *Renilla* bajo el promotor del citomegalovirus.

El tratamiento de Klf10-Luc-2000 con el DBcAMP durante 48 h aumentó 2.1 veces la actividad transcripcional del promotor de *Klf10*, mientras que el TPA la aumentó 2 veces (Figura 14). Ninguna de las dos moléculas utilizadas alteró significativamente los niveles de luciferasa en el vector vacío (pGL3) (Figura 14). Cabe resaltar que los niveles relativos de luciferasa de Klf10-Luc-2000 son cinco veces mayor a los dados por el vector vacío (Figura 14), lo que nos indica que la secuencia que clonamos en el vector pGL3-basic es transcripcionalmente activa.

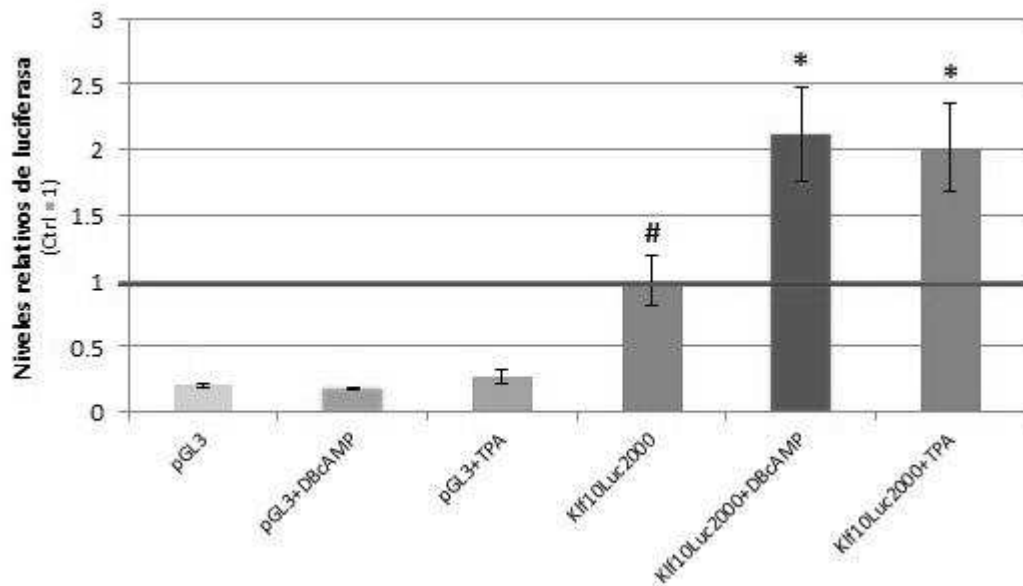


Figura 14: El DBcAMP y el TPA incrementan la actividad transcripcional del promotor de *Klf10*. Se muestra la cuantificación de la actividad de luciferasa de los tratamientos con DBcAMP y TPA de las células N1 transfectadas con pGL3 o con *Klf10-Luc-2000*. Se calculó el índice de la actividad de luciferasa de luciérnaga sobre la actividad de luciferasa de *Renilla*, normalizando *Klf10Luc2000* a 1. Se ilustra además la actividad del vector vacío (pGL3). * indica una $p < 0,05$ comparada contra *Klf10Luc2000*; # indica una $p < 0,05$ comparada contra pGL3.

CREB y AP1 incrementan la actividad del promotor de *Klf10*

Ya que observamos que tanto el DBcAMP como el TPA pueden aumentar la actividad transcripcional del promotor de *Klf10*, decidimos probar si este aumento se debe a los factores de transcripción CREB y AP1. Cabe recordar que en el promotor de *Klf10* encontramos sitios posibles de unión para ambos factores de transcripción (apéndice 1). Para probar esta hipótesis, co-transfectamos las células N1 con *Klf10*-Luc-2000 junto con los vectores de expresión para CREB o para cFos y cJun (las proteínas que dimerizan para formar AP1 [Hess et al, 2004]). En este ensayo realizamos una de curva dosis-respuesta utilizando diferentes dosis de los vectores de expresión. La figura 15 muestra que tanto CREB como AP1 aumentan la actividad transcripcional del promotor de *Klf10*. El efecto es dependiente de la dosis del vector de expresión utilizada. También se muestra que la co-transfección con CREB y AP1 (800 ng de cada uno) tiene un efecto sinérgico sobre la actividad transcripcional del promotor de *Klf10*.

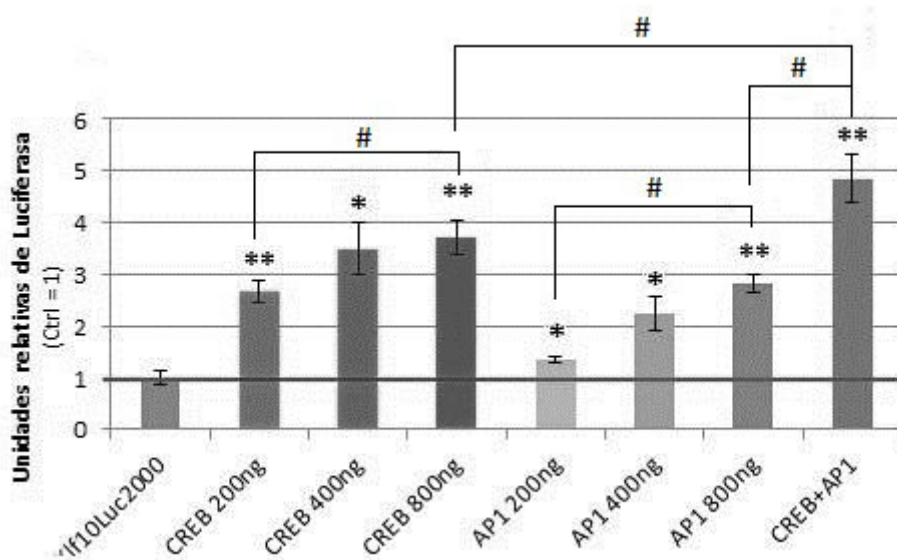


Figura 15: CREB y AP1 incrementan la actividad transcripcional del promotor de *Klf10*. Se muestra la cuantificación de la señal de luciferasa de las cotransfecciones con *Klf10*-Luc-2000 junto con CREB o AP1 (cFos y cJun). Se calculó el índice de la actividad de luciferasa de luciérnaga sobre la actividad de luciferasa de Renilla, normalizando *Klf10*Luc2000 a 1. * indica una $p < 0,05$ comparada con *Klf10*Luc2000; ** indica una $p < 0,01$ comparada contra *Klf10*Luc2000; # indica una $p < 0,05$ entre los grupos marcados.

Un enfoque diferente para corroborar las observaciones anteriores fue el transfectar las células con los vectores de expresión para los factores de transcripción, y tratarlas con el DBcAMP en el caso de la transfección con CREB o con el TPA para la transfección con AP1. Si el aumento transcripcional causado por el DBcAMP se debe a la activación de CREB, el tratamiento con el DBcAMP de las células transfectadas con CREB deberá potenciar la actividad transcripcional de Klf10-Luc-2000. El mismo razonamiento es válido en el caso del tratamiento con el TPA en las células transfectadas con AP1. La figura 16 muestra que el tratamiento con el DBcAMP fue capaz de potenciar los efectos de CREB sobre el promotor de *Klf10*, mientras que el TPA no tuvo ningún efecto sobre la transfección con AP1. Estos resultados indican que el aumento de la actividad transcripcional causada por CREB puede ser dependiente de los niveles de la fosforilación de CREB.

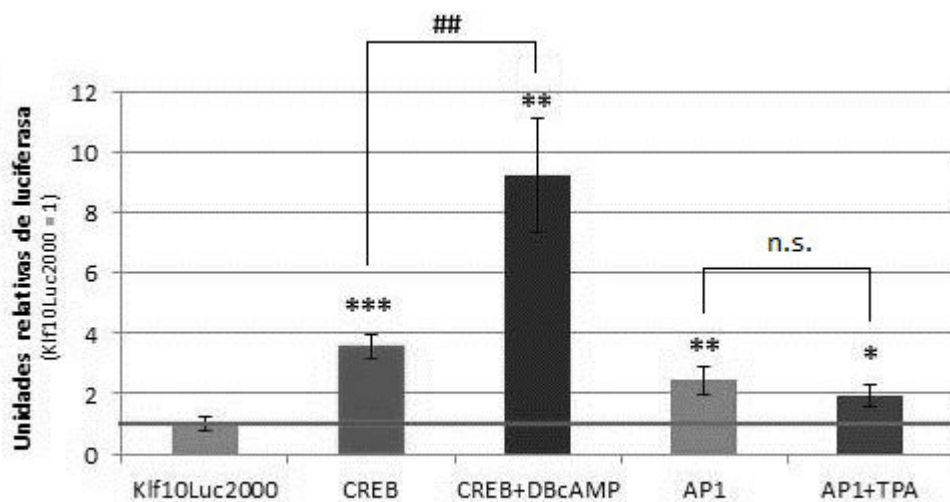


Figura 16: El DBcAMP potencia el efecto de CREB sobre el promotor de *Klf10*, mientras que el TPA no tiene ningún efecto sobre AP1. Se muestra la cuantificación de la señal de luciferasa del tratamiento con el DBcAMP o el TPA de células co-transfectadas con *Klf10*-Luc-2000 y CREB o AP1. Se calculó el índice de la actividad de luciferasa de luciérnaga sobre la actividad de luciferasa de Renilla, normalizando la señal de *Klf10*Luc2000 a 1. * indica una $p < 0,05$ comparado con *Klf10*Luc2000; ** indica un valor de $p < 0,01$ comparado con *Klf10*Luc2000; *** indica una $p < 0,001$ comparado con *Klf10*Luc2000; ## indica una $p < 0,01$ entre los grupos marcados, n.s. indica una diferencia no significativa entre los grupos marcados.

El promotor de *Klf10* tiene dos sitios posibles de unión para AP1 y sólo un sitio de unión para CREB. Como una aproximación para identificar el papel de estos sitios, utilizamos la construcción *Klf10-Luc-500*, la cual incluye el sitio de CREB y sólo uno de los dos sitios para AP1. Cabe recordar que la construcción *Klf10-Luc-2000* contiene el sitio CREB y los dos sitios AP1. Al comparar los niveles de la inducción de *Klf10-Luc-500* con los de *Klf10-Luc-2000* en respuesta a CREB y a AP1 observamos que no hay una diferencia significativa entre el efecto de CREB o de AP1 (Figura 17). Tampoco vemos una diferencia significativa entre la actividad basal de *Klf10-Luc-500* y la de *Klf10-Luc-2000*. Estos experimentos sugieren que en la región que comprenden las 516 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción se encuentran los sitios de unión de CREB y AP1 responsables de la regulación mediada por CREB y AP1. Sin embargo no descartamos que el efecto sinérgico cuando CREB y AP1 actúan juntos pueda depender de otros sitios. Estos resultados también sugieren que esta región es la responsable de los niveles basales de expresión de *Klf10*.

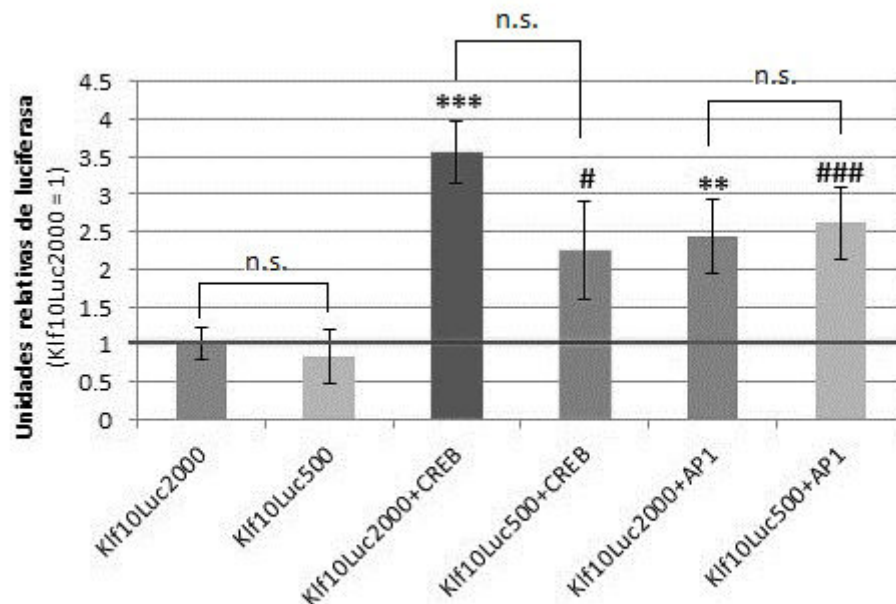


Figura 17: CREB y AP1 inducen la actividad transcripcional de *Klf10-Luc-2000* y *Klf10-Luc-500* a niveles similares. Se muestra la cuantificación de la señal de luciferasa de las co-transfecciones con *Klf10-Luc-500* o *Klf10-Luc-2000* junto con CREB o AP1. Se calculó el índice de la actividad de luciferasa de luciérnaga sobre la actividad de luciferasa de Renilla, normalizando la señal de *Klf10Luc2000* a 1. ** indica un valor de $p < 0,01$ comparado contra *Klf10Luc2000*; *** indica un valor

de $p < 0,001$ comparado contra Klf10Luc2000; # indica un valor de $p < 0,05$ comparado contra Klf10Luc500; ### indica un valor de $p < 0,001$ comparado contra Klf10Luc500, n.s. indica una diferencia no significativa entre los grupos marcados..

DISCUSIÓN

Diversos grupos han reportado que los niveles de expresión de *Klf10* se inducen en respuesta al TGF β , BMP2, el EGF, el estradiol y el NGF. El TGF β actúa a través de Smad3; BMP2 señala por medio de Smad1; el EGF puede señalar por medio de STAT1, STAT3, Elk1, CREB o NF κ B; el estradiol se une al receptor de estrógenos, facilitando su translocación al núcleo; el NGF señala a través de CREB y AP1. [Álvarez-Rodríguez et al, 2007; Álvarez et al, 2006; Booy et al, 2011; Chen et al, 2004; Dahlman-Wright et al, 2006; Dijkmans et al, 2009; Dobolyi et al, 2012; Hsu et al, 2011; Jorinsen et al, 2004; Karin et al, 1995; Segal et al, 1996; Song et al 2005; Subramaniam et al, 1995]. En este trabajo encontramos que el promotor de *Klf10* contiene sitios posibles de unión para todos estos factores de transcripción. Estos resultados sugieren que el TGF β , BMP2, el EGF, el estradiol y el NGF podrían activar directamente la transcripción del gen de *Klf10*, además que corroboran los resultados generados por Subramaniam et al en 1995, quien demostró que el aumento en los niveles de expresión de *Klf10* mediada por el TGF β no requiere de la síntesis de proteínas, lo que sugiere que es a través de la acción directa de las proteínas Smad sobre el promotor de *Klf10*.

Diversos grupos han demostrado que durante el desarrollo del ratón, *Klf10* se expresa en el sistema nervioso central. Nuestro grupo identificó por medio de los ensayos de la PCR cuantitativa que el mRNA de *Klf10* se expresa en el hipotálamo en el día embrionario 15 disminuyendo sus niveles en los días posteriores [Armenta-Martínez, manuscrito en preparación]. El grupo de Nathaniel Heintz encontró por medio de los ensayos de hibridación *in situ* realizados en cortes de cerebros de embriones de ratón del día embrionario 15.5 que el mRNA de *Klf10* se encuentra localizado en el tálamo y en el cerebelo durante el desarrollo [<http://www.gensat.org/index.html>]. Cabe recordar que durante los días embrionarios 12 y 17 se da la neurogénesis en el hipotálamo [Markaris, 2002].

Para determinar si *Klf10* podría tener un papel en la neurogénesis realizamos un análisis *in silico* del el promotor en busca de los sitios de unión para los factores de transcripción con funciones en procesos neurogénicos. Los factores de transcripción CREB, AP1, Lef1, Arnt y Smad1 surgieron como candidatos en este análisis. CREB promueve la supervivencia y proliferación de los

precursores neuronales [Bonnie et al, 2002; Walton et al, 1999]; AP1 está involucrado en la diferenciación y la supervivencia de las células PC12 [Leppä et al, 2001]; Lef1 actúa bajo la vía de Wnt y es necesario para la neurogénesis en el hipotálamo [Lee et al, 2006]; Smad1 forma parte de la vía de BMP2, que es necesario para la diferenciación de los precursores de las neuronas granulares cerebelares durante el desarrollo [Álvarez-Rodríguez et al, 2007]; Arnt2 es indispensable para la generación las neuronas hipotalámicas responsables de la liberación de la TRH y de la somatostatina [Hosoya et al, 2001].

Tanto el tratamiento con el DBcAMP como el tratamiento con el TPA incrementan la tasa transcripcional del promotor de *Klf10*. Con una construcción que contiene al gen reportero de luciferasa bajo el control del promotor de *Klf10* (Klf10-Luc) determinamos experimentalmente que tanto CREB como AP1 incrementan la actividad del promotor de *Klf10* en las células N1. Esto mismo observamos al transfectar las células N1 con la construcción *Klf10*-Luc y tratándolas con DBcAMP o con TPA. Tanto el tratamiento con el DBcAMP como el tratamiento con el TPA incrementan la tasa transcripcional del promotor de *Klf10*. De manera interesante la actividad del promotor de *Klf10* se incrementa en mayores niveles en el cotratamiento con ambas moléculas que cuando se trata con una sola molécula, es decir el efecto del DBcAMP y el TPA es sinérgico. Este hecho se evidenció en los ensayos de RT-PCR. En estos ensayos únicamente el co-tratamiento con los dos compuestos incrementan los niveles del mRNA de *Klf10*, mientras que en los tratamientos con los compuestos por separado no observamos cambio significativo de estos niveles. En conclusión, estos experimentos indican que CREB y AP1 son capaces de incrementar la actividad transcripcional del promotor de *Klf10*; a la vez que sugieren que este incremento puede darse de forma sinérgica.

Existen datos en la literatura que sugieren que CREB y AP1 pueden actuar sinérgicamente para inducir la transcripción. Tal es el caso del gen de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima clave en la biosíntesis de los neurotransmisores del tipo catecolaminas [Nagatsu et al, 1964]. El gen de *TH* contiene sitios de unión para CREB y para AP1. Los niveles de expresión de *TH* se aumentan tras un flujo entrante de Ca^{2+} . Por medio del uso de construcciones génicas que contienen el promotor de *TH* y en el cual los sitios de unión para CREB y para AP1 no son funcionales, se encontró que el incremento causado por Ca^{2+} requiere de ambos sitios intactos [Nagamoto-Combs et al, 1997].

Además, mediante ensayos de retardo electroforético EMSA se comprobó que ambos factores de transcripción pueden unirse a este promotor [Lim et al, 2000]. Nuestros resultados sugieren que *Klf10*, de manera similar que *TH*, puede ser regulado de manera sinérgica por CREB y AP1. Existen reportes que muestran que la acetilación de histonas incrementa la actividad transcripcional de AP1, tal es el caso del gen de la interleucina-8. En este gen, la acetilación el promotor, regulada por CREB, favorece la transactivación por acción de AP1 [Rahman et al, 2002]. Es posible que el efecto sinérgico de CREB y AP1 sobre el promotor de *Klf10* se deba al reclutamiento de CBP por CREB al promotor de *Klf10*, y que una vez ahí, CBP acetile algunas histonas en este promotor. Lo que conlleve al incremento de la actividad transcripcional de AP1, y finalmente a un incremento en la expresión de *Klf10*.

CREB desempeña varios papeles en el desarrollo del sistema nervioso central. En los ratones nulos para CREB se ha demostrado que este factor de transcripción es esencial para la supervivencia de las neuronas. Los ratones nulos para CREM (otra proteína de la familia CREB) y que además carecen de CREB específicamente en el sistema nervioso central muestran una inducción de la apoptosis en neuronas postmitóticas, estos ratones mueren perinatalmente. Si en cambio se remueve CREB del sistema nervioso central postnatalmente en los ratones nulos para CREM el resultado es una neurodegeneración progresiva que continúa hasta el adulto [Mantamadiotis et al, 2002]. Se ha propuesto que CREB favorece la supervivencia neuronal mediante a regulación de la transcripción de genes pro-supervivencia como Bcl-2 [Riccio et al, 1999]. Esta propuesta se ve apoyada por el hecho de que la pérdida de CREB induce la apoptosis dependiente del gen pro-apoptótico Bax [Lonze et al, 2002], lo que sugiere que CREB favorece la supervivencia neuronal mediante la regulación del balance entre Bcl-2 y Bax.

Además de este papel en la supervivencia neuronal, CREB juega un papel en el crecimiento axonal. En las neuronas corticales derivadas de los ratones nulos para CREB se encontró que el crecimiento axonal está comprometido. Este efecto es independiente de los defectos en la supervivencia causados por la carencia de CREB hecho que se demostró en los cultivos de las neuronas derivadas de los ratones dobles nulos para CREB y Bax, el cual es el efector de la muerte neuronal en los ratones nulos para CREB. En estos cultivos celulares, el crecimiento axonal se ve reducido sin afectarse la supervivencia. Resultados similares se observaron en los cultivos

celulares de las neuronas derivadas de los ratones nulos para CREB en presencia del inhibidor de la apoptosis BAF [Lonze et al, 2002]. Las neuronas de los ganglios dorsales de los ratones nulos para CREB muestran proyecciones cortas y no logran innervar sus tejidos blanco. Este fenotipo es similar al observado en los ratones nulos para NGF o TrkA. Por lo tanto se ha propuesto que el papel de CREB en el crecimiento axonal está ligado a su papel en la vía de señalización del NGF [Patel et al, 2000].

Entre las señales neurogénicas con la capacidad de regular la actividad de CREB encontramos a Wnt y al NGF. La vía clásica de señalización del NGF se da a través de la MAPcinasa ERK, la cual regula positivamente la expresión de cFos y por consiguiente la formación de AP1 [Matsuoka et al, 2012]. No obstante, el NGF también es capaz de señalizar a través de CREB. Esto se determinó mediante el uso de dos versiones CREB dominantes negativas, una de ellas (A-CREB) impide la unión a DNA del CREB silvertre mientras que la otra se trata de una versión de CREB en la cual la serina 133 se encuentra mutada por una alanina por lo se puede unir al DNA pero no es capaz ejercer su función. En los eperimentos realizados con estas versiones mutantes de CREB el NGF no logró promover la supervivencia de las neuronas simpáticas [Riccio et al, 1999]. Por lo que se propone que el efecto del NGF sobre la supervivencia de las neuronas simpáticas depende de CREB. Se ha reportado que el NGF es capaz de aumentar los niveles del mRNA de *Klf10* efecto mediado por el receptor TrkA. Sin embargo no se ha descrito la vía de señalización por la cual el NGF ejerce este efecto [Spittau et al, 2010]. Nuestros resultados sugieren que el aumento de los niveles del mRNA en las células que sí responden al NGF podría ser regulado por CREB y AP1.

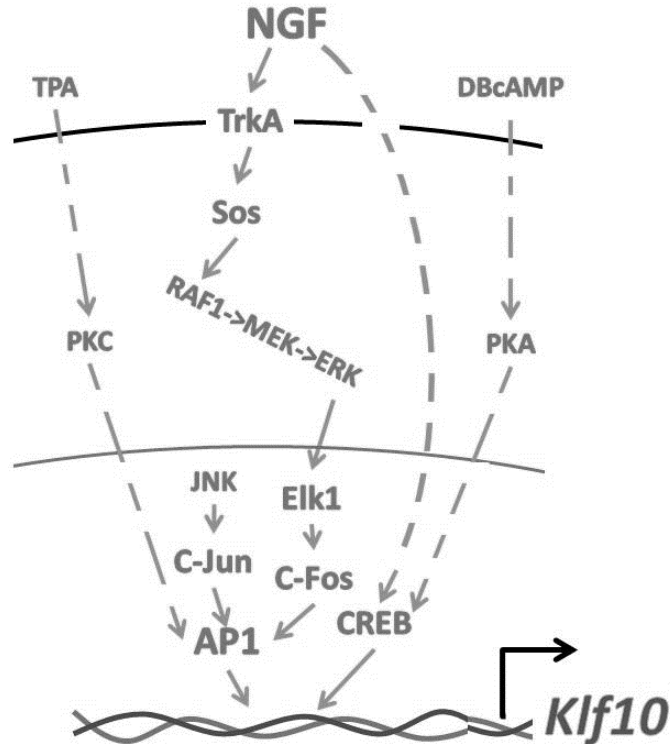


Figura 18: Modelo propuesto de la regulación de *Klf10* por medio del NGF. En este estudio probamos que tanto CREB como AP1, por sí mismos o activados por el DBcAMP o el TPA, pueden regular la actividad transcripcional del promotor del gen de *Klf10*.

La vía clásica de Wnt señala por medio del factor de transcripción Lef1. La unión de Wnt con el receptor Frizzled lleva a la translocación al núcleo de la proteína β -Catenina, en donde se une al factor de transcripción Lef1 y permite la regulación de sus genes blanco [Alberts et al, 2008]. Wnt puede también señalar a través de CREB mediante la activación de PKA. Los ensayos de sobre-expresión con una versión de CREB dominante negativa, así como los embriones de los ratón carentes de CREB demostraron que CREB se necesita para la inducción de los genes miogénicos que son activados por Wnt, siendo esto independiente de Lef1 [Chen et al, 2005]. Nuestro análisis muestra que el promotor de *Klf10* presenta un sitio de unión para el factor de transcripción Lef1, lo que indica que *Klf10* puede ser blanco de regulación de la vía canónica de Wnt. Los estudios en el pez *Danio rerio* demostraron que la vía de señalización de Wnt es importante para la neurogénesis del hipotálamo. En estos estudios demuestran que la pérdida de la función de Lef1, por medio del uso de los morfolinós (compuestos usados para inhibir la traducción de mRNAs), causa una reducción en la expresión de algunos genes proneurales en el hipotálamo como *Sox3* y

la *Neurogenina* [Lee et al, 2006]. Nosotros proponemos que Wnt favorece la neurogénesis en el hipotálamo a través de promover la expresión de *Klf10*. Cabe recalcar que el ratón nulo para *Klf10* no presenta defectos anatómicos evidentes en el hipotálamo [Martínez-Armenta et al, manuscrito en preparación] y esto parece indicar que los procesos de proliferación no están afectados en estos ratones. Esta observación apoya la hipótesis de que *Klf10* está involucrado en los pasos finales de la diferenciación que incluirían la expresión de algunos neuropéptidos específicos y la consolidación del fenotipo de neuronas hipotalámicas. Para probar esto haría falta analizar la expresión de los diversos neuropéptidos hipotalámicos o marcadores de diferenciación en los ratones nulos para *Klf10*.

Nuestros resultados muestran que *Klf10* es un blanco de la regulación de CREB y AP1, los cuales participan en una variedad de vías de señalización, tales como el BDNF, el TGF β , Wnt, Ca²⁺, el NGF, entre otras. Existen varios reportes que demuestran que *Klf10* es importante en procesos de la diferenciación celular, tales como la diferenciación de los osteoblastos y de los linfocitos T [Cao et al, 2009; Subramaniam et al, 2007]. Con esto en mente, y teniendo en cuenta que *Klf10* se expresa en el sistema nervioso central en los periodos embrionarios; proponemos que *Klf10* puede ser una molécula con participación en la neurogénesis. Esta propuesta se ve apoyada por los resultados generados en nuestro grupo que demuestran que *Klf10* se expresa en el hipotálamo en los días embrionarios 15-17 [Martínez-Armenta, manuscrito en preparación], que es el periodo en que se da la consolidación del fenotipo neuronal en el hipotálamo. Se requiere de estudios que definan las vías neurogénicas que pudieran regular al gen de *Klf10*, así como identificar genes neurogénicos cuya expresión sea regulada por *Klf10*. Para analizar el papel de *Klf10* en diferentes vías neurogénicas proponemos analizar los niveles del mRNA de *Klf10* en los tratamientos de los cultivos primarios neuronales de embriones de ratón con señales neurogénicas como Wnt, el BDNF o las neurotrofinas. En el caso de la búsqueda de los genes neurogénicos regulados por *Klf10* proponemos realizar ensayos de ChIP-seq (Inmunoprecipitación de cromatina – Secuenciación) con un anticuerpo específico para *Klf10* a partir de cultivos primarios de neuronas derivados de hipotálamos de embriones de ratón.

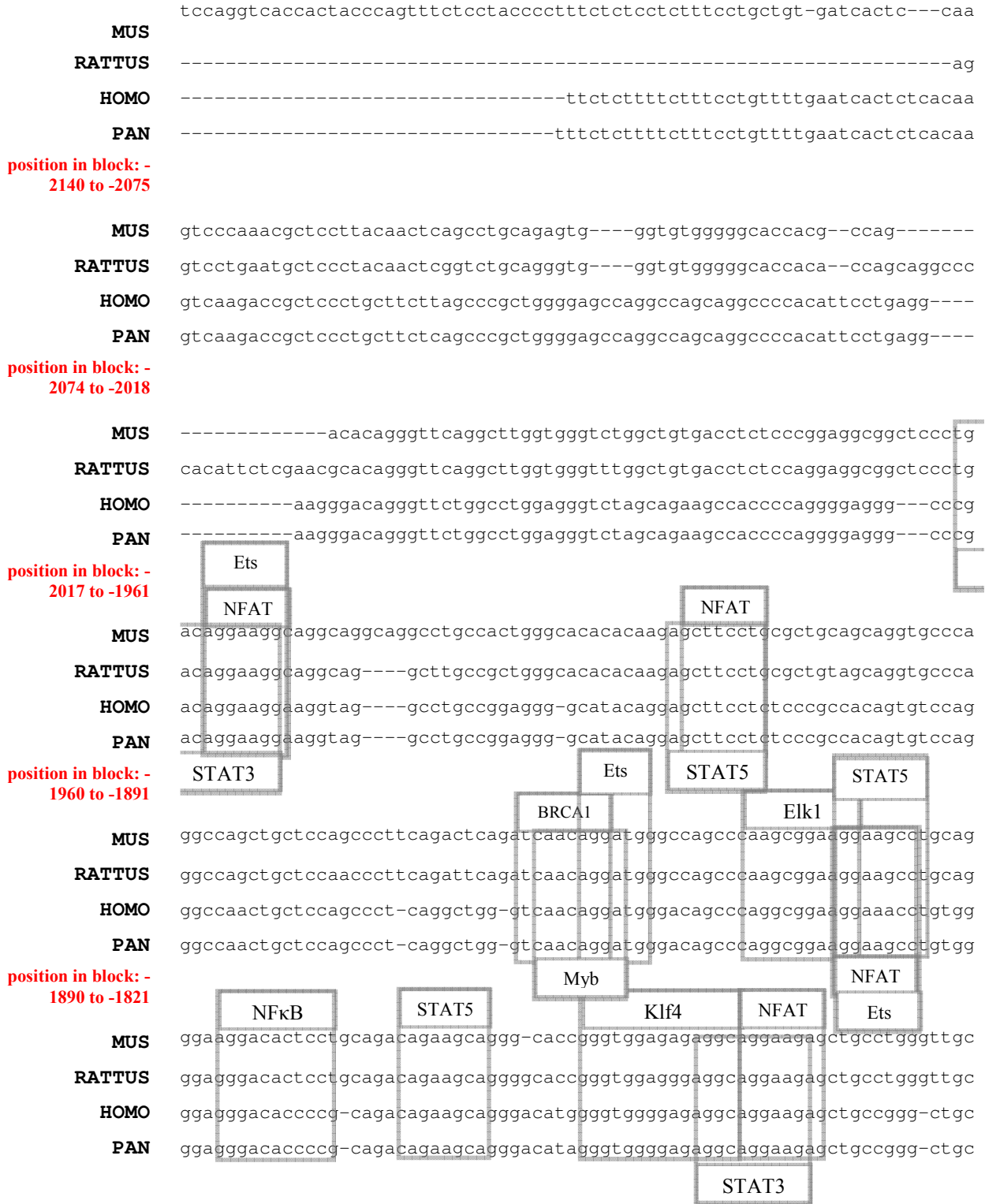
Con base en los resultados generados en este proyecto de maestría podemos concluir que *Klf10* es un blanco de la regulación de CREB y AP1, aunque queda pendiente determinar cuáles son los sitios exactos necesarios para esta regulación.

PERSPECTIVAS

- Caracterizar los sitios de unión para CREB y AP1 en el promotor de *Klf10* por medio de ensayos de CHIP y de mutaciones sobre el promotor.
- Determinar el efecto de otras señales, como Wnt, estradiol, TGF β ó EGF sobre la actividad transcripcional del promotor de *Klf10*.

APÉNDICE

1. Sitios putativos de unión de factores de transcripción sobre el promotor de *Klf10*



position in block: -
1820 to -1752

		API		Ets	HSF	
MUS	tgagttggcgctcctccagcggattcagagcaggcagtgacaggaggccattcagtcac-----c					
RATTUS	tgagttggcgctcctccagcggattcaagctggcagtgacaggaggccattcagtcatacccccacccc					
HOMO	tgagctggcgctcctccagcagactcaggagggcggtgacaggaggccattccctcct-----c					
PAN	tgagctggcgctcctccagcagactcaggagggcggtgacaggaggccattccctcct-----c					

position in block: -
1751 to -1692

					Pax2	
		SP1			Oct	
MUS	ttccccactcccacccccaccagggttctctggcccacg---ttattatcattacatttgttgctg-					
RATTUS	caccccgcctcccaccctaccagggttctctggcccgtg--gtactgtcattaagtgttgctg-					
HOMO	atccccgcagccctgggcctctctgg---tctggccaacagtatactatcattatttattgctggtg					
PAN	atccccgcagccctgggcctctctgg---tctggccaacagtatactatcattatttattgctggtg					

position in block: -
1691 to -1626

					HoxA5	
					Otp	
MUS	--gctggctttaggtata---ccagaaggaaccatcagatagatggtg---gtagagctggaggcctcta					
RATTUS	--gctggctttaggtata---ccagaaggaaccatcagatagatgctgctagtagagctagcggcctcta					
HOMO	tcgctagcctgggccttagatacattagaaaaaacccatcggaagatacgcatagcattggcagtttcta					
PAN	tcgctagcctgggccttagatacattagaaaaaacccatcggaagatacgcatagcattggcagtttcta					

position in block: -
1625 to -1564

MUS	aaacaaa---ttccctcctttacctagctctgtggtgactg---agaaagggcacctgctttagcc-ct					
RATTUS	aagctat---tccctcctttaccagctctg-----tgccttagca-cg					
HOMO	aaagaattaattcccttccctgtgttcattctgtgattactgggatagaaatgctatttgcattaccagcc					
PAN	aaacaattaattcccttccctgtgttcattctgtgattactgggatagaaatgctatttgcattaccagcc					

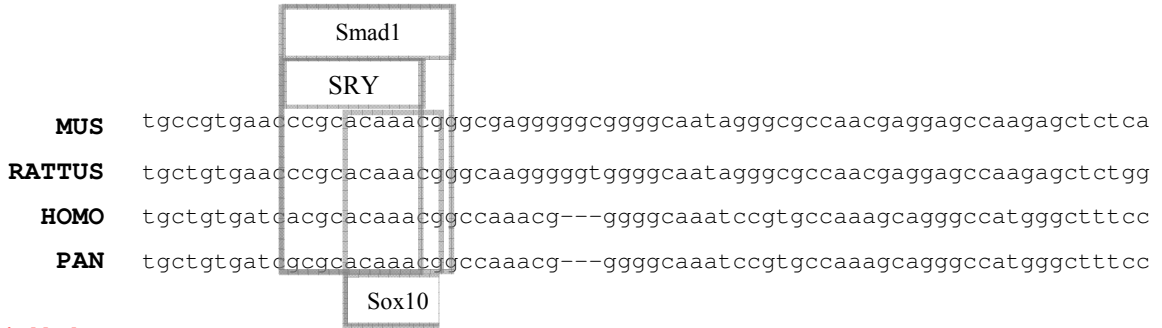
position in block: -
1563 to -1503

				Ets	Pax2	
MUS	tttagcccag---cagg-ctgaaaaagcccacaggagg-gcagtgacttttgtctcatgatctgectgtc					
RATTUS	tctagctcgg---cagg-ctgaaaag-cccataggagg-gcagtgacttttgtctcatgatccgcctgat					
HOMO	tttcattcagttacagagacgtgagtgtcgaaggagagacagtgatttttgccttaaattcagcctgtc					
PAN	tttcattcagttacagagacgtgagtgtcgaaggagagacagtgatttttgccttaaattcagccg-tc					

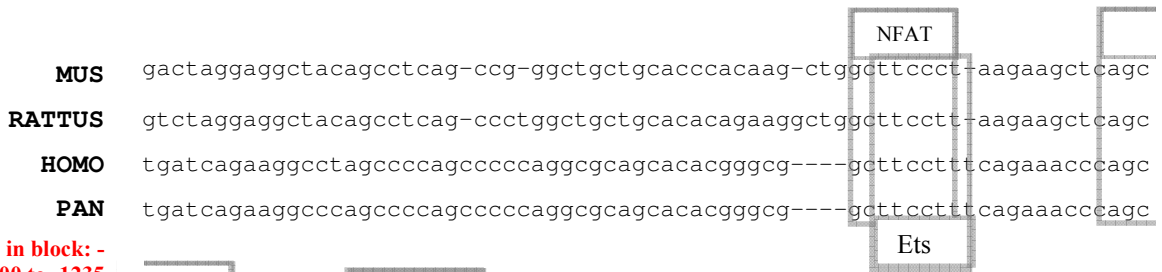
position in block: -
1502 to -1438

				Mvb	Pax2	
MUS	ccagggagaagataaaaaatctctagtttgctttaagccccgttatcactcctccggctccaacag---c					
RATTUS	ccaagagagacgataaaaaatctctagtttgctttaagccccgttatcactgctccggctccaacag---c					
HOMO	caaatcg---gataagatctccgatttgctttaagccccgttatcactgcttctctccaacaacagc					
PAN	caaatcg---gataagatctccgatttgctttaagccccgttatcactgcttctctccaacaacagc					

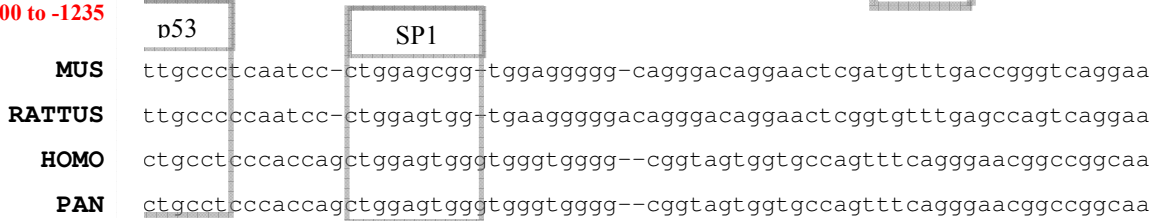
position in block: -
1437 to -1371



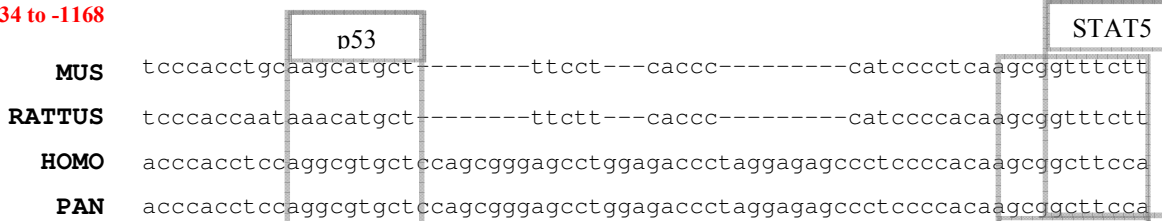
position in block: -
1370 to -1301



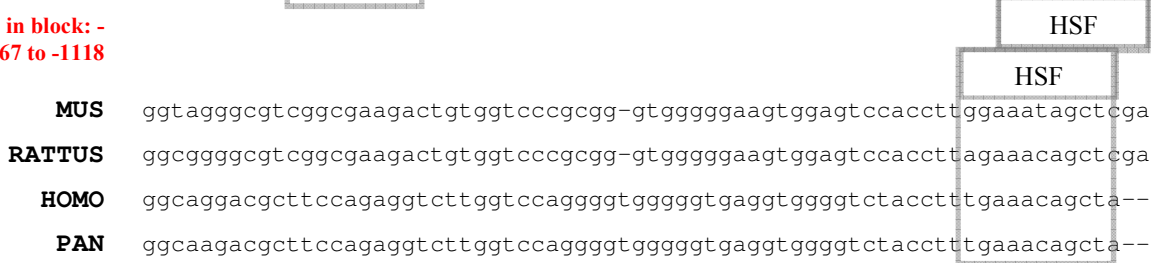
position in block: -
1300 to -1235



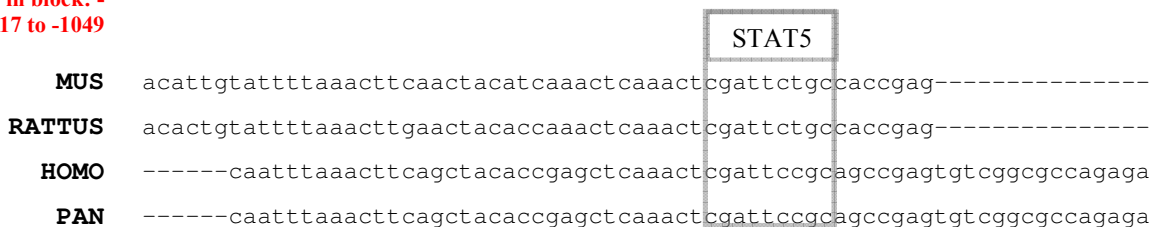
position in block: -
1234 to -1168



position in block: -
1167 to -1118



position in block: -
1117 to -1049



position in block: -
1048 to -994

MUS -----cg-tcgggtctggggctccctgccacgccactagctctttggtaccggcttcccttagtccc
RATTUS -----cactcgagcttaggggtcccggccacgccactagccctaaggtagccttcccgtagtccc
HOMO aggataaaaaactcgggtctacggctccccaccacgccccctggtccggctcctctgggcttccaggagtcc
PAN aggataaaaaactcgggtctacggctccccaccacgccccctggtccggctcctctgggcttccaggagtcc

NFAT

STAT1

position in block: -
993 to -933

MUS cactccaaccgcccagaaggacgggagggacgcgcagaggcgggcctgctgctagtgcctgtgctgcag
RATTUS cacaccaaccgcccagaaggacgggagggacgcgcagaggcgggcctgctgccagtgcctgtgctgcag
HOMO cacgccatcctctgggttgcccaggagg---aaggatgggcggggcgggcagggcgtgcgggcgctgcag
PAN cacgccatcctctgggttgcccaggagg---aaggatgggcggggcgggcagggcgtgcgggcgctgcag

position in block: -
932 to -863

MUS atggg-aggacgagccagcgcctgccgccttgggcgtgggcggtgagtgcgagcaggtgtctcttccgtg
RATTUS atggg-aggacgagccaacgcctgccgccttgggcgtgggcggtgagtgcgagcaggtgtctcttccgtg
HOMO atggggagggcgagcccgcggca--cggcgtgagcgggggagaggcgcgcgagcaggtgtcgcctccgtg
PAN atggggagggcgagcccgcggca--cggcgtgagcgggggagaggcgcgcgagcaggtgtcgcctccgtg

Krox

MvoD

Pax2

position in block: -
862 to -794

MUS acagggtcccgcgccaccatctgcctggttctccccagtctc-cggcttagagtgacaaaaccg
RATTUS acagggtcccgcgccaccacctgcctggttctccccagtctcagcgttagagtgacaaaatccg
HOMO acagggtcccccatcc-----cgcgccccagtgtctccccg-----aggcttagtgaggcaaaaccda
PAN acagggtcccccatcc-----cgcgccccagtgtctccccg-----aggcttagcgaggcaaaaccda

Ets

position in block: -
793 to -725

MUS gcaaatgct-cagaaatgdcgctcagtggttcatccatcccttgcctccacgcaagaccacagaga--ac
RATTUS gcaaatgct-cagaaatgdcactcagtggttccccggctcttgcctccacgcaagaccacagaga--ac
HOMO gcaaatgcttbagaaatgcagctcagtcggtcaccgggttct-gcttcctcatcagacgcgcaagaggat
PAN gcaaatgcttbagaaatgcagctcagtcggtccccgggttct-gcttcctcatcagacgcgcaagaggat

HoxA5

HoxA5

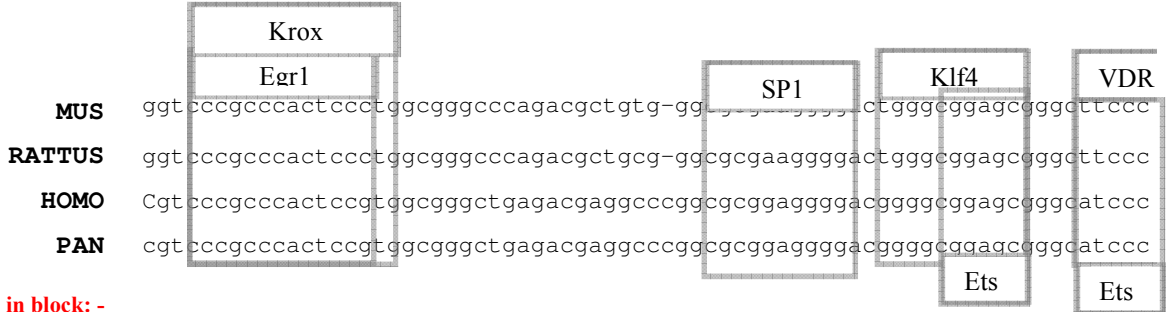
NFAT

position in block: -
724 to -658

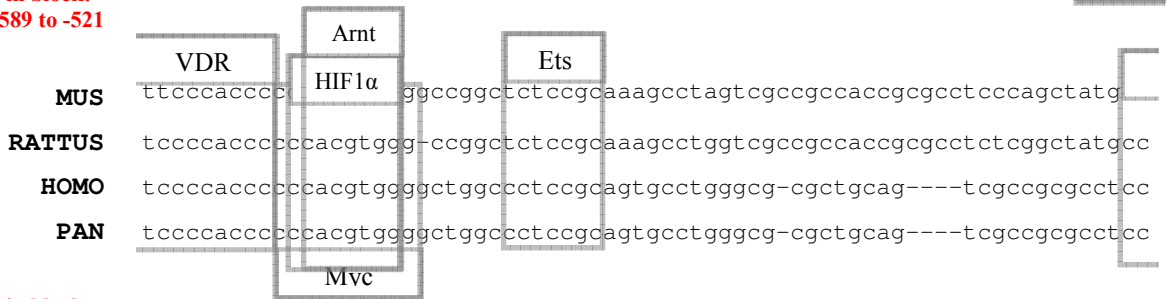
MUS cacgctgccaaagaacgtctggtggctcggagccg-cgctcgcagcctccgcctccgcctcctgctcgg
RATTUS cgcgcttccaaagaacgtctggtggccaggagccg--cgctcgcagcctccgccttc-----tgctcgg
HOMO Ggcgcttccaatgcaaatctcttggtcgggcccttggtggcagccgcgcgctccccgcctgctgg
PAN Ggcgcttccaatgcaaatctcttggtcgggcccttggtggcagccgcgcgctccccgcctgctgg

STAT5

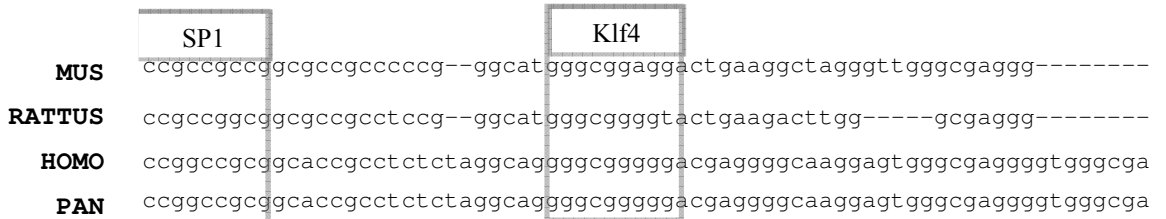
position in block: -
657 to -590



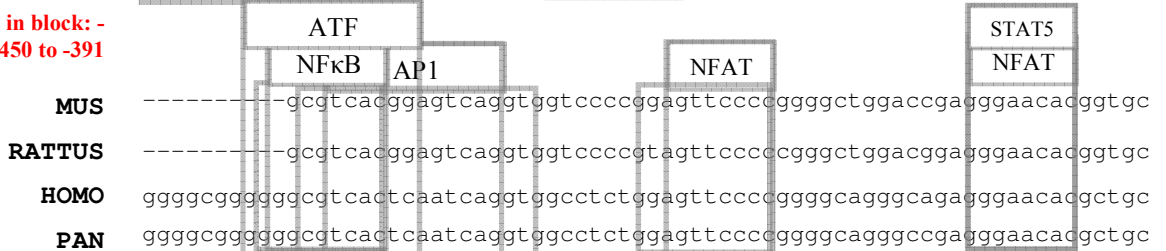
position in block: -
589 to -521



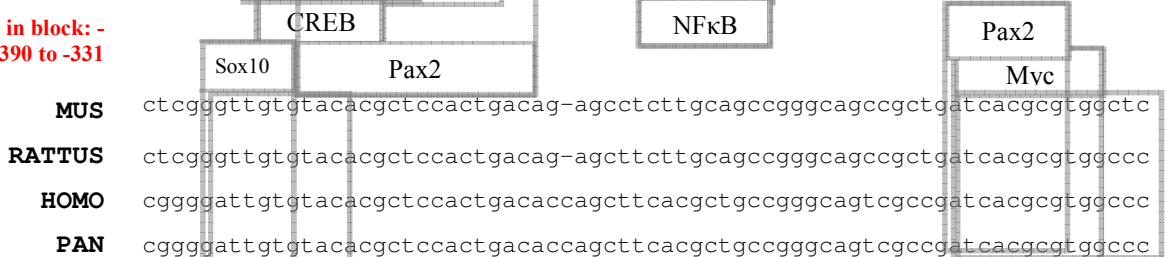
position in block: -
520 to -451



position in block: -
450 to -391



position in block: -
390 to -331



position in block: -
330 to -262



	nanog		Lefl	
MUS	tgcagctcattggctgaggcctcacacacctttgccgctgattggctgacactaggccccgcctctac			
RATTUS	cgccagcccattggctgaggcctcacacacctttaccgctgattggctgataccacgccccgccttccac			
HOMO	cgccagcccattggcgggcgctcacacacctttgccgctgattggcggcctcaggctccgccccacc			
PAN	cgccagcccattggcgggcgctcacacacctttgccgctgattggcggcctcaggctccgccccacc			

position in block: -
261 to -192

	Klf4		p53		SP1	Smad3
MUS	cccgcccgcggcgcggggcaggcagagcggctacctgcacggggaggggggagacagcgcggagcgcgg					
RATTUS	Cccgcccgcggcgcggggcaggcagagcggctacctgcatggggaggggggagacagcgcggagcgcgg					
HOMO	cccgcccgcggcgcggggcaggctgagcggctacctgaatggggagggggagacagcgcgcgtgagcgcgg					
PAN	cccgcccgcggcgcggggcaggctgagcggctacctgaatggggagggggagacagcgcgcgtgagcgcgg					

position in block: -
191 to -122

			Klf4		Krox
MUS	tggcgtcg-----acgtctagtgctcagtgctcccgctctgtggctaactaagcagccagcagccaggc				
RATTUS	tggcgtcg-----acgtctagtgctcagtgctccg-tctgtg----gctaggcagccagcagccaagc				
HOMO	cggcggcgggagcggcgtcgagtgctcagtgctccgtgcgcccgctctgtg----gccaaagcagccagcagcctagc				
PAN	cggcggcgggagcggcgtcgagtgctcagtgctccgtgcgcccgctctgtg----gccaaagcagccagcagcctagc				

position in block: -
121 to -58

MUS	agctcgcgacctgcgggcaggcagccaacctgctcaacttcggcgcttctctccag-----
RATTUS	Agctcgcgacctacgggcaggcagccaacctgcttaacttcggcgcttctctccagcaagcttcggtaa
HOMO	ag-----ccagtcagcttgccg-----ccggcgg-----
PAN	ag-----ccagtcagcttgccg-----ccggcgg-----

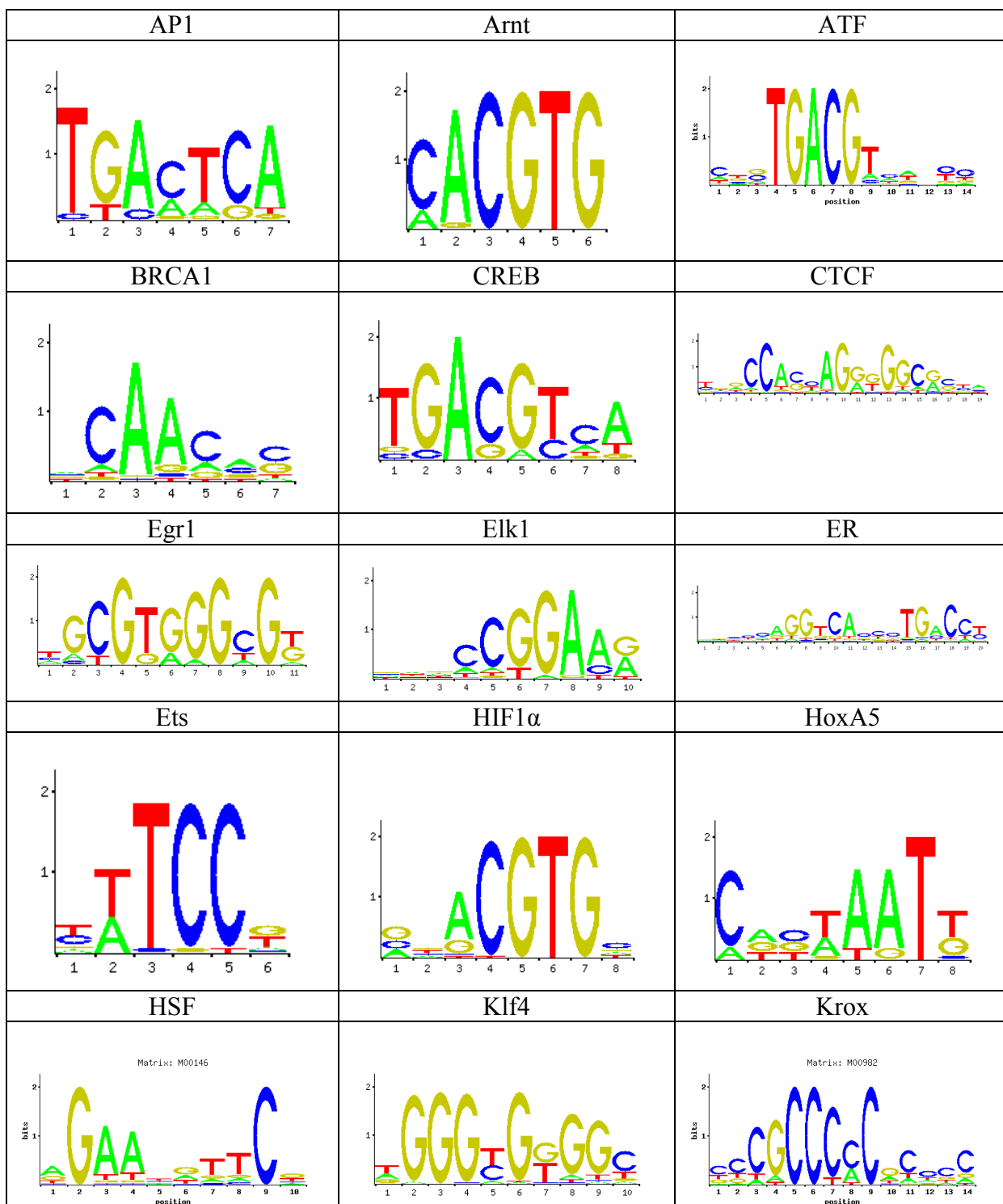
position in block: -
57 to -1

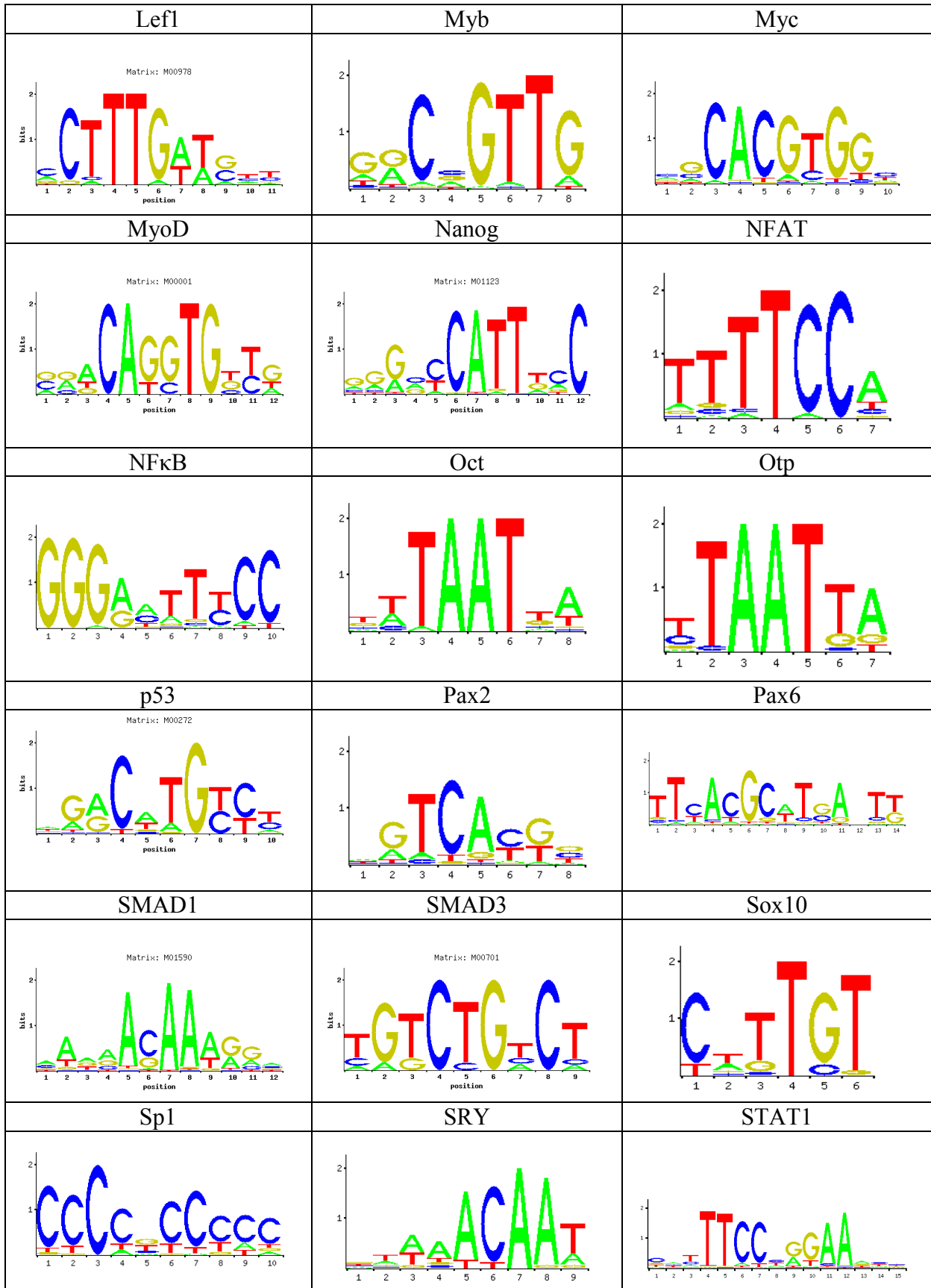
MUS	-----
RATTUS	Gttacctggagatgctggctcttctcctgctgtgtccgggagccagccgaag
HOMO	-----
PAN	-----

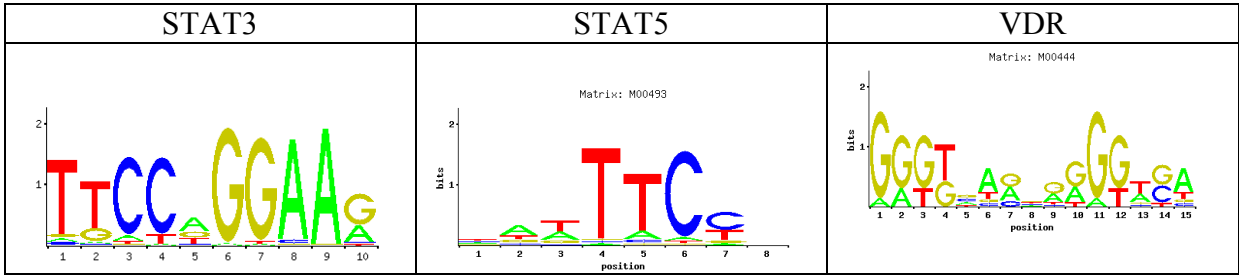
position in block: 0
to -1

2. Secuencias consenso de factores de transcripción

Obtenidos de la bases de datos JASPAR







REFERENCIAS

1. Acampora D, et al., *Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Ortopedia gene*. Genes & Dev, 1999, 13:2787-27800.
2. Akaneya Y, et al., *Ephrin-A5 and EphA5 interaction induces synaptogenesis during early hippocampal development*. PLoS One, 2010, 5:e12486.
3. Alberts, et al. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2008.
4. Alme MN, et al., *Chronic fluoxetine treatment induces brain region-specific upregulation of genes associated with BDNF-induced long-term potentiation*. Neural Plast, 2007, 2007:26496.
5. Aloe L, et al., *Nerve growth factor: basic findings and clinical trials*. Biomedical Reviews, 1999, 10:3-14.
6. Alvarez-Rodriguez, et al., *Bone Morphogenetic Protein 2 opposes Shh-mediated proliferation in cerebellar granule cells through a TIEG-1-based regulation of Nmyc*. J of Biol Chem, 2007, 282:37170-37180.
7. Alvarez JV, et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 is required for the oncogenic effects of non-small-cell lung cancer-associated mutations of the epidermal growth factor receptor*. Cancer Res, 2006, 66:3162-3168.
8. Anderson DJ, *Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination*. Trends Genet, 1997, 16:276-280.
9. Angers S, et al. *Proximal events in Wnt signal Transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10:468-477.
10. Barker V, et al., *TNF α contributes to the death of NGF-dependent neurons during development*. Nature Neurosci, 2001, 4:1194-1198.
11. Basu P, et al. *Evolutionary conservation of KLF transcription factors and functional conservation of human γ -globin gene regulation in chicken*. Genomics, 2004, 84:311-319.
12. Bedogni B, et al., *Redox regulation of cAMP-responsive element-binding protein and induction of manganous superoxide dismutase in nerve growth factor-dependent cell survival*. J Biol Chem, 2003, 278:16510-16519.
13. Bieker J. *Kruppel-like factors: three fingers in many pies*. J Biol Chem, 2001, 276:34355-34358.
14. Bonnie E, et al., *Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system*. Neuron 2002, 35:605-623.
15. Booy EP, et al., *Epidermal growth factor regulates Mcl-1 expression through the MAPK-Elk-1 signalling pathway contributing to cell survival in breast cancer*. Oncogene, 2011, 30:2367-2378.
16. Burbach J, et al. *Gene Regulation in the Magnocellular Hypothalamo-Neurohypophysial System*. Physiol Rev, 2001, 81:1197-1267.
17. Cao Z, et al., *Kruppel-like factor KLF10 targets transforming growth factor- β 1 to regulate CD4⁺ CD25⁺ T cells and T regulatory cells*. J of Biol Chem, 2009, 284:24914-24924.
18. Chawla S, et al., *CREB/CBP and SRE-interacting transcriptional regulators are fast on-off switches: duration of calcium transients specifies the magnitude of transcriptional responses*. J Neurochem, 2001, 78:849-858.
19. Chen AE, et al., *Protein kinase A signaling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins*. Nature, 2005, 433:317-322.
20. Chen D, et al., *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors 2004, 22:233-241.
21. Chen Q, et al., *CREB-binding protein/p300 co-activation of crystalline gene expression*. J Biol Chem, 2002, 277:24081-24089.
22. Chen X, et al. *Transcriptional profiling of kruppel like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation*. J Mol Biol, 2003, 326:665-677.
23. Chen Z, et al., *Porcine KLF gene family: structure, mapping, and phylogenetic analysis*. Genomics, 2010, 95:111-119.
24. Chilton JK. *Molecular mechanisms of axon guidance*. Dev Biol, 2006, 292:1324.
25. Chrisman H, et al. *Identification and characterization of a consensus DNA binding element for the zinc finger transcription factor TIEG/EGR α* . DNA and Cell Biol, 2003, 22:187-199.
26. Cohen A, et al., *An essential role of ERK signaling in TPA-induced reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J of General Vir, 2006, 87:795-802.
27. Conkright M, et al. *A gene encoding an intestinal-enriched member of the kruppel-like factor family expressed in intestinal epithelial cells*. Nucleic Acids Res, 1999, 27:1263-1270.
28. Consales C, et al., *GDNF signaling in embryonic midbrain neurons in vitro*. Brain Res, 2007, 1159:28-39.
29. Cook T, et al., *Three conserved transcriptional repressor domains are a defining feature of the TIEG subfamily of Sp1-like zinc finger proteins*. J Biol Chem, 1999, 274:29500-29504.
30. Cook T, et al. *TIEG proteins join the Smads as TGF- β -regulated transcription factors that control pancreatic cell growth*. Am J Physiol Gastr Liver Physiol, 2000, 278:G513-G521.
31. Dahlman-Wright K, et al., *International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors*. Pharmacological Reviews, 2006, 58:773-781.
32. Dijkmans T, et al. *Identification of new growth factor-responsive immediate-early genes*. Brain Res, 2009, 1249:19-33.
33. Dobolyi A. *Transforming growth factor beta in the central nervous system*. Neuroscience – dealing with frontiers, 2012, capitulo 6. In Tech.
34. Doe CQ, *Asymmetric cell division and neurogenesis*. Curr Opin Genet Dev, 1996, 6:562-566.
35. Edlund T, et al. *Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system*. Cell, 1999, 96:211-224.
36. Einarsdottir E, et al., *A mutation in the nerve growth factor beta gene (NGFB) causes loss of pain perception*. Hum Mol Genet, 2004, 13:799-805.
37. Fautsch MP, et al., *Characterization of the mouse TGF β -inducible early gene (TIEG): conservation of exon and transcriptional regulatory sequences with evidence of additional transcripts*. Mammalian Genome, 1998, 9:838-842.
38. Fautsch MP, et al. *TGF β -Inducible early gene (TIEG) also codes for early growth response α (EGR α): evidence of multiple transcripts from alternate promoters*. Genomics 51, 1998, 108-116.
39. Flanders KC, et al., *Localization and actions of transforming growth factor- β s in the embryonic nervous system*. Development, 1991, 113:183-191.
40. Frise E, et al., *The Drosophila numb protein inhibits signaling of the notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93:1925-1932.
41. Fukuda H, et al., *Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression*. Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 2006, 5:190-208.

42. Galceran J, et al., *Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1*. Development, 2000, 127:462-482.
43. Gabala ML, et al., *The nucleotide receptor P2RX7 mediates ATP-induced CREB activation in human and murine monocytic cells*. J of Leukocyte Biol, 2008, 84:1159-1171.
44. Gonzales GA, et al., *A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence*. Nature, 1989, 337:749-752.
45. Goshu E, et al., *Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus*. Mol Endocrinol, 2004, 18:1251-1262.
46. Guerra-Crespo M, et al. *BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture*. Eur J Neur, 2001, 14:484-494.
47. Guerra-Crespo, et al. *Transcriptional profiling of fetal hypothalamic TRH neurons*. BMC Genomics, 2011, 12:222.
48. Gunther M, et al., *A set of proteins interacting with transcription factor Sp1 identified in a two-hybrid screening*. Mol Cell Biochem, 2000, 210:131-142.
49. Guo M, et al., *Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of numb and notch*. Neuron 17:27-41.
50. Hall AC, et al., *Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling*. Cell, 2000, 100:525-535.
51. Hassig C, et al. *Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A*. Cell, 1997, 89:341-347.
52. Hefferan T, et al. *Overexpression of a nuclear protein, TIEG, mimics transforming growth factor- β action in human osteoblast cells*. J Biol Chem, 2000, 275:20255-20259.
53. Herbert TP, et al., *Distinct signaling pathways mediate insulin and phorbol ester-stimulated eukaryotic initiation factor 4F assembly and protein synthesis in HEK 293 cells*. J of Biol Chem, 2000, 275:11249-11256.
54. Hess J, et al., *AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings*. J of Cell Sci 2004, 117:5965-5976.
55. Holub JL, et al., *The role of nerve growth factor in caspase-dependent apoptosis in human BE(2)C neuroblastoma*. J of Pediatric Surgery, 2011, 46:1191-1196.
56. Hosoya T, et al., *Defective development of secretory neurons in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice*. Genes Cell, 2001, 6:361-374.
57. Hsu, CF, et al. *Klf10 induces cell apoptosis through modulation of BI-1 expression and Ca²⁺ homeostasis in estrogen-responding adenocarcinoma cells*. Int J of Biochem & Cell Biol. 2011, 43:666-673.
58. Huber T, et al. *Neptune, a Krüppel-like transcription factor that participates in primitive erythropoiesis in Xenopus*. Curr. Biol, 2001, 11:1456-1461.
59. Jacobs S, et al., *Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus*. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103:3902-3907.
60. Jiang J, et al. *A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells*. Nat Cell Biol, 2008, 10:353-360.
61. Johnsen SA, et al., *Modulation of transforming growth factor beta (TGFbeta)/Smad transcriptional responses through targeted degradation of TGFbeta-inducible early gene-1 by human seven in absentia homologue*. J Biol Chem, 2002, 277:30754-30759.
62. Jorinsen RN, et al. *Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling*. Exp Cell Res, 2003, 284:31-53.
63. Kandel, et al. *Principles of Neural Science*, 4th Edition, 2000, Mc Graw Hill.
64. Kao S, et al., *Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the MAPK cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells*. The J of Biol Chem, 2001, 276:18167-18177.
65. Karin M, et al. *Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus*. Curr Biol, 1995, 5:747-757
66. Kim J, et al. *Histone demethylase JARID1B/KDM5B is a corepressor of TIEG1/KLF10*. Biochem. Biophys. Res. Commun, 2010.
67. Kim YM, et al., *Zn²⁺-induced IL-8 expression involves AP-1, JNK, and ERK activities in human airway epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 290:1028-1035.
68. Kobori N, et al., *Altered expression of novel genes in the cerebral cortex following experimental brain injury*. Brain Res Mol Brain Res, 2002, 104:148-158.
69. Kriegstein K, et al. *TGF- β and the regulation of neuron survival and death*. J Physiol Paris, 2002, 96:25-30.
70. Lee J, et al. *Canonical wnt signaling through lef1 is required for hypothalamic neurogenesis*, Development, 2006, 133:4451-4461.
71. Lee S, et al. *A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus*. Development, 2000, 127:457-467.
72. Leppä S, et al., *Complex functions of AP-1 transcription factors in differentiation and survival of PC12*. Mol and Cell Biol, 2001, 21:4369-4378.
73. Lewin B. *Genes IX*. Mc Graw Hill, 2008.
74. Lim J, et al., *Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by the cAMP-signaling pathway: involvement of multiple transcription factors*. Mol Cell Biochem, 2000, 212:51-60.
75. Lim JY, et al., *Brain-Derived Neurotrophic Factor stimulates the neuronal differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-Dependent signaling pathways*. J of Neurosci Res, 2008, 2168-2178.
76. Liu C, et al., *Identification of the downstream targets of SIM1 and ARNT2, a pair of transcription factors essential for neuroendocrine cell differentiation*. J Biol Chem, 2003, 277:44857-44867.
77. Logan C, et al., *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004, 20:781-810.
78. Lonze, et al., *Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB*. Neuron. 2002 34:371-385.
79. Luchi S. *Three classes of C2H2 zinc finger proteins*. Cell. Mol. Life Sci, 2001, 58:625-635
80. Mantamadiotis T, et al., *Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration*. Nat Genet, 2002, 31:47-54.
81. Matsuoka Y, et al., *Selective inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1/2 blocks nerve growth factor to brain-derived neurotrophic factor signaling and suppresses the development of and reverses already established pain behavior in rats*. Neuroscience, 2012, 206:224-236.
82. Markaris E., *Development of the neuroendocrine hypothalamus*. Front Neuroendo 2002 23; 257-291
83. Maruoka H, et al., *Dibutyl- α -cAMP up-regulates nur77 expression via histone modification during neurite outgrowth in PC12 cells*. J Biochem, 2010, 148:93-101.
84. Martinez-Armenta M. *El papel de Klf10 en la expresión del gen de TRH durante la etapa de diferenciación terminal*, manuscrito en

- preparación.
85. Mayr B, et al., *Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2:599-609.
 86. McConnell BB, et al., *Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases*. Physiol Rev, 2010, 90:1337-1381.
 87. Michaud J. *The developmental program of the hypothalamus and its disorder*. Clin Genet, 2001, 60:255-263.
 88. Michaud JL, et al., *Development of neuroendocrine lineages require the bHLH-PAS transcription factor SIM1*. Genes Dev, 1998, 12:3264-3275
 89. Michaud JL, et al., *ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus*. Mechanisms of Dev, 2000, 90:253-261.
 90. MoffettP, et al., *Different transcriptional properties of mSin-1 and mSin-2*. FBS Lett, 2000, 466:80-86.
 91. Morla AO, et al., *Protein tyrosine phosphorylation in the cell cycle of BALB/c 3T3 fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83:8191-8195.
 92. Mu Y, et al., *Non-Smad signaling pathways*. Cell Tissue Res, 2012, 347:11-20.
 93. Murai K, et al., *Hes6 is required for the neurogenic activity of neurogenin and NeuroD*. PLoS One, 2011, 6:e27880.
 94. Nagamoto-Combs K, et al., *Tyrosine hydroxylase gene promoter activity is regulated by both cyclic AMP-responsive element and API sites following calcium influx*. J Biol Chem, 1997, 272:6051-6258.
 95. Nagatsu T, et al. *Tyrosine hydroxylase the initial step in norepinephrine biosynthesis*. J Biol Chem, 1964, 239:2910-2917.
 96. Nieber F, et al., *Comparative expression analysis of the neurogenins in Xenopus tropicalis and Xenopus laevis*. Dev Dyn, 2009, 238:451-458.
 97. Nakai S, et al., *The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mice*. Genes Dev, 1995, 9:3109-3121.
 98. Nonaka M., *A Janus-like role of CREB protein: enhancement of synaptic property in mature neurons and suppression of synaptogenesis and reduced network synchrony in early development*. J of Neurosci, 2009: 29:6389-6391.
 99. Noti J, et al. *The leukocyte integrin gene CD11d is repressed by gut-enriched kruppel-like factor 4 in myeloid cells*. J Biol Chem, 2005, 280:3449-3457.
 100. Noti J, et al. *The zinc finger transcription factor transforming growth factor b-inducible early gene-1 confers myeloid-specific activation of the leukocyte integrin CD11d promoter*. J Biol Chem, 2004, 279:27948-26958.
 101. Oates A, et al. *The zebrafish klf gene family*. Blood, 2001, 98:1792-1801.
 102. Patel TD, et al., *Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo*. Neuron, 2000, 25:345-357.
 103. Pérez- Martínez L, et al. *Factors involved in the establishment of hypothalamic neuroendocrine phenotypes*. Mol Endoc, 2006, capitulo 7.
 104. Pérez-Martinez L, et al. *Tissuie inhibitor of metalloproteinase-2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal*. J Neuro Sci, 2005, 25:4917-4929.
 105. Pérez-Monter, et al. *The kruppel-like factor 4 controls biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone during hypothalamus development*. Mol and Cell Endocr, 2011, 333:127-133.
 106. Purves D, et al., *Neuroscience Third Edition*. Sinaure Associates Inc, 2004.
 107. Quina AS, et al., *Chromatin structure and epigenetics*. Biochem Pharmacol, 2006, 72:1563-1569.
 108. Rahman I, et al., *Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/API activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation*. Mol Cell Biochem, 2002, 234-235:239-238.
 109. Rajamannan N, et al. *TGFb inducible early gene-1 (TIEG1) and cardiac hypertrophy: discovery and characterization of a novel signaling pathway*. J Cell Biochem, 2007, 100:315-325.
 110. Romain P, et al., *Novel Notch alleles reveal al Deltex-dependent pathway repressing neural fate*. Curr Biol, 2001, 11:1729-1738.
 111. Rhyu MS, et al., *Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter*. Cell, 1994, 76:477-491.
 112. Riccio A, et al., *Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons*. Science, 1999, 286:2358-2361.
 113. Roussa E, et al., *TGF-beta promotes survival on mesencephalic dopaminergic neurons in cooperation with Shh and FGF-8*. Neurobiol Dis, 2004, 16:300-310.
 114. Routes J, et al., *CREB (cAMP response element binding protein) and C/EBPalpha (CCAAT/enhancer binding protein) are required for the superstimulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by adenoviral E1a and cAMP*. Biochem J, 2000, 352:335-342.
 115. Sahores M, et al., *Frizzled-5, a receptor for the synaptic organizer Wnt7a, regulates activity-mediated synaptogenesis*. Development, 2010, 137:2215-2225.
 116. Sambrook J, et al., *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
 117. Sánchez-Muñoz I, et al., *Regulation of somatostatin gene expression by brain derived neurotrophic factor in fetal rat cerebrocortical cells*. Brain Res, 2011, 1375:28-40.
 118. Schramm L, et al., *Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters*. Genes & Dev, 2002, 16:2593-2620.
 119. Schulze SR, et al., *Chromatin structure: paradigms established in Drosophila melanogaster*. Annu Rev Entomol, 2007, 52:171-192.
 120. Scobie K, et al. *Kruppel-like factor 9 is necessary for late-phase neuronal maturation in the developing dentate gyrus and during adult hippocampal neurogenesis*. J Neurosci, 2009, 29:9875-9887.
 121. Seldeen KL, et al., *DNA plasticity is a key determinant of the energetics of binding of Jun-Fos heterodimeric transcription factor to genetic variants of TGACGTCA motif*. Biochem, 2009, 48:12213-12222.
 122. Segal R, et al. *Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors*. Annu Rev Neurosci, 1996, 19:463-489.
 123. Sheena A, et al., *CREB, plasticity and memory*. Handbook of Chemical Neuroanatomy, 2002, 19:329-361.
 124. Song G, et al. *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. J Cell Mol Med, 2005, 9:59-71.
 125. Spittau, G. *Tieg1/Klf10 is upregulated by NGF and attenuates cell cycle progression in the pheochromocytoma cell line PC12*. J of Neurosc Res, 2010, 88:2017-2025.
 126. Spitz F, et al., *Transcription factors: from enhancer binding to developmental control*. Nat Rev Genetics, 2012, 16:613-626.
 127. Subramaniam M, et al., *Identification of a novel TGF-beta-regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts*. Nucleic Acids Res, 1995, 23:4907-4912.
 128. Subramaniam M, et al. *Role of TIEG1 in biological Processes and Disease States*. J Cell Biochem, 2007, 102:539-548.

129. Subramaniam M, et al. *TGF β inducible early gene-1 directly binds to, and represses, the OPG promoter in osteoblasts*. Biochem and Biophysical Res Comm, 2010, 392:72-76.
130. Tachibana I, et al. *Overexpression of the TGF β -regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells*. J Clin Invest, 1997, 99:2365-2374.
131. Tanaka S, et al., *Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells*. Mol Cell Biol, 2004, 24:884-8846.
132. Thomas MC, et al., *The general transcription machinery and general cofactors*. Crit Rev in Biochem and Mol Biol, 2006, 41:105-178.
133. Ubieto R, et al. *BDNF up-regulates pre-pro-TRH mRNA expression in the fetal/neonatal paraventricular nucleus of the hypothalamus. Properties of the transduction pathway*. Brain Res, 2007, 1174:28-38.
134. Walton M, et al., *CREB phosphorylation promotes nerve cell survival*. J of Neurochem 1999, 73:1836-1842.
135. Wang W, et al., *The murine Otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus*. Dev Biol, 2000, 15:432-449.
136. Wechsler-Reya RJ, et al., *Control of neural precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog*. Neuron, 1999, 22:103-114.
137. Wegner M. *SOX after SOX: SOXession regulates neurogenesis*. Genes Dev, 2011, 25:2423-2423.
138. Whitfield TW, et al., *Functional analysis of transcription factor binding sites in human promoters*. Genome Biology, 2012, 13:R50.
139. Wieschaus E, et al. Krüppel, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation. Dev. Biol, 1984, 104:172-186
140. Wu W, et al., *Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit*. Nature, 1999, 400:331-336.
141. Xiao X, et al., *Targeting CREB for cancer therapy: friend of foe*. Curr Cancer Drug Targets, 2010, 10:382-391.
142. Xiong Y, et al., *Polycomb antagonizes p300/CREB-binding protein-associated factor to silence FOXP3 in a Kruppel-like factor-dependent manner*. J Biol Chem, 2012, 287:34372-34382.
143. Yan Bo, et al., *Notch signaling downstream of foxD5 promotes neural ectodermal transcription factors that inhibit neural differentiation*. Dev Dyn, 2009, 238:1358-1365.
144. Yang XJ, *Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis*. Seminars in Cell & Dev Biol, 2004, 91-103.
145. Ying-Tang H, et al., *Inhibition of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate induction of c-fos mRNA by the protein kinase A inhibitor N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinoline sulfonamide*. Biochem Pharmacol 1999, 58:1639-1647.
146. Yue W, et al., *Activation of the MAPK pathway enhances sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to the mitogenic effect of estradiol*. Endocrinology, 2002, 143:3221-3229.
147. Zhang JS, et al. *A conserved α -helical motif mediates the interaction of Sp1-like transcriptional repressors with the corepressor mSin3A*. Mol. and Cell. Biol, 2001, 21:5041-5049.
148. Zhou T, et al., *Neurons derived from PC12 cells have the potential to develop synapses with neurons from rat cortex*. Acta Neurobiol Exp, 2006, 66:105-112.
149. Zhu S, et al. *Glutamatergic stimulation triggers rapid Kruppel-like factor 4 expression in neurons and the overexpression of Klf4 sensitizes neurons to NMDA-induced caspase-3 activity*. Brain Res, 2009, 1250: 49-62.