

PLAN DE TRABAJO PROPUESTO

TÍTULO: “Rol del factor de diferenciación neuronal NeuroD1 en la síntesis y secreción de melatonina”

1- ANTECEDENTES

El sistema circadiano influencia diversos aspectos conductuales y fisiológicos, tales como el sueño, la temperatura corporal y el funcionamiento mental, como así también a los sistemas endócrino e inmune (Klein y cols., 1991; Roenneberg y Mellow, 2003). La **glándula pineal** es considerada el **transductor** neuroendócrino del reloj circadiano central ubicado en los **núcleos supraquiasmáticos** del hipotálamo.

Los desórdenes en este sistema afectan a un amplio sector de la población, que incluye ancianos, ciegos, sujetos sometidos a cambios drásticos de horario e incluso niños, y se caracterizan por trastornos en el sueño, en los estados de ánimo, alteraciones afectivas estacionales y depresión, entre otros. La frecuencia de los mismos es elevada en la sociedad actual, pero sus diagnósticos y tratamientos están enmascarados por su frecuente asociación con otras patologías de base como la diabetes y por no tener un reconocimiento clínico importante (Klein y cols., 1998; Manji y Lenox, 2000; Magnusson y Boivin, 2003; Yesavage y cols., 2003; Reid y Zee, 2004).

De lo anterior se puede deducir que un mayor entendimiento de los eventos moleculares involucrados en la diferenciación morfofuncional de la glándula es crucial para prevenir, diagnosticar y tratar estas enfermedades.

NeuroD1 forma dímeros con otros factores de transcripción, las proteínas E, para finalmente unirse a secuencias consenso del ADN llamadas E-boxes, modulando la transcripción de determinados genes con distribución tisular específica como el que codifica a la insulina (Naya y cols., 1995). NeuroD1 es un factor neurogénico capaz de convertir células ectodérmicas en neuronas en *Xenopus* (Lee y cols., 1995). A su vez, está implicado en el desarrollo de las células fotorreceptoras de la retina, las cuales están evolutivamente relacionadas con los pinealocitos (Pennesi y cols., 2003; Klein, 2004). Es importante destacar que la glándula pineal y la retina constituyen las dos principales fuentes de melatonina. La producción de insulina dependiente del NeuroD1 por las células beta pancreáticas, confirmada por la muerte temprana de los ratones KO por diabetes severa (Naya y cols., 1997), potencia el rol del factor como mediador de funciones endócrinas. Estudios de la expresión del ARNm del NeuroD1 en la glándula pineal de roedores revelaron que el mismo comienza a observarse a partir del día 17 del desarrollo embrionario, 1-2 días después de iniciada la evaginación diencefálica que dará origen a la glándula. Los niveles del ARNm aumentan progresivamente durante el último periodo embrionario, siendo relativamente constantes durante la vida adulta (Muñoz y cols., 2007). Estos autores, mediante el estudio del patrón de expresión génica de glándulas pineales provenientes de ratones NeuroD1 KO neonatales vía análisis de microarray, revelaron que 127 transcritos aparecen down-regulados mientras que 16 son up-regulados. De acuerdo a resultados complementarios de RT-PCR cuantitativa, el gen down-regulado más afectado fue un miembro de la familia de las kinesinas, *Kif5C*. Por otro lado, el gen que codifica a la enzima ácido glutámico descarboxilasa 1, *Gad1*, fue significativamente up-regulado. El gen que codifica para la enzima AA-NAT (arilalquilamina N-acetiltransferasa), también

apareció como un blanco potencial del NeuroD1. Esta enzima es la limitante en la vía de síntesis de la melatonina.

2- OBJETIVOS

El **objetivo general** del siguiente plan es contribuir a un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares responsables de la diferenciación morfológica y funcional de la **glándula pineal**, con el fin de prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades relacionadas con el **sistema circadiano**, tales como trastornos en el sueño y depresión.

El factor de diferenciación neuronal conocido como **NeuroD1/BETA2** (neurogenic differentiation factor 1 y beta cell E-box transactivator, respectivamente), fue descubierto en 1995 (Lee y cols., 1995; Naya y cols., 1995), y pertenece a la familia de factores de transcripción conocida como bHLH (basic helix-loop-helix). Su presencia y rol potencial en el control espacial y temporal de la función pineal ha sido recientemente documentada (Muñoz y cols., 2007). Nuevos estudios son necesarios a fin de elucidar como un factor de diferenciación celular clave en la definición de la suerte y función de ciertos tipos neuronales y las células beta pancreáticas contribuye a la biología de la glándula pineal.

La **hipótesis general** es que la influencia del NeuroD1 en la biología glandular podría estar mediada por dos componentes. Uno de ellos promovería la expresión de genes durante el desarrollo temprano de la glándula, mientras el segundo mantendría las funciones pineales específicas durante la adultez, incluyendo la síntesis de la hormona **melatonina** y las señales de transducción requeridas para controlar dicho proceso.

El **objetivo específico** es definir a nivel molecular el rol del factor de diferenciación NeuroD1 en el desarrollo morfofuncional de la glándula pineal. Para lograr esto es preciso en primera instancia caracterizar el patrón de expresión del factor NeuroD1 en la glándula pineal de rata. Estudios de ganancia y pérdida de la actividad del NeuroD1 serán llevados a cabo en pinealocitos adultos a fin de dilucidar el rol del mismo en el proceso de síntesis y secreción de melatonina.

3- ACTIVIDADES Y METODOLOGÍAS

La hipótesis de trabajo será investigada por medio de las siguientes estrategias:

Objetivo Específico 1: Caracterizar el patrón de expresión del factor NeuroD1 en la glándula pineal de rata.

Para determinar si NeuroD1 modula la expresión de genes específicos de la glándula pineal, debido a la naturaleza circadiana de la misma, necesitamos conocer el perfil diario tanto del ARNm como de la proteína. Estudios previos mostraron que no hay diferencias significativas en los niveles del ARNm entre el medio día y la media noche (Muñoz y cols., 2007). Esto no descarta un ritmo diario del mensajero y/o la proteína, por lo tanto se requiere de una caracterización más fina del patrón de expresión del NeuroD1 a lo largo del día. Glándulas pineales de ratas adultas mantenidas bajo un ciclo controlado de luz-oscuridad (L-D 14:10) serán colectadas cada 3-4 horas. Como controles positivos serán utilizados cortes de cerebelo y retina, ya que estos tejidos expresan altos niveles de NeuroD1, mientras la corteza cerebral adulta será uno de los controles negativos. Los niveles del factor serán analizados en triplicados de tres sets de muestras independientes usando real-time PCR (en su defecto Northern Blot-ver Factibilidad), hibridación *in situ* y

Western Blot. Se llevarán a cabo, además estudios inmunohistoquímicos con y sin fluorocromos. Los últimos a los fines de co-localizar el NeuroD1 con marcadores específicos de la glándula y marcadores subcelulares. En los estudios del ARNm de NeuroD1, se utilizarán como controles internos β -actina, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y la proteína ribosomal RPL32. Es importante destacar que en el laboratorio de la Dra. Muñoz disponemos de cinco anticuerpos anti-NeuroD1, tres de ellos comerciales y los dos restantes generados en colaboración con el laboratorio del Dr. Klein (NIH, USA). Actina e histona-3-fosfato, entre otros, servirán como controles en los estudios de la proteína. Estos últimos se llevaran a cabo en homogenatos totales, y fracción citoplásmica y nuclear. Se realizará un análisis de las potenciales modificaciones post-traduccionales de NeuroD1 a lo largo del día, para esto se cuenta con un anti-fosfoS336-NeuroD1. En el caso de disponer en el futuro de un anticuerpo comercial adecuado, se incluirá en nuestros estudios. Para determinar si las diferencias son significativas (probabilidad menor que 0.05) serán utilizados análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test de comparación múltiple de Tukey. De comprobar la existencia de variaciones diarias tanto en el ARNm como en la proteína, se procederá a investigar las características circadianas, repitiendo los estudios anteriores en condiciones de oscuridad permanente y bajo disrupción del sistema circadiano por remoción de los ganglios cervicales superiores, que inervan a la glándula pineal.

Con lo anterior esperamos definir si NeuroD1 exhibe un ritmo circadiano en los niveles de ARNm y/o proteína, como así también indagar sobre las modificaciones post-traduccionales del factor de transcripción en la glándula pineal de rata.

Objetivo Específico 2: Dilucidar el rol del NeuroD1 en la síntesis y secreción de la melatonina.

Para analizar la probable relación entre NeuroD1 y la cascada de eventos responsables de la producción rítmica de la melatonina, se evaluarán *in vitro* tanto la síntesis como la secreción de la hormona en diferentes condiciones experimentales. El estudio del patrón génico en la glándula pineal de animales NeuroD1 KO recién nacidos, vía microarray y RT-PCR cuantitativa, reveló la caída leve pero estadísticamente significativa de la AA-NAT (arilalquilamina N-acetiltransferasa), enzima limitante en la biosíntesis de indol, precursor de la melatonina (Muñoz y col., 2007). Para conocer si el factor actúa como modulador de la misma, se recurrirá al cultivo primario de pinealocitos, los cuales serán aislados de glándulas provenientes de ratas adultas, mediante el uso de la enzima papaína y cultivadas de acuerdo a un protocolo estándar (Gaildard y cols., 2005). Posteriormente, se mimificará la estimulación nocturna de la glándula mediante el empleo de noradrenalina y análogos (agonistas y antagonistas) para estudiar la síntesis y secreción de melatonina en ausencia o sobreexpresión del NeuroD1. Los mismos análisis se realizarán sobre HIOMT (hidroxindol O-metil transferasa), otra enzima participante en la síntesis de la hormona. Además, tanto los niveles de ARNm y proteína de las dos enzimas citadas serán determinados, utilizando las metodologías explicadas anteriormente, adicionando ensayos radiométricos de RIA y HPLC para los análisis de actividad enzimática pertinentes.

Los niveles de NeuroD1 serán bloqueados mediante el uso de una estrategia molecular conocida como ***interferencia del ARN (iRNA)***. Esta ha sido elegida luego de verificar que los animales knock-out (KO) para NeuroD1 generados, no sobreviven más de 3-5 días después del nacimiento (Naya y cols., 1997; Muñoz y cols., 2007), esto impide

evaluar *in vivo*, la influencia del factor en animales adultos. Se cuenta con dos *shARN* (*short hairpin RNA*) diferentes, que son secuencias específicas y verificadas de ARNm de NeuroD1, las cuales serán expresadas usando partículas adenovirales, que contienen un promotor U6. Como control negativo se utilizarán virus que expresan un shARN para laminina. La efectividad del ensayo será determinada tanto por los niveles de ARNm como de proteína, utilizando análisis de Northern Blot y/o RT-PCR, Western Blot e IHC.

En el caso de que los parámetros mencionados sean afectados por la ausencia del factor, experimentos de sobreexpresión de NeuroD1 serán llevados a cabo con el fin de demostrar la especificidad de la respuesta, es decir que si este es responsable de los cambios observados, los mismos deberían ser revertidos luego de su sobreexpresión. Este ensayo se llevará a cabo utilizando partículas virales que expresen la proteína de fusión NeuroD1-GFP (green fluorescence protein). Dichas partículas serán generadas a partir de un clon existente en nuestro laboratorio. Será realizado el análisis estadístico de los resultados expresados como media \pm ESM para establecer si las diferencias en los diversos parámetros a medir son significativas; ANOVA seguido del test de Neuman-Kuels, y el test de Student's se aplicarán según corresponda. Valores de *P* menores a 0.05 serán considerados significativos.

Finalizado este objetivo, esperamos conocer si NeuroD1 ejerce efectos en el proceso de síntesis de la hormona melatonina, mediante la regulación de genes claves como son los que codifican para las enzimas AA-NAT Y HIOMT.

4- FACTIBILIDAD

Es importante destacar que el Instituto de Histología y Embriología de Mendoza, lugar físico donde opera el laboratorio de la Dra. Estela Muñoz, cuenta con toda la infraestructura y equipamiento para desarrollar las actividades planificadas. En la actualidad trabajamos en colaboración con el laboratorio del Dr. David Klein (NIH, USA) (Ver: <http://eclipse.nichd.nih.gov/nichd/ldn/SNE/Collaborators/collaborators.htm>), lo cual posibilita la disponibilidad de los anticuerpos y partículas virales mencionadas anteriormente. Estos reactivos fueron generados por Muñoz durante sus visitas anuales al mencionado laboratorio. La Dra. Muñoz es co-directora de un proyecto de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2006-00451). Además, esta línea de trabajo esta incluida dentro del PME 2006-00306; "Consolidación de una red en Biología Celular para la resolución de problemas de la salud animal y humana", bajo la dirección de la Dra. Marisa Colombo. A través del mismo se procedió a la compra de un equipo de real time PCR, que estará en funcionamiento antes de finalizar el corriente año.

El IHEM, por otra parte, cuenta con los microscopios Nikon TE 2000 invertido, Nikon E600 Confocal y Olympus FV 1000 Confocal, los cuales serán de utilidad en el análisis de los ensayos de IHC a desarrollar. Para la ejecución de la segunda parte del proyecto, que incluye el cultivo de pinealocitos, nuestro Instituto cuenta con una sala de cultivo completamente equipada para tal fin. Además, los estudios de RIA pertinentes para la medición de actividad enzimática se realizarán en el contador de centelleo líquido Pharmacia, WALLAC, 1214 RACKBETA, y en los equipos de HPLC y FPLC con los que cuenta dicho establecimiento.

Los equipos pequeños y de rutina para las investigaciones básicas se encuentran en el laboratorio de la Dra. Muñoz.

5- DESARROLLO DE PLAN DE TESIS

Para llevar a cabo el *objetivo específico 1* se estima que se necesitará un tiempo mínimo de dos años, durante los cuales también se realizarán parte de los cursos de postgrados requeridos por el reglamento de la Carrera. En el mismo periodo se presentarán los resultados a obtener en congresos específicos, tanto nacionales como internacionales, a ser definidos en un futuro.

Para completar la segunda parte del Plan, el *objetivo específico 2*, se requerirá un periodo aproximado de dos años adicionales. Durante este lapso, se hará énfasis en la publicación de los trabajos realizados en revistas con referato, como también en la culminación de la realización de los cursos de postgrado pertinentes.

Un último año será requerido para la redacción del escrito de la Tesis de Doctorado como así también para las correcciones oportunas sobre la misma.

En resumen, para la realización del presente Plan de Tesis se estima una duración total de cinco años calendario.

Es importante destacar que la Licenciada Analía Castro Zapata forma parte del plantel de becarios de CONICET, siendo éste su primer año en la categoría Postgrado Tipo I.

Por otro lado, un proyecto directamente relacionado con la temática propuesta y con la Dra. Muñoz como directora se encuentra en evaluación por parte de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

REFERENCIAS

Gaildrat P, Møller M, Mukda S, Humphries A, Carter DA, Ganapathy V and Klein DC (2005) A novel pineal-specific product of the oligopeptide transporter PepT1 gene: circadian expression mediated by cAMP activation of an intronic promoter. *J. Biol. Chem.* 280: 16851-16860,

Klein DC, Moore RY and Reppert SM (1991) *Suprachiasmatic Nucleus: the Mind's Clock.* Oxford University Press, Inc.

Klein DC, Coon SL, Krzysztow M, Bernard M, Roseboom PH and Rodríguez IR (1998). *Biological Rhythms and Psychiatric Disease: Focus on Melatonin-Related Genes.* In: *Genetics and Psychiatric Disorders* J. Wahlstrom (ed) Pergamon: 289-300.

Klein DC (2000) Serotonin N-Acetyltransferase: a Personal Historical Perspective. In: *Melatonin after Four Decades.* J. Olcese (ed) Plenum Publishing Corp, New York: 5-16.

Klein DC (2004) The 2004 Aschoff/Pittendrigh lecture: Theory of the origin of the pineal gland: a tale of conflict and resolution. *J Biol Rhythms* 19:264-279.

Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N and Weintraub H (1995) Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268: 836-844.

Magnusson A and Boivin D (2003) Seasonal Affective Disorder: an Overview. *Chronobiol Int* 20(2):189-207.

Manji HK and Lenox RH (2000) The Nature of Bipolar Disorder. *J Clin Psychiatry* 61(13):42-57.

Muñoz EM, Bailey MJ, Rath MF, Shi Q, Morin F, Coon S, Moller M and Klein D (2007) NeuroD1: developmental expression and regulated genes in the rodent pineal gland. *J Neurochem* 102(3):887-899.

Naya FJ, Stellrecht CM and Tsai MJ (1995) Tissue-Specific Regulation of the Insulin Gene by a Novel Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor. *Genes Dev* 9(8):1009-1019.

Naya FJ, Huang h., Qiu Y., Mutoh H, DeMayo FJ., Leiter AB., and Tsai MJ (1997) Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA27neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11, 2323-2334.

Reid KJ and Zee PC (2004) Circadian Rhythm Disorders. *Semin Neurol* 24(3): 3153-25.

Roenneberg T and Merrow M (2003) The Network of Time: Understanding the Molecular Circadian System. *Curr Biol* 13(5):R198-207.

Yesavage JA, Friedman L, Ancoli-Israel S, Bliwise D, Singer C, Vitiello MV, Monjan AA and Lebowitz B (2003) Development of Diagnostic Criteria for Defining Sleep Disturbance in Alzheimer's Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 16(3):131-139.